



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MORELOS



FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

FACULTAD
DE CIENCIAS
BIOLÓGICAS

**EVALUACION DE LA INMUNIDAD ACTIVA INDUCIDA POR OMPS DE
Klebsiella pneumoniae EN UN MODELO MURINO**

**TESIS PROFESIONAL POR ETAPAS
QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:
B I Ó L O G A
P R E S E N T A:
ALONDRA YARELI MARTÍNEZ MORA**

**DIRECTOR DE TESIS:
DRA. HILDA MINERVA GONZÁLEZ SÁNCHEZ**

CUERNAVACA, MORELOS

Diciembre, 2022

Comité Tutelar

Dra. María Luisa del Carmen Garduño Ramírez

Presidente

Secretario M. en C. Luis Enrique Cruz Trujillo

1er. Vocal Dra. Hilda Minerva González Sánchez

2do. Vocal Dra. Nayeli Monterrosas Brisson

3er. Vocal Dr. Juan Mauricio Téllez Sosa

AGRADECIMIENTOS

Me siento afortunada de haber terminado esta etapa que fue la universidad, así como esta tesis que fue escrita entre emociones de ansiedad y estrés en medio de una pandemia, pero siempre con el entusiasmo de seguir aprendiendo.

Quiero agradecer a mi papá y a mi mamá que siempre han trabajado para darme lo necesario y seguir estudiando, a **mis hermanas** por el apoyo incondicional que siempre me han dado, por sus consejos y motivación de mi hermana Eli, sin ellos esto no hubiese sido posible.

A la **Dra Hilda** por haberme aceptado como su alumna en el laboratorio, siempre dispuesta a enseñarme desde cero, agradecerle por su paciencia, su tiempo, sus enseñanzas, por motivarme a seguir aprendiendo. Y sobre TODO por el apoyo que siempre me ha brindado y que me sigue dando. La quiero mucho.

Al Dr Juan y al Dr Humberto, por su paciencia y compartir sus conocimientos conmigo para ayudarme a mejorar.

Le agradezco a **mi mejor Amix**, por siempre tratar de entender y comprenderme, por sus consejos y su paciencia para escucharme. Por casa una de las aventuras vividas y hacer más amena mi estancia durante los 4 años de la Uni y seguir conmigo.

ÍNDICE

I.	RESUMEN	1
II.	INTRODUCCION	
	1. Enfermedades infecciosas bacterianas y la multiresistencia a antimicrobianos	2
	2. Clasificación y mecanismo de acción de los antibióticos	4
	3. Mecanismos de resistencia a los antibióticos	7
	4. <i>Klebsiella pneumoniae</i>	9
	5. Alternativas terapéuticas contra bacterias multiresistentes	15
III.	MARCO TEÓRICO	
	1. Inmunoterapia para infecciones por bacterias multiresistentes	17
	2. Vacunología reversa.....	22
IV.	ANTECEDENTES	24
V.	JUSTIFICACIÓN	26
VI.	HIPÓTESIS	27
VII.	OBJETIVO GENERAL	27
VIII.	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	27
IX.	METODOLOGÍA	
	Objetivo 1. Producir y purificar las proteínas recombinantes OMP40, OMP61 y OMP70 de <i>K. pneumoniae</i>	28
	Objetivo 2. Analizar la seroconversión de ratones inmunizados con antígenos de <i>K. pneumoniae</i>	34
	Objetivo 3. Determinar la sobrevivencia de los ratones inmunizados desafiados contra el reto letal de <i>K. pneumoniae</i>	36
X.	RESULTADOS	38
XI.	DISCUSIÓN	53
XII.	CONCLUSIONES	59
XIII.	PERFECTIVAS	60
XIV.	REFERENCIAS	61

RESUMEN

El uso común e indiscriminado de antibióticos, automedicación y exposición a infecciones intrahospitalarias ha provocado la aparición de bacterias que son resistentes a antibióticos. Entre estos patógenos, *Klebsiella pneumoniae*, responsable de la mayoría de las infecciones en vías urinarias adquiridas en hospitales, tienen gran importancia dado al surgimiento de cepas resistentes a carbapenémicos y que pueden propagar sus genes de resistencia a otras especies bacterianas relacionadas. Ante la amenaza constante de la disminución efectiva de los antibióticos, se encuentran en desarrollo una variedad de tratamientos alternativos, así como vacunas que puede ayudar a prevenir infecciones bacterianas reduciendo la necesidad de antibióticos. Previamente, en nuestro laboratorio se empleó un enfoque de vacunología reversa para identificar antígenos blanco candidatos, que correspondieron a proteínas de membrana externa (OMP) que serán utilizados para evaluar su potencial profiláctico contra *K. pneumoniae*. El objetivo general de este proyecto es evaluar la capacidad protectora de OMP40, OMP61 y OMP70 de *K. pneumoniae* en ratones Balb/c frente a un reto letal. Para ello, se produjeron de manera recombinante las OMPs a partir de cultivos de cepas BL21-A1 de *E. coli* que contienen regiones de los genes codificantes clonados en el vector de expresión pIVEX2.4b. La producción de las OMPs se evaluó en geles de poliacrilamida y se purificaron mediante cromatografía de afinidad en condiciones nativas (OMP61 y OMP70) o en condiciones híbridas (OMP40). Se evaluó la pureza de las proteínas purificadas por SDS-PAGE, se dializaron en PBS y se cuantificaron con un ensayo de ácido bicinonínico. Se emplearon las OMPs en combinación para inmunizar a grupos de 6 ratones Balb/c vía subcutánea y a los 10 y 20 días posteriores vía intraperitoneal. Se verificó la seropositividad de los ratones inmunizados por medio de ELISA, previo a la administración de una dosis letal de *K. pneumoniae* ATCC 700603 (1×10^8 UFC) vía intraperitoneal. Los resultados mostraron que a pesar de que los ratones generaron anticuerpos contra las OMPs, éstos no fueron capaces de brindar protección contra la infección y los ratones murieron.

INTRODUCCIÓN

1. Enfermedades infecciosas bacterianas y la multirresistencia a antimicrobianos

Las enfermedades infecciosas son causadas por microorganismos patógenos como bacterias, virus, parásitos y hongos. A principios del siglo XX, las enfermedades por estos patógenos representaban la principal causa de muerte a nivel global (Alós et al 2015). Gracias a los avances científicos y tecnológicos se logró reducir su incidencia mediante la generación de vacunas y nuevos fármacos. Sin embargo, estas enfermedades aún representan un importante problema de salud que tiene un gran impacto sobre todo en países con recursos limitados. En particular, las infecciones bacterianas tienen un gran impacto sobre la salud pública, ya que, a pesar de la existencia de un amplio arsenal de agentes antimicrobianos, desafortunadamente su uso indiscriminado ha llevado al surgimiento de cepas resistentes que pueden causar consecuencias devastadoras.

El uso de los antibióticos en el año 1940 fue uno de los principales avances con gran impacto en la sociedad. Antes de que se descubriera la penicilina en 1928, las infecciones bacterianas como meningitis y neumonía eran la principal causa de muerte (Alós , 2015). Gracias a los antibióticos, se pudieron hacer intervenciones importantes para el control de enfermedades y hubo un aumento de varios años en la esperanza de vida de la población, salvando millones de vidas (Alós, 2015). Además, no solo se obtuvo un beneficio directo, curando infecciones que pudiesen ser mortales, sino también se obtuvo un beneficio indirecto en las más exitosas técnicas terapéuticas como las cirugías, trasplantes o quimioterapias, éstas no podrían ocurrir de manera exitosa sin una cobertura antibiótica adecuada (Oteo Iglesias, 2019). Sin embargo, en los últimos años existe una amenaza creciente debido a la resistencia bacteriana a antibióticos, la cual podemos entender como la capacidad que tiene una bacteria para sobrevivir en concentraciones de un antibiótico que inhiben o matan a otras bacterias de la misma especie. El uso masivo de los antibióticos ha causado a nivel mundial un aumento importante en la resistencia a antibióticos (Alós, 2015).

Las bacterias resistentes a antibióticos son la principal causa de infecciones nosocomiales (IN), representado alrededor de un 70% en los pacientes de unidades de cuidados intensivos (Agaba, 2017). Reportes realizados por la Red Hospitalaria de Vigilancia Epidemiológica (RHOVE) de la Secretaría de Salud indican que en México las IN más frecuentes son bacteriemias (23%), neumonía (20%), infección de vías urinarias (15.9%), infección de herida quirúrgica (15.4%) y otras (25.4%) (Gutiérrez et al., 2017). Entre las especies patógenas más frecuentes que causan IN está el grupo denominado con el acrónimo ESKAPE que comprende los nombres de seis especies de bacterias patógenas altamente virulentas y resistentes a antibióticos: *Enterococcus faecium*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa* y especies de *Enterobacter spp* (Mulani, 2019).

La Asamblea Mundial de la Salud aprobó en mayo del 2015 un plan de acción mundial sobre la resistencia a los antimicrobianos, con la finalidad de asegurar que se pueda seguir previniendo y tratando enfermedades infecciosas por medio de fármacos eficaces y seguros (OMS, 2017). En el año 2017, la Organización Mundial de la Salud (OMS) publicó una lista con los principales patógenos que son resistentes a antibióticos y que representan una amenaza a nivel mundial para la salud pública, esta lista se divide en tres categorías: prioridad crítica, alta o media. A continuación, se enlistan los patógenos para los cuales se requiere el desarrollo de nuevos antibióticos o alternativas terapéuticas según su prioridad, propuesta por la OMS:

Prioridad Crítica

- *Acinetobacter baumannii*, resistente a carbapenémicos.
- *Pseudomonas aeruginosa*, resistente a carbapenémicos.
- *Enterobacteriaceae*, resistente a carbapenémicos, productoras de β -lactamasas de espectro extendido (BLEE).

Prioridad Elevada

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

Prioridad Media

- *Streptococcus pneumoniae*, sin sensibilidad a la penicilina.
- *Haemophilus influenzae*, resistente a la ampicilina.
- *Shigella spp.*, resistentes a las fluoroquinolonas.

2. Clasificación y mecanismos de acción de los antibióticos

La aparición de la resistencia a los antibióticos es un problema importante en el tratamiento de infecciones microbianas tanto en hospitales como en la comunidad. Para comprender los mecanismos de resistencia bacteriana es importante conocer cómo se clasifican y cuáles son los mecanismos de acción de los antibióticos (**Figura 1**). Los antibióticos pueden agruparse en diferentes clases dependiendo de su estructura y mecanismos de acción antibacteriana:

Síntesis de pared celular

- **Beta-lactámicos**: Son un grupo de antibióticos que constituye la familia más numerosa de antimicrobianos, se caracteriza por la presencia en su estructura de un anillo beta-lactámico. Actúan inhibiendo la última etapa de la síntesis de la pared celular bacteriana. A lo largo de los años se han ido ampliando gracias a la incorporación de nuevas moléculas que tiene una mayor acción frente a bacilos Gramnegativos (Sejia & Vignoli, 2006). Los antibióticos beta-lactámicos se pueden

diferenciar en los siguientes grupos: penicilinas, cefalosporinas, carbapenémicos, monobactámicos e inhibidores de las beta-lactamasas (Suárez & Gudiol, 2009).

- ✓ Penicilinas: bencilpenicilinas, aminopenicilinas, ureidopenicilinas.
 - ✓ Cefalosporinas:
 - 1ª generación: cefazolina, cefalexina
 - 2ª generación: cefaxotidina, cefacior, cefonicida
 - 3ª generación: cefotaxima, ceftriaxona,
 - 4ª generación: cefepima
 - 5ª generación: ceftarolina, ceftobiprol
 - ✓ Monobactámicos: aztreonam
 - ✓ Carbapenémicos: imipenem, meropenem, ertapenem
 - ✓ Inhibidores de beta-lactamasas: Sulbactam, ácido clavulánico, tazobactam
- Glicopéptidos: Son antibióticos que actúan sobre la pared bacteriana, inhibiendo la síntesis y ensamblado de la segunda etapa del peptidoglicano de la pared celular. Causa daño a los protoplastos alterando la permeabilidad de la membrana citoplasmática y altera la síntesis de ARN (Seija & Vignoli, 2006).
 - ✓ Vancomicina
 - ✓ Teicoplanina
 - ✓ Dalvabancina
 - Fosfomicina: Es un antibiótico que actúa en uno de los primeros pasos de la síntesis del peptidoglicano, inhibe la enzima piruviltransferasa, tomando el lugar del fosfoenolpiruvato. De esta manera ya no hay reacción para sintetizar el peptidoglicano (Calvo & Martínez, 2008).

Síntesis de proteínas

Actúan sobre la subunidad 30S del ribosoma:

- Aminoglucósidos: Son antibióticos activos en la mayoría de las especies de *Enterobacteriaceae* y *Pseudomonadaceae*. Estos aminoglucósidos se unen a la subunidad 30S del ribosoma, interfiriendo a nivel de la traducción del ARN y el consiguiente bloqueo de la síntesis proteica (Seija & Vignoli, 2006).

- ✓ Kanamicina
- ✓ Amikacina
- ✓ Estreptomicina
- ✓ Gentamicina
- ✓ Paramomicina
- Tetraciclinas: Son antibióticos bacteriostáticos.
 - ✓ Tetraciclina
 - ✓ Oxitetraciclina
 - ✓ Doxiclina

Otros antibióticos actúan en la región 50S del ribosoma como:

- Cloranfenicol.
- Lincosamidas: Clindamisisina, lincomicina.
- Macrólidos: Eritromicina, azitromicina, claritromicina.

Síntesis de ácidos nucleicos

- Quinolonas: Son antibióticos bactericidas e inhiben la ADN girasa, enzima que cataliza el superenrollamiento del ADN cromosómico, que asegura una adecuada división celular. Se clasifican en diferentes generaciones:
 - ✓ Primera generación (ácido nalidíxico y ácidos pipemídico): Tienen actividad sobre enterobacterias, son inactivas sobre Grampositivos y anaerobios.
 - ✓ Segunda generación (norfloxacina y ciprofloxacina): También llamadas fluoradas por incorporar un átomo de flúor y presenta gran actividad sobre Gramnegativos.
 - ✓ Tercera generación (levofloxacina, gatitofloxacina): Tienen una menor actividad sobre Gramnegativos y mejoran su actividad sobre Grampositivos.
 - ✓ Cuarta generación (moxifloxacina, trovafloxacina): Retienen su actividad sobre Gramnegativos y la aumentan en Grampositivos, agregando actividad sobre microorganismos anaerobios (Seija & Vignoli, 2006).

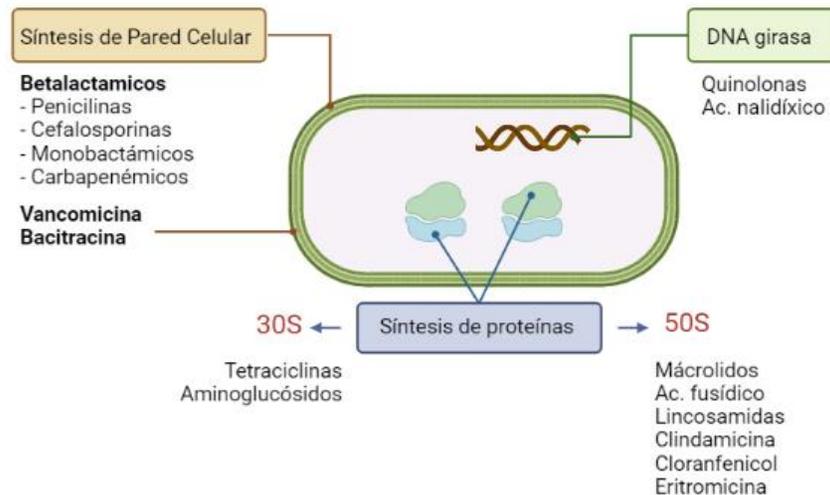


Figura 1. Mecanismo de acción de los antibióticos. Los antibióticos actúan en diferentes estructuras y de diferentes formas de la bacteria como: inhibiendo la síntesis de proteínas, de la pared celular o la actividad del ADN.

3. Mecanismos de resistencia a los antibióticos

Los diferentes tipos de antibióticos han sido rebasados por los patógenos, mientras que se han desarrollado nuevos antimicrobianos, éstos corren el mismo riesgo de generar cepas resistentes, provocando un problema de salud que está en constante evolución. Se considera que la resistencia bacteriana tiene una base genética natural y una adquirida. En el caso de la resistencia natural, todas las bacterias de la misma especie son resistentes a algunas familias de antibióticos, siendo un mecanismo permanente, determinado genéticamente y sin correlación con la dosis de antibiótico. Un ejemplo es la resistencia que presenta *Klebsiella pneumoniae* que por producción natural de β -lactamasas es resistente a las penicilinas (ampicilina y amoxicilina) (Pérez & Robles, 2013). La resistencia adquirida es una característica particular de una especie que presenta sensibilidad a un antibiótico pero que ha adquirido su resistencia al ser modificada genéticamente, ya sea por mutación o por la adquisición de elementos genéticos móviles que contiene genes de resistencia (plásmidos, transposones e integrones). De manera particular los antibióticos que han sido afectados por este mecanismo son los β -lactámicos, aminoglicósidos, tetraciclinas, cloranfenicol y sulfamidas

(Pérez & Robles, 2013). Sea natural o adquirida, la resistencia a los antibióticos puede ocurrir por diferentes mecanismos:

1. **Modificación enzimática del antibiótico:** Las bacterias expresan enzimas que tienen la capacidad de crear cambios en la estructura del antibiótico, lo que hace que éste pierda su funcionalidad. En el caso de las β -lactamasas, son proteínas que tiene la capacidad de hidrolizar el anillo β -lactámico que poseen los antibióticos de esta familia (Tafur et al., 2008).
2. **Bombas de expulsión:** Funcionan tomando el antibiótico del espacio periplásmico y expulsándolo al exterior, esto evita que llegue al sitio de acción. Este es un mecanismo que se usa frecuentemente en bacterias Gramnegativas (Tafur et al., 2008).
3. **Modificación de la molécula diana:** Los cambios en el sitio diana son el resultado de la mutación de un gen bacteriano en el cromosoma, la interacción del antibiótico con la molécula diana es comúnmente específica y tiene diferentes alteraciones (Kapoor et al., 2017).
 - Alteración en la subunidad 30S o 50S del ribosoma que induce la resistencia a antibióticos que afectan la síntesis de proteínas.
 - Alteración de proteínas de unión a penicilina (PBP): La modificación de PBP es un mecanismo común en bacterias Gram positivas, y la producción de β -lactamasas es un mecanismo para el desarrollo de resistencia en bacterias Gramnegativas.
 - La ADN girasa mutada y la topoisomerasa IV producen resistencia a quinolonas, el mecanismo de resistencia implica la modificación de estas enzimas.
4. **Cambios en la permeabilidad de la membrana externa:** Las bacterias tienen la capacidad de generar cambios en la capa lipídica, los cambios en porinas hacen

que se vea alterada la permeabilidad de la membrana. Las porinas son proteínas que forman canales en la membrana externa que regulan la entrada de algunos elementos e incluso de los antibióticos (Tafur et al., 2008).

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 (Rodríguez et al, 2014). Por ello, se crearon diferentes términos para identificar el grado de susceptibilidad que presentan los microorganismos a los antibióticos. El término multirresistencia (MDR) se definió como la ausencia de sensibilidad al menos de un antibiótico de tres o más familias de antimicrobianos, la resistencia extensa (XDR) se definió como la ausencia de sensibilidad al menos un antibiótico de todas las familias excepto una o dos y la pan resistencia (PDR) se definió como la no susceptibilidad a todos los agentes en todas las categorías de antimicrobianos (Magiorakos et al., 2012). Entre los diversos patógenos que han desarrollado resistencia a múltiples fármacos, encontramos a *Klebsiella pneumoniae*, una enterobacteria que ha clasificado la OMS con prioridad crítica, para la cual se requieren nuevos antibióticos o alternativas terapéuticas.

4. *Klebsiella pneumoniae*

4.1. Características generales

Fue descrita por primera vez por Carl Friedländer en 1882 como una bacteria aislada de los pulmones de pacientes que habían muerto de neumonía. En la clasificación establecida por Orskov en 1984, clasifica el género *Klebsiella* en 5 especies basándose en características fenotípicas y bioquímicas: *K. pneumoniae*, *K. oxytoca*, *K. terrigena*, *K. ornithinolytica* y *K. planticola*. Asimismo, la especie *K. pneumoniae*, se dividió en tres subespecies: *K. pneumoniae subsp. pneumoniae*, *K. pneumoniae subsp. ozaenae* y *K. pneumoniae subsp. rhinoscleromatis* (Cubero, 2015).

K. pneumoniae pertenece a las bacterias Gramnegativas de la familia Enterobacteriaceae. Es un bacilo inmóvil, oxidasa negativa y catalasa positiva, tiene una

cápsula compuesta por polisacáridos que es importante para la determinación de su patogenicidad, puede cultivarse en medios de cultivo sencillos como agar sangre, en condiciones óptimas de crecimiento de 37°C y pH 7. Son bacterias anaerobias facultativas, es decir, que pueden crecer en presencia o ausencia de oxígeno, fermentan lactosa y reducen el nitrato a nitrito, y fijan nitrógeno (Cubero, 2015). Tiene como hábitat las aguas residuales, el suelo, las plantas y es un patógeno oportunista en humanos y otros animales colonizando las mucosas de los mamíferos (Cubero, 2015). *K. pneumoniae* causa IN potencialmente mortales como neumonía, infecciones del tracto urinario (ITU), infecciones del torrente sanguíneo y sepsis. Actualmente, esta bacteria ha ganado atención debido al aumento del número de infecciones que causa y al crecimiento de la presencia de cepas multirresistentes (Bengoechea & Pessoa, 2019). Las infecciones por *K. pneumoniae* presentan tasas de morbilidad y mortalidad variables, los factores de riesgo que favorecen estas infecciones son la inmunodepresión de los pacientes, la edad, la realización de procedimiento invasivos como el uso de catéteres, uso de agentes antimicrobianos y la vulnerabilidad frente a microorganismos multirresistentes (Cubero, 2015).

K. pneumoniae emplea factores de virulencia que usa como estrategia para crecer y evitar la respuesta inmune del huésped. Entre estos factores de virulencia se encuentran la cápsula, lipopolisacáridos (LPS), sideróforos, fimbrias (también llamadas pili) y proteínas de membrana externa (Paczosa & Meccas, 2016).

- Cápsula: Está formada por polisacáridos capsulares que recubren a la célula, tiene funciones como la prevenir la fagocitosis de las bacterias por parte de las células inmunes, dificulta la acción bactericida de péptidos antimicrobianos y bloquea la interacción de los componentes del complemento evitando la lisis y opsonización (Paczosa & Meccas, 2016).
- LPS: Forman parte de la membrana y se compone de un antígeno O, un oligosacárido central y un lípido A. El lípido A se inserta en la membrana

bacteriana siendo un activador potencial de la inflamación y protege contra la acción bactericida de péptidos antimicrobianos. El antígeno O es la subunidad más externa de LPS, tiene una función importante como la protección contra el complemento y evitar la lisis bacteriana por el complejo de ataque de la membrana del complemento (Paczosa & Mecsas, 2016).

- Fimbrias de tipo 1 y 3, son las principales estructuras adhesivas unidas a membranas que se caracterizan por ser factores de patogenicidad. Las fimbrias tipo 1 contribuyen a las infecciones urinarias, con la formación de biofilm en la vejiga durante la infección. En el caso de las fimbrias tipo 3 también facilitan la producción de biofilm y unión de éste a dispositivos médicos (Paczosa & Mecsas, 2016).
- Sideróforos: La adquisición de hierro durante la infección se realiza a través de la secreción de sideróforos, al ser moléculas que poseen una mayor afinidad por el hierro de las proteínas de transporte en el huésped (Paczosa & Mecsas, 2016).

Proteínas de membrana externa (OMP's). Es un grupo amplio de proteínas poco caracterizadas que poseen dominios transmembranales, algunas de las éstas son importantes para la virulencia de *K. pneumoniae*, y el grupo incluye entre otras a porinas, bombas y transportadores. Algunas OMP's protegen a la bacteria contra el sistema inmune innato, como es en la protección contra la fagocitosis, muerte mediada por neutrófilos y resistencia contra péptidos antimicrobianos. Además, contribuyen a la integridad e impermeabilidad de la membrana celular bacteriana (Paczosa & Mecsas, 2016).

4.2. Multirresistencia a antibióticos

La aparición y propagación de *K. pneumoniae* multirresistente, específicamente las cepas productoras de β -lactamasas de espectro extendido (BLEE), confieren resistencia a penicilinas de espectro extendido, cefalosporinas y aztreonam, pero no cefamicinas o

carbapenémicos, y a menudo son responsables del fracaso del tratamiento con antibióticos en el ámbito hospitalario (Paterson, 2005; Bradford, 2001). Este tipo de resistencia generalmente se codifica en plásmidos que pueden transferirse fácilmente entre bacterias (Bradford, 2001). Los carbapenémicos se han utilizado para el tratamiento de infecciones Gramnegativas productoras de BLEE, incluida *K. pneumoniae*. Sin embargo, se han desarrollado mecanismos de resistencia a los carbapenémicos entre los aislados clínicos Gramnegativos en todo el mundo (Eftekhar & Naseh, 2015)

Las carbapenemasas son la familia más importante de las β -lactamasas con un amplio espectro sobre antimicrobianos β -lactámicos, entre ellos los carbapenémicos. La primer carbapenemasa que se identificó en enterobacterias fue SME-1 (por "*Serratia marcescens enzyme*") en Londres en 1982, y después en el año 1984 se describió la enzima IMI-1 (por "*imipenem-hydrolyzing β -lactamase*") en Estados Unidos de América (Vera et al., 2017). Estas enzimas están clasificadas en base a sus propiedades funcionales y moleculares, de la misma forma que otras β -lactamasas (Vera et al., 2017). Particularmente, las carbapenemasas de *K. pneumoniae* (KPC) son el principal mecanismo de resistencia de esta bacteria, se identificaron por primera vez en Estados Unidos, en el año de 1996 y se han ido extendiendo de manera internacional (Muñoz et al., 2013). Las KPC se han identificado en las principales especies de enterobacterias, extendiéndose por países y continentes, aunque la epidemiología exacta de su distribución varía según su ubicación geográfica (Muñoz et al., 2013). Es importante destacar que las enterobacterias productoras de carbapenemasas no solamente han sido aisladas en ambientes hospitalarios, sino también en otros ambientes como aguas residuales representando una amenaza por el potencial riesgo de diseminación de genes de resistencia (Vera et al., 2017).

En bacilos Gramnegativos, la mayoría de las cepas productoras de carbapenemasas corresponden a aislados clínicos de *K. pneumoniae* y *E. coli* y las carbapenemasas más

frecuentemente identificadas son enzimas del tipo KPC, NDM-1, IMP, VIM, OXA-48 y OXA-181 (Nordmann et al., 2012; Pitout et al., 2015).

En la publicación que emitió la OMS en el año 2017, se dieron a conocer los patógenos que representan una amenaza para la salud humana, destacándose en el grupo crítico las bacterias que son resistentes a los antimicrobianos carbapenémicos como lo son: *A. baumannii*, *P. aeruginosa* y enterobacterias productoras de BLEE resistentes a carbapenémicos (Vera et al., 2017). Los tipos de BLEE varían geográficamente, las primeras que aparecieron fueron CTX-1, SHV-2 y SHV-3, posteriormente se incluyeron TEM-4, SHV-2, CTX-M-9 y CTX-M-10 (Ahmad et al., 2012). Recientemente surgieron nuevas BLEE como TEM-110, SHV-11, SHV-12, CTX-M-14 y CTX-M-15 (Ahmad et al., 2012).

4.3. Epidemiología

Klebsiella pneumoniae es la causa más frecuente de IN del tracto respiratorio y segunda causa más común de bacteriemia por Gramnegativos e ITU. Junto con *E. coli*, son la principal causa de infecciones graves en recién nacidos y otros pacientes inmunodeprimidos. La tasa de mortalidad de bacteriemia y neumonía por *K. pneumoniae* puede superar el 50%, siendo este el patógeno de mayor importancia que es adquirido en un hospital, particularmente en las unidades de cuidados intensivos, unidades de cuidados intensivos de prematuros, así como en las salas médicas, pediátricas y quirúrgicas (Ahmad et al., 2012). Las infecciones causadas por bacterias productoras de KPC no muestran tropismo tisular, pero se han asociado con factores de riesgo como hospitalización prolongada, estadía en unidades de cuidados intensivos, inmunosupresión, uso de dispositivos médicos invasivos, uso de antibióticos y recepción de trasplantes (Vera et al., 2017).

En el año 2014. la OMS informó que las cepas de *K. pneumoniae* resistentes a carbapenémicos se han esparcido a nivel mundial y se han determinado regiones en donde se registran pocos aislados productores de KPC como Australia y África. En

regiones donde KPC se considera endémica como E.U.A., Puerto Rico, Colombia, Grecia, Israel y China existen alelos del gen codificante de KPC que han sido clasificados de manera secuencial como bla_{KPC-1} a bla_{KPC-24}. Las variantes KPC-2 y KPC-3 son las más comunes en aislados clínicos y responsables de brotes epidémicos, siendo KPC-2 la más predominante con brotes registrados en E.U.A., Europa y China, mientras que la enzima KPC-3 ha sido detectada principalmente en E.U.A., Israel y América Latina (Vera et al., 2017).

El primer reporte de KPC-2 fue realizado en Colombia en el año 2006, y en el año 2011 se informó sobre el primer reporte de un brote de KPC-3, convirtiéndose en un problema endémico del país. En Chile, los últimos años se ha reportado un aumento de la resistencia a carbapenémicos, especialmente en enterobacterias y en marzo del 2012 se registró el primer hallazgo de una cepa de *K. pneumoniae* productora de KPC aislada de un paciente proveniente de Italia. Asimismo en Brasil, Uruguay, Ecuador y Argentina también se ha reportado la presencia de KPC, (Vera et al., 2017). En México, durante 6 meses del año 2018 se realizó un estudio en el que participaron 47 laboratorios de varios estados del país, reportando datos sobre las tasas de resistencia a antibióticos de algunos patógenos en los que están incluidos *Enterobacter*, *K. pneumoniae* y *A. baumannii*, entre otros. Para este estudio se usaron muestras clínicas de orina, muestras respiratorias (aspirado traqueal/lavado bronquial), sangre y heces. Los autores reportaron a *K. pneumoniae* con un 12% de resistencia a carbapenémicos de manera similar con *Enterobacter*, se clasificaron a los patógenos como MDR, XDR y PDR. Se encontró además que *A. baumannii* presentó la tasa de MDR más alta del 53%, seguida de *K. pneumoniae* con 22.6% y *E. coli* con un 19.4%. Por ello, el gobierno de México dio a conocer un acuerdo de la obligatoriedad que se tiene de la Estrategia Nacional de Acción contra la Resistencia a los Antimicrobianos (Garza González et al., 2019).

5. Alternativas terapéuticas contra bacterias multirresistentes

La efectividad de los antibióticos ha disminuido cada año contra bacterias multirresistentes incluyendo *K. pneumoniae*. Dada la necesidad de nuevos enfoques terapéuticos se encuentran en desarrollo una variedad de tratamientos alternativos

contra estos patógenos entre los que se incluyen nuevos antibióticos, terapia con bacteriófagos, péptidos antimicrobianos, terapia fotodinámica y anticuerpos monoclonales (mAbs) contra bacterias (Mulani et al., 2019).

En la mayoría de estos nuevos enfoques terapéuticos que han llegado a pruebas clínicas se destaca el uso de mAbs o fragmentos de anticuerpos dirigidos a epítomos que se encuentran expuestos en la superficie celular, estos se pueden administrar de forma pasiva o producirse de manera directa en el paciente mediante vacunación (Patti, 2004). Recientemente, ha incrementado el interés de utilizar mAbs para tratar infecciones bacterianas, ya que éstos presentan varias ventajas frente a otros tratamientos, entre ellas que son altamente específicos y no generan resistencia, son capaces de activar mecanismos que llevan a cabo la eliminación del patógeno y no generan disbiosis (Téllez Sosa et al., 2020).

La terapia con bacteriófagos presenta como ventajas su alta especificidad, baja dosis requerida y su rápida proliferación, pero entre sus desventajas se encuentra que debido a su alta especificidad es necesario analizar *in vitro* su eficacia (Mulani et al., 2019). Además, la especificidad de los bacteriófagos ha sido beneficioso para su uso en la tipificación de bacterias patógenas, los bacteriófagos que se unen a bacterias son identificados fácilmente por anticuerpos marcados logrando una fácil detección y también al lisar una bacteria es posible el reconocimiento de la identidad de la bacteria que provoca la enfermedad (Segundo et al., 2010).

Los péptidos antimicrobianos se agrupan en 3 familias: defensinas, catelicidinas e histaminas. Destacando las defensinas por su amplio potencial terapéutico en enfermedades infecciosas, su efecto antimicrobiano se debe a la inhibición de la entrada del patógeno y su eliminación (Rivas Santiago et al., 2006). Generalmente, estos péptidos causan lisis al interactuar con la membrana celular de la bacteria. Se han aislado una gran variedad de péptidos antimicrobianos y se ha reportado su actividad antimicrobiana y antiinflamatoria. Sin embargo, pocos de estos péptidos han sido aprobados por su toxicidad, poca estabilidad en el cuerpo y pérdida de su actividad a bajas concentraciones en presencia de proteínas plasmáticas (Mahlpuu et al., 2016).

La terapia fotodinámica también ha sido considerada para el tratamiento en infecciones causadas por bacterias multirresistentes, ésta resulta en estrés oxidativo lo que lleva a muerte celular. Una de sus limitaciones es su aplicación, ya que es utilizada para tratamientos en la piel e infecciones de tejidos blandos (Mulani et al., 2019). Por otro lado, varias formulaciones de nanopartículas han demostrado su eficacia para la inhibición del crecimiento bacteriano en dispositivos médicos (Mulani et al., 2019).

Finalmente, las vacunas son reconocidas como instrumentos esenciales y altamente efectivas para combatir la resistencia a los antimicrobianos dada por bacterias multirresistentes. El uso profiláctico de vacunas ayuda a prevenir infecciones bacterianas, reduciendo la necesidad de antibióticos y minimizando la presión que pudiera conllevar a la aparición de cepas resistentes (Jansen et al., 2018). El desarrollo actual de vacunas está enfocado en bacterias con mayor resistencia a antibióticos como lo son las vacunas para prevenir infecciones causadas por *Enterobacteriaceae*, particularmente la bacteria *E. coli* se encuentran en etapas preclínicas o clínicas tempranas de desarrollo (Jansen et al., 2018).

MARCO TEÓRICO

1. Inmunoterapia en infecciones por bacterias multirresistentes

La inmunización es el resultado de una respuesta inmunitaria que se da al introducir un antígeno en el cuerpo, mientras que la inmunidad es la capacidad que tiene el organismo para combatir una infección que es provocada por un agente patógeno particular (Murphy et al., 2008). La inmunización puede ser activa o pasiva.

1.1 Inmunización pasiva

La inmunización pasiva se da mediante la transferencia de inmunidad por medio de anticuerpos purificados proporcionando una protección inmediata contra agentes patógenos. Aunque la protección se da de manera inmediata, es de corta duración mientras los anticuerpos se encuentran activos en el cuerpo, después estos anticuerpos se catabolizan (Murphy et al., 2008). En este tipo de inmunidad destaca que:

- Se confiere mediante la transferencia de anticuerpos específicos contra el antígeno.
- No se genera memoria inmunitaria.

Los mAbs son capaces de reconocer un solo epítipo, son producidos por un clon de linfocitos B y son empleados en terapia para el tratamiento de varias enfermedades formando la familia de fármacos denominados anticuerpos monoclonales terapéuticos. Debido a la especificidad que tienen son útiles para la eliminación del patógeno, como terapia en la detección de células específicas como las células tumorales e incluso la inhibición de procesos inflamatorios (Ruíz et al., 2007).

El primer mAb terapéutico fue aprobado por la FDA (Food and Drug Administration) en 1986 para el tratamiento del rechazo del trasplante de riñón. Actualmente se han desarrollado mAbs que ofrecen nuevas oportunidades para el tratamiento de infecciones bacterianas, enfocándose en la identificación de anticuerpos dirigidos contra endotoxinas o exotoxinas, ejerciendo su acción terapéutica de manera altamente selectiva, además de considerarse como un medicamento de bajo riesgo (Téllez Sosa et al., 2020). En el caso de las enfermedades infecciosas, la unión de los mAbs con sus moléculas diana

conlleva a la eliminación del patógeno a través de la opsonización, el impedimento estérico, la neutralización de toxinas, la aglutinación o precipitación del antígeno, la activación de sistema complemento y la citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (Abbas, 2017).

Los mAbs, específicamente los anticuerpos monoclonales humanos (Hu-mAbs) han sido importantes en los campos anticanceroso y autoinmune. Desde el años 2002 a 2016 más de 40 hu-mAbs han sido aprobados por la FDA como tratamiento de diferentes enfermedades. Un ejemplo es KB001-A, un mAb desarrollado para infecciones causadas por *Pseudomonas aeruginosa*, siendo un mAb seguro para pacientes humanos (Zurawski & McLendon, 2020). Actualmente se encuentran en desarrollo 14 hu-mAbs para patógenos bacterianos causantes de IN (**Tabla 1**).

Nombre	Especie bacteriana blanco	Compañía	Fase de desarrollo
AR301	<i>Staphylococcus aureus</i>	Aridis Pharmaceuticals	Fase 2 completa
			Fase 3 en desarrollo
MEDI4893	<i>Staphylococcus aureus</i>	Medimmune	Fase 2 completa
MEDI3902	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Medimmune	Fase 1 completa
			Fase 2 en desarrollo
AR101	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Aridis Pharmaceuticals	Fase 1 completa
			Fase 2 en desarrollo
514G3	<i>Staphylococcus aureus</i>	Xbiotech	Fase 2
ARN-100	<i>Staphylococcus aureus</i>	Arsansis	Fase 2 detenida
PolyCAb	<i>Clostridium difficile</i>	MicroPharm	Fase 1
RG7861	<i>Staphylococcus aureus</i>	Roche	Fase 1
TRL1068	Biofilm-multiple species	Trellis Bioscience	Preclínica
			Iniciando fase 1
AR401-mAb	<i>Acinetobacter baumannii</i>	Aridis Pharmaceuticals	Preclínica
VXD-003	<i>Acinetobacter baumannii</i>	VaxDyn	Preclínica
Cd-ISTAb	<i>Clostridium difficile</i>	Integrated BioTherapeutics	Preclínica
ASN-4	<i>Escherichia coli</i> (ST131)	Arsansis-Outlicensed to BB100	Preclínica
ASN-5	<i>K. pneumoniae</i>	Arsansis-Outlicensed to BB200	Preclínica

Tabla 1. Anticuerpos monoclonales que están siendo evaluados para el tratamiento de infecciones bacterianas (Tomado y modificado de Zurawski & McLendon, 2020)

Los mAb se desarrollan frecuentemente para enfermedades bacterianas en las que existen muy pocas o ninguna opción terapéutica como lo es en el caso de bacterias que son resistentes a múltiples fármacos, sin embargo, una de las principales desventajas son los altos costos de fabricación (Oleksiewicz et al., 2012).

1.2 Inmunización activa

La inmunización activa confiere inmunidad protectora y memoria inmunitaria, se puede adquirir con la infección natural por un microorganismo, o de manera artificial mediante la administración de una vacuna. Cuando se obtiene un buen resultado de la inmunización, la exposición subsecuente al agente patógeno genera una reacción inmunitaria intensificada que lo elimina o previene la enfermedad y como su nombre lo indica, el sistema inmunitario participa de manera activa: la proliferación de células T y B reactivas con antígeno dan lugar a la formación de células de memoria (Kindt et al., 2007). En años recientes se ha optado por la generación de vacunas para el tratamiento de enfermedades infecciosas causadas por bacterias patógenas. Generalmente, los candidatos vacunales sometidos a ensayos clínicos en la mayoría de los casos solo están centrados en un antígeno específico. Esta estrategia ha sido eficaz en la generación de vacunas para ciertas bacterias patógenas como *Streptococcus pneumoniae*, *Hemophilus influenzae* y *Neisseria meningitidis*. En la **Tabla 2** se muestran algunas de las vacunas desarrolladas contra algunas enfermedades infecciosas, que han sido aprobadas y que actualmente se encuentran comercializadas.

Vacuna	Nombre comercial	Tipo/ruta	Aprobación	Presentación
Ántrax	BioThrax	Bacteria inactivada/IM	1970	Vial de dosis múltiple
DTaP	Daptacel Infanrix	Bacteria inactivada/IM Bacteria inactivada/IM	2012 1997	Vial de dosis única Vial de dosis única o jeringa
DT	Generic	Toxoides bacterianos inactivados/IM	1978	Vial de dosis única
<i>Haemophilus influenzae</i> type b	ActHIB Hiberix PedvaxHI B	Bacteria inactivada/IM Bacteria inactivada/IM Bacteria inactivada/IM	1993 2009 1989	Vial de dosis única Vial de dosis única Vial de dosis única
Meningocócica	Menomune Menactra Menveo Trumeda Bexsero	Bacteria inactivada/SC Bacteria inactivada/IM Bacterias recombinantes/IM Bacterias recombinantes/IM	1981 2005 2010 2014 2015	Vial de dosis única o múltiple Vial de dosis única Vial de dosis único Jeringa Jeringa
Pneumocócica	Pneumovax 23 Prevnar 13	Bacteria inactivada/SC o IM Bacteria inactivada/IM	1983 2010 (PCV7-2000)	Vial de dosis única, Vial de dosis múltiple o Jeringa
Tétanos (reducido), Difteria, Pertusis	Boostrix Adacel	Bacteria inactivada/IM Bacteria inactivada/IM	2005 2005	Vial de dosis única o jeringa Vial de dosis única o jeringa
Tifoidea	Typhim Vi Vibotif	Bacteria inactivada/IM Bacterias vivas atenuadas/ Oral (cápsulas)	1994	Vial de dosis múltiple o jeringa Paquete de 4 cápsulas

Tabla 2. Vacunas aprobadas para infecciones bacterianas. (Tomado y modificado de Centers for Disease Control and Prevention. *Epidemiology and Prevention of Vaccine-Preventable Diseases*, 13th Edition).

Actualmente no existen vacunas autorizadas por la FDA para el tratamiento o la prevención de la infección por *K. pneumoniae*. Un enfoque de inmunoterapia que utilice vacunas o inmunización pasiva podría proporcionar una alternativa viable al uso de antibióticos para el tratamiento y la prevención de infecciones graves por *K. pneumoniae*. Recientemente se han publicado algunos trabajos en los que se han probado diferentes antígenos (OMP, fimbrias, entre otros) en ratones para saber la capacidad protectora que estos le pudieran conferir al ratón ante una dosis letal de la bacteria, en la **tabla 3** se muestran algunos de los trabajos publicados y los antígenos utilizados.

Referencia	Antígeno	Cepa	Protocolo de inmunización	Resultados
Hussein 2018 Microbial Pathogenesis	OmpK17 OmpK36 F36/17	10031	Los ratones se dividieron en grupos de 10 ratones cada uno, se utilizaron los antígenos individuales con cada uno de los tres adyuvantes: partículas GEM, hemozoína y adyuvante de Freund incompleto (IFA), utilizando la vía de inmunización subcutánea (SC), fueron inmunizados con el antígeno correspondiente los días 1, 14 y 28 y luego fueron desafiados con una dosis letal 50 de <i>K. pneumoniae</i> .	La proteína OmpK17 obtuvo los mejores resultados, como candidata a vacuna.
Babu 2017 Frontiers in Microbiol.	OmpA + OmpK36 (r-AK36)	10031 13883	Se agruparon ratones en tres lotes de 10 ratones cada uno. Se extrajo sangre de todos los ratones 2 días antes del inicio del programa de inmunización y el suero combinado sirvió como control negativo. Dos grupos, recibieron proteína recombinante por vía subcutánea con adyuvante completo de Freund (CFA), seguido de tres dosis de refuerzo con un intervalo de 10 días con la misma cantidad de proteína en adyuvante incompleto de Freund. El tercer grupo sirvió como control.	Es eficaz al inducir una respuesta inmunitaria de memoria
Seeberger 2017 Angew Chem Int Ed	CRM197-1	43816 Kp5214	Los ratones (tres individuos por grupo) se inmunizaron el día 0 con CRM197-1 conjugado formulado en hidróxido de aluminio o CFA y recibieron dos inyecciones de refuerzo los días 14 y 35 con la misma cantidad de antígeno por vía subcutánea Los ratones que sirvieron de control recibieron PBS.	CRM197-1 tiene potencial para ser candidata a vacuna.
Lundberg 2013 Hum Vaccines & Immunotherapeutic s	KP-13, 21, 32, 37, 38, 39, 60, 65	B5055 A5054	Para inmunización activa (vía subcutánea), proteínas recombinantes formuladas con CFA o hidróxido de aluminio se inyectaron en ratones, los días 14 y 28, se reforzó a los ratones con la misma cantidad de proteína e IFA.	Los antígenos KP-65, 38 y 21, confirieron protección al ratón

Kurupati 2011 Clin. Vaccine Immunol.	OmpA Ompk36		Los ratones se inmunizaron a intervalos de 2 semanas para un total de cuatro inyecciones con pOmpA o pOmpK36. Se tomaron muestras de sangre 7 días después de cada inyección. Se incluyeron 10 ratones por grupo y a los ratones de los grupos de control (grupos 1 y 2) se les inyectó el vector parental pVAX1 por vía intradérmica e intramuscular (im), a los ratones de los grupos 3 y 4 se les inyectó im con los plásmidos recombinantes pOmpA y pOmpK36. A los ratones pertenecientes a los grupos 5 y 6 se les inyectó por vía intradérmica los plásmidos recombinantes. Al grupo 7 que representaron el control negativo se inyectaron con PBS.	OmpK36, proporcionó una alta protección contra el desafío letal.
Lavender 2005 Int. J. Med. Microbiol.	Fimbrias tipo 3	43816 IA565	Se tomaron muestras de suero de los ratones 24 h antes de la inmunización primaria y posteriormente 24 h antes de la inmunización de refuerzo. Para aquellos ratones que fueron desafiados con <i>K. pneumoniae</i> , también se tomaron muestras de suero 24 h antes de la infección. Los grupos de control de animales se inmunizaron con PBS.	No mostró protección
Wang 2017 PlosOne	MrkA	43816	Se inocularon ratones con un aislado resistente a múltiples fármacos por vía intranasal y los anticuerpos anti-MrkA identificados se administraron por vía intraperitoneal (IP) 24 horas antes del desafío bacteriano o una hora después del desafío bacteriano para terapia pasiva.	No mostró protección.
Lee 2015 Experimental & Molecular Medicine	Vesículas extracelulares	4208	Los ratones se inyectaron de manera intraperitoneal con el antígeno tres veces durante 3 semanas a intervalos de 1 semana. Siete días después de la última inmunización, tanto los ratones inmunizados como los no inmunizados fueron expuestos a la dosis letal de <i>K. pneumoniae</i> .	Se observó protección.

Tabla 3. Pruebas de inmunización con candidatos vacunales para *K. pneumoniae* (elaboración propia).

2. Vacunología reversa

De manera convencional, las vacunas se han desarrollado bajo los principios de “aislar, inactivar/atenuar e inyectar/inocular”, esto es realizando aislamientos y cultivos del patógeno completo o de algunos de sus componentes, así como pruebas de inmunización para la detección de antígenos vacunales. Afortunadamente, en el año

2000 surgió un nuevo enfoque de vacunología reversa en el que el descubrimiento de potenciales antígenos vacunales se realiza mediante el uso de la genómica y bioinformática reduciendo la cantidad de tiempo que lleva el hallazgo de nuevos antígenos y con mayor probabilidad de éxito que con los métodos convencionales (Goycochea Valdivia, 2018).

Este enfoque inicia con la secuencia genómica y mediante un análisis informático se pueden predecir aquellos antígenos que tiene una mayor probabilidad de ser candidatos a ser usados vacunas (**Figura 2**). El enfoque tiene como ventaja que el período de detección y evaluación del desarrollo de la vacuna es menor (1 o 2 años) en comparación con el enfoque convencional (Kanampalliwar, 2020;Rappuoli, 2000).

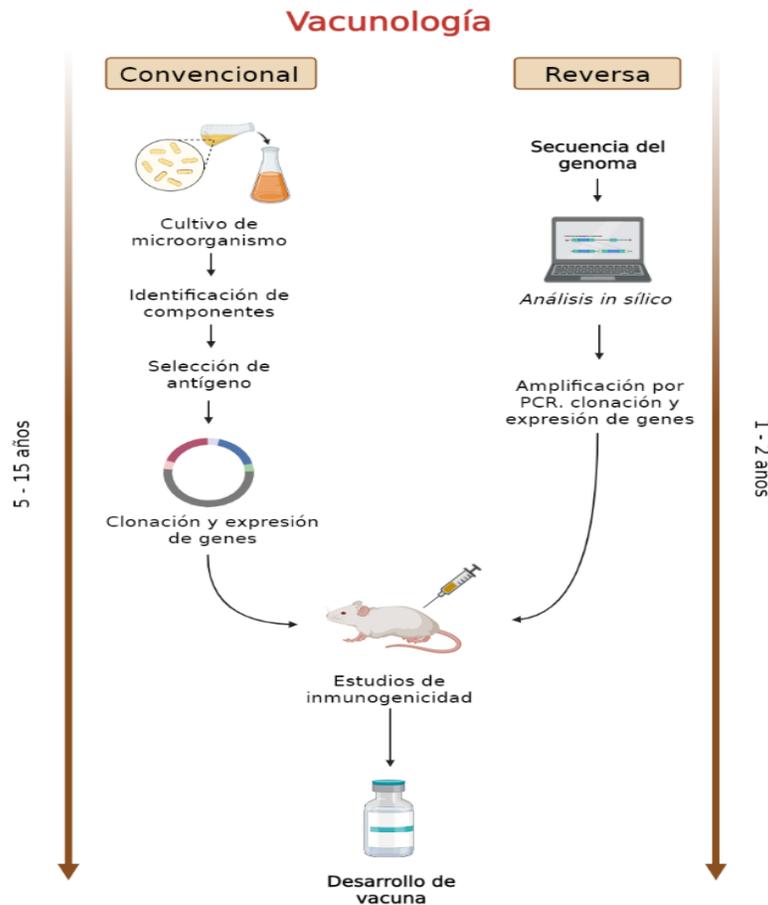


Figura 2. Representación esquemática de los pasos esenciales del desarrollo de una vacuna por el enfoque convencional y vacunación inversa (tomada y modificada de Ferreira & Porco, 2008).

ANTECEDENTES

Utilizando un análisis bioinformático con el programa ProteinOrtho y el uso de genomas filogenéticamente representativos de *Klebsiella sp* y *Enterobacter sp*, disponibles públicamente (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>), nuestro grupo de investigación identificó genes ortólogos (“core genome”) de *Klebsiella sp* y *Enterobacter sp*. Posteriormente, utilizando el programa PSORTb se identificaron las proteínas ortólogas de membrana externa (OMPs) presentes en todos los genomas analizados. De este conjunto, se seleccionaron las ocho proteínas ortólogas cuya conservación en los genomas analizados de *Klebsiella sp* y *Enterobacter sp* fue > 90% de identidad a nivel de secuencia de aminoácidos. En principio este enfoque permitirá identificar proteínas ampliamente conservadas en ambas bacterias con potencial para ser usados como antígenos vacunales. El análisis de predicción de dominios membranales de estas proteínas orientó la identificación de dominios o segmentos expuestos de éstas. Posteriormente, se generaron las construcciones en el vector pVIVEX2.4b para producir estos dominios de forma recombinante en *E. coli*.

Péptido codificante	Segmento (pb)
OMP40	570
OMP61	258
OMP70	372
OMP52	450
OMP46	723
OMP39	384
OMP73	159
OMP69	378

En este proyecto se analizó la protección inducida por la inmunización de las OMP40, OMP61 y OMP70 en un modelo murino. Particularmente, como característica de cada una de estas proteínas se sabe que OMP40 es una proteína transglicosilasa llamada MtlA que se encuentra anclada a la membrana externa. La OMP61, conocida como BamE forma parte del complejo proteico Bam. Este complejo facilita el plegado y la inserción de proteínas en la membrana externa de la bacteria. Mientras que OMP70, es una lipoproteína que está asociada a peptidoglucanos de la pared celular bacteriana. Como se mencionó antes, en un trabajo previo de nuestro laboratorio, se generaron construcciones que tienen los dominios o regiones de los genes codificantes de estas OMPs clonados en el vector pIVEX2.4b (**Figura 3**). El vector pIVEX2.4b tiene un promotor T7 para la expresión del gen de interés, también contiene un sitio de clonación múltiple (MCS) que es en donde se insertaron los distintos dominios génicos. Los péptidos-fusión generados (en lo subsecuente nombrados como proteínas OMP) poseen una cola de histidinas (Histag), así como un sitio de corte para la proteasa factor XA. La digestión con el Factor XA permite la separación de la proteína de interés de la cola de histidinas. Estas construcciones fueron introducidas en la cepa BL21 A1 de *E.coli* y se cuenta con bacterias que incluyen el constructo codificante para cada proteína de interés.

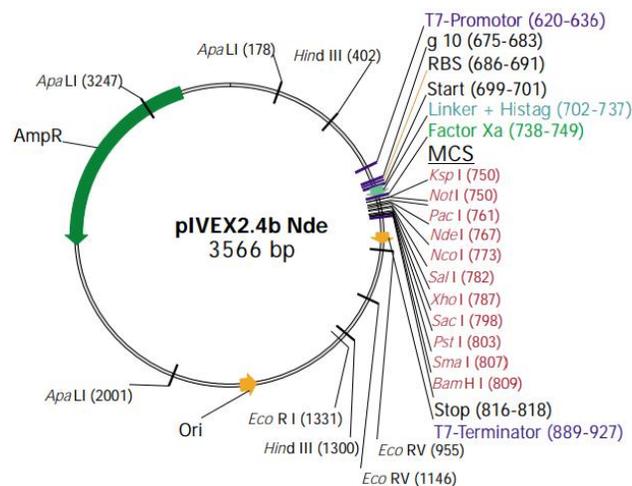


Figura 3. Vector pIVEX2.4b. Este vector tiene un gen de resistencia a la ampicilina, así como un promotor T7 y una región importante llamada Sitio de Clonación Múltiple (MCS) que es en donde se inserta el gen que codifica para nuestras proteínas de interés que están unidas a una cola de histidinas.

JUSTIFICACIÓN

El uso indiscriminado de antibióticos, automedicación, y exposición a infecciones intrahospitalarias ha ocasionado la adaptación de bacterias resistentes a múltiples fármacos que representan una amenaza a nivel global para la salud pública. Entre ellos, *K. pneumoniae* es uno de los patógenos críticos con multirresistencia, responsable de la mayoría de las infecciones en vías urinarias adquiridas en hospitales, y responsable frecuente de bacteriemias nosocomiales y neumonías. Estas infecciones prolongan la estancia de los pacientes en hospitales afectando la economía del sistema sanitario y de la familia. La inmunoterapia ofrece una alternativa terapéutica con amplias ventajas frente a otro tipo de tratamientos. La terapia con mAbs es una alternativa prometedora, dado que son altamente específicos y no generan disbiosis, mientras que las vacunas ofrecen una alternativa profiláctica que evitaría la necesidad de antibióticos y de otros tratamientos. Por ello, la evaluación de antígenos blanco candidatos (OMP40, OMP61 y OMP70) de *K. pneumoniae* es importante para la identificación de nuevos candidatos vacunales.

HIPÓTESIS

La inoculación de OMPs de *K. pneumoniae* en ratones BALB/c inducirá la inmunidad activa que los protegerán contra un reto letal.

OBJETIVO GENERAL

Evaluar la capacidad protectora de OMP40, OMP61 y OMP70 de *Klebsiella pneumoniae* en ratones BALB/c frente a un reto letal.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Producir y purificar las proteínas recombinantes OMP40, OMP61 y OMP70 de *K. pneumoniae*.
2. Analizar la seroconversión de ratones inmunizados con antígenos de *K. pneumoniae*.
3. Determinar la sobrevivencia de los ratones inmunizados desafiados contra el reto letal de *K. pneumoniae*.

METODOLOGÍA

Objetivo 1. Producir y purificar las proteínas recombinantes OMP40, OMP61 y OMP70 de *K. pneumoniae*.

Para alcanzar este objetivo se realizaron cultivos de *E. coli* (BL21 A1) previamente transformadas en el laboratorio con las construcciones que tienen los genes codificantes para producir las proteínas OMP40, OMP61 y OMP70 de *K. pneumoniae*.

1. Inducción de la expresión de las OMPs en E. coli BL21 A1.

Estas bacterias fueron cultivadas en 200 ml de medio Luria Bertani (LB) con 200 µg/ml de carbenicilina y glucosa al 0.1%. Los cultivos se incubaron en un período de 4 horas, hasta alcanzar una densidad óptica de 0.4 a una longitud de onda de 600 nanómetros y se tomó 1 ml de muestra pre-inducción. Posteriormente se indujo la expresión de la proteína añadiendo 2 ml de arabinosa al 0.2% e incubando durante 4 horas adicionales y se tomó 1 ml de muestra post-inducción (Hussein et al., 2018). Las bacterias se cosecharon por centrifugación a 8,000 rpm por 20 minutos a 4°C y se guardó el pellet. Después, las muestras tomadas en las condiciones pre y post-inducción, las células se lisaron (hirviendo por 10 minutos en presencia del buffer de carga) y las proteínas se separaron por electroforesis en geles de poliacrilamida con dodecilsulfato de sodio (SDS-PAGE).

2. Análisis de proteínas por SDS-PAGE

El SDS-PAGE es preparado con un gel concentrador que se encarga de evitar que la muestra se disperse por el gel y alinea la proteína de la muestra en una fina banda y con un gel separador que es el que permite la separación de la proteína en base a su peso molecular. Se prepararon los geles con un espesor de 1 mm, de 8x10 cm, con un porcentaje de acrilamida del 10%. La polimerización se llevó a cabo a temperatura ambiente y los geles se dejaron reposar 10 minutos antes de su utilización. Las muestras se desnaturalizaron diluyéndolas 1:1 (V:V) con buffer reductor de muestra (tris 120 mM, glicerol 10%, SDS 6%, beta-mercaptoetanol puro, azul de bromofenol 0.05%) y buffer no reductor (tris 120 mM, glicerol 20%, SDS 4%, azul de bromofenol 0.1%).

Para el gel separador se mezclaron: 2 ml de la mezcla de acrilamida /bis-acrilamida (30%:0.8%), 2.25 ml de tris-HCl 1 M pH 8.8, 60 µl de persulfato de amonio 10%, 6 µl de tetrametiletilendiamina (TEMED) y agua BD.

Para el gel concentrador se mezclaron: 0.66 ml de la mezcla de acrilamida /bis acrilamida (30%:0.8%), 416.66 µl de tris- HCl 1 M pH 6.8, 33.33 µl de SDS 10%, 16.66 µl de persulfato de amonio al 10%, 3.33 µl de TEMED y agua BD.

Se cargaron las muestras (300 µg de la proteína) con un volumen final de 25 µl en cada pozo, se corrieron a 110 V por 120 minutos. Después se tiñó el gel con tinción de Comassie (metanol 20%, ácido acético 10% y 0.1% azul de Comassie) por 12 horas y se destiñó con solución destiñidora a base de metanol 50% y ácido acético 10% para observar la expresión y el estado de las proteínas de interés.

3. *Sonicación*

Una vez que se corroboró la presencia de la proteína de interés, se realizó el proceso de sonicación utilizando el pellet celular obtenido de la centrifugación del cultivo de inducido. Para este proceso el pellet celular fue resuspendido en 5 ml de buffer de lisis con 1 mg/ml de lisozima e incubado en hielo durante 30 minutos.

El contenido del buffer de lisis es el siguiente:

- Para para condiciones nativas: 50 mM de NaH_2PO_4 , 300 mM NaCl y 10 mM de imidazol, pH 8.
- Para condiciones híbridas (buffer de lisis desnaturizante): 100 mM de NaH_2PO_4 , 10 mM de tris, 8 M de urea, pH 8.

Se sonicó con 10 pulsos de 30 segundos alternando con 30 segundos de descanso, después se centrifugó a 4400 rpm por 40 minutos a 4°C. Para la purificación en condiciones nativas se utilizó el sobrenadante, mientras que para las condiciones híbridas el pellet se puso en agitación con 10 ml de buffer de lisis desnaturizante durante toda la noche a temperatura ambiente, seguido de centrifugación a 4400 rpm por 40 minutos a TA.

4. Purificación de proteínas

Las proteínas se purificaron mediante una cromatografía de afinidad con metales inmovilizados (Immobilized Metal Affinity Chromatography o IMAC) en columnas con resina de Níquel-NTA (Ni-NTA de la marca Sigma). Esta técnica se basa en la afinidad de las histidinas por iones metálicos como el Ni^{+2} . De manera que las proteínas que tengan etiqueta de histidinas se unirán al Ni^{+} y aquellas que no la presenten serán eluidas mediante los lavados (**Figura 4**) (Hage et al., 2012).

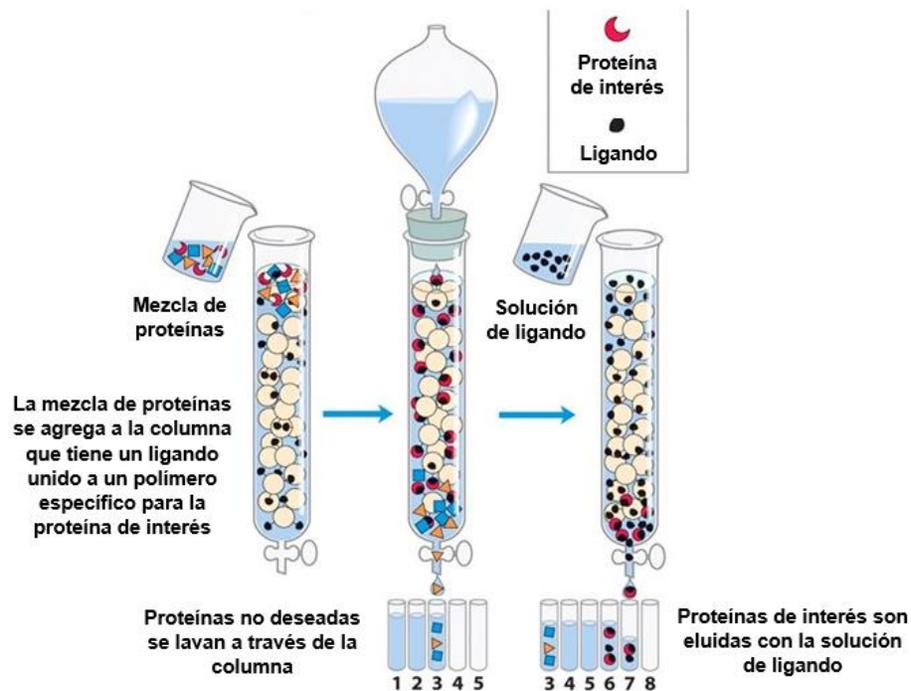


Figura 4. Cromatografía de afinidad. Un ligando (círculos color negro) se inmoviliza uniéndose en la columna cromatográfica, las proteínas de interés se unen al ligando y el resto de los componentes se lavan en la columna (tomada de ...).

4a. Purificación de proteínas en condiciones nativas.

En este protocolo de purificación se agregó el lisado celular (sobrenadante) a la resina Ni-NTA y se dejó en agitación a 200 rpm toda la noche a 4°C. Se cargó la columna con la mezcla de lisado-Ni-NTA y se colectó el flujo. Posteriormente, se realizó un lavado con

5 ml de buffer de lavado (50 mM de NaH_2PO_4 , 300 mM NaCl y 20 mM de imidazol, pH 8), se monitorizó la cantidad de proteína colectada midiendo la concentración en un espectrofotómetro. Se continuaron los lavados con buffer de lavado hasta que no se detectó proteína. Por último, se usó el buffer de elución (50 mM de NaH_2PO_4 , 300 mM NaCl y 500 mM de imidazol, pH 8) el cual tiene un contenido mayor de imidazol, lo que permite que la proteína se desprenda de la columna. Al agregar el buffer de elución se colectaron las eluciones en volúmenes de 1 ml. A cada una de las eluciones se les midió la concentración de proteína con el espectrofotómetro. Se continuó la elución hasta que ya no se detectó proteína.

4b. Purificación de proteínas en condiciones híbridas.

Se agregó el lisado (sobrenadante derivado del pellet que estuvo en agitación durante toda la noche) al gel de afinidad de Ni-NTA y se dejó en agitación a 200 rpm toda la noche a 4°C. Se cargó la columna con la mezcla de lisado-Ni-NTA y se colectó el flujo. Posteriormente se realizaron lavados con buffer start (1 M Na_2HPO_4 y 1 M NaH_2PO_4 pH 7.0), se monitorizó la cantidad de proteína colectada midiendo la concentración en un espectrofotómetro, se añaden aproximadamente 7 volúmenes. En caso necesario se continuaron los lavados con buffer de lavado hasta que no se detectó proteína. Por último, se añadió buffer de elución (0.1 M glicina pH 3.0) y se colectaron alícuotas de 1 ml en tubos eppendorf que previamente habían sido adicionados con 50 μl de buffer neutralizante (1 M tris-HCl pH 9.5). A cada una de las muestras colectadas se les monitoreó su concentración con un espectrofotómetro. Se continuó la elución hasta que ya no se detectó proteína.

Posteriormente, se analizó la pureza de las OMPs purificadas mediante electroforesis SDS-PAGE, cargando en el gel de acrilamida las eluciones que obtuvieron una mayor concentración de proteínas. Los geles se cargaron con 30 μg de proteína empleando el protocolo descrito previamente.

5. *Diálisis en PBS.*

Posterior a verificar la pureza de la proteína, se procedió a eliminar la alta concentración de imidazol contenido en la muestra mediante diálisis. La diálisis es un proceso que separa moléculas de acuerdo con su tamaño mediante el empleo de membranas semipermeables, para ello, empleamos una membrana de celulosa de 3,5 kDa (Millipore), la cual fue previamente hervida en agua miliQ durante 10 min. Con la membrana se formó una bolsa en la cual se colocó la muestra en el interior (1 ml de la proteína purificada). La bolsa de diálisis se introdujo en un vaso conteniendo 1 L de PBS 1X estéril y se dejó en agitación lenta a 4 °C durante toda la noche. La proteína purificada se recuperó y guardó a 4 °C.

6. *Cuantificación de proteínas.*

Para tener una cuantificación más precisa de las proteínas se realizó un ensayo de ácido bicinconínico (BCA). Esta técnica combina la reducción Cu^{+2} a Cu^{+1} en medio alcalino con la detección del catión Cu^{+1} utilizando el ácido bicinconínico, obteniendo como producto de la reacción un color púrpura (**Figura 5**). El complejo hidrosoluble absorbe 562 nm de manera lineal con el incremento de la proteína que tiene un rango de 20-2000 $\mu\text{g}/\text{ml}$. La concentración de nuestras proteínas se determinó a partir de una curva de calibración construida con una proteína de referencia (utilizamos albúmina de suero bovino, BSA) y el estuche BCA Protein Assay de Pierce.

-Se prepararon los estándares (1 ml) de la proteína BSA, con concentraciones de 1500, 750, 500, 250, 125, 50, 25 y 5 $\mu\text{g}/\text{ml}$, a partir de un stock de BSA de 2 mg/ml.

-Se preparó el reactivo de trabajo (WR) de acuerdo al Kit “Pierce™ BCA Protein Assay” con una relación de 50:1, 50 partes del reactivo A por cada parte del reactivo B.

-Para la preparación de las muestras a analizar se mezclaron 25 μl de la muestra problema/estándares, más 200 μl de WR. Se mezcló durante 30 segundos, y se dejó incubando a 37° C por 30 minutos, se cubrió la placa con parafilm, después se dejó

atemperar la placa a temperatura ambiente y se midió la absorbancia a 562 nm en un lector de placas.

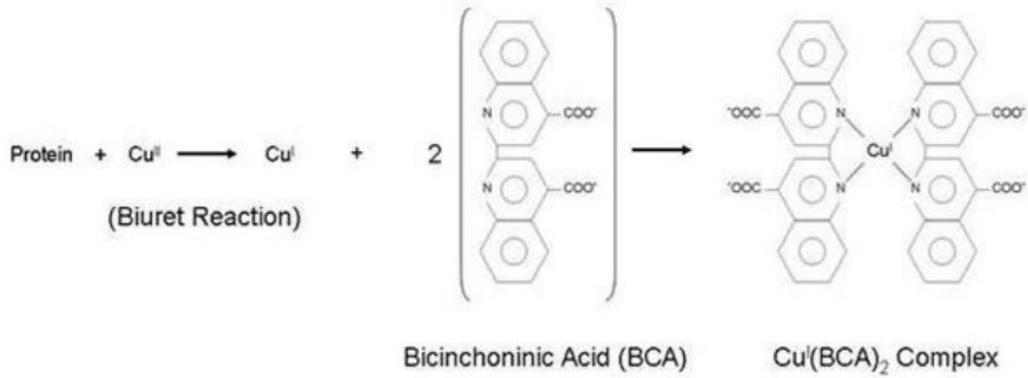


Figura 5. Esquema de la reacción del método BCA.

Las proteínas reducen los iones cúpricos a iones cuprosos bajo condiciones alcalinas, los iones cuprosos reaccionan con el BCA obteniendo un color purpura que indica la cantidad de proteína (tomada de)

Objetivo 2. Analizar la seroconversión de ratones inmunizados con antígenos de *K. pneumoniae*

1. Inmunización

Para este objetivo se utilizaron ratones de la cepa BALB/c de 6-8 semanas de edad, se obtuvo una muestra de suero un día antes de la primera inmunización y posteriormente fueron inmunizados por vía subcutánea (SC) con 20 µg de antígenos de *K. pneumoniae* (combinación las proteínas OMP40, 61 y 70, 20 µg de cada una), con 20 µg un lisado de bacteria o con PBS, todos en combinación con el adyuvante AddaVax 1:1 (en un volumen final de 150 µl). Se realizó una segunda inmunización 11 días después con 10 µg de antígenos, lisado o PBS y una tercera inmunización al día 22 con la misma cantidad de proteína, ambas por vía intraperitoneal. Se obtuvo muestra de suero un día antes y 5 días después de la tercera inmunización. Se inmunizaron lotes de 6 ratones para cada uno de los grupos: combinación de OMPs, lisado de *K. pneumoniae* como control positivo y PBS como control negativo.

*1.1 Preparación de lisado de *K. pneumoniae**

Se preparó un cultivo de *K. pneumoniae* ATCC 700603 en 3 ml de medio LB, se dejó durante toda la noche a 37 °C. Después, se realizaron 6 ciclos de congelación y descongelación, incubando a -20°C durante 15 minutos seguidos de 5 minutos a 37°C. Posteriormente, se resuspendió en 5 ml de buffer de lisis con 1 mg/ml de lisozima para después sonicar 15 pulsos (30 segundos y 30 segundos de descanso) y centrifugar a 4500 rpm por 40 minutos a 4°C, obteniendo el lisado (sobrenadante).

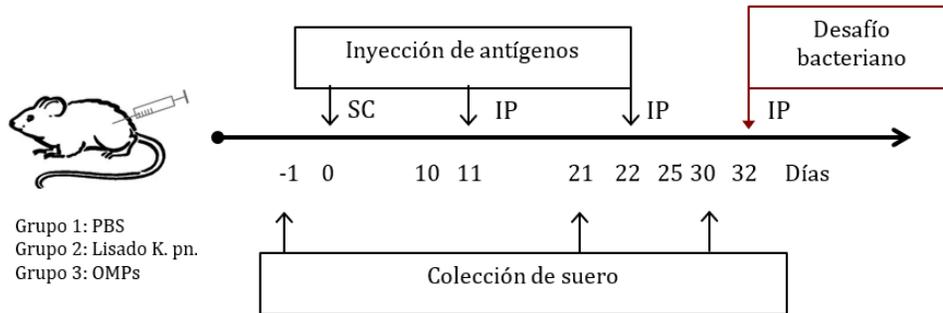


Figura 6. Esquema de inmunización. Se emplearon lotes de 6 ratones hembras BALB/c de 6-8 semanas de edad, para cada uno de los grupos, control (+) que fue administrado con lisado de *K. pneumoniae*, control (-) se le administro PBS y el grupo inmunizado con las OMPs . La primera inmunización se realizó por vía subcutánea (SC) empleando 20 µg de proteína en combinación con Addavax (1:1), seguido de dos refuerzos por vía intraperitoneal (IP) con 10 µg de proteína a los días 11 y 22, la colección de suero se realizó un día previo a la inmunización y a los días 21 y 30, para después enfrentar a los animales inmunizados con una dosis letal 100 (8×10^8 unidades formadoras de colonias) de *K. pneumoniae* ATCC 700603 el día 32.

2. ELISA - Detección de anticuerpos contra OMPs 40, 61 y 70

Para analizar la producción de anticuerpos posterior a la inmunización, se recubrieron placas de ELISA con 1 µg por pozo de cada OMP 40,61 y 70 (de forma individual) en buffer 0.1 M Na_2CO_3 , pH 9.6 (50 µl/pozo), y se dejó durante toda la noche a 4°C. Al siguiente día se realizaron varios lavados con 200 µl de wash buffer (PBS 1X-Tween 20 al 0.1%, pH 7.4), después se bloqueó la placa con 200 µl de solución de bloqueo (1% BSA en PBS 1X, pH 7.4) durante 60 minutos a 30°C, luego se retiró el bloqueo y se agregaron 50 µl de los sueros inmunes y pre-inmunes (diluidos: 1:50) y se incubaron por 120 minutos a 37°C. Posteriormente, se realizaron 4 lavados con wash buffer, seguidos de 100 µl del anticuerpo secundario conjugado con HRP diluido 1:5000 en dilución (1% BSA + PBS 1X-Tween 20 al 0.1%) y se incubaron durante 60 minutos a 37°C. Para poder revelar se agregaron 50 µl de diclorhidrato de o-fenilendiamina (OPD) 10 mg/ml disuelto en buffer de citratos pH 5.0 con peróxido de hidrógeno (1 µl de peróxido por ml de buffer). La reacción se detuvo a los 10 minutos con 50 µl de H_2SO_4 1M, y posteriormente se leyó la absorbancia a 490 nm en un lector de ELISA (Babu et al., 2017).

Objetivo 3. Determinar la sobrevivencia de los ratones inmunizados desafiados contra el reto letal de *K. pneumoniae*.

1. Estandarización de Dosis Letal 100

Se estandarizó la dosis letal preparando suspensiones celulares de *K. pneumoniae* ATCC 700603 en un rango de 10^4 a 10^9 unidades formadoras de colonias (UFC) por ml en PBS, que serán inoculadas de forma intraperitoneal en grupos de 6 ratones para determinar la dosis letal 100. Para realizar el cálculo de la concentración de bacterias se preparó el cultivo bacteriano en 3 ml de medio LB y se dejó durante toda la noche a 37°C , al día siguiente se puso un subcultivo en 100 ml de LB agregando $10\ \mu\text{l}$ del cultivo O/N y el matraz se dejó agitando a 37°C . Se tomaron lecturas de concentración cada hora en el espectrofotómetro a 600 nm, posteriormente se prepararon suspensiones bacterianas a diferentes tiempos de incubación tomando 1 ml del subcultivo (se prepararon 8 tubos eppendorf con $900\ \mu\text{l}$ de PBS 1X y se le agregó $100\ \mu\text{l}$ del subcultivo para hacer diluciones 1×10^1 hasta 1×10^8) y se realizaron plaqueos por duplicado de las suspensiones bacterianas preparadas. Al día siguiente se realizó el conteo de las unidades formadoras de colonias (UFC), y se administró en los ratones la cantidad correspondiente a la concentración requerida, ajustando el volumen a $150\ \mu\text{l}$ por ratón. La concentración más baja a la cual muere el 100% de los ratones fue considerada como la dosis letal 100.

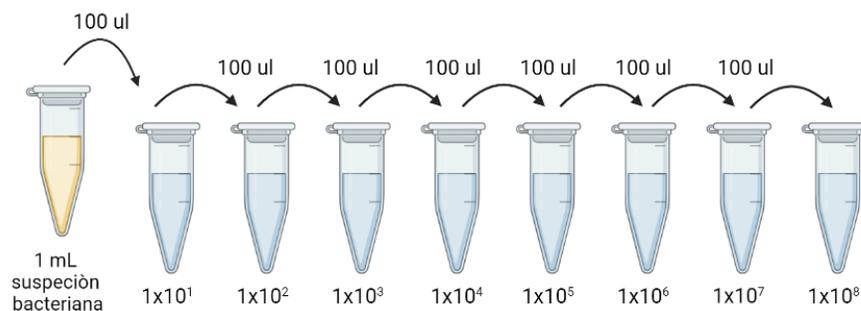


Figura 7. Diluciones para conteo de unidades formadoras de colonias. En 8 tubos Eppendorf se agregaron $900\ \mu\text{l}$ de PBS 1x estéril, posteriormente se tomaron $100\ \mu\text{L}$ de la suspensión bacteriana y se hicieron diluciones de 1×10^1 hasta 1×10^8 . Estas diluciones fueron sembradas ($25\ \mu\text{l}$) en placas con medio LB para la cuantificación del número de UFC/ml.

2. Reto letal con K. pneumoniae.

Para estudiar la eficacia protectora de las OMPs, los ratones fueron desafiados con la cepa hipervirulenta de *K. pneumoniae* ATCC 700603. Los grupos de ratones inmunizados fueron administrados con la dosis letal 100 de *K. pneumoniae* en un volumen de 150 μ l, 10 días después de la última inmunización. La eficacia protectora de las proteínas recombinantes se comprobó evaluando las tasas de supervivencia durante 15 días posteriores al reto (Babu et al., 2017). Todos los días se observó a los animales en busca de signos de enfermedad, como pérdida de peso, cambio en la apariencia del pelaje y falta de movimiento.

3. Análisis estadístico

La normalidad de los datos fue evaluada empleando la prueba de Shapiro-Wilk. Se compararon las lecturas de ELISAs entre los diferentes grupos y entre días empleando Kruskal-Wallis con comparaciones múltiples de Dunn. Se empleó el software GraphPad Prism 8 para la elaboración de las gráficas y para el análisis estadístico. Los resultados con un valor de p inferior a 0.05 se consideraron estadísticamente significativos.

RESULTADOS

Objetivo 1. Producción y purificación de las proteínas recombinantes OMP40, OMP61 y OMP70 de *K. pneumoniae*.

Para la inducción de cada una de las proteínas (OMP40, OMP61 y OMP70) se realizaron cultivos en volúmenes de 200 ml de medio LB con carbenicilina y glucosa para cada proteína, provocando la expresión de nuestra proteína con arabinosa y se determinó que el tiempo adecuado de inducción para obtener una buena cantidad de proteína es de 4 horas. Por medio de SDS-PAGE se observó la correcta expresión de las proteínas en condiciones “pre” y “post” inducción. El peso de las proteínas inducidas observadas en los geles, coincidió con el peso teórico esperado que es para OMP40 de 23.84 kDa, para OMP61 de 14.9 kDa y para OMP70 de 16.6 kDa (**Figuras 8 y 9**). En los geles de acrilamida pudimos observar el patrón de bandeo generado por las proteínas que están expresando las bacterias previo a la inducción y como tras añadir la arabinosa se encuentra una nueva banda que corresponde con el peso de nuestra proteína de interés. Después de observar a las proteínas expresadas, se repitió el proceso varias veces para producirlas en gran cantidad, ya que se había observado previamente que la inducción es más eficiente empleando volúmenes pequeños de medio de cultivo (100 – 200 mL).

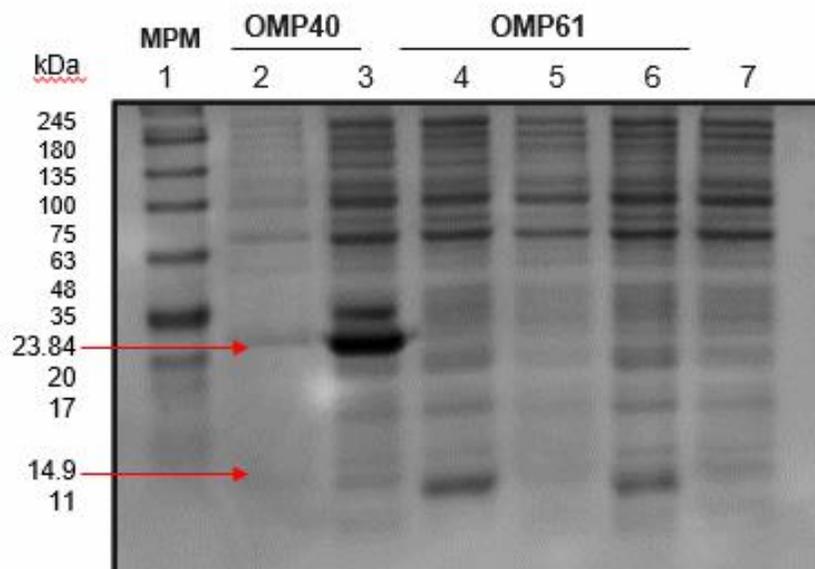


Figura 8. Electroforesis en gel de acrilamida de extractos de BL21-A1 que expresan OMP40 y 61. Carriles: 1. Marcador de peso molecular, 2. OMP40 pre- inducción. 3. OMP40 post-inducción. 4,6. OMP61 post-inducción. 5,7. OMP61 pre- inducción.

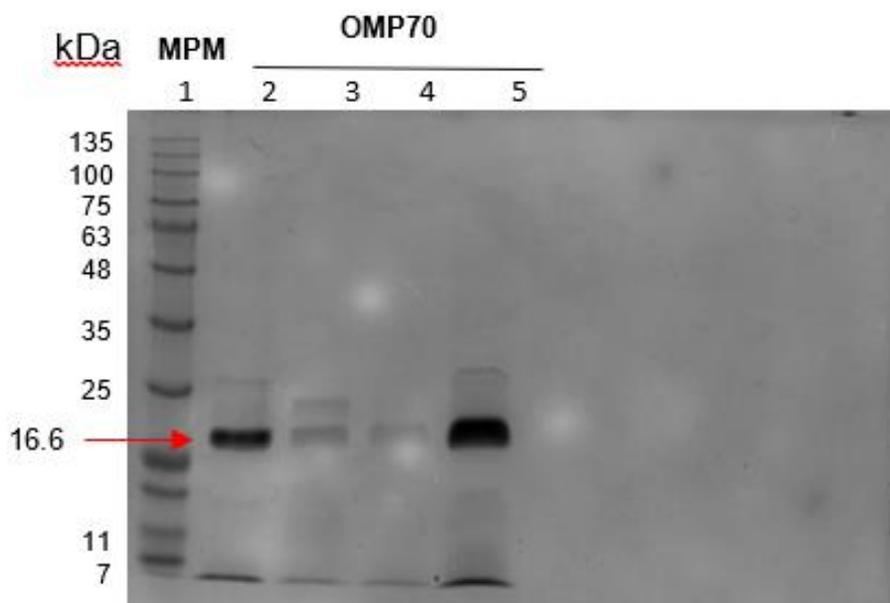


Figura 9. Electroforesis en gel de acrilamida de extractos de la cepa BL21-A1 que expresan OMP70. Carriles: 1. Marcador de peso molecular, 2. OMP70 post-inducción. 3. OMP70 pre-inducción. 4. OMP70 Pellet. 5. OMP70 Sobrenadante 39

Después de inducir la expresión de las proteínas, se colectó todo el medio de cultivo y se centrifugó. El pellet obtenido fue sonificado para provocar la lisis de la pared celular de la bacteria con la consiguiente liberación de las proteínas. Posteriormente, se realizó la purificación de las proteínas de acuerdo con los protocolos del manual “The QIAexpression and purification of 6xhis-tagget proteins” para la extracción y purificación de las proteínas bajo condiciones nativas (OMP61 y OMP70). Por otra parte, para la purificación de proteínas en condiciones híbridas (OMP40) se empleó un protocolo generado por nuestro grupo de investigación. La purificación se realizó mediante una cromatografía de afinidad utilizando Ni⁺² para que nuestras proteínas de interés que tenían la etiqueta de histidinas se quedaran unidas al níquel.

Para las proteínas OMP61 y OMP70 la purificación se realizó en condiciones nativas, lo que quiere decir que las proteínas no sufren ningún cambio en su estructura. Durante este procedimiento se usaron buffers de lavado y elución que contienen de menor a mayor concentración de imidazol lo que permite que la proteína se pueda despegar de la columna. Así se logró obtener a las proteínas purificadas (**Figura 10**).

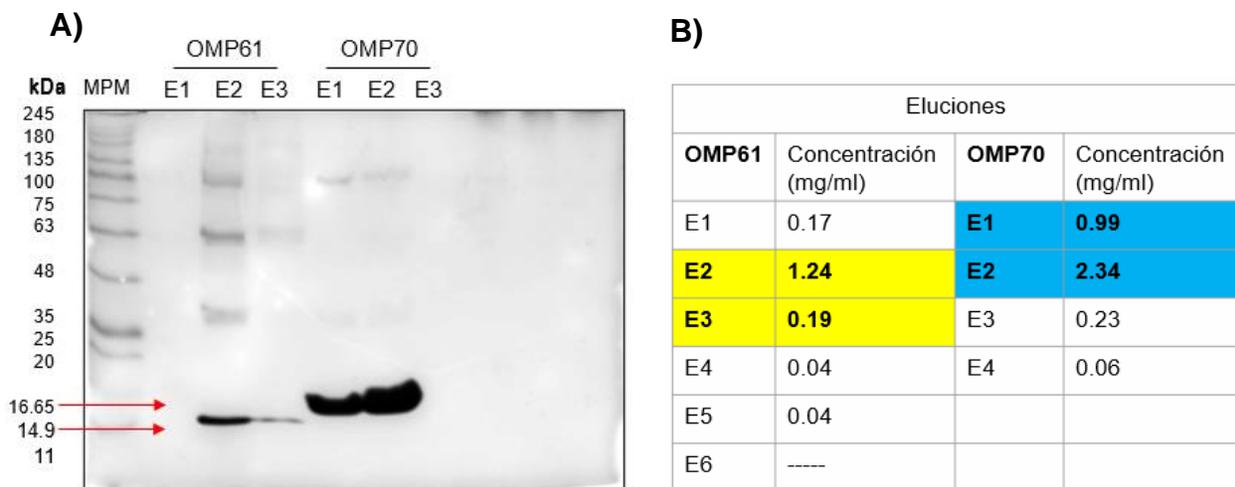


Figura 10. Purificación de OMP61 y OMP70. **A.** Electroforesis en gel de acrilamida de las proteínas purificadas. Carriles: 1. Marcador de peso molecular. E1, E2, E3. Eluciones de OMP61. E1, E2, E3. Eluciones de OMP70. **B.** Tabla con las concentraciones de las proteínas obtenidas en las eluciones.

La proteína OMP40 se purificó en condiciones híbridas, en este procedimiento se tiene a la proteína de manera desnaturalizante y una vez purificada se va a obtener de manera nativa. Para este procedimiento se usó un buffer de lisis que contiene urea, que se fue eliminando con los lavados en la columna al emplear un buffer de lavado con base en fosfato de sodio. La elución de la proteína se logró cambiando el pH, esto es acidificando la columna para que se despegara la proteína. La proteína eluída se colectó en buffer neutralizante.

En el caso de OMP40 se presentaron varios problemas con su inducción, extracción y purificación. Se tuvo que repetir el procedimiento de la inducción dado que en un par de ocasiones no se observó inducción (datos no mostrados). Posteriormente, se realizaron algunos ajustes en el protocolo y se indujo la proteína, pero no pudo ser extraída del pellet (posterior a la sonicación), por lo cual se prepararon nuevos buffers y se repitió el procedimiento. Una vez colectada la proteína, se procedió a su purificación (**Figura 11**). Después de varios intentos se logró obtener a la proteína purificada. Dado que la cantidad de proteína obtenida era baja, las eluciones se precipitaron con acetona y finalmente pudieron ser observadas en el gel (**Figura 12**).

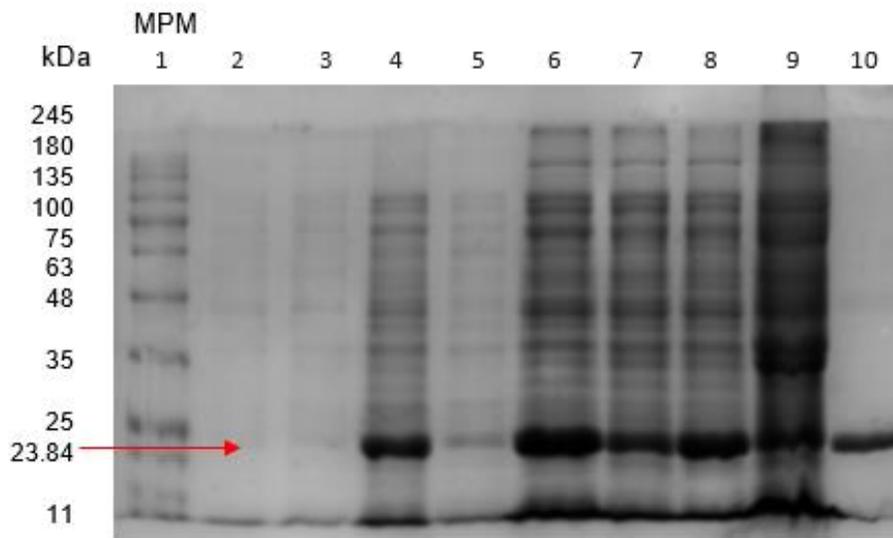


Figura 11. Electroforesis en gel de acrilamida de la purificación de la OMP40. Carriles: 1. Marcador de peso molecular, 2,3. OMP40 pre- inducción. 4,5. OMP40 post-inducción. 6,7,8. OMP40 pellet. 9. Flujo. 10. Elución 7

OMP40	Concentración (mg/ml)
E1	0.34
E2	0.24
E3	0.40
E4	0.38
E5	0.24
E6	0.25
E7	0.17
E8	0.30
E9	0.28
E10	0.19

Tabla 4. Concentraciones (mg/ml) de la eluciones OMP40.

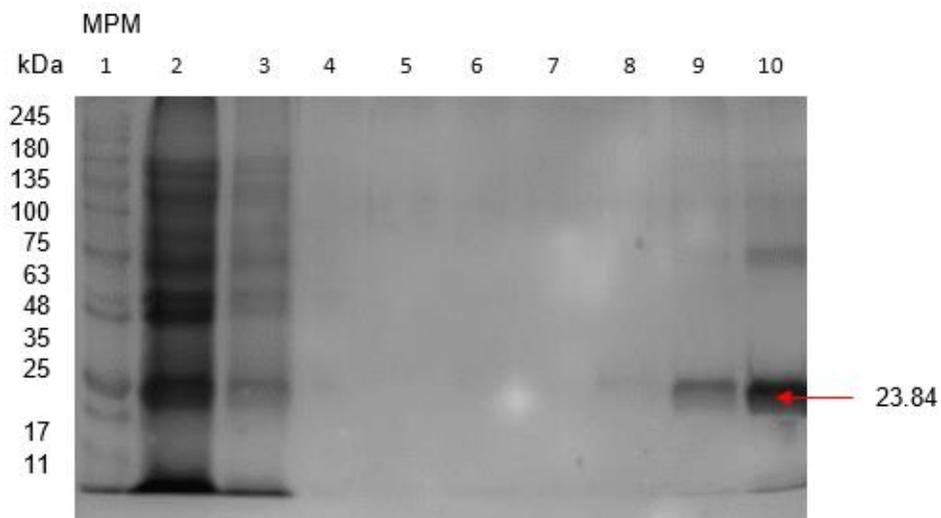


Figura 12. Electroforesis en gel de acrilamida de la purificación de OMP40. Carriles: 1. Marcador de peso molecular, 2. OMP40 Flujo. 3. OMP40 Buffer B. 4,10 OMP40 Eluciones (1-7)

Posteriormente, todas las proteínas obtenidas fueron dializadas en PBS y cuantificadas. En las **figuras 13** y **14** se muestran las curvas de calibración de los ensayos de BCA para la cuantificación de las proteínas. Se observó que hay una alta correlación entre la concentración de la proteína con la absorbancia observada, así como poca dispersión entre las réplicas, lo que nos indica que nuestra cuantificación es confiable.

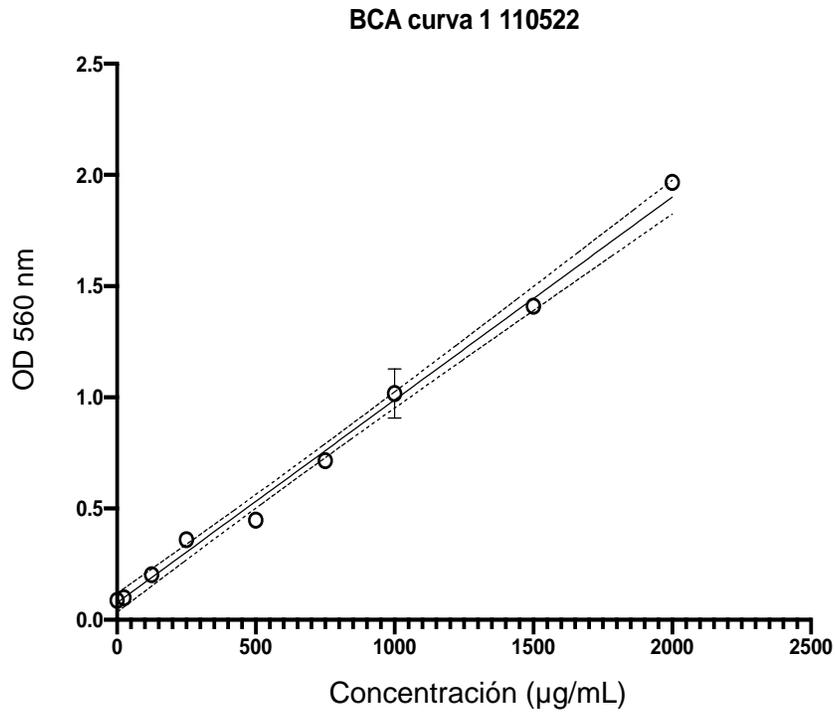


Figura 13. Curva de calibración para las concentraciones de proteína (albúmina de suero bovino) de 25-2000 µg/mL evaluado por un ensayo de BCA. Se realizaron dos réplicas para cada concentración.

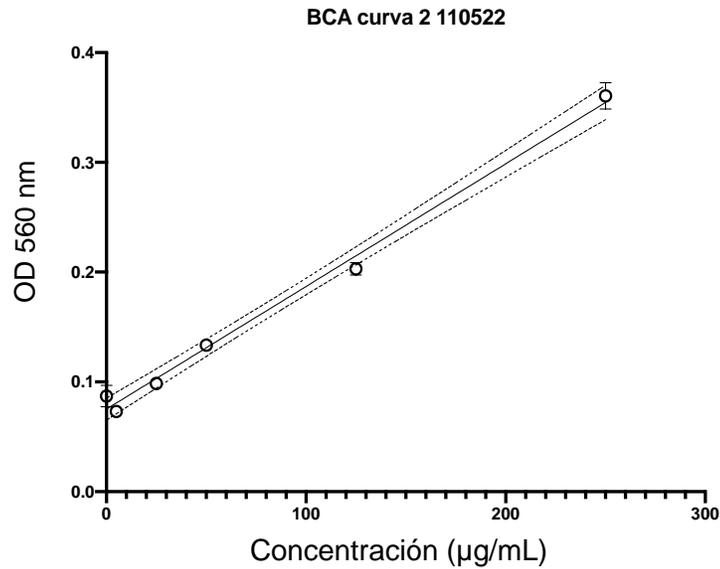


Figura 14. Curva de calibración para las concentraciones de proteína (albúmina de suero bovino) de 0-250 µg/mL evaluado por un ensayo de BCA. Se realizaron dos réplicas para cada concentración.

Una vez que se realizó la cuantificación de proteínas por BCA se obtuvieron las concentraciones que se muestran en la Tabla 5, es importante mencionar que aún en la segunda purificación de la proteína OMP40 su concentración fue baja en comparación con las proteínas OMP 61 y 70.

OMP	Concentración (mg/mL)	Volumen total (mL)
OMP70	1.431	1
OMP61	1.015	1
OMP40	0.5525	1
OMP40	0.2937	1

Tabla 5. Concentraciones de proteínas dializadas.

Objetivo 2. Analizar la seroconversión de ratones inmunizados con antígenos de *K. pneumoniae*.

Para la inmunización se utilizaron grupos de 6 ratones BALB/c de 6-8 semanas, nuestro grupo control negativo fue inmunizado únicamente con PBS 1x, el grupo control positivo se inmunizó con un lisado de *K. pneumoniae* y nuestro grupo que fue inmunizado con las proteínas OMP40, 61 y 70 (combinadas). En la inmunización inicial inyectamos a los ratones por vía subcutánea (SC) 20 µg de los antígenos (proteínas) o del lisado, o bien PBS, preparados con adyuvante AddaVax en un volumen final de 150 µl para cada ratón y los refuerzos se aplicaron en los días 11 y 22 inyectando 10 µg de antígeno por vía intraperitoneal (IP) sin adyuvante.

Se sangró a los ratones para la obtención de suero los días 21 y 30 después de la primera inmunización. Obteniendo un volumen de 20 µl de muestra de suero que fueron utilizados para la detección de anticuerpos.

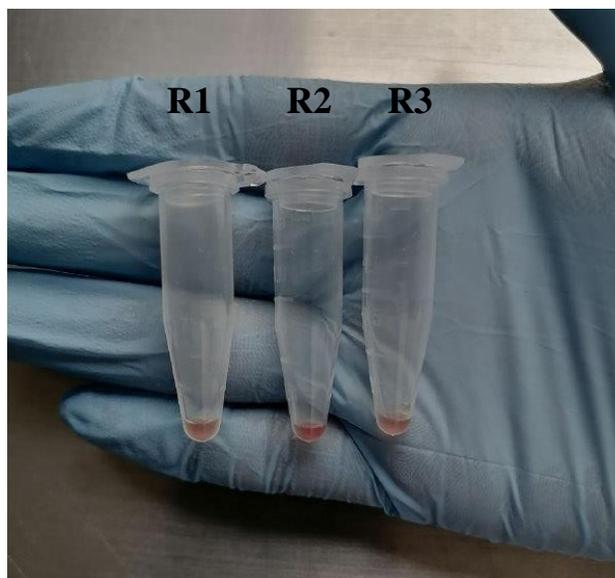


Figura 15. Fotografía de los sueros de ratón (R1, R2 y R3) obtenidos al día 21 post-inmunización.

La detección de anticuerpos (contra OMP40, 61 y 70) en suero de ratón se realizó mediante la técnica de ELISA. Encontramos que los ratones inmunizados con la

combinación de las OMPs y los ratones inmunizados con el lisado de *Klebsiella* generaron anticuerpos contra cada una de las OMPs analizadas, siendo OMP61 la proteína contra la cual se generaron mayor cantidad de anticuerpos (**Figuras 15-17**). Los ratones que recibieron PBS no generaron un nivel detectable de anticuerpos contra las OMPs de *Klebsiella*, como era esperado. Al comparar las muestras obtenidas a los 21 y a los 30 días posteriores a la inmunización, vemos que en ambos casos la cantidad de anticuerpos fue mayor que en aquella previo a la inmunización, es decir, seroconvirtieron. Además, observamos que los anticuerpos contra cada una de las OMPs se elevaron del día 21 al día 30 (**Figuras 15-17**).

Cuando comparamos la cantidad de anticuerpos detectados de cada una de las OMPs, observamos que se generó una mayor cantidad contra OMP61, seguido de OMP70 y luego OMP40 (**Figuras 15-17**). En el caso del lisado de *Klebsiella*, también se detectaron menos anticuerpos contra OMP40, y una cantidad similar de OMP70 y OMP61. En el caso de los ratones inyectados con PBS, la cantidad de anticuerpo no varió con el paso de los días y las inyecciones (**Figuras 15-17**).

Finalmente, cuando comparamos la cantidad de anticuerpos generados por la administración del lisado, contra la de las OMPs, observamos que en el caso de OMP61 y OMP40 tiende a ser más efectiva la inmunización con las OMPs que con el lisado al día 30 post-inmunización (**Figuras 15 y 17**). En el caso de OMP70, se observó una cantidad similar de anticuerpos anti-OMP70 cuando se inmunizó con el lisado o con la mezcla de OMPs (**Figura 16**).

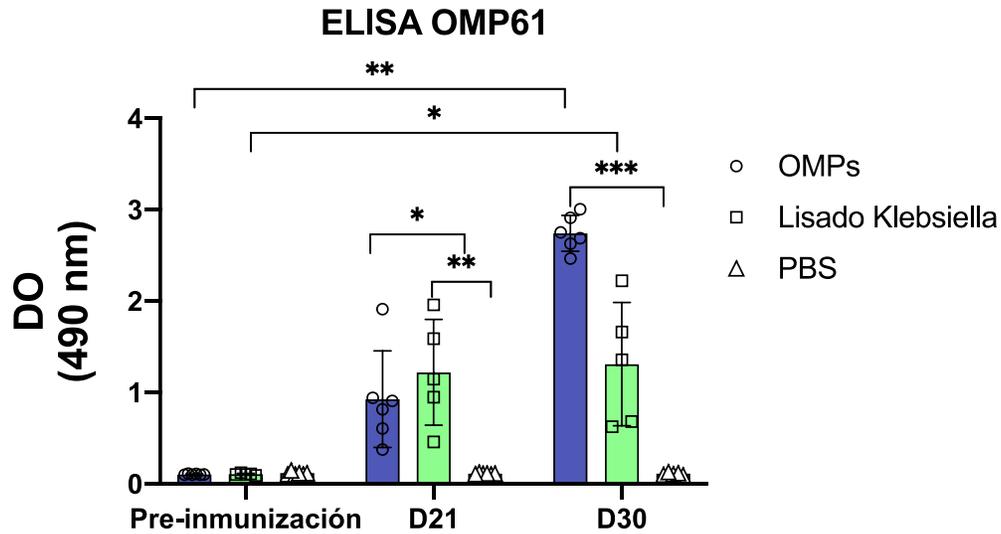


Figura 15. Análisis de la presencia de anticuerpos contra OMP61 en suero de los ratones inmunizados. Se comparó entre los ratones inmunizados con la mezcla de OMPs, los inmunizados con lisado de *K. pneumoniae* y los inyectados solo con PBS. Las muestras de suero se usaron a una dilución 1:50 y se midieron por medio de ELISA a los días 0, 21 y 30 post-inmunización. Los datos representan la media \pm desviación estándar. Kruskal-Wallis con comparaciones múltiples de Dunn, * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$.

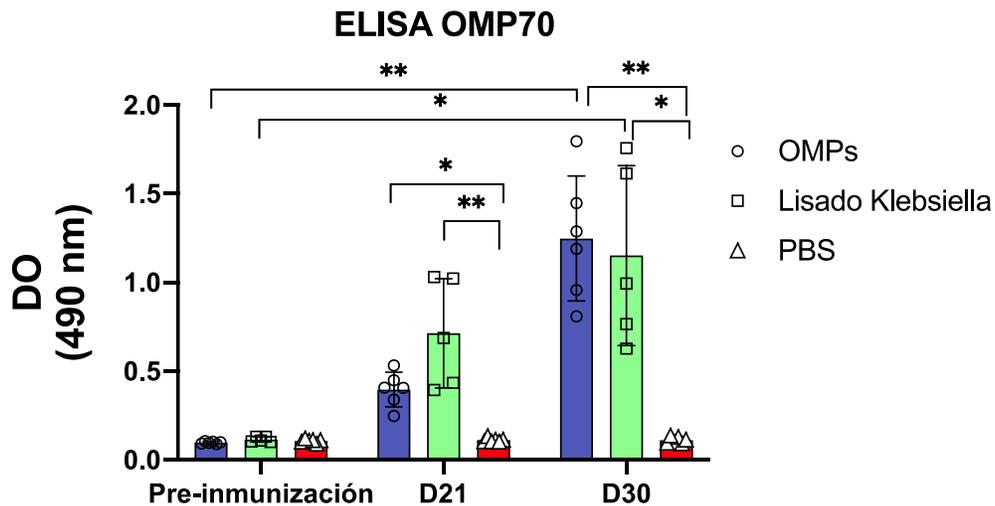


Figura 16. Análisis de la presencia de anticuerpos contra OMP70 en suero de los ratones inmunizados. Se comparó entre los ratones inmunizados con la mezcla de OMPs, los inmunizados con lisado de *K. pneumoniae* y los inyectados solo con PBS. Las muestras de suero se usaron a una dilución 1:50 y se midieron por medio de ELISA a los días 0, 21 y 30 post-inmunización. Los datos representan la media \pm desviación estándar. Kruskal-Wallis con comparaciones múltiples de Dunn, * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$.

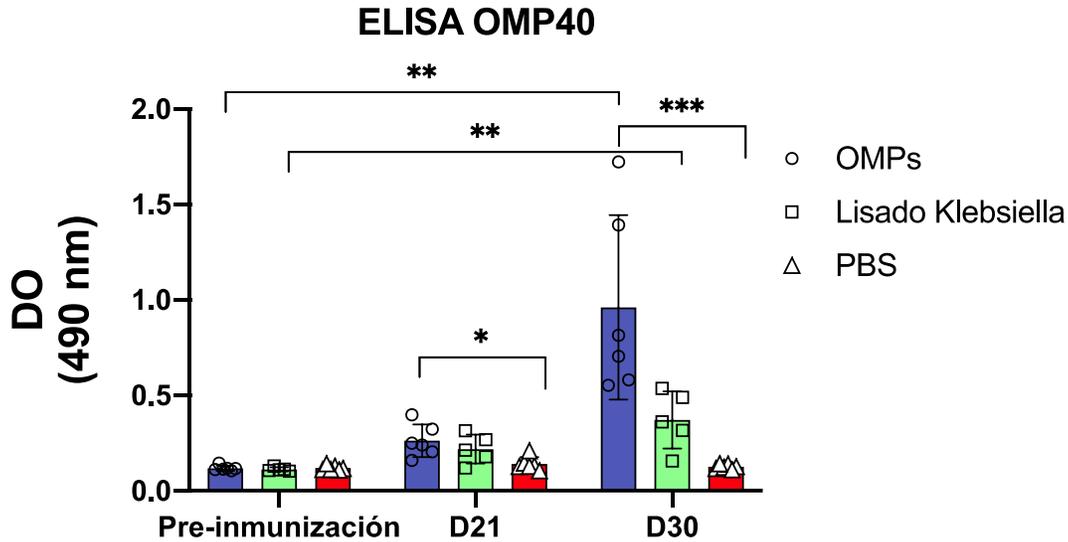


Figura 17. Análisis de la presencia de anticuerpos contra OMP61 en suero de los ratones inmunizados. Se comparó entre los ratones inmunizados con la mezcla de OMPs, los inmunizados con lisado de *K. pneumoniae* y los inyectados solo con PBS. Las muestras de suero se usaron a una dilución 1:50 y se midieron por medio de ELISA a los días 0, 21 y 30 post-inmunización. Los datos representan la media \pm desviación estándar. Kruskal-Wallis con comparaciones múltiples de Dunn, * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$.

Objetivo 3. Determinar la sobrevivencia de los ratones inmunizados desafiados contra el reto letal de *K. pneumoniae*.

Para la estandarización de la dosis letal se realizaron 4 curvas de crecimiento de *K. pneumoniae* ATCC 700603 (**Figura 18**). Las curvas de crecimiento se realizaron en medio LB y se tomaron lecturas de su absorbancia a una densidad óptica de 600 nm cada hora e incluso cada 30 minutos para tener una mayor precisión en que tiempo las células se encuentran en su fase logarítmica. Posteriormente, se tomó 1 ml de la muestra a diferentes tiempos, mismas con las que se hicieron diluciones que fueron sembradas en placas LB. Después, se calculó el número de UFC/ml para poder saber cuál es la dosis requerida para el reto letal.

En las curvas observamos que la fase exponencial del crecimiento bacteriano estaba entre las 3 y las 6 horas, que fue a los tiempos a los que preparamos diluciones bacterianas y realizamos plaqueo y conteo de colonias (**Figura 19**). Observamos que el tiempo ideal para el conteo fue de 4 horas de crecimiento, que es cuando obteníamos los resultados más reproducibles, ya que la absorbancia subía abruptamente entre las 5 y 6 h (**Figura 19**).

Antes de hacer el reto letal con los ratones inmunizados, se realizó un ensayo con 2 grupos de 5 ratones BALB/c de 6 semanas. Un grupo se usó para hacer un ensayo del reto letal con la DL100 y otro con DL50. A las 24 horas todos los ratones a los que se les aplicó la DL100 murieron, mientras que a los que se les aplicó la DL50 murieron solo 2 y 3 vivieron (**Figura 20**). El desafío bacteriano para este ensayo se realizó con 8×10^8 UFC (DL100) y 4×10^8 UFC (DL50).

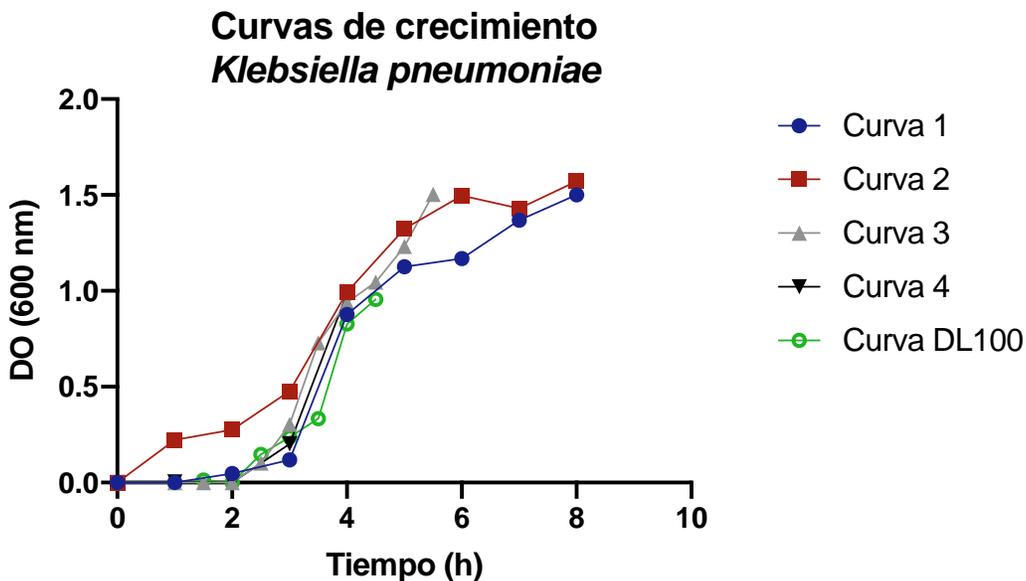


Figura 18. Curvas de crecimiento de *K. pneumoniae* ATCC 700603 en medio LB. Se analizó la absorbancia a 600 nm por duplicado en muestras de cultivo a cada uno de los tiempos indicados. Se observó que la fase exponencial se encuentra entre las 2-6 horas de cultivo. Se realizaron cuatro curvas de crecimiento para evaluar la reproducibilidad de los resultados. En la figura se muestra la curva del cultivo que se empleó para determinar la dosis letal.

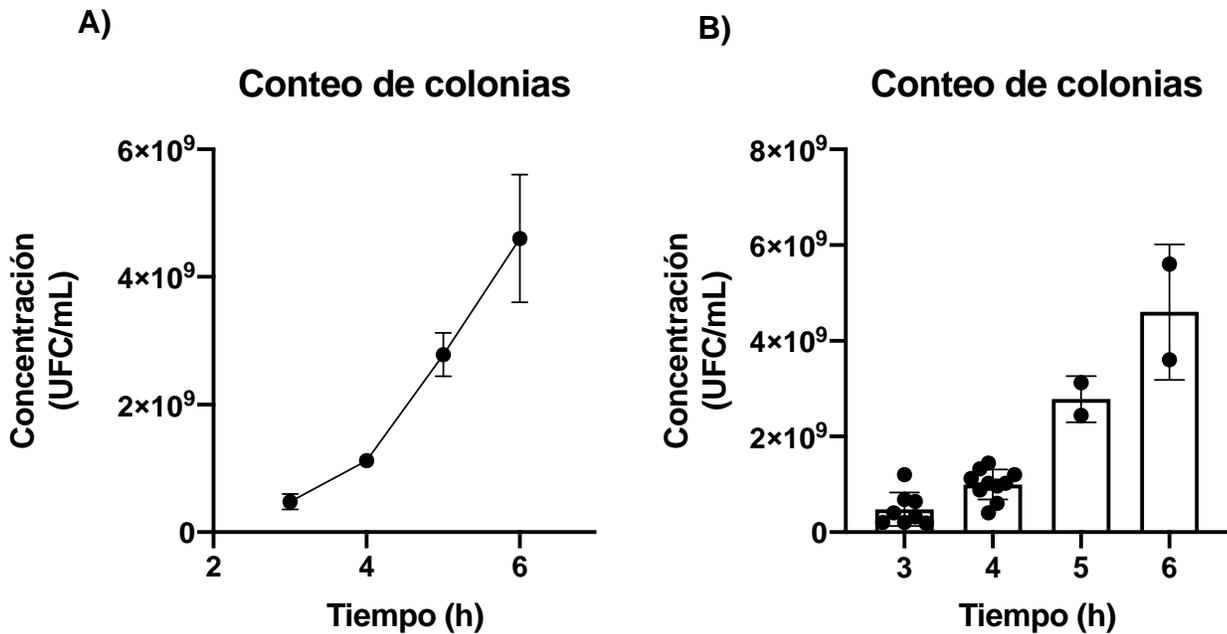


Figura 19. Conteo de colonias de *K. pneumoniae* ATCC 700603 tras su crecimiento en medio LB. Se prepararon suspensiones bacterianas a diferentes tiempos de incubación tomando 1 ml del subcultivo (diluciones 1×10^1 hasta 1×10^8) y se realizaron plaques por duplicado de las suspensiones bacterianas preparadas. Al día siguiente se realizó el conteo de las colonias y se determinó su concentración expresada como UFC/ml. A. Curva de concentración de las bacterias con respecto al tiempo, se observa que el crecimiento está en fase exponencial. B. Representación del conteo en forma de gráfica de barras para mostrar la reproducibilidad de los conteos.

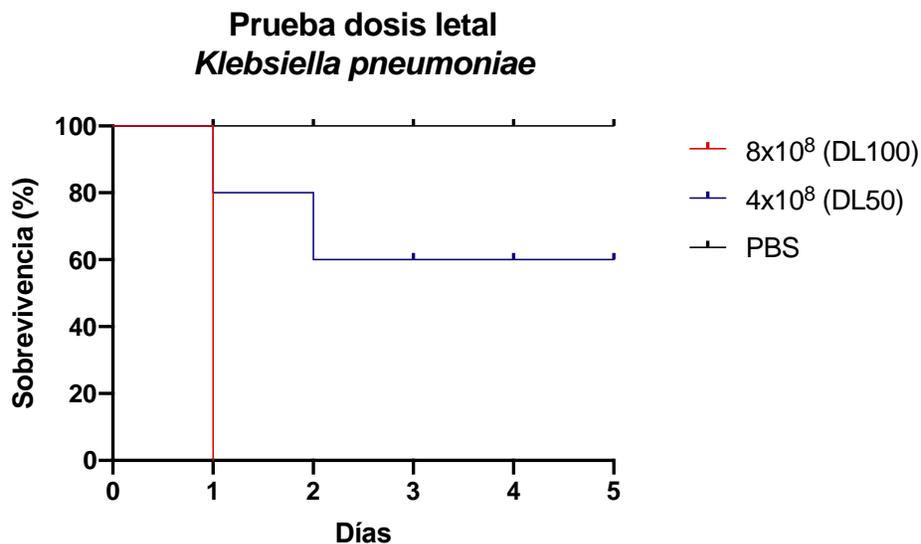


Figura 20. Ensayo de dosis letal 100 con una carga bacteriana de 8×10^8 UFC de *K. pneumoniae* ATCC 700603 y dosis letal 50 (4×10^8) aplicadas a 5 ratones BALB/c por grupo. Con la DL100 murieron todos los ratones y con DL50 sobrevivieron 3 ratones.

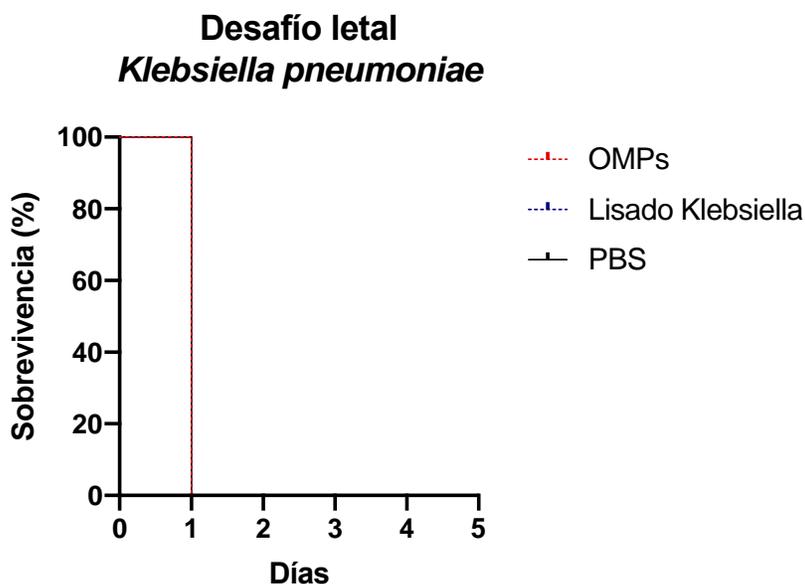


Figura 21. Desafío letal con 8×10^8 UFC de *K. pneumoniae* ATCC 700603 en ratones BALB/c previamente inmunizados con una mezcla de OMPs, con un lisado de *K. pneumoniae* (control positivo) o con PBS (control negativo). Se observa la muerte de los ratones de nuestros tres grupos.

Entonces, ya que corroboramos que los ratones tenían anticuerpos contra las OMPs y que la dosis letal estaba bien calculada, realizamos el ensayo 10 días después de la última inmunización. Los ratones fueron administrados con 8×10^8 UFC (DL100) de *Klebsiella pneumoniae*, por vía intraperitoneal; sin embargo, contrario a lo esperado, a las 24 horas se observó que todos los ratones de nuestros 3 grupos habían muerto (**Figura 21**). El conteo de placas de la dosis administrada a los ratones corroboró que habíamos aplicado la concentración bacteriana correcta, así que interpretamos que la inmunización con las OMPs no fue protectora, y que nuestro control positivo (lisado de *Klebsiella*) tampoco funcionó.

DISCUSIÓN

La enterobacteria *Klebsiella pneumoniae* resistente a múltiples antibióticos es responsable de una gran cantidad de infecciones que son adquiridas en hospitales (infecciones nosocomiales) y adquiridas en la comunidad, como: infecciones en vías urinarias, neumonía, bacteremia, meningitis e incluso abscesos hepáticos, afectando principalmente a personas con un sistema inmunodeprimido y neonatos (Asoni et al., 2021). En México, la resistencia a antibióticos es un grave problema de salud pública, en un estudio realizado en el 2018 se analizaron tasas de resistencia de varios patógenos como: *Enterobacter*, *K. pneumoniae*, *A. baumannii*, entre otros, frente a diversos antibióticos. Reportando a *K. pneumoniae* con un 12% de resistencia a carbapenémicos de manera similar con *Enterobacter*. En dicho estudio se encontró que *K. pneumoniae* representa al segundo patógeno con la tasa más alta en MDR con 22.6% (Garza González et al., 2019). Es por ello, que el desarrollo de vacunas contra *K. pneumoniae* es una necesidad, y una prioridad para varios países al ser un método más prometedor, rentable y eficaz que el desarrollo de nuevos antibióticos.

En el presente trabajo, evaluamos el potencial profiláctico de las proteínas recombinantes OMP40, 61 y 70 para prevenir infecciones causadas por *K. pneumoniae*. Actualmente no existe ninguna vacuna aprobada por FDA para la prevención de infecciones por *K. pneumoniae*, sin embargo, en los últimos años se han hecho diversos estudios para desarrollar vacunas utilizando lipopolisacáridos (LPS), polisacáridos capsulares (CPS) entre algunos otros componentes que son factores de virulencia de *K. pneumoniae*, incluyendo algunos donde se han evaluado OMPs (Mehmood et al., 2020). Ya sea de forma individual o en combinación con otros antígenos, se ha visto que las proteínas utilizadas tuvieron un efecto positivo en la generación de anticuerpos. Uno de los primeros estudios de este tipo, fue el de Kurupati, 2011 en donde se probó la eficacia protectora de una vacuna de ADN que codificaba a OmpA y OmpK36, un par de porinas de *K. pneumoniae*, en ratones que fueron administrados por vía intramuscular e intradérmica cada 2 semanas en un total de 4 inyecciones. Estos ratones fueron enfrentados a una dosis letal 50, teniendo como resultado un alto nivel de protección con

el ADN de las OMPs que fueron administrados por vía intradérmica más que por la vía intramuscular. Posteriormente, Babu y colaboradores en 2017 evaluaron la protección de la vacuna recombinante rAK36 compuesta por los antígenos OmpA y OmpK36 en un modelo murino, la primera inmunización se realizó por vía subcutánea con 50 µg de antígeno, seguido de 3 refuerzos por vía intraperitoneal con la misma cantidad de antígeno y reportaron una producción significativa de anticuerpos. Además, los ratones inmunizados fueron desafiados con una dosis letal 50 a la cual sobrevivieron. Un año después, Hussein y colaboradores probaron las proteínas OmpK17 y OmpK36 (porinas), cada una con tres diferentes adyuvantes [Matriz potenciadora de grampositivos (GEM), hemozoína (Hz) y adyuvante incompleto de Freund (IFA)] que fueron administrados por vía subcutánea, seguido de dos refuerzos por la misma vía, y después por vía intraperitoneal fueron enfrentados a una dosis letal 50 (DL50). En el ensayo ELISA realizado se muestra la generación de anticuerpos con altos títulos para OmpK17 con IFA, en donde los ratones sí lograron sobrevivir al reto, sin embargo, para OmpK36 aunque se mostraron títulos favorecedores de anticuerpos, al ser administrados con otro adyuvante, los ratones no lograron sobrevivir frente al reto letal. Por ello, vemos que es importante la selección del tipo de adyuvante que se administra en conjunto con el antígeno, para la adecuada activación de la respuesta inmune y la generación de anticuerpos protectores.

Los adyuvantes cumplen una función importante al activar, potenciar y modular al sistema inmune tanto humoral como celular, en la generación de anticuerpos, y de esta forma se puede tener una protección vacunal más completa (Cárdenas Vargas et al., 2016). En los estudios antes mencionados, se utiliza el adyuvante completo de Freund (Babu 2017), el adyuvante incompleto de Freund (Hussein, 2018), Hz (Hussein, 2018) y GEM (Hussein 2018). Los adyuvantes completo e incompleto de Freund son de los más utilizados en la investigación, dado que es considerado de los más poderosos al ser una emulsión de agua en aceite mineral mezclado con micobacterias muertas, sin embargo, es reactogénico para el ser humano (Batista et al., 2014). Mientras que GEM es un nuevo sistema de inmunoadyuvante, son partículas derivadas de *Lactococcus lactis* a las que se les eliminó el ADN y la mayoría de las proteínas, dejando solo el peptidoglicano de la

pared celular (Hussein, 2018). Por otro lado, Hz es un análogo químico de la hemozoína generada por el parásito de la malaria, y tiene un potente efecto adyuvante en diversos modelos animales (Lee et al., 2016a). Para este proyecto utilizamos el adyuvante AddaVax que es una nano emulsión compuesta de aceite de escualeno en agua y actúa en el reclutamiento y activación de las células presentadoras de antígeno. El AddaVax tiene una formulación semejante a la de MF59 que es un adyuvante aprobado para su uso en humanos. El aceite de escualeno es biodegradable lo que le permite metabolizarse más fácilmente que el aceite de parafina que es el que se utiliza en los adyuvantes de Freund (Cárdenas et al., 2016).

En este trabajo, fueron utilizadas las proteínas OMP40, 61 y 70 en combinación y complementadas con adyuvante AddaVax para la inmunización de los ratones Balb/c. Las proteínas recombinantes fueron previamente purificadas por cromatografía de afinidad, ya que tenían una etiqueta de histidinas que les permitía unirse al níquel en la columna, lo que nos ayudó a tener una mayor pureza de las proteínas. Al realizarse los ensayos de cuantificación de las proteínas, obtuvimos una cantidad favorecedora de proteína para OMP 61 y 70, con respecto a OMP40, ya que la cantidad de proteína fue menor. Lo anterior se pudiera relacionar a que la purificación del OMP40 se realizó en condiciones híbridas, lo que pudo ocasionar pérdida de proteína en los lavados e incluso de podría atribuir a que se perdió al quedarse en los cuerpos de inclusión al momento de la sonicación, por eso es que fue nuevamente producida y purificada para su uso en las inmunizaciones.

La primera inmunización se realizó por vía subcutánea, al ser una de las vías más inmunogénicas junto a la vía intradérmica, ya que son las que permiten un contacto más prolongado del antígeno con las células dendríticas, estas células son las que ayudarán a la estimulación de las respuestas inmunitarias. Los refuerzos fueron por vía intraperitoneal, esta segunda vía es un poco menos inmunogénica, sin embargo, es la más utilizada y considerada una de las vías más rápidas, aunque también existe el riesgo de perforación de órganos lo que puede ocasionar la muerte del individuo. Con los sueros pre y post inmunes se pudo evaluar la seroconversión, al analizar los sueros obtuvimos

como resultado la generación significativa de anticuerpos contra OMP61 y 70 y una menor cantidad para OMP40. Sin embargo, aunque se generaron anticuerpos los ratones no sobrevivieron al reto letal administrado por vía intraperitoneal con 8×10^8 UFC de *K. pneumoniae*. A pesar de haber estandarizado la dosis letal, puede ser que aun así la misma haya sido un tanto alta en la carga bacteriana, y que por ello, los ratones no lograron sobrevivir frente al reto. El hecho de que los ratones inmunizados con el lisado de la bacteria completa no hayan sobrevivido tampoco, apoya esta teoría. Otra opción, es que los anticuerpos no sean protectores porque no logren unirse a la bacteria, posiblemente por la presencia de la cápsula. Como se mencionó en antecedentes, la selección de los antígenos se realizó de manera bioinformática por vacunología reversa, considerando aquellas proteínas que se encontraran en la membrana externa de la bacteria, además únicamente se produjeron los dominios expuestos de estas OMP's. De manera que existe la posibilidad de que los anticuerpos generados estén dirigidos contra regiones de las proteínas no totalmente accesibles en las bacteria intactas. Para determinar si este es el caso se necesitan hacer más estudios evaluando el suero inmune con la bacteria completa.

Respecto a la cepa utilizada para los ensayos de desafío letal, empleamos la cepa *Klebsiella pneumoniae* ATCC 700603, la cual corresponde a la subespecie *quasipneumoniae* que fue aislado de la orina de un paciente hospitalizado en Richmond, Virginia. Esta bacteria produce betalactamasa SHV-18 y se usa como control para la producción de betalactamasa de espectro extendido. Este organismo es una cepa de control de calidad CLSI para pruebas de susceptibilidad antimicrobiana (*Klebsiella quasipneumoniae* Brisse et., al 700603, s.f.). En comparación con otros estudios, Hussein y colaboradores (año) emplearon la cepa ATCC 10031 de la cual no se menciona su sensibilidad a antibióticos, Babu y colaboradores (año) utilizaron una cepa hipervirulenta (serotipo K1) para el análisis con la DL50, mientras que, Kurupati y colaboradores (año) no mencionan la cepa que utilizaron. Las diferencias en la virulencia de la cepa a emplear se relacionan con la dosis que se debe de administrar a los ratones en el desafío letal. Por ello, posiblemente algunos autores optan por emplear una DL50 en vez de una DI100.

En la literatura consultada, se mencionan a las OMPs como posibles candidatos vacunales, ya que producen un significativo título de anticuerpos. Como sucedió en este proyecto en el cual se observó la producción de anticuerpos con las proteínas de membrana externa evaluadas. Se han realizado estudios con otros componentes de la bacteria *K. pneumoniae* como en el trabajo de Lavender y colaboradores (2011), en el cual inmunizaron ratones con las fimbrias tipo 3 y luego los enfrentaron con un reto letal (DL100), al cual no lograron sobrevivir. Mismo fue el caso del estudio con vesículas extracelulares de Lee y colaboradores (2016b) en el que se usó un esquema de inmunización de 3 inyecciones con las vesículas cada semana, y al aplicar la DL 50 los ratones no sobrevivieron. También, se han realizado estudios como el de Wang y colaboradores (2017) de inmunización pasiva, para esto se realizaron inmunizaciones en ratones con un aislado resistente a múltiples fármacos por vía intranasal y los anticuerpos anti-MrkA se administraron por vía intraperitoneal a otro grupo de ratones, 24 horas antes del desafío bacteriano al cual no lograron sobrevivir. Hacer ensayos de inmunización aplicando una dosis letal es muy importante para saber si los antígenos inoculados confieren una protección vacunal completa, ya que se han publicado trabajos como el de Seeberger y colaboradores (2017), en el que se evaluó un glicoconjugado semisintético obteniendo altos títulos de anticuerpos. Sin embargo, no hicieron ensayos de letalidad para comprobar la protección de manera completa dado que la cepa de la cual derivaron los anticuerpos mencionan que es avirulenta en ratones, por lo que analizaron la función de los anticuerpos mediante un ensayo de opsonofagocitosis, quedando la incógnita si de verdad proporcionan protección en un modelo *in vivo*.

En conjunto, la investigación y realización de estudios de inmunización empleando OMPs es prometedora para la identificación de nuevos candidatos vacunales. Existen diferentes estrategias para la identificación de estos candidatos vacunas como es el caso de Lundberg y colaboradores (2013), quienes utilizaron una estrategia de ANTIGENoma, para identificar antígenos conservados entre diversos serotipos de *K. pneumoniae* y los probaron en un modelo de sepsis letal en ratones. Entre ellos, identificaron algunos que sí brindan protección mediante ensayos de desafío letal. A pesar de que este es un enfoque novedoso y eficaz, es más costoso que la vacunología reversa, pues se requiere

de expresar todos los antígenos para determinar cuáles son protectores. Además, en este proyecto el enfoque que empleamos nos permitirá identificar candidatos vacunales contra *Klebsiella pneumoniae* y *Enterobacter cloacae* (otra enterobacteria multirresistente), por lo que posteriormente se podrían probar las mismas proteínas como antígenos vacunales y evaluar si protegen contra la infección con *Enterobacter cloacae*.

CONCLUSIONES

En este presente proyecto, se evaluó la capacidad protectora de OMP40, OMP61 y OMP70 de *Klebsiella pneumoniae* en ratones Balb/c frente a un reto letal. Para ello, se produjeron y purificaron las proteínas OMP61 y OMP70 en condiciones nativas. Mientras que OMP40 no pudo ser obtenida en la fracción soluble, por lo cual se purificó en condiciones híbridas para OMP40, empleando urea para su extracción y obteniendo la proteína nuevamente de forma nativa durante la purificación en la columna. Realizamos ensayos de inmunización empleando una mezcla de las OMPs, PBS como control negativo y un lisado de *Klebsiella* como control positivo. Concluimos que la inmunización fue exitosa dado que se observó seroconversión para cada una de las proteínas los ratones inmunizados. Consideramos fundamental la realización de las 3 inmunizaciones, dado que tras la tercera inmunización la cantidad de anticuerpos incrementó significativamente. Por otro lado, al realizar las curvas de crecimiento bacteriano y el conteo de placas, determinamos que los ensayos eran reproducibles. Además, cuando probamos las dosis letales 100 y 50, previamente estandarizadas por nuestro grupo de investigación, concluimos que son correctas, correspondiendo la DL100 a 8×10^8 UFC y la DL50 a 4×10^8 UFC. Finalmente, los ratones inmunizados y los grupos control fueron retados con la dosis letal 100 de *K. pneumoniae*, y se evaluó su sobrevivencia. Los ratones de todos los grupos murieron dentro de un período de 24 horas. Con ello, determinamos que hubo generación de anticuerpos contra las OMPs de interés, pero éstos no fueron protectores, siendo importante mencionar que cada una de las proteínas se encontraban fusionadas a una etiqueta de histidinas, lo que posiblemente pudo sesgar la respuesta inmunitaria del ratón. De acuerdo con nuestra hipótesis, la inoculación de OMPs de *K. pneumoniae* en ratones Balb/c indujo la inmunidad activa, pero ésta no los protegió contra un reto letal. Consideramos que es fundamental repetir el ensayo del desafío letal, dado que por cuestiones de tiempo solamente se realizó una vez y es clave para obtener conclusiones y para determinar la investigación futura.

PERSPECTIVAS

Consideramos que los experimentos posteriores deben ir enfocados principalmente en el ensayo del desafío letal: 1) Repetir el experimento para corroborar los resultados. 2) Aplicar otra dosis bacteriana más baja, considerar cambiar la dosis letal 100 por una dosis letal 50, para asegurarse de no exceder la carga bacteriana que podría ser la razón de que no sobreviviera el control positivo. 3) Probar la DL100 de *Enterobacter cloacae* en los ratones inmunizados, dado que los antígenos seleccionados están presentes en ambas bacterias. 4) Probar inmunizar con las proteínas sin la etiqueta de histidinas.

Además, podría modificarse el esquema de inmunización, es decir, se pudiera extender el tiempo entre cada inmunización, incrementar la concentración de proteína a administrar, e incluso se podría agregar una cuarta inmunización para obtener un mayor título de anticuerpos. Se podría considerar también cambiar y probar otro adyuvante, así como las vías de administración, que son importantes factores al momento de realizar la inmunización.

Otra posibilidad de probar la protección brindada por los anticuerpos es emplear el suero de los ratones inmunizados en ensayos de inmunización pasiva, es decir, administrarlos a otro grupo de ratones y enfrentarlos ante una dosis bacteriana de *Klebsiella*. También podría analizarse la carga bacteriana en los tejidos de los animales inmunizados y enfrentados con un reto bacteriano, para determinar si ésta es menor en los ratones que generaron anticuerpos.

Referencias

- Abbas, A. K. (2017). *Cellular and Molecular Immunology* (9th ed.). ELSEVIER.
- Agaba, P., Tumukunde, J., Tindimwebwa, J., & Kwizera, A. (2017). Nosocomial bacterial infections and their antimicrobial susceptibility patterns among patients in Ugandan intensive care units: a cross sectional study. *BMC Research Notes*, 1-12.
- Ahmad, T. A., Sayed, L. H., Haroun, M., Hussein, A. A., & Ashry, E. S. (2012). Development of immunization trials against *Klebsiella pneumoniae*. *Vaccine*, 2411-2420.
- Alós, J. (2015). Resistencia bacteriana a los antibioticos: una crisis global. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*, 692-699.
- Asoni, L., Girardel, R., Rojas Converso, T., & Darrieux, M. (2021). Current Stage in the Development of *Klebsiella pneumoniae* Vaccines. *Infect Dis Ther.*, 2157-2175.
- Babu, L., Uppalapati, S. R., Sripathy, M. H., & Reddy, P. N. (2017). Evaluation of Recombinant Multi-Epitope Outer Membrane Protein-Based *Klebsiella pneumoniae* Subunit Vaccine in Mouse Model. *Frontiers in Microbiology*, 1-12.
- Batista Duharte, A., Lastre, M., & Pérez, O. (2014). Adyuvantes inmunológicos. Determinantes en el balance eficacia-toxicidad de las vacunas contemporáneas. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*, 106- 114.
- Bengoechea, J. A., & Pessoa, J. S. (2019). *Klebsiella pneumoniae* infection biology: living to counteract host defences. *FEMS Microbiology Reviews*, 123-144.
- Bradford, P. (2001). Extended-spectrum beta-lactamases in the 21st century: characterization, epidemiology, and detection of this important resistance threat. *Clinical microbiology reviews*, 933-951.

- Calvo, J., & Martínez Martínez, L. (2008). Mecanismos de acción de los antimicrobianos . *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*, 44- 52.
- Cárdenas Vargas, A., Pedroza Roldán , C., & Elizondo Quiroga , D. (2016). Adyuvantes para vacunas: tipos, aplicaciones y modos de acción . *Revista Mexicana de Ciencias Farmacéuticas* , 29- 47 .
- Cubero González, M. (2015). *Epidemiología molecular, factores de virulencia y caracterización de los mecanismos de resistencia de Klebsiella pneumoniae*. UNIVERSITAT DE BARCELONA.
- Eftekhar, F., & Naseh, Z. (2015). Extended-spectrum β -lactamase and carbapenemase production among burn and non-burn clinical isolates of *Klebsiella pneumoniae*. *Iranian Journal of Microbiology*, 144-149.
- ELSEVIER. (24 de 02 de 2021). Obtenido de <https://www.elsevier.com/es-es/connect/medicina/edu-inmunologia-inmunidad-activa-y-pasiva-caracteristicas-y-diferencias>
- Epidemiology and Prevention of Vaccine-Preventable Diseases 13th Edition. (2015). CDC. Obtenido de <https://www.cdc.gov/vaccines/pubs/pinkbook/index.html>
- Ferreira, J., & Porco, A. (2008). Vacunas derivada del análisis de los genomas: vacunología. *Interciencia*, 353-358.
- García Palomo, J. D., Agüero Balbín , J., & Santos Benito, M. F. (2010). García Palomo JD, Agüero Balbín J, Parra Blanco JA, Santos Benito MF. Enfermedades infecciosas. Concepto. Clasificación. Aspectos generales y específicos de las infecciones. Criterios de sospecha de enfermedad infecciosa. Pruebas diagnósticas complementar. *Medicina*, 3251-3264.

- Garza González, E., Morfín Otero, R., Mendoza Olazarán, S., Bocanegra Ibarias, P., Flores Treviño, S., Rodríguez Noriega, E., . . . Camacho Ortiz, A. (2019). A snapshot of antimicrobial resistance in Mexico. Results from 47 centers from 20 states during a six-month period. *PLOS ONE*, 1 - 13.
- Goycochea Valdivia, W. A. (2018). Vacunología inversa: Abriendo paso al futuro para el desarrollo de nuevas vacunas. *Conferencia Inaugural*, 1-6.
- Gutiérrez Muñoz, J., Ramírez Corona, A., Martínez Bustamante, M. E., Coria Lorenzo, J., Armenta Gallejos, L., Ayala Franco, J. R., . . . Suárez Cuenca, J. A. (2017). Estudio multicéntrico de resistencias bacterianas nosocomiales en México. *Revista Latinoamericana de Infectología Pediátrica*, 68-75.
- Hage, D. S., Anguizola, J. A., Bi, C., Li, R., Matsuda, R., Papastavros, E., . . . Zheng, X. (2012). Pharmaceutical and biomedical applications of affinity chromatography: Recent trends and developments. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 93-105.
- Hussein, K. E., Bahey-El-Din, M., & Sheweita, S. A. (2018). Immunization with the outer membrane proteins OmpK17 and OmpK36 elicits protection against *Klebsiella pneumoniae* in the murine infection model. *Microbial Pathogenesis*, 12-18.
- Jann Lee, M., Igari, Y., Tsukui, T., Ishii, K., & Cobán, C. (2016). Current status of synthetic hemozoin adjuvant: A preliminary safety evaluation. *Vaccine*.
- Jansen, K., Knirsch, C., & Anderson, A. S. (2018). The role of vaccines in preventing bacterial antimicrobial resistance. *Nature medicine*, 10-20.
- Kanampalliwar, A. M. (2020). Reverse Vaccinology and Its Applications. *Methods in Molecular Biology*, 1-16.

Kang, J.-G., Lee, H.-W., Ko, S., & Chae, J.-S. (2018). Comparative proteomic analysis of outer membrane protein 43 (omp 43)-deficient *Bartonella henselae*. *Journal of veterinary science*, 59-70.

Kapoor, G., Saigal, S., & Flongavan, A. (2017). Action and resistance mechanisms of antibiotics: A guide for clinicians. *Journal of anaesthesiology, clinical pharmacology*, 300-305.

Kindt, T. J., Goldsby, R. A., & Osborne, B. A. (2007). *INMUNOLOGÍA de Kuby*. McGraw-Hill.

Klebsiella quasipneumoniae Brisse et al 700603. (s.f.). Obtenido de ATCC: <https://www.atcc.org/products/700603>

La OMS publica la lista de las bacterias para las que se necesitan urgentemente nuevos antibióticos (27 de Febrero de 2017). Organización Mundial de la Salud: <https://www.who.int/es/news/item/27-02-2017-who-publishes-list-of-bacteria-for-which-new-antibiotics-are-urgently-needed>

Magiorakos, A., Srinivasan, A., Carey, R., Carmeli, Y., Falagas, M., C.G., G., . . . Monnet, D. (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: the official publication of the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*, 268-281.

Mahlapuu, M., Hakansson, J., Ringstad, L., & Björn, C. (2016). Antimicrobial Peptides: An Emerging Category of Therapeutic Agents. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 1-12.

Manual MSD . (Octubre de 2020). Obtenido de <https://www.msdmanuals.com/es-mx/hogar/infecciones/inmunizaci%C3%B3n-vacunaci%C3%B3n/introducci%C3%B3n-a-la-inmunizaci%C3%B3n-vacunaci%C3%B3n#:~:text=Hay%20dos%20tipos%20de%20inmunizaci%C3%B3n,Inmunizaci%C3%B3n%20pasiva>

Mehmood , A., Naseer, S., Ali, A., Fatima, H., Rehman, S., & Karim Kiani, A. (2020). Identification of novel vaccine candidates against carbapenem resistant *Klebsiella pneumoniae*: A systematic reverse proteomic approach. *Computational biology and chemistry*.

Mulani, M. S., Kamble, E. E., Kumbar, S. N., Tawre, M. S., & Pardesi, K. R. (2019). Emerging Strategies to Combat ESKAPE Pathogens in the Era of Antimicrobial Resistance: A Review. *Frontiers in Microbiology* , 1-24.

Muñoz Price, S., Poirel, L., Bonomo, R., Schwaber, M., Daikos, G., Cormican, M., . . . Quinn, J. (2013). Epidemiología clínica de la expansión global de las carbapenemasas de *Klebsiella pneumoniae*. *Lancet Infect Dis.*, 785-796.

Murphy, K., Travers, P., & Walport, M. (2008). *INMUNOBIOLOGÍA DE JANEWAY* (Séptima ed.). McGrawHill.

Nordmann, P., Dortet, L., & Poirel, L. (2012). Carbapenem resistance in Enterobacteriaceae: here is the storm! *Trends in molecular medicine*, 263-272.

Oleksiewicz, M. B., Nagy, G., & Nagy, E. (2012). Anti-bacterial monoclonal antibodies: Back to the future? *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 124-131.

Oteo Iglesias, J. (2019). Cromptiendo la resistencia a antibióticos. *RIECS*, 84-89.

- Paczosa, M. K., & Mecsas, J. (2016). *Klebsiella pneumoniae*: Going on the Offense with a Strong Defense. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 629-661.
- Paterson, D. L., & Bonomo, R. A. (2005). Extended-spectrum beta-lactamases: a clinical update. *Clinical microbiology reviews*, 657-686.
- Patti, J. M. (2004). A humanized monoclonal antibody targeting *Staphylococcus aureus*. *Vaccine*, S39-S43.
- Pérez Cano, H. J., & Robles Contreras, A. (2013). Aspectos básicos de los mecanismos de resistencia bacteriana . *Revista Médica MD*, 186-191.
- Pitout, J. D., Nordmann, P., & Poirel, L. (2015). Carbapenemase-Producing *Klebsiella pneumoniae*, a Key Pathogen Set for Global Nosocomial Dominance. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 5873-5884.
- Prigau, C. (2013). Infecciones del trato urinario nosocomiales. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica* , 614-624.
- Pujol, M., & Limón, E. (2013). Epidemiología general de las infecciones nosocomiales. Sistemas y programas de vigilancia. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica* , 108-113.
- Rappuoli, R. (2000). Reverse vaccinology. *Current opinion in microbiology*, 445-450.
- Rivas Santiago, B., Sada, E., Hernández Pando, R., & Tsutsumi, V. (2006). Péptidos antimicrobianos en la inmunidad innata de enfermedades infecciosas. *Salud Pública Mex.*, 62-71.
- Rodríguez Noriega, E., León Garnica, G., Petersen Morfin, S., Pérez Gómez, H. R., González Díaz, E., & Morfin Otero, R. (2014). La evolución de la resistencia bacteriana en México, 1973-2013. *Biomédica*, 181-190.

- Ruíz, G., Moreno, M., López, M., & Vega, M. (2007). Anticuerpos monoclonales terapéuticos. *Genoma España Anticuerpos monoclonales terapéuticos*, 1-120.
- Segundo A., N., Hernández B., E., López V., O., & Torres A., O. (2010). Los bacteriófagos como una alternativa en el tratamiento de enfermedades infecciosas Bacterianas (Fagoterapia). *Revista Mexicana de Ciencias Farmacéuticas*, 17-26.
- Seija, V., & Vignoli, R. (2006). Principales grupos de antibióticos . *Temas de bacteriología y virología médica*, 631- 647.
- Suárez , C., & Gudiol, F. (2009). Antibióticos betalactámicos. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*, 116-129.
- Tafur , J. D., Torres, J. A., & Villegas, M. V. (2008). Mecanismos de resistencia a los antibióticos en bacterias Gramnegativas. *Asociación Colombiana de Infectología*, 217-225.
- Téllez Sosa, J., González Sánchez, H. M., & Martínez Barnetche, J. (2020). Anticuerpos monoclonales humanos una alternativa para tratar infecciones por bacterias resistentes a antibióticos. *Biotecnología en movimiento*, 20-24.
- The QIAexpression and purification of 6xhis-tagget proteins . (s.f.).
- Vacunas. (2007). En T. J. Kindt, R. A. Goldsby, & B. A. Osborne, *INMUNOLOGÍA de Kuby* (págs. 475-492).
- Vera Leiva, A., Barría Loaiza, C., Lima, C., Aguayo Reyes, A., Dominguez , M., Bello Toledo, H., & González Rocha , G. (2017). KPC: Klebsiella pneumoniae carbapenemasa, principal carbapenemasa en enterobacterias. *Revista chilena de infectología*, 476-484.

Zurawski, D. V., & McLendon, M. K. (2020). Monoclonal Antibodies as an Antibacterial Approach Against Bacterial Pathogens. *Antibiotics*, 1-12.



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL
ESTADO DE MORELOS



FACULTAD
DE CIENCIAS
BIOLÓGICAS

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS
Secretaría Académica

Licenciatura en Biología, Programa Educativo de Calidad.

Cuernavaca, Mor., 13 de marzo del 2024

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: **C. MARTÍNEZ MORA ALONDRA YARELI**, con el título del trabajo: **EVALUACION DE LA INMUNIDAD ACTIVA INDUCIDA POR OMPS DE *Klebsiella pneumoniae* EN UN MODELO MURINO**. En calidad de miembros de la comisión revisora, consideramos que el trabajo reúne los requisitos para optar por la Modalidad de Titulación por Tesis Profesional por Etapas como lo marca el artículo 26° del Reglamento de Titulación Profesional vigente de la Universidad Autónoma del Estado de Morelos.

Atentamente
Por una humanidad culta

JURADO REVISOR

FIRMA

PRESIDENTE: DRA. MARÍA LUISA DEL CARMEN GARDUÑO RAMÍREZ

SECRETARIO: M. EN B. LUIS ENRIQUE CRÚZ TRUJILLO

VOCAL: DRA. HILDA MINERVA GONZÁLEZ SÁNCHEZ

SUPLENTE: DRA. NAYELI MONTERROSAS BRISSON

SUPLENTE: DR. JUAN MAURICIO TÉLLEZ SOSA





UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL
ESTADO DE MORELOS

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

LUIS ENRIQUE CRUZ TRUJILLO | Fecha:2024-03-14 14:37:26 | Firmante

iWTJ4wsZuQpAOage/4uu2KS4i/6qSmxCj7cZLYr+q2g55kJI5CRMgZFOqmae5/teggM6hJkdCTJOWbINfMWTlksvA2BrAQZTEgccWPyf5G6vzzXIWdi5r0tqddYSpKfSGHY4asNnfkJEK19qpH2usYQ0vkNDCXr7WlZ3ZnkmC57mX8rH3ffKtz2vc/IIIdg8yvAcN+gWJzv6l6T8L2POOBMIJ8cFmepUdVXqv8yGms5CyC2O+Fkg+tXAOumir3V6M5MKUu9qpgJCxiJ8g8SJRvaqJYQfZL8unnh2bVslqXM0tJLLowlS6uNBaysqC3GrD04hyR0SZGyfwXfbRYBdw==

HILDA MINERVA GONZÁLEZ SÁNCHEZ | Fecha:2024-03-14 15:02:55 | Firmante

Y2eAFhTTdXpOBA8hsrccNe3u2McXZZL/JOW8rUN0InflaRLEy4bjd6yLbAwqLdTch677GwNBNkWRr9yIFNI3GkXHvAjhWDvyBkdGstEEV5AsDCuDiyBkihTetFaqjEPHjEWsxgYedNo+INmaT5Jm6WRuFF4Woc2lxE/BZY0d9vQ1JDGkZbjkjELpFSyrz1A8CEyFi7L2CkzdFhUhPqdaGn8EamOiS6OxQFWS7YG+rREZ0MNAyUFDCCq+1/eB4Mf10C5xo1zVpOMgvUeexX8eM2/KcwYRBMieMMDFe2zX5hPjQ1QBCX529EnQb/QCFuPNYUUAeEndR4KpSO2YphdQ==

JUAN MAURICIO TÉLLEZ SOSA | Fecha:2024-03-14 19:53:28 | Firmante

aAOrJ52N+K0a0SgehpKxgWYkVpbfW70ezV38Ojydc7mtJPAy+RSbxK7M6mTY6jyg7c7GpERcUqXQv6HbleP1AZy0/C3wegdt72cv9DGdJADTnhvf5X/Dm8R4nHMSFRBuwLtgfwrekJhNg7AD9xN1aXWzVDlaXSOBpejg/dcuV+8/0bCAs12tFGAVDMjDkaArLg4CR809SJUUqa3bfEGVJT0DbXlgGSfocrwFvVeGOG511QZx7IVG73PAcl4KITFFHEFMlhYBMmXhC3t2ZDOIX/3auD/wMOQPWwBLPla42sdQXv5LXI/DrS2ybBZGPRRe7c1IDpmC6B19ILs3J+D61w==

MARIA LUISA DEL CARMEN GARDUÑO RAMIREZ | Fecha:2024-03-19 09:27:03 | Firmante

YwgozDc5nMSzDmW2WTWMT7kQnqaD+aHnBqoXHgFONnA5GGXAakCHQEvGJiEgqZc8C4zccacP8Qhkv+6YW4ZTC48FSF77eDB43/JAWzi41SP2nDbhjLI2OZax6yGpR9DKufztI3UAIEP8Ad7+wjskiM7IZLCYHqfr4g49EN0NDx/7K8nSivCUk9xT8a1Ooux+B81ptwRR6wttAHZC072QkyfsM8ro2Z0POX/xlV5rfRbilk+HBh2mHJez30PXXqKW+88xM697K8Lg0E/m3y/VkGiiS++pdacftxO1GPLQknf8fEJ7TQdgrf5YFIFDdvqHhNemNqyZx+jk+J2Tc6whA==

NAYELI MONTERROSAS BRISSON | Fecha:2024-03-19 23:36:05 | Firmante

sMwxgN7UIC8MBUko/MmvJleP361rmfDdwa1WlviGZ/4cwQT0G36liKJB8FFRDHxULHnqkT5nv+yIhZBTITEEMZtnYq4Qlitr195SMTukOIWT9DPyrdrvYHII7SN12Ddxoor4L29jpN8HrEHOiWv8hBKEt46MfOJoo1T/3kkC8Jo6nb922nZF+QI2Iw4FnTf1JyecwLnn+wGzPL+ffapsb4ss12s+fduP8LHZW3Yx5/Y2+c3oixXlYJlqMmibeY6szTuZ5PcGAU4XxiEvMbWhzDUq3iS3Gtw4438FYQws7x+EDxV+NH6/77TRYCGFM1m8BSuZNoiOtePRKYKIAH4Pw==

Puede verificar la autenticidad del documento en la siguiente dirección electrónica o escaneando el código QR ingresando la siguiente clave:



Te3uYIZgQ

<https://efirma.uaem.mx/noRepudio/zRGellaJzviVtsa7Au4pOAvtqK72qV3z>



UAEM
RECTORÍA
2023-2029