



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA
DE MÉXICO

“Análisis de los mecanismos de virulencia de
Klebsiella pneumoniae”.

TESINA

Para obtener el título de:

BIÓLOGO

PRESENTA

ALONDRA MURGUÍA RODRÍGUEZ

DIRECTORA DE TESIS

Dra. Gloria Luz Paniagua Contreras

PROYECTO FINANCIADO POR LA DGPA, UNAM,
PAPIIT IN225020



Facultad de Estudios Superiores
IZTACALA

Los Reyes Iztacala, Edo. Méx. 2021



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

Agradecimientos

A la Dra. Gloria Luz Paniagua por brindarme la oportunidad de estar en su laboratorio, además de dirigir mi trabajo.

Al Dr. Erick Monroy López, por brindarme apoyo y orientación en la elaboración de este trabajo.

A la Máxima casa de estudios, UNAM, por forjarme en mi carrera y brindarme la información, así como el conocimiento con el que egreso.

Agradecimientos personales

A mi padre Jorge Murguía Valencia porque sin él no habría llegado a este punto de mi vida. Padre mío te debo tanto, te agradezco todo lo que me has enseñado y lo que me has dado a base de tu esfuerzo y sudor. Para ti y por ti es este trabajo, nadie lo merece más que tú; eres la razón de mi inclinación a la ciencia y eres el por qué aún me faltan muchos logros. Siéntete orgulloso, este es el resultado de tantos años de esfuerzos, enseñanzas y complicaciones. En mi corazón siempre va a estar presente que hiciste todo lo humanamente posible para permitir que cada uno de tus hijos alcanzará su meta, e inclusive para nunca rendirte y darnos la espalda. Tienes mi más sincera gratitud y admiración por tu perseverancia en estos 23 años de vida, gracias por no irte. Estas palabras no cubren la magnitud de mis emociones para expresarte todo lo que me siento en deuda contigo, porque si no fuera por ti, no habría logrado uno de los tantos sueños de mi vida. Gracias por existir, por dejar que existiera y por mostrarme la humildad. Te amo padre mío.

A mi hermano Jorge Murguía Rodríguez, mi pequeño. Hemos recorrido muchas situaciones juntos durante nuestra vida y agradezco haberte tenido a mi lado, ambos hemos crecido no sólo físicamente sino también mentalmente. Aún te quedan planes y metas por cumplir, espero en algún momento ser un apoyo para que logres lo que te falta. Nunca te rindas en tus sueños, puedes lograr todo lo que te propongas, pero nunca olvides que esa decisión conlleva sacrificios y ten siempre presente que debes tener los pies en la tierra. Te amo hermano mío.

A mi hermana Judith Alejandra Murguía Esquivel, mi niña. A pesar de ser tan chica he aprendido cosas de ti, de igual manera que a nuestro hermano, graba en tu mente y corazón que todo aquello que quieras hacer depende de ti, no te rindas, tú que apenas empiezas, fija una meta en tu mente y visualiza que la llevas a cabo, porque, así como los mayores pudimos, tú también eres capaz. No te rindas y siempre ve hacía adelante, eres tan capaz como nosotros y como tu padre. Te amo monito.

A Adrián Javier Romero Chaveste. Gracias por guiarme y enseñarme a través de este camino. Siempre estaré agradecida a ti y a tu familia por abrimme los brazos y acogirme en un lugar nuevo, por su tolerancia, cariño y respeto.

A mi amiga Cassandra García Barragán. Aún recuerdo cuando te llamaba pidiendo ayuda, gracias por ser un soporte en mi vida y en mi carrera. Has sido una persona fundamental en mi desarrollo como persona y como profesionista. Es increíble que sigamos llevándonos tan bien después de 10 años juntas, te amo demasiado Kass y eres lo mejor que pudo haberme pasado en la secundaria y en mi vida, por ello mereces un espacio aquí. Te adoro. Espero que sigamos juntas muchos años más.

A mi familia por formar parte de mi vida.

A mis compañeras y amigas Yuli y Mariana, porque siempre estuvieron ahí para mí escuchando mis problemas y apoyándome.

A mis amigos de la facultad, gracias por enseñarme y formar parte de mi vida.

A las personas que conocí a lo largo de mi vida universitaria, les agradezco por acompañarme en este trayecto.

Dedicatoria

A mi padre, Jorge Murguía Valencia.

A mis hermanos, Jorge Murguía Rodríguez, Judith Alejandra Murguía Esquivel y
Cassandra Raquel Cuadra Rodríguez.

A los que me acogieron en mi nueva casa durante 4 años.

A mi familia.

“Las especies que sobreviven no son las más fuertes, ni las más rápidas, ni las más
inteligentes; sino aquellas que se adaptan mejor al cambio”
- Charles Darwin –

“La ciencia reemplaza el prejuicio privado con evidencia pública y verificable”
- Richard Dawkins-

“Los seres vivos somos sistemas autopoieticos moleculares, sistemas moleculares
que nos producimos a nosotros mismos, y la realización de esa producción de sí
mismo como sistemas moleculares constituye el vivir”
- Humberto Maturana –

“Nada tiene sentido en la biología si no es a la luz de la evolución”
- Theodosius Dobzhansky-

Índice general

Agradecimientos	I
Agradecimientos personales.....	II
Dedicatoria	IV
Índice general.....	V
Lista de Figuras y tablas.....	VII
Abreviaturas	IX
Resumen	X
Objetivo	XI
1 INTRODUCCIÓN.....	1
1.1 Las bacterias y sus características	1
1.2 Familia Enterobacteriaceae.....	3
1.3 Especie <i>Klebsiella pneumoniae</i>	4
1.4 Sistemática del género <i>klebsiella</i>	6
1.5 Epidemiología	8
1.6 Resistencia a antibióticos	9
1.7 Factores de virulencia.....	13
1.7.1 Cápsula	14
1.7.2 Sideróforos.....	17
1.7.3 Fimbrias.....	22
1.7.4 OMP's	25
1.7.5 Porinas	27
1.7.6 LPS, función, composición y características	29
1.8 Particularidades de <i>K. pneumoniae</i>	35
1.8.1 <i>WabG</i> en <i>K. pneumoniae</i>	38
1.8.2 <i>waaG</i> codifica para proteínas glucosiltransferasas (GT) de la familia 4	40
1.8.3 Gen <i>uge</i> (uridin difosfato galacturonato 4-epimerasa) en <i>K. pneumoniae</i>	46
1.8.4 Transporte del LPS	51

1.9	Respuesta inmunológica tras la interacción con el LPS.....	57
2	Importancia de la caracterización molecular de <i>wabG</i> y <i>uge</i>	63
3	REFERENCIAS.....	65

Lista de Figuras y tablas

Tabla 1. Diferentes clasificaciones de *Klebsiella*

Tabla 2. Reacciones bioquímicas de las especies de *Klebsiella*.

Fig 1. Árbol filogenético derivado del análisis de la secuencia 16S rDNA de varios géneros de la familia *Enterobacteriaceae*.

Fig 2. Estructura química de los principales β -lactámicos.

Fig 3. Factores de virulencia bien caracterizados en *K. pneumoniae*, en cepas clásicas e HV.

Fig 4. Se han determinado diversas funciones de la cápsula como factor de virulencia en *K. pneumoniae*.

Fig 5. Producción de sideróforos y roles en la virulencia de *K. pneumoniae*.

Fig 6. Topología transmembrana de las proteínas de captación de Hierro mediante enterobactina y cómo funcionan.

Fig 7. Representación tridimensional y bidimensional entre Lipocalina-2 y el sideróforo enterobactina.

Fig 8. Función de las fimbrias tipo 1 durante la infección por *K. pneumoniae* y la formación de biopelículas.

Fig 9. Función de las fimbrias de tipo 3 durante la infección por *K. pneumoniae* y la formación de biopelículas.

Fig 10. Estructura trimérica de OmpK36 de *K.pneumoniae*. a) Vista desde el exterior de la célula.

Fig 11. Estructura de la envoltura celular de las Gramnegativas. A) Donde la membrana interna (IM) presenta fosfolípidos, lipoproteínas, así como proteínas α -hélice.

Fig 12. El LPS se compone de tres subunidades principales: lípido A, un núcleo de oligosacárido y antígeno O.

Fig 13. Comparación estructural del LPS de *E.coli*, *S. enterica* y *K.pneumoniae*.

Fig 14. LPS de *K. pneumoniae*.

Fig 15. Representación de WaaG en *E. coli* y *wabG* en *K.pneumoniae*.

Fig 16. Estructura tridimensional de la proteína WabG generada por análisis in silico.

Fig 17. Estructuras representativas de las primeras enzimas glicosiltransferasa (GT) cristalizadas en cada familia estructural.

Fig 18. Mecanismos catalíticos en GT, se muestran los mecanismos de inversión y retención.

Fig 19. Ejemplificación del mecanismo de catálisis por inversión.

Fig 20. Mecanismo catalítico de retención, presente en las enzimas GT-B pertenecientes a la familia 4.

Fig 21. Reconocimiento molecular de un péptido en la superficie de la membrana plasmática.

Fig 22. Mecanismo cinético propuesto para UDP-GLE.

Fig 23. Resumen de las diferentes vías de síntesis del antígeno O.

Fig 24. La imagen muestra la representación cuaternaria de unión del LPS a MsbA.

Fig 25. Modelo representativo del proceso por el cual el LPS es volteado hacia la cara situada en el espacio periplásmico.

Fig 26. Estructura del transportador del LPS LptB₂FG.

Fig 27. Modelo representativo de la extracción de LPS por LptB₂FG.

Fig 28. Detección de lípido A por el receptor de inmunidad innata TLR4 de células animales.

Fig 29. Visión general de la vía de señalización LPS/TLR4.

Fig 30. Señalización y activación del sistema inmune en organismos superiores.

Abreviaturas

DNA: ácido desoxirribonucleíco

LPS: lipopolisacárido

Kb: kilobases

rDNA: ácido desoxirribonucleíco ribosomal

UTIs: infecciones del tracto urinario

UMAE: unidad médica de alta especialidad

CAUTIs: infecciones de vías urinarias asociadas a catéteres

ESBLs: betalactamasas de espectro extendido

NAM: N-acetilmurámico

NAG: N-acetil glucosamina

PBPs: proteínas de unión a penicilina

IS: inserción de secuencias

KPC: *Klebsiella pneumoniae* carbapenemasa

MBLs: metalo-Betalactamasa

EDTA: ácido etilendiaminotetraacético

CHDL: clase D de carbapenemasas que hidrolizan b-lactamasas

FV: factores de virulencia

HV: hipervirulentas

rmpA y *rmpA2*: reguladores de la transcripción de la cápsula HV en *K.pneumoniae*

cps: operon donde están localizados los genes que sintetizan para la cápsula clásica e HV en *K. pneumoniae*.

TNF-: factor de necrosis tumoral

IL-6: interleucina 6

NF-B: factor nuclear potenciador de las cadenas ligeras kappa de las células B activadas.

IL-1: interleucina 1

Resumen

Klebsiella pneumoniae es una bacteria Gramnegativa, aerobia y anaerobia facultativa perteneciente a la familia Enterobacteriaceae, está presente en la naturaleza, incluyendo plantas, animales y humanos, en estos últimos se encuentra de manera comensal en la región nasofaríngea, así como en el tracto intestinal. Las especies del género *Klebsiella* infectan principalmente a individuos inmunocomprometidos, siendo la causa de varios tipos de infecciones en humanos tales como, infecciones de las vías respiratorias, infecciones de vías urinarias (UTIs) así como de sangre. La patogenicidad de *K. pneumoniae* se debe a los factores de virulencia, entre los que destacan cuatro clases principales, la cápsula, sideróforos, fimbrias y por último el lipopolisacárido (LPS). El LPS también conocido como endotoxina, es un componente importante y necesario de la membrana celular externa de todas las bacterias Gram negativas, es un factor de virulencia importante que protege contra las defensas humorales, pero también puede ser un fuerte activador inmunológico. El LPS típicamente está compuesto por un antígeno O, un oligosacárido central y un lípido A. Estos elementos se encuentran codificados por el cluster de genes *rfa* (*waa*) y *rfb*, donde el clúster de genes *waa* está involucrado en la síntesis adecuada de LPS. De los genes incluidos, *wabG* codifica para un ácido galacturónico transferasa, que emplea UDP-GalA como sustrato donador, el cual es el resultado de la actividad de la enzima uridin difosfato galacturonato 4-epimerasa que es resultado de la expresión del gen *uge*. Se ha demostrado que al deletarse los genes *wabG* y *uge* la estabilidad del LPS se vería comprometida generándose un fenotipo rugoso profundo exhibiendo una hipersensibilidad a los compuestos hidrófobos y polimixina B, un perfil de la membrana externa alterado y la liberación de la enzima periplásmica β -lactamasa.

Objetivo

General

- Describir los mecanismos de virulencia en *Klebsiella pneumoniae*

Particular

- Analizar la biosíntesis del LPS en *Klebsiella pneumoniae*
- Determinar la participación de los genes *wabG* y *uge* en la síntesis del LPS

1 INTRODUCCIÓN

1.1 Las bacterias y sus características

Las bacterias son microorganismos procariotas, es decir, microorganismos unicelulares sencillos que carecen de núcleo y organelos, el cromosoma bacteriano es una molécula de DNA circular que contiene aproximadamente 5000 pares de kb; su reproducción es mediante fisión binaria; suelen presentar tamaños de 0.1 a 20 μm o más (Levin y Angert, 2015), con diversas formas, así como disposición espacial (Murray, Rosenthal y Pfaller, 2013). La pared celular que rodea a las bacterias es compleja, y existen dos formas básicas: una pared celular Grampositiva con una gruesa capa de peptidoglucano y una pared celular Gramnegativa que se caracterizan por poseer una pared celular que carece de ácidos teicoicos y lipoteicoicos, además contiene dos capas, la primera capa que está compuesta por peptidoglucano, la cual se encuentra inmediatamente después de la membrana citoplasmática (Michael, 2009; Sizar y Unakal, 2021). En la parte externa de la capa de peptidoglucano se encuentra la membrana externa; el espacio comprendido entre la primera capa y la membrana externa recibe el nombre de espacio periplásmico, el cual contiene diversas enzimas hidrolíticas que participan en el metabolismo y degradación de macromoléculas, en este espacio también se encuentran presentes factores de virulencia líticos como hidrolasas, B-lactamasas, etc (Beveridge, 1999). En este tipo de bacterias también se presentan diversos sistemas de transporte que atraviesan la pared celular, dentro de estos sistemas de transporte se incluyen los dispositivos de secreción I, II, III, IV y V que contribuyen a la virulencia de la bacteria por su participación en el transporte de moléculas que facilitan la adherencia bacteriana o la proliferación celular (Green y Mecsas, 2015). La membrana externa, característica de las bacterias Gramnegativas, mantiene la estructura bacteriana además de funcionar como una barrera impermeable a macromoléculas y moléculas hidrófobas; la configuración de la membrana externa consiste en una bicapa lipídica asimétrica, cuya zona interna

contiene fosfolípidos, mientras que la zona externa está conformada por lipopolisacáridos (LPS) (Beveridge, 1999).

El LPS es conocido también como endotoxina cuando se desprende de la bacteria como consecuencia de una lisis celular, por lo que constituye un potente estimulador de la respuesta inmunitaria, debido a que activan los linfocitos B induciendo la liberación de interleucina 1, 6, factor de necrosis tumoral así como de otros factores que son liberados por macrófagos y células dendríticas (Bertani y Ruiz, 2018).

La membrana externa se encuentra conectada a la membrana citoplasmática a través de zonas de adhesión, estas zonas proporcionan una vía membranosa para el paso de los componentes recién sintetizados de la membrana externa hacia la citoplasmática, además se encuentra unida al peptidoglucano por medio de lipoproteínas (Beveridge, 1999). El mantenimiento de la membrana externa se da mediante enlaces catiónicos divalentes formados entre los fosfatos de las moléculas de LPS (Lipopolisacárido) así como por la interacción hidrófobas entre el LPS y las proteínas presentes en la membrana. Lo anterior conlleva a la producción de una membrana externa fuerte y rígida, que si bien permite la difusión a ciertas sustancias para la nutrición, así como para la diseminación de los residuos de la bacteria; sin embargo, su alteración debilita a la bacteria favoreciendo el paso de macromoléculas (Murray, Rosenthal y Pfaller, 2013; Beveridge, 1999). Algunas bacterias como *Klebsiella pneumoniae* se encuentran rodeadas de capas de polisacáridos denominados cápsulas, la presencia de cápsula es considerada un factor de virulencia, ya que es poco antigénica y antifagocítica, por otra parte, también actúa como barrera ante moléculas hidrófobas tóxicas y facilita la adherencia a otras bacterias o superficies de los tejidos del hospedero (Paczosa y Mecsas, 2016). Otras estructuras que pueden estar presentes o no en las bacterias son los flagelos, estos están formados por flagelina, las cuales son unas subunidades proteicas enrolladas helicoidalmente, que proporcionan motilidad a la bacteria y permiten que la célula se dirija hacia los nutrientes evitando las sustancias tóxicas; las especies bacterianas pueden presentar uno o varios flagelos en su superficie (Murray,

Rosenthal y Pfaller, 2013). Por otra parte, las fimbrias también constituyen un importante determinante de virulencia, ya que favorecen la adhesión de las bacterias al organismo del hospedero, además de que los extremos de las fimbrias pueden contener proteínas tales como lectina que se fijan a azúcares específicos (Paczosa y Mecsas, 2016). Por último, los pilis sexuales configuran una estructura tubuliforme, juegan un papel importante en las bacterias Gramnegativas, ya que gracias a estos la transferencia horizontal es posible, y por tanto es posible la adquisición de plásmidos que proveen de ventajas a las bacterias tales como la resistencia a los antibióticos, lo cual hace que el proceso de eliminación de bacterias causantes de enfermedades en el organismo sea más complicado (Kaiser, 2021).

1.2 Familia Enterobacteriaceae

La familia Enterobacteriaceae es el grupo más grande y heterogéneo de bacilos Gramnegativos con importancia clínica. Son microorganismos ubicuos, parte de la microbiota intestinal de muchos animales incluido el humano; en el humano producen una gran variedad de enfermedades, más del 70% de las infecciones del tracto urinario y diversas infecciones intestinales. Algunos organismos tales como *K. pneumoniae*, *Escherichia coli*, etc., forman parte de la microbiota comensal normal por lo que cuando el sistema inmune se ve comprometido pueden producir infecciones oportunistas; por otra parte, microorganismos como por ejemplo *Shigella*, *Salmonella typhi*, etc, se encuentran asociadas siempre a enfermedades en el ser humano (Murray, Rosenthal y Pfaller, 2013). Las enfermedades por enterobacterias pueden originarse a partir de un reservorio animal, de un portador humano o de la diseminación endógena de los microorganismos (Bertani *et al.*, 2005). Los miembros de esta familia son bacilos Gramnegativos, los cuales comparten un antígeno común, antígeno enterobacteriano, conocido también como núcleo de oligosacáridos (Bertani y Ruiz, 2018); estos bacilos pueden ser móviles o inmóviles y no forman esporas. La familia Enterobacteriaceae tiene unos requerimientos nutricionales sencillos: fermentan la glucosa, reducen los

nitratos y son catalasa-positivos y oxidasa-negativo, este último es una característica importante (Octavia y Lan, 2014).

Un gran número de bacterias pertenecientes a la familia Enterobacteriaceae poseen fimbrias, también conocidas como pili; se han subdividido en dos clases generales: fimbrias comunes las cuales son codificadas por el cromosoma, así como pilis sexuales los cuales participan en el proceso de conjugación y son codificados por plásmidos (Murray, Rosenthal y Pfaller, 2013).

1.3 Especie *Klebsiella pneumoniae*

La primera mención de *Klebsiella pneumoniae* fue por Carl Friedlander en 1882 al aislar la bacteria de muestras de pulmón obtenidas de pacientes que habían muerto por neumonía (Friedlaender, 1882), en 1885 el género *Klebsiella* fue denominado por Trevisan en honor al microbiólogo alemán Edwin Klebs. La especie tipo de este género es *Klebsiella pneumoniae*, descrita por Schroeter en 1886 y posteriormente por Trevisan en 1887 (Brenner *et al.*, 2005; Octavia y Lan, 2014). El género *Klebsiella* está formado por bacilos anaerobios facultativos, además de ser oxidasa negativos. Este género forma parte de la familia *Enterobacteriaceae*. Las bacterias de este género también se caracterizan por presentar cápsulas, ser inmóviles a excepción de *K. mobilis*, y producir la enzima lisina descarboxilasa, además de ser positivas a la prueba de Voges-Proskauer (Edwards y Ewing, 1986). La mayoría de las cepas utiliza carbohidratos como L-arabinosa, D-cellobiosa, citrato, D-fructosa, D-glucosa, 2-cetoglucosa, maltosa, D-mannitol, D-melibiosa, D-rafinosa, D-tetralosa y D-xylosa como fuente de energía, sin embargo, las subespecies *K. pneumoniae*, *ozaenae* y *rhinoscleromatis* utilizan myo-inositol, L-ramnosa y sucrosa como fuente de energía (Brenner *et al.*, 2005). En la actualidad la clasificación de las especies *Klebsiella* se lleva a cabo mediante reacciones bioquímicas, Tabla 2 (Brenner *et al.*, 2005).

En un principio la importancia médica del género *Klebsiella* llevó a su subdivisión en tres especies de acuerdo con las enfermedades que causaban:

K. pneumoniae, *K. ozaenae* y *K. rhinoscleromatis*. Sin embargo, persiste una inconsistencia de base a nivel de diferenciación de especie y subespecie (Arenas *et al.*, 2009), Tabla 1. Actualmente se reconocen 9 especies en el género *Klebsiella*, de acuerdo con la clasificación de Genbank, estas especies son *K. pneumoniae*, *K. oxytoca*, *K. granulomatis*, *K. variicola*, *K. aerogenes*, *K. senegalensis*, *K. singaporensis*, *K. milletis* y *K. alba*, esta diferenciación se realizó a partir de pruebas bioquímicas además de moleculares con base en su identidad en el RNAr 16S (Arenas *et al.*, 2009). La adopción de una nomenclatura consistente resulta complicada, en Estados Unidos y la mayoría de los países europeos se rigen por la clasificación de Orskov (Orskov, 1984), mientras que Gran Bretaña y los países que antiguamente pertenecían a la antigua Commonwealth se adhieren a la clasificación de Cowan (Cowan, Steel, Shaw y Duguid, 1960).

Tabla 1. Diferentes clasificaciones de *Klebsiella*.

Comparación de las diferentes clasificaciones de especies del género *Klebsiella* de acuerdo con Cowan, Bascom, Orskov y Genbank (Arenas *et al.*, 2009).

Cowan 1960	Bascomb 1971	Ørskov 1984	Taxonomía Actual (Genbank)
<i>K. aerogenes</i>	<i>K. aerogenes/ oxytoca/edwardsii</i>	<i>K. oxytoca</i>	<i>K. oxytoca</i>
<i>K. Edwardsii</i> subespecie edwardsii subespecie atlantae	<i>K. pneumoniae</i> sensu stricto sensu lato	<i>K. pneumoniae</i> subsp. pneumoniae subsp. ozaenae subsp. rhinoscleromatis	<i>K. pneumoniae</i> subsp. pneumoniae subsp. ozaenae subsp. rhinoscleromatis
<i>K. pneumoniae</i>	<i>K. ozaenae</i>	<i>K. terrigena</i>	<i>K. variicola</i>
<i>K. ozaenae</i>	<i>K. rhinoscleromatis</i>	<i>K. planticola</i> (Syn. Trevisanii)	<i>K. granulomatis</i> (previamente clasificado como <i>Calymmatobacterium granulo-</i> <i>matis</i>)
<i>K. rhinoscleromatis</i>	<i>K. Unnamed group</i>	<i>K. ornithinolytica</i>	<i>K. milletis</i> <i>K. singaporensis</i> <i>K. senegalensis</i> <i>K. aerogenes</i> <i>K. alba</i>
	<i>Enterobacter aerogenes</i>		<i>R. terrigena</i> , <i>R. planticola</i> , <i>R. ornithinolytica</i>

Tabla 2. Reacciones bioquímicas de las especies de *Klebsiella* (Modificado de Podschun y Ullman, 1998).

Características	<i>Klebsiella pneumoniae</i>			<i>K. oxytoca</i>	<i>K. terrigena</i>	<i>K. planticola</i>	<i>K. ornithinolytica</i>
	subsp. <i>pneumoniae</i>	subsp. <i>ozaenae</i>	subsp. <i>rhinoscleromatis</i>				
Indol	-	-	-	+	-	v ^b	+
Ornitina descarboxilasa	-	-	-	-	-	-	+
Lisina descarboxilasa	+	v	-	+	+	+	+
Degradación de pectato	-	-	-	+	-	-	-
Gas de lactosa a 44.5°C	+	-	-	-	-	-	-
Crecimiento a 10°C	-	-	-	+	+	+	+
Ácido proveniente de:							
D-Melezitosa	-	-	-	v	+	-	-
L-Sorbosa	v	-	-	+	+	+	-
Utilización de:							
m-Hidroxibenzoato	-	-	-	+	+	-	-
m-Hidroxi-L-prolina	v	-	-	v	v	+	-
Malonato	+	-	+	+	+	+	+
Rojo de metilo	-	+	+	-	+	v	+
Reacción Voges-Proskauer	+	-	-	+	+	+	+

1.4 Sistemática del género *klebsiella*

El género *Klebsiella* consiste en tres líneas filéticas que también comparte con otros miembros de la familia *Enterobacteriaceae*, como *Enterobacter aerogenes*, *Erwinia* y *Tatumella*, Fig 1 (Arenas et al., 2009). El primer grupo comprende a la especies *K. granulomatis* y *K. pneumoniae* así como a las subespecies *pneumoniae*, *rhinoscleromatis* y *ozaenae*, compartiendo un 99% de similitud de la secuencia 16S rRNA; el segundo grupo contiene a las especies *K. ornithinolytica*, *K. planticola*, *K. trevisanii* y *K. terrigena*, en este grupo las especies *K. planticola* y *K. trevisanii* comparten una similitud del 99% en la secuencia 16S rRNA, ambas taxas son indistinguibles al nivel de especie, por lo que se ha propuesto que ambas se agrupen como *K. planticola*; *K. ornithinolytica* se encuentra más relacionada a *K. planticola* que *K. terrigena* y *K. oxytoca*, la cual forma el tercer grupo que es el más alejado (Drancourt, Bollet, Carta y Rousselier, 2001; Octavia y Lan, 2014). También se ha propuesto la división de los géneros *Klebsiella* y *Raoultella*, dejando a la especie *K. oxytoca* como grupo monofilético (Drancourt, Bollet, Carta y Rousselier, 2001).

La relación filogenética del género *Klebsiella* con otros géneros pertenecientes a la familia *Enterobacteriaceae* se han estudiado con anterioridad con base en su relación genómica (Arenas *et al.*, 2009). Con base en el porcentaje de relación DNA-DNA con *Escherichia coli* K-12 se distinguen tres grupos entre las especies *Enterobacter/Klebsiella*, que son consistentes con los tres grupos mencionados anteriormente. Un grupo presenta una cepa de *Enterobacter cloacae*, exhibiendo 48% de homología con *Escherichia coli* K-12, el segundo grupo contiene *K. pneumoniae*, *K. ozaenae* y *Enterobacter aerogenes* exhibiendo una homología de 35-40% con *Escherichia coli* K-12. El tercer grupo presenta las especies *Enterobacter liquefaciens* y *Enterobacter hafniae* con una homología de 15-21% con *Escherichia coli* K-12 (Drancourt, Bollet, Carta y Rousselier, 2001).

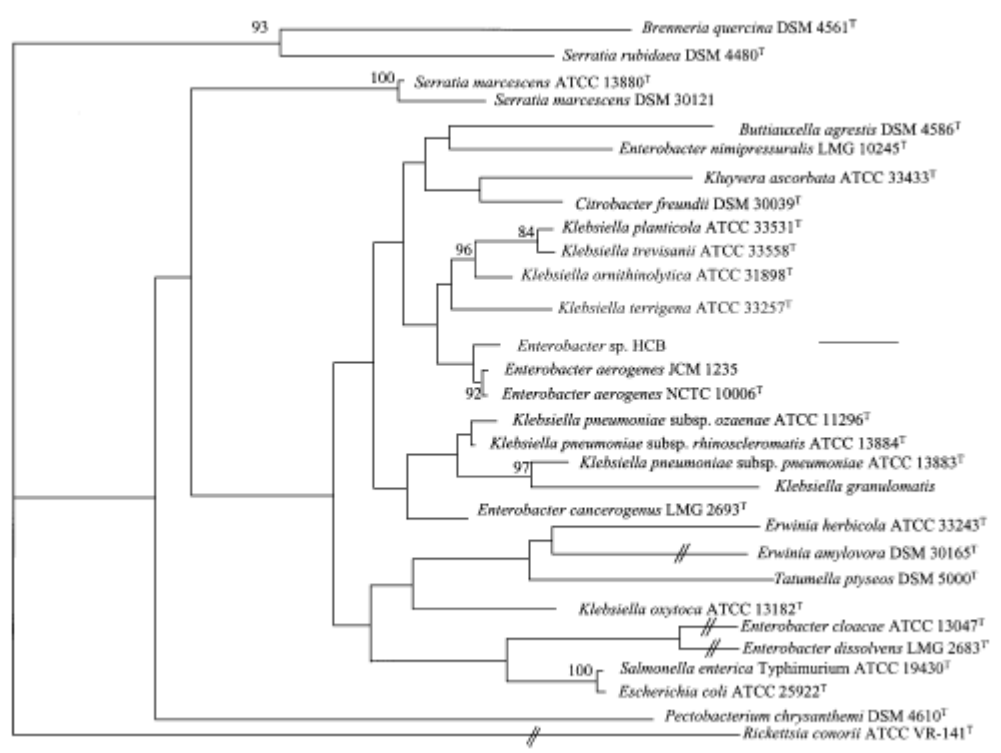


Fig 1. Árbol filogenético derivado del análisis de la secuencia 16S rDNA de varios géneros de la familia *Enterobacteriaceae*, incluyendo nueve especies de *Klebsiella* (*Raoultella*). Los números dentro del dendrograma indican la ocurrencia (%) de la ramificación en 100 árboles (solo se muestran valores de 70 y superiores). La barra de escala indica 1% de divergencia (Drancourt, Bollet, Carta y Rousselier, 2001).

1.5 Epidemiología

El género *Klebsiella* está presente en la naturaleza, incluyendo plantas, animales y humanos. Son la causa de varios tipos de infecciones en humanos tales como, infecciones de las vías respiratorias, infecciones de vías urinarias (UTIs) así como de sangre (Podschun y Ullman, 1998). Las infecciones por *Klebsiella* son adquiridas ya sea por el contacto con equipo médico contaminado o con hemoderivados infectados, por otra parte, los principales reservorios para la transmisión de *Klebsiella* en el hospital son los residuos de tracto gastrointestinal y las manos del personal (Podschun y Ullmann, 1998).

Las especies del género *Klebsiella* infectan principalmente a individuos inmunocomprometidos y que padecen severas enfermedades como diabetes mellitus o la obstrucción pulmonar crónica. En humanos, *Klebsiella pneumoniae* se encuentra de manera comensal en la región nasofaríngea, del 1 al 6% de las bacterias presentes pertenece a *Klebsiella*, así como en el tracto intestinal. Sin embargo, cuando se habla de pacientes hospitalizados, las tasas de colonización tienen un incremento proporcional al tiempo en el que duran internados, por ejemplo, se ha reportado la presencia de *Klebsiella* en pacientes, en un 77% en heces, 19% en faringe y 42% en las manos (Casewell y Phillips, 1977; Casewell y Phillips, 1978). Las infecciones nosocomiales por *Klebsiella* son causadas principalmente por *K. pneumoniae*, que es la especie más importante del género desde el punto de vista médico y están asociadas a una mortalidad alta (50%). Por otra parte, la alta tasa de enfermedades nosocomiales generadas está asociada al uso de antibióticos (Podschun y Ullman, 1998).

Se estima que el género *Klebsiella* es el responsable del 9.9% de las infecciones nosocomiales bacterianas en los Estados Unidos después de *Clostridium difficile* y *Staphylococcus aureus*, lo cual lo sitúa entre los ocho patógenos infecciosos más importantes en hospitales. *K. pneumoniae* causa, principalmente, infecciones del tracto urinario y neumonías y es el segundo

agente causal, después de *E. coli*, de septicemias nosocomiales por bacterias Gram negativas (Martin y Bachman, 2018). En el 2016 en México, se analizaron 48 377 resultados de cultivos nosocomiales en el Instituto Mexicano del Seguro Social (IMSS); de estos 13 207 (27.3 %) corresponden a UMAE (unidad médica de alta especialidad) y 35 170 (72.6 %) a unidades médicas de segundo nivel. El microorganismo más frecuentemente aislado fue *E. coli* con 8192 (16.9 %); *K. pneumoniae* fue el cuarto microorganismo más frecuente donde 3,122 corresponden a unidades médicas del IMSS, 2,118 unidades médicas de segundo nivel y 1004 a UMAE (Arias-Flores, Rosado-Quiab, Vargas-Valerio y Grajales-Muñiz, 2016).

El tracto urinario es el sitio más comúnmente infectado por *K. pneumoniae*, las infecciones de vías urinarias asociadas a catéteres (CAUTIs) son otras infecciones ocasionadas por *Klebsiella pneumoniae*, debido a la característica de la formación de biofilms y adherencia a los catéteres (Martin y Bachman, 2018).

1.6 Resistencia a antibióticos

A lo largo de los años ha existido una preocupación por el incremento de la resistencia a una amplia gama de antibióticos por cepas de *K.pneumoniae*. Como consecuencia infecciones simples tales como UTIs (infecciones del tracto urinario) se han vuelto reacias al tratamiento, por otra parte, infecciones serias tales como neumonías son potencialmente mortales. Varios estudios realizados durante el año 2000 mostraron que del 20-80% de las cepas de *K. pneumoniae* son resistentes a la primera generación de antibióticos, entre los cuales se incluyen las cefalosporinas, fluoroquinolonas y aminoglucósidos (Morrisey *et al.*, 2013).

Dos tipos de resistencias se han observado comúnmente en *K. pneumoniae*; el primero involucra la expresión de las betalactamasas de amplio espectro (ESBLs), son enzimas producidas por bacilos Gramnegativos, con más frecuencia por *E. coli* y *K. pneumoniae*. Son capaces de inactivar a las penicilinas y cefalosporinas de primera y segunda generación, también

inactiva a oximino-cefalosporinas y aztreonam (Garcías *et al.*, 2013), seleccionando a las bacterias resistentes a los antibióticos. El modo de acción de los beta-lactámicos es mediante la inhibición de la síntesis del peptidoglicano en las bacterias. Los antibióticos beta-lactámicos tienen estructuras similares a la D-alanil-D-alanina, además de presentar el residuo terminal aminoacil en el precursor N-acetilmurámico (NAM)/ N-acetil glucosamina (NAG) que son las subunidades que conforman la capa de peptidoglicano, de la pared celular bacteriana, (Grampositivos y Gramnegativos). La similitud estructural entre los antibióticos beta-lactámicos y D-alanil-D-alanina facilita su unión al sitio activo de las proteínas de unión a penicilina (PBPs Penicillin Binding Proteins). El núcleo beta-lactámico de la molécula se une al Residuo Ser403 del sitio activo de las PBP (Penicillin Binding Proteins). Esta inhibición de las PBPs previene la transpeptidación final necesaria para la síntesis de la capa de peptidoglicano (Nordmann, Dortet y Laurent, 2012).

El principal mecanismo involucrado en la resistencia a los beta-lactámicos es la producción de enzimas Betalactamasas que hidrolizan el anillo betalactámico presente en los antibióticos. Se han clasificado cuatro grupos de beta-lactamasas dependiendo de su actividad; Las penicilinasas, inactivan a la penicilina, pero no degradan cefalosporinas, aztreonam o carbapenemes; Cefalosporinasas, las cuales inactivan a las cefalosporinas así como a las aminopenicilinas, sin embargo, no afectan a otras penicilinas, como aztreonam y carbapenemes. Las ESBL (betalactamasas de espectro extendido) inactivan a la mayoría de los beta-lactámicos excepto a los carbapenemes, por su parte las betalactamasas de amplio espectro (ESBL) son inhibidas por ácido clavulánico. Por último, las carbapenemasas inactivan a los carbapenemes y dependiendo de la enzima, también pueden inactivar otros tipos de beta-lactámicos, Fig 2 (Nordmann, Dortet y Laurent, 2012).

El segundo mecanismo involucra la expresión de carbapenemasas, enzimas que hacen que las bacterias sean resistentes a casi todos los beta-lactámicos, incluidos los carbapenemes (Paczosa y Mecsas, 2016). Los carbapenemes son frecuentemente utilizados como último recurso para el tratamiento de

infecciones causadas por *K.pneumoniae* resistentes a múltiples fármacos. La resistencia a carbapenemes en *K.pneumoniae* está ligado a diferentes mecanismos, de los cuales los dos más importantes son: la adquisición de genes que codifican para enzimas capaces de degradar carbapenemes, o bien, mediante el decremento en la toma de antibióticos por la deficiencia de porinas, lo cual está asociado a la sobreexpresión de β -lactamasas que poseen una afinidad débil por los carbapenemes (Nordmann, Dortet y Laurent, 2012; Pitout, Nordmann y Poirel, 2015).

En la familia Enterobacteriaceae la resistencia a los carbapenémicos puede ser como resultado de la producción de las betalactamasas de espectro extendido (ESBL) en combinación con defectos en la permeabilidad de la membrana externa (Nordmann, Dortet y Laurent, 2012). En *K. pneumoniae* este mecanismo está presente, que es la pérdida de porinas en la membrana externa, que propicia una disminución de la permeabilidad en la misma, lo anterior se debe a mutaciones puntuales, frecuentes o a inserciones que interrumpen a las secuencias codificantes, lo que genera una terminación prematura en la transcripción de la secuencia; Por otra parte, también puede ser resultado de mutaciones puntuales en la región promotora, lo que posiblemente afecta la transcripción de la misma; o bien, debido a mecanismos identificados que previenen la inserción de la porina en la membrana externa; otra razón es debido a la inserción de secuencias (IS), las cuales causan alteraciones en las porinas, múltiples copia IS pueden estar presentes en el cromosoma, y su transposición a la región donde se encuentran los genes que codifican para las porinas se selecciona dependiendo de la presión generada por el antibiótico al cual se encuentra expuesta la bacteria (Doumith, Ellington, Livermore y Woodford, 2009).

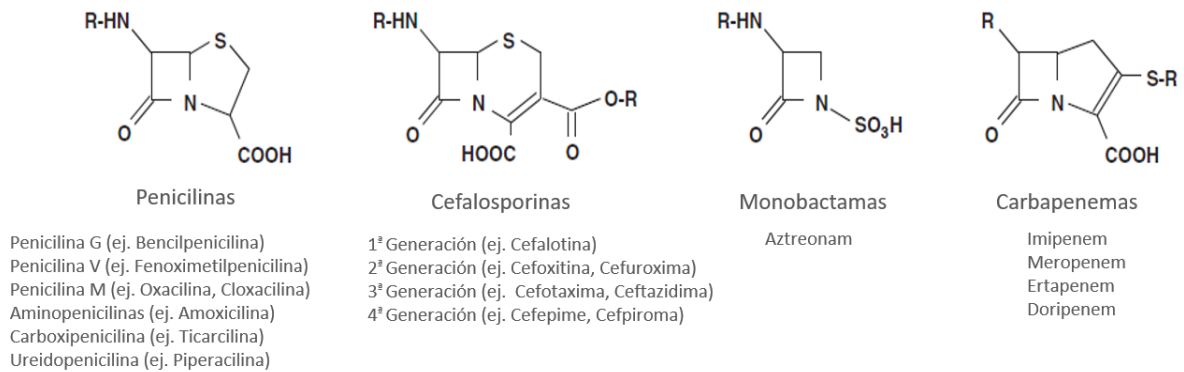
β - lactámicos

Fig 2. Estructura química de los principales beta-lactámicos.

Las verdaderas carbapenemasas son insensibles a los carbapenemes, por lo que son eficientes aun cuando están presentes los defectos de impermeabilidad de la membrana externa en organismos como *K.pneumoniae* (Nordmann, Dortet y Laurent, 2012); estas carbapenemasas pertenecen a la clase molecular Amber A, B o D, las cuales están presentes en *K. pneumoniae*. En *K. pneumoniae* la clase A ha sido extensamente estudiada, donde el tipo de enzima *K. pneumoniae* carbapenemasa (KPC) se ha reportado casi exclusivamente para este organismo, el primer caso de *K. pneumoniae* expresando una carbapenemasa fue en 1996 en Carolina del Norte. Posteriormente las carbapenemasas MBL, NDM-1, IMP y VIM se encontraron en cepas de *K. pneumoniae*. Las enzimas KPC prevén de resistencia a las penicilinas, carbapenemes, cefalosporinas, cefamicinas y monobactámicos, y pueden ser inhibidas por B-lactámicos como el ácido clavulánico (de manera débil), tazobactam, ácido borónico y avibactam (Pitout, Nordmann y Poirel, 2015). La clase B, conocida como metalo-Betalactamasa (MBLs) se identificó primero en *K.pneumoniae* y en varias especies de enterobacterias (Nordmann, Nass y Poirel, 2011), son enzimas del tipo NDM, VIM e IMP. Las bacterias que presentan enzimas MBLs son frecuentemente resistentes a las penicilinas, carbapenemes, cefalosporinas y cefamicinas, sin embargo, son susceptibles a monobactámicos, además su actividad puede inhibirse mediante sustancias quelantes como el EDTA, ácido

dipicolínico, etc (Pitout, Nordmann y Poirel, 2015). La clase D conocida como (CHDL) es OXA-48, hidroliza eficientemente a los B-lactámicos de amplio espectro como penicilinas, carbapenemes y cefalosporinas (Poirel, Heritier, Spicq y Normann, 2004).

1.7 Factores de virulencia

K. pneumoniae emplea varias estrategias para asegurar su crecimiento y protección de la respuesta inmune del hospedero. Hay cuatro clases principales de factores de virulencia (FV) que se han caracterizado en *K. pneumoniae*. Estos FV son la cápsula, donde se incluyen a las cepas hipervirulentas (HV) que presentan una hiper cápsula; sideróforos; fimbrias también conocidas como pilis; y por último el lipopolisacárido (LPS), Fig 3. Otros factores importantes en la virulencia de *K. pneumoniae* que se han identificado recientemente son, Proteínas de Membrana Externa (OMPs), porinas, bombas de eflujo, sistemas de transporte de hierro y genes involucrados en el metabolismo de alantoína, sin embargo, estos factores no han sido completamente caracterizados (Paczosa y Mecsas, 2016).

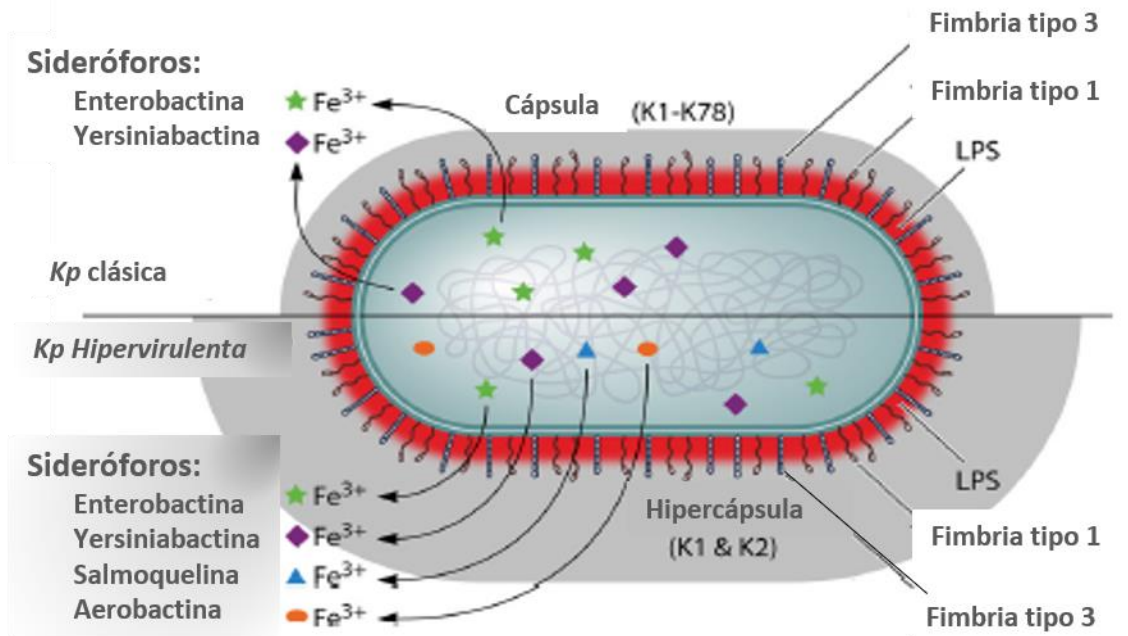


Fig 3. Factores de virulencia bien caracterizados en *K. pneumoniae*, en cepas clásicas e HV. Se representan los factores de virulencia mejor descritos, cápsula, LPS, fimbrias (tipo 1 y 3) y sideróforos. (Modificado de Paczosa y Mecsas, 2016).

1.7.1 Cápsula

La cápsula es una matriz de polisacáridos que cubre a la célula y es necesaria para la virulencia de *K. pneumoniae*, ya que las cepas carentes de ella son menos virulentas. Durante la infección por *K. pneumoniae*, la cápsula protege contra la respuesta inmune del hospedero a través de múltiples mecanismos, que incluyen la inhibición de la fagocitosis por las células inmunes, la prevención de la activación de la respuesta inmune temprana y la anulación de la lisis por el complemento y los péptidos antimicrobianos, Fig 4, (Domenico, Salo, Cross y Cunha, 1994; Paczosa y Mecsas, 2016).

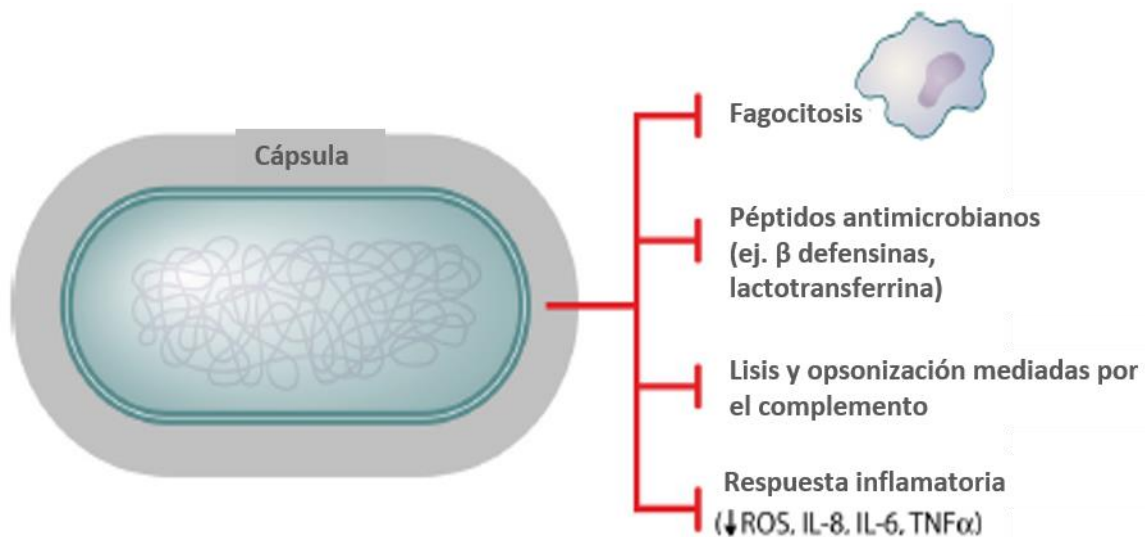


Fig 4. Se han determinado diversas funciones de la cápsula como factor de virulencia en *K. pneumoniae*. La primera de ellas es que participa en la prevención de la fagocitosis y opsonofagocitosis de la bacteria; la segunda consiste en la obstaculización de la acción bactericida de péptidos como las defensinas 1 y 3, así como lactoferrinas; también evita la acción de los componentes de la vía del complemento, como C3, que interaccionen con la membrana evitando por tanto la lisis bacteriana. Por último, evita la activación de la respuesta inmune, ya que protege al LPS (Lipopolisacárido) del reconocimiento por los receptores de células inmunes. (Modificado de Paczosa y Meccas, 2016).

Las cepas capsulares de *K. pneumoniae* son significativamente menos propensas que las cepas acapsulares a ser fagocitadas por células inmunes innatas tanto en presencia como en ausencia de opsoninas (Domenico, Salo, Cross y Cunha, 1994).

Por otra parte, las cepas HV (hipervirulentas) de *K. pneumoniae* producen una hipercápsula conocida por ser hipermucoviscosa debido al exopolisacárido mucoso que recubre a la bacteria, por lo que la cápsula es más robusta. Las cepas clásicas e HV presentan polisacáridos específicos de la cepa denominados antígeno K (Pan *et al.*, 2018), los cuales se designan a partir de métodos serológicos. Hay al menos 78 serotipos capsulares definidos, se ha observado una variación en la gravedad de la infección relacionada con el serotipo, donde los serotipos K1 y K2 se han identificado como las cepas virulentas predominantes (Fung *et al.*, 2002).

Los genes involucrados en la síntesis de la cápsula clásica, así como la HV de *K. pneumoniae* se encuentran localizados en el operón *cps* (los genes biosintéticos de las cápsulas de polisacáridos de ácido colánico); formado por los genes *wzi* (proteína monomérica β -barril), *wza* (Proteína de exportación de polisacáridos), *wzb* (Proteína-tirosina-fosfatasa), *wzc* (Tirosina-proteína-cinasa), *gnd* (6-fosfogluconato deshidrogenasa), *cpsB* (Manosa-1-fosfato guaniltransferasa) y *galF* (Alfa-D-glucosil-1-fosfato uridililtransferasa). En la actualidad el gen *wzi* es utilizado para la tipificación del antígeno K, ya que está presente en las cepas de *K. pneumoniae* con cápsulas clásicas; *wzi* codifica para una proteína de superficie involucrada en la fijación de la cápsula con la membrana externa, por lo que la pérdida de esta proteína conlleva a una bacteria sin presencia de cápsula. Ahora bien, *wzy* (Núcleo lipídico A - O-antígeno ligasa) también conocido como *orf4*, se encuentra involucrado en la polimerización de polisacáridos capsulares, mientras que los genes *wza* (*orf5*), *wzc* (*orf6*), participan en su ensamble en la superficie bacteriana. Al igual que *E. coli*, *K. pneumoniae*, produce una variedad de cápsulas, esta diversidad surge de la actividad glicosiltransferasa de *wbaP* (Undecaprenolfosfato Galactosa-1-P transferasa), *wbaZ* (Glicosiltransferasa), *wcaN* (Glucoronosiltransferasa), *wcaJ* (Biosíntesis del ácido colánico UDP-glucosa transportador de lípidos transferasa), y *wcaO* (Glicosiltransferasa) (Paczosa y Mecsas, 2016).

Por otra parte, la síntesis de la cápsula de *K. pneumoniae* HV, está ligada a la expresión de dos reguladores transcripcionales transmitidos por plásmidos, el regulador *mpaA* (regulator of mucoid phenotype A) y *mpaA2* (regulator of mucoid phenotype A2) del fenotipo mucoso; donde únicamente *mpaA* mejora la síntesis del polisacárido capsular, sin embargo, se ha reportado que los genes *mpaA* y *mpaA2* participan en la regulación de la activación de la transcripción de *cps* (Chun-Ru *et al.*, 2011). La síntesis de la cápsula también puede promoverse como resultado de factores externos. Por ejemplo, concentraciones altas de glucosa provoca un incremento en la regulación en la producción de cápsula a través de *mpaA*, mientras que altas

concentraciones de hierro extracelular provoca una disminución en la regulación en la síntesis de la cápsula (Paczosa y Mecsas, 2016).

En estudios realizados con *K. pneumoniae* en pulmones infectados se encontró que las cepas capsulares indujeron menores niveles de citocinas proinflamatorias TNF- e IL-6 (Factor de Necrosis Tumoral e Interleucina) y niveles más altos de citocina antiinflamatoria IL-10 que las cepas acapsulares (Yoshida *et al.*, 2000; Yoshida *et al.*, 2001). Además, las cepas capsulares de *K. pneumoniae* amortiguan NF- κ B a través de un mecanismo dependiente de la activación de NOD1 (Dominio de oligomerización de unión a nucleótidos), que atenúa la producción de IL-8 inducida por IL-1, una proteína de respuesta inmune multipotente importante para el reclutamiento y activación de neutrófilos (Regueiro *et al.*, 2011). De acuerdo con estas respuestas de citocinas, se reclutan más células inmunes en los pulmones infectados con cepas acapsulares que con cepas capsulares (Yoshida *et al.*, 2000).

Las cepas hipervirulentas (HV) de *K. pneumoniae* son menos sensibles a la muerte del complemento que las cepas clásicas. La hiper cápsula se ha correlacionado con un aumento de la resistencia a la fagocitosis por parte de neutrófilos y macrófagos humanos en comparación con varias cepas clásicas (Pomakova *et al.*, 2012). En general, el fenotipo de hipercápsula aumenta la resistencia a una variedad de defensas humorales, incluida la destrucción del complemento, HBD-1 a -3 (beta-defensina del plasma humano) y otros péptidos antimicrobianos como la proteína 1 de neutrófilos humanos y la lactoferrina (Paczosa y Mecsas, 2016).

1.7.2 Sideróforos

K. pneumoniae es un organismo que requiere hierro el cual es un recurso limitado y por ende es adquirido del ambiente para que la bacteria prolifere durante la infección. Inicialmente en el plasma del hospedero se encuentra muy poco hierro, sin embargo, un aumento de este en el hospedero permite el aumento de patógenos, ya que es esencial para su crecimiento, por lo que proteínas de unión a hierro como transferrinas y lactoferrinas desempeñan un

papel vital importante, puesto que previenen la proliferación bacteriana por sí mismas o al interactuar con anticuerpos (Bullen, Rogers y Griffiths, 1972). En el caso de mamíferos, pueden reducir sus niveles de hierro durante una infección bacteriana mediante el empleo de lactoferrinas, las cuales son proteínas de defensa innata presente en fluidos corporales (Bullen, Rogers y Griffith, 1972; Miethke y Marathiel, 2007). Debido a lo anterior, bacterias como *K. pneumoniae* así como otros tipos de bacterias deben emplear tácticas para la adquisición de hierro a partir del hospedero.

La estrategia empleada por diferentes bacterias así como por *K. pneumoniae* para la obtención de hierro es a través de la secreción de sideróforos, los cuales son moléculas con mayor afinidad por el hierro que la que poseen las proteínas de unión a hierro del hospedero (Miethke y Marathiel, 2007). Las diferentes cepas de *K. pneumoniae* codifican para varios sideróforos, de manera que la virulencia y expresión de cada sideróforo varía, Fig 5.

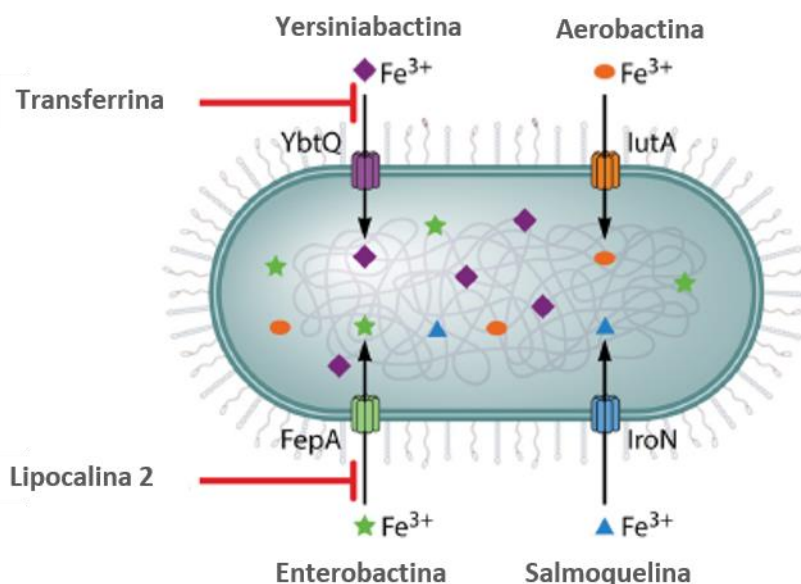


Fig 5. Producción de sideróforos y roles en la virulencia de *K. pneumoniae*. Se ha descubierto que las cepas de *K. pneumoniae* producen uno o más de los siguientes sideróforos: enterobactina, salmoquelina, yersiniabactina y aerobactina. La enterobactina es el sideróforo principal utilizado por *K. pneumoniae*, aunque es inhibido por la molécula del hospedero lipocalina-2. La salmoquelina es una forma c-glucosilada de enterobactina que ya no puede ser inhibida por la lipocalina-2. Yersiniabactin y aerobactin son estructuralmente distintas de la enterobactina y la

salmoquelina. Ninguno de los sideróforos puede ser inhibido por la lipocalina-2, pero la funcionalidad de la yersiniabactina se reduce en presencia de la molécula del hospedero transferrina. FepA (Receptor de membrana externa), IroN (transportador de hierro), YbtQ (transportador de yersiniabactina) e IutA (aereobactina) (Modificado de Paczosa y Mecsas, 2016).

En *K. pneumoniae* varios sideróforos son expresados, incluyendo enterobactina, yersiniabactina, salmoquelina y aereobactina, la afinidad por el hierro varía, por lo que aerobactina posee menor afinidad, mientras que la mayor la posee enterobactina (Brock, Williams, Liceaga y Wooldridge, 1991; Perry, Balbo *et al.*, 1999).

El primer sistema para la adquisición de hierro en las cepas clásicas e HV de *K. pneumoniae* es enterobactina. Los genes requeridos para la biosíntesis de enterobactina en *K. pneumoniae* se encuentran en el cluster *tABCDEF*, mientras que el cluster *fepABCDG* (codifica para la maquinaria responsable de la toma de hierro) codifica para las proteínas que median su transporte y *fepA* que codifica el receptor de hierro, Fig 6 (Tomada de Raymond, Dertz y Kim, 2003; Paczosa y Mecsas, 2016).

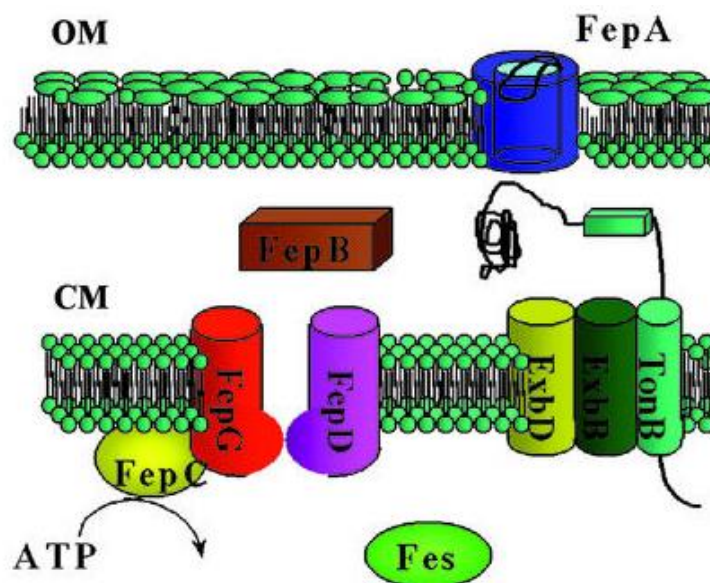


Fig 6. Topología transmembrana de las proteínas de captación de Hierro mediante enterobactina y cómo funcionan. En un estado de deficiencia de hierro, los

receptores de hierro proliferan entre las proteínas de la membrana externa (OM). FepA (Receptor de hierro) es una proteína de canal compuesta por un barril β y una proteína de puerta N-terminal. El receptor FepA es muy específico y reconoce el dominio de unión al hierro y los dominios de unión amida de FeEnt (Enterobactina férrica). El movimiento de compuerta de FepA es transducido por el complejo proteico TonB-ExbB-ExbD (complejo proteico encargado que transduce la energía de la fuerza motriz de los protones al receptor para permitir la translocación de la fuente de hierro específica), que está anclado en la membrana citoplasmática (CM). FepB administra FeEnt a los poros citoplásmicos formados por FepD y FepG. La ATPasa citoplásmica, FepC, proporciona energía para ayudar a la captación a través de la membrana interna. FeEnt esterasa, cataliza la escisión hidrolítica lo que lleva a la liberación intracelular de hierro (Raymond, Dertz y Kim, 2003).

Una medida realizada por el hospedero es la secreción de Lipocalina-2, la cual neutraliza a enterobactina. Lipocalina-2 es una proteína multifuncional antimicrobiana, secretada por diferentes tipos de células incluyendo neutrófilos. Es expresada de forma basal, sin embargo, su expresión aumenta en el hospedero como respuesta a infecciones ocasionadas en el tracto respiratorio por *K. pneumoniae*; por lo que Lipocalina-2 no elimina a *K. pneumoniae* sino que inhibe su crecimiento mediante la inhibición de la adquisición de hierro (Raymond, Dertz y Kim, 2003). Lipocalina-2 posee una afinidad por enterobactina de manera que compite con Fep A por ella, y por ende secuestra a enterobactina. Se ha propuesto una forma de unión de Lipocalina-2 a enterobactina: Lipocalina-2 se une a enterobactina mediante la intercalación de residuos con carga positiva de Arg y Lys con los ligandos de enterobactina; a su vez estos ligandos se sitúan en las oquedades presentes en el cáliz trilobulado de Lipocalina-2, Fig 7A y B (Goetz *et al.*, 2002).

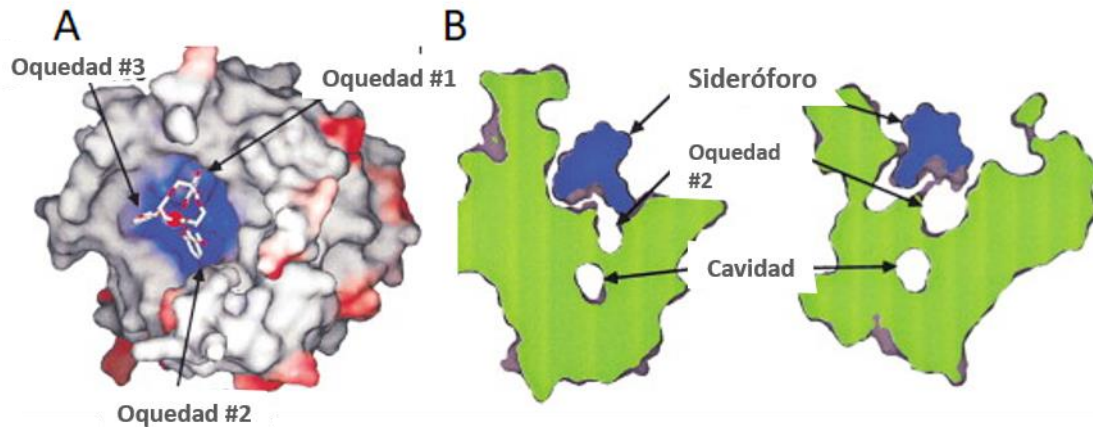


Fig 7. Representación tridimensional y bidimensional entre Lipocalina-2 y el sideróforo enterobactina. Se muestran las oquedades que interactúan con los ligandos de enterobactina. (Modificado de Goetz *et al.*, 2002).

El sideróforo yersiniabactina encontrado originalmente en el patógeno *Yersinia* se ha identificado también en *K. pneumoniae*. Los genes *irp* (genes que codifican para proteínas reguladoras del hierro) codifican las proteínas requeridas para la síntesis del sideróforo, mientras que los genes *ybt* y *fyu* codifican para las proteínas transportadoras necesarias para la secreción de yersiniabactina; *ybtQ* (ATPasa) por su parte codifica una ATPasa necesaria para el transporte adecuado de yersiniabactina (Lawlor, O' Connor y Miller, 2007; Paczosa y Mecsas, 2016). A diferencia de enterobactina, yersiniabactina no es inhibida por lipocalina-2, debido a la diferencia estructural significativa que existe entre ambos sideróforos, sin embargo en presencia de transferrinas, yersiniabactina es incapaz de adquirir el hierro necesario para el crecimiento de *K.pneumoniae* (Bachman *et al.*, 2011).

Salmoquelina es un tipo de enterobactina c-glucosilada, dicha modificación se encuentra en el cluster *iroA* (codifica para proteínas involucradas en el transporte y modificación de enterobactina). Esta modificación evita la unión de lipocalina-2 con salmoquelina, por lo que aún en presencia de lipocalina-2 *K.pneumoniae* es capaz de colonizar la zona nasofaríngea del hospedero (Bachman, Miller y Weiser, 2009).

Aerobactina es un sideróforo perteneciente a la clase química hidroxamato. Entre el 93 y 100% de las cepas HV de *K. pneumoniae* lo presentan (Vernet *et al.*, 1995)

1.7.3 Fimbrias

En *K. pneumoniae*, las fimbrias representan otra clase de factor de virulencia, ya que son proteínas mediadoras importantes en la adhesión. En *K. pneumoniae*, las fimbrias tipo 1 y 3 son las estructuras proteínicas de mayor adhesión (Di Martino *et al.*, 1996; Favre-Bonte, Darfeuille-Michaud y Forestier, 1995), Fig 8 y 9.

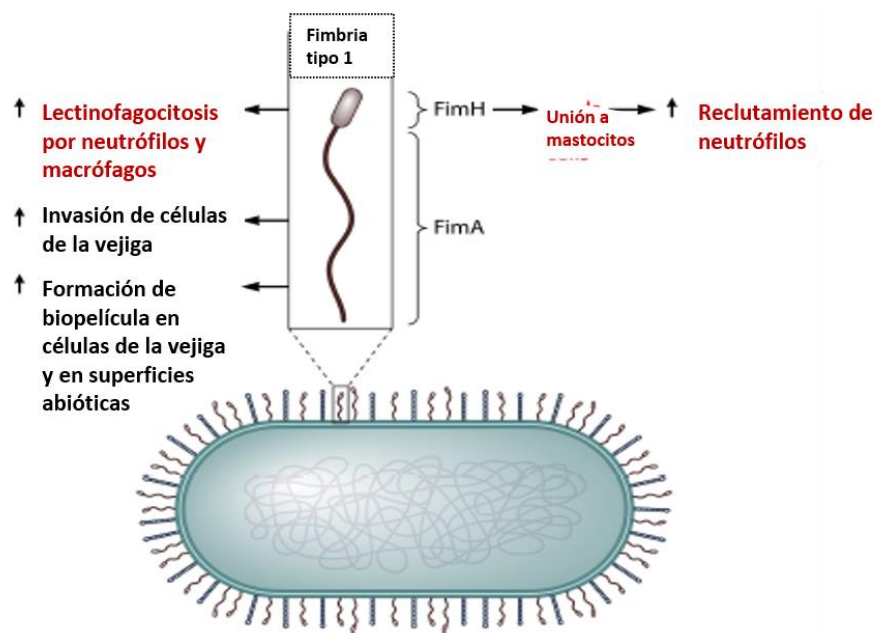


Fig 8. Función de las fimbrias tipo 1 durante la infección por *K. pneumoniae* y la formación de biopelículas. Las fimbrias de tipo 1 son estructuras adhesivas filamentosas, unidas a la membrana, compuestas principalmente de subunidades FimA (Subunidad mayor de fimbrias tipo-1), con la subunidad FimH (Adhesivo específico de fimbria D-manosa de tipo 1) en la punta. Estas fimbrias tienen un papel en la invasión de células de la vejiga por *K. pneumoniae*, así como en la formación de biopelículas en la vejiga y en superficies abióticas. (Modificado de Paczosa y Meccas, 2016).

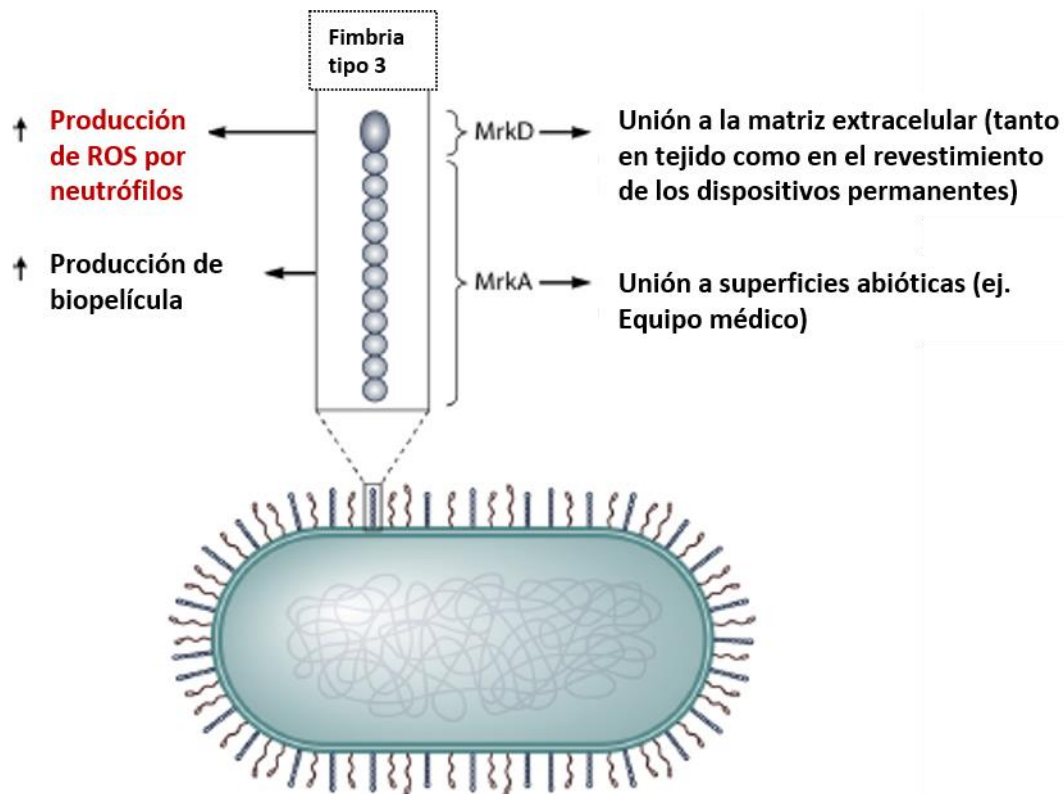


Fig 9. Función de las fimbrias de tipo 3 durante la infección por *K. pneumoniae* y la formación de biopelículas. Las fimbrias de tipo 3 son estructuras adhesivas en forma de hélice, unidas a membranas, en la superficie de *K. pneumoniae*. Compuestas principalmente por subunidades MrkA (Subunidad fimbrial tipo 3), con la subunidad MrkD (Proteína adhesiva de la fimbria) en la punta. Se ha descubierto que las fimbrias de tipo 3 son necesarias para la producción de biopelículas de *K. pneumoniae* y la unión a dispositivos médicos. (Modificado de Paczosa y Mecsas, 2016).

Las fimbrias tipo 1 son apéndices filamentosos que permiten la adherencia a las células epiteliales del hospedero, están presentes en la superficie celular bacteriana de la mayoría de los organismos pertenecientes a la familia *Enterobacteriaceae*, son delgadas (7 nm de diámetro) y largas, aproximadamente entre 50 a 250 nm, con un peso molecular de 1700 (Firon, Ofek y Sharon, 1983); este tipo de fimbria se presenta en un 90% de los cultivos ambiental y clínico de *K. pneumoniae* (Klemm y Schembri, 2000). Algunas fimbrias, como el tipo 1, contienen lectinas, las cuales son necesarias para adherirse a las células del hospedero, puesto que pueden reconocer las

unidades de oligosacáridos como la manosa, presentes en la superficie de estas células (Ofek, Miremand y Sharon, 1977; Firon, Ofek y Sharon, 1983).

Las fimbrias tipo 1 están formadas por dos subunidades; el gen *fimA* codifica para la subunidad FimA, la cual forma la base del apéndice, mientras que las propiedades adhesivas se ubican en la subunidad menor FimH, localizada en la punta del apéndice, esta subunidad es codificada por el gen *fimH*; FimH es la responsable de la unión a manosa presente en las células epiteliales del hospedero (Stahlhut *et al.*, 2009). *K. pneumoniae* a diferencia de *E. coli* presenta un gen *fimK*, cuya función es desconocida, sin embargo, se ha hipotetizado que está involucrado en la expresión de la proteína FimK, que participa en la regulación de la fimbria de tipo 1, ya que al deletarse este gen se ha observado la ausencia de fimbrias de tipo 1 (Rosen *et al.*, 2015).

Las fimbrias tipo 3 son filamentos de proteínas con forma similar a una hélice. Están presentes en prácticamente todos los aislamientos de *K. pneumoniae* y median la adhesión a varios tipos de células *in vitro*. A diferencia de la fimbria tipo 1 que es un factor de virulencia necesario ya que permite la adherencia de *K. pneumoniae* a células epiteliales, la fimbria tipo 3 es necesaria para la formación de biopelículas, ya que se ha comprobado que es importante su presencia para la unión inicial a la superficie celular o superficies inertes, además de estar involucrada en la unión célula-célula para la formación del biofilm (Schroll *et al.*, 2010). Por lo que las fimbrias del tipo 3, pueden ser un factor de virulencia relacionado a infecciones de vías urinarias asociadas a catéteres (Schroll, Barken, Krogfelt y Struve, 2010).

En *K. pneumoniae* este tipo de fimbria es codificado por el cluster de genes *mrkABCD* (genes que codifican para la unidad fimbrial tipo 3). La estructura de la fimbria tipo 3 consiste en una subunidad MrkA y una adhesina MrkD situada en la punta, Fig B. La proteína MrkB está involucrada en el ensamblaje y la expresión de la fimbria tipo 3, mientras que la proteína MrkF participa en la estabilidad superficial de la fimbria (Allen, Gerlach y Clegg, 1991). En contraste con la fimbria tipo 1, el tipo 3 es insensible a manosa, pero se ha

demostrado que poseen un receptor que se une a colágeno tipo IV y V (Paczosa y Mecsas, 2006).

Usualmente una biopelícula se forma cuando las bacterias que crecen entran en contacto con una superficie, se adhieren formando una estructura tridimensional (3D) compleja. Las bacterias dentro de esta estructura a menudo se vuelven resistentes a los productos químicos además de que proporcionan una fuente de infecciones (Davies, 2003). En *K. pneumoniae*, las fimbrias de tipo 3 se expresan durante la formación de biopelículas en los catéteres (Stahlhut, Struve, Krogfelt y Reisner, 2012; Schroll, Barken, Krogfelt y Struve, 2010). Las fimbrias de tipo 3 ayudan a *K. pneumoniae* en la colonización de los tubos endotraqueales y, por tanto, en la infección pulmonar de dos maneras: primero, MrkA se une directamente a las superficies plásticas y, segundo, MrkD facilita la unión al colágeno o las superficies recubiertas de matriz extracelular derivada de células bronquiales (Francois, Vudaux y Lew, 1998). Por otra parte es posible que las fimbrias de tipo 3 y posiblemente, de tipo 1 también contribuyan al ingreso y persistencia de *K. pneumoniae* en los ventiladores asociados a neumonía (VAPs). Los tubos endotraqueales, comúnmente utilizados para ventilar a los pacientes, permiten que las bacterias accedan a los pulmones, ya que obstaculizan el aclaramiento mucociliar del paciente, dañan los tejidos del huésped al colocarse y proporcionan una superficie para la formación de biopelículas (Kollef, 2004).

1.7.4 OMP's

Varias proteínas de membrana externa (OMPs) han sido clasificadas de importancia en *K. pneumoniae*, tal como la proteína OmpA presente en la membrana externa. Dicha proteína presenta un rol en la virulencia de *K. pneumoniae*. OmpA es una de las principales proteínas de membrana externa que se ensambla en esta bicapa lipídica a través de una región N-terminal, ocho regiones β -barril anfipáticas con la región C-terminal retenida en el periplasma (Pautsch y Schulz, 1998). OmpA se encuentra altamente

conservada entre los miembros de la familia *Enterobacteriaceae* (Confer y Ayalew, 2013). Dentro de las funciones que se le atribuyen a esta proteína se incluyen la integridad celular estructural, la adhesión a las superficies mucosas, la resistencia al suero, la invasión, la resistencia a los péptidos antimicrobianos y la activación de la célula huésped y en el crecimiento celular (Weiser y Gotschlich, 1991; Confer y Ayalew, 2013).

Se ha comprobado que OmpA presenta un rol en la activación de la respuesta del sistema inmune innato y adaptativo, ya que se une a las células epiteliales de los bronquios, y también a macrófagos, generando un aumento en la producción de citocinas (Pichavant, *et al.*, 2003) así como al reclutamiento de neutrófilos (Jeannin *et al.*, 2002). La importancia patogénica de OmpA se ha establecido en numerosos estudios, ya que se ha demostrado que una delección del gen *ompA* en *K. pneumoniae* ocasiona una síntesis mayor de interleucina 8 en las células bronquiales así como de TNF- α en comparación a cepas isogénicas que presentan OmpA (March *et al.*, 2011; Confer y Ayalew, 2013). OmpA y sus proteínas homólogas también están involucradas en la adhesión a células epiteliales en superficies mucosas (Confer y Ayalew, 2013).

Las proteínas de membrana externa (OMPs), son lipoproteínas asociadas a peptidoglucano (Pal) además de la lipoproteína mureína (LppA) desempeñan un papel en la virulencia de *K. pneumoniae*, ya que al deletarse los genes que codifican para Pal y LppA una reducción en la supervivencia al suero es observada, ya que la eliminación únicamente del gen *lppA* (lipoproteína mureína) ocasiona que la habilidad de *K. pneumoniae* de sobrevivir en presencia del suero se reduzca ligeramente, mientras que la susceptibilidad a este mismo aumenta drásticamente cuando la eliminación del gen *pal* (lipoproteínas asociadas a peptidoglucano) se lleva a cabo. En un trabajo donde se utilizaron mutantes HV de *K. pneumoniae* con delección isogénica de estos dos genes en un modelo de infección intraperitoneal de ratón se encontró que la pérdida de estos genes resulta en una menor eficiencia bacteriana (Hsieh *et al.*, 2013). Los experimentos *in vitro* con estas cepas indican que los mecanismos de mayor eficiencia en la que incurren

estas proteínas pueden incluir protección contra la fagocitosis de neutrófilos y muerte por neutrófilos y componentes del suero (Hsieh *et al.*, 2013). Además, estas proteínas probablemente contribuyan a la integridad y la impermeabilidad selectiva de la membrana celular de una manera independiente de la cápsula y del LPS (Lipopolisacárido) y, a lo largo de estas líneas, también fortalecen a *K. pneumoniae* contra detergentes aniónicos y ciertos antibióticos, sin embargo, aún se requiere de mayor estudio (Paczosa y Mecsas, 2016).

1.7.5 Porinas

Las porinas son estructuras proteicas que determinan la permeabilidad de la membrana externa en bacterias Gramnegativas, a través de canales abiertos al tránsito de agua, facilitando el transporte pasivo de moléculas hidrofílicas. Estas estructuras están presentes en la membrana externa, con una estructura diferente a las proteínas de membrana. Su estructura está conformada de dos hojas β antiparalelas, con secuencia polar lo que le confiere una resistencia a detergentes (Cowan *et al.*, 1992), Fig 10.

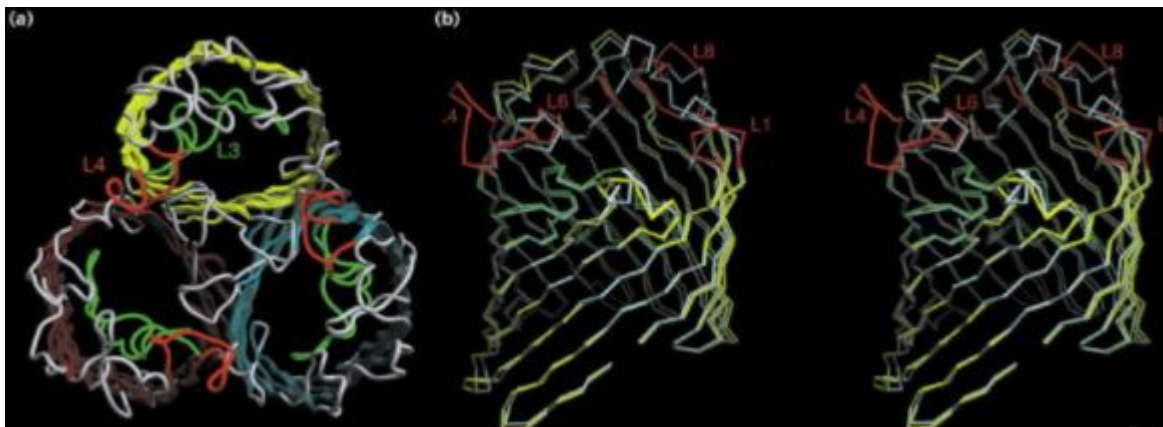


Fig 10. Estructura trimérica de OmpK36 de *K.pneumoniae*. a) Vista desde el exterior de la célula. Los tres monómeros tienen un color diferente. (b) Vista estereoscópica de la superposición de los monómeros de OmpK36 (amarillo) y OmpF (gris claro) (Pagés, James y Winterhalter, 2008).

Con base en estudios realizados en *E. coli* se han clasificado tres tipos de familias de porinas OmpF (Proteína F de la membrana externa de *Escherichia coli*), OmpC (Proteína C de la membrana externa de *Escherichia coli*) y PhoE (Proteína de membrana externa), estas porinas constituyen la base del conocimiento actual acerca de las porinas de las bacterias Gramnegativas; las familias OmpF y OmpC muestran una ligera preferencia por los cationes, mientras que PhoE selecciona fosfatos inorgánicos y aniones (Pagés, James y Winterhalter, 2008).

OmpK35 y OmpK36 son porinas que comúnmente no se expresan o son muy poco expresadas en cepas de *K. pneumoniae* resistentes a los antibióticos (Doumith, Ellington, Livermore y Woodford, 2009). Las porinas OmpK35 pertenece a la familia de porinas OmpF las cuales presentan un tamaño de canal grande, por otra parte, OmpK36 pertenece al grupo de porinas OmpC, los cuales poseen un tamaño de canal chico (Pagés, James y Winterhalter, 2008), además OmpK36 comparte un 87% de familiaridad con la porina OmpC de *E. coli*. La regulación negativa de estas porinas parece proveer una ventaja para *K. pneumoniae* frente a la selección de antibióticos, donde probablemente las porinas sirven como un canal que permite la entrada de antibióticos a las bacterias (Hernandez-Alles *et al.*, 2000), ya que al restaurar la expresión de los genes *ompK35* y *ompK36* en cepas de *K. pneumoniae* resistentes a carbapenemes se comprobó un decrecimiento significativo de las cepas resistentes; sin embargo en el caso de las cepas HV de *K. pneumoniae*, se observó que al deletar el gen *ompK36* se incrementó la resistencia a ciertos antibióticos (Hernandez-Alles *et al.*, 2000; Doumith, Ellington, Livermore y Woodford, 2009). Por ejemplo, la pérdida de la proteína OmpK36 en *K. pneumoniae* contribuye al aumento en la resistencia a los antibióticos, así como un incremento en la resistencia al suero (Confer y Ayalew, 2013), pero la resistencia es mayor al deletar tanto *ompK35* y *ompK36* ya que conduce a una mayor resistencia a los antibióticos que en cepas que presentan una sola delección (Tsai *et al.*, 2011). La delección de porinas es consecuencia de mutaciones puntuales, más frecuentemente debido a secuencias de inserción (ISs) que interrumpen las secuencias codificantes, lo

que conlleva a una terminación prematura durante la traducción; debido a mutaciones puntuales en la región promotora lo que probablemente afecta la transcripción y por último debido a mecanismos no identificados que funcionan a nivel de la traducción para evitar la inserción de porinas en la membrana externa.

1.7.6 LPS, función, composición y características

El Lipopolisacárido (LPS) es un glicoconjugado anfipático de masa molecular de aproximadamente de 100kDa; constituye del 10 al 15% del total de las moléculas de la membrana externa de las Gram negativas, y representa el 75% de total de la superficie bacteriana (Caroff y Karibian, 2003), una de las funciones más importantes es que sirve de soporte estructural de la membrana externa, por otra parte funciona como una barrera impermeable a pequeñas moléculas hidrofóbicas, además establece una barrera que protege a la célula del ingreso de moléculas tóxicas tales como antibióticos y sales biliares (Nikaido, 2003; Carpenter, Parkin y Khalid, 2016), que usualmente suelen penetrar bicapas lipídicas, esto genera que bacterias como *K. pneumoniae* presenten una resistencia innata a antimicrobianos (Zhang, Meredith y Kahne, 2013). Debido a que la estructura de LPS es el componente bacteriano principal que entra en contacto con el sistema inmune, frecuentemente juega un rol importante en la patogenicidad bacteriana (Needham y Trent, 2013), Fig 11.

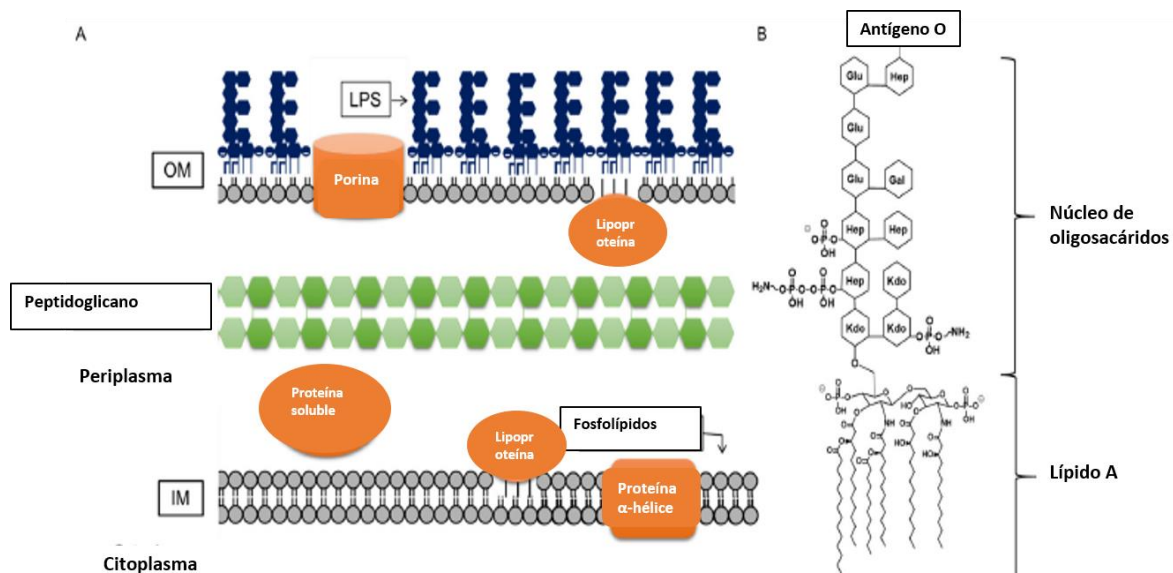


Fig 11. Estructura de la envoltura celular de las Gramnegativas. A) Donde la membrana interna (IM) presenta fosfolípidos, lipoproteínas, así como proteínas α -hélice. Por su parte, la membrana externa (OM) presenta en su cara interna fosfolípidos y lipoproteínas, mientras que en la cara externa se encuentran los lipopolisacáridos (LPS); también presenta porinas que atraviesan ambas caras. B) Se muestra la estructura prototipo del LPS producido por *E. coli*. (Modificado de Bertani y Ruiz, 2018).

Debido a la naturaleza anfipática el LPS funciona como una barrera. La porción acil del lípido A provee la hidrofobicidad que inhibe el paso de moléculas hidrofílicas a través de la membrana externa. Sin embargo, en contraste con otras bicapas lipídicas, el núcleo oligosacárido, así como el antígeno O, proveen al LPS de un carácter hidrofílico, generando que la membrana externa sea particularmente impermeable a compuestos hidrofóbicos (Bertani y Ruiz, 2018; Raetz y Whitfield, 2002).

1.7.6.1 Principales características del LPS

El LPS (Lipopolisacárido) posee la propiedad de ser termoestable, este es el principal antígeno de la pared celular, constituido por tres componentes: el polisacárido O, un núcleo oligosacárido, compartido por todas las enterobacterias, y finalmente el Lípido A, el cuál es el responsable de la actividad de endotoxina, siendo un importante factor de virulencia (Raetz y Whitfield, 2002), Fig 12.

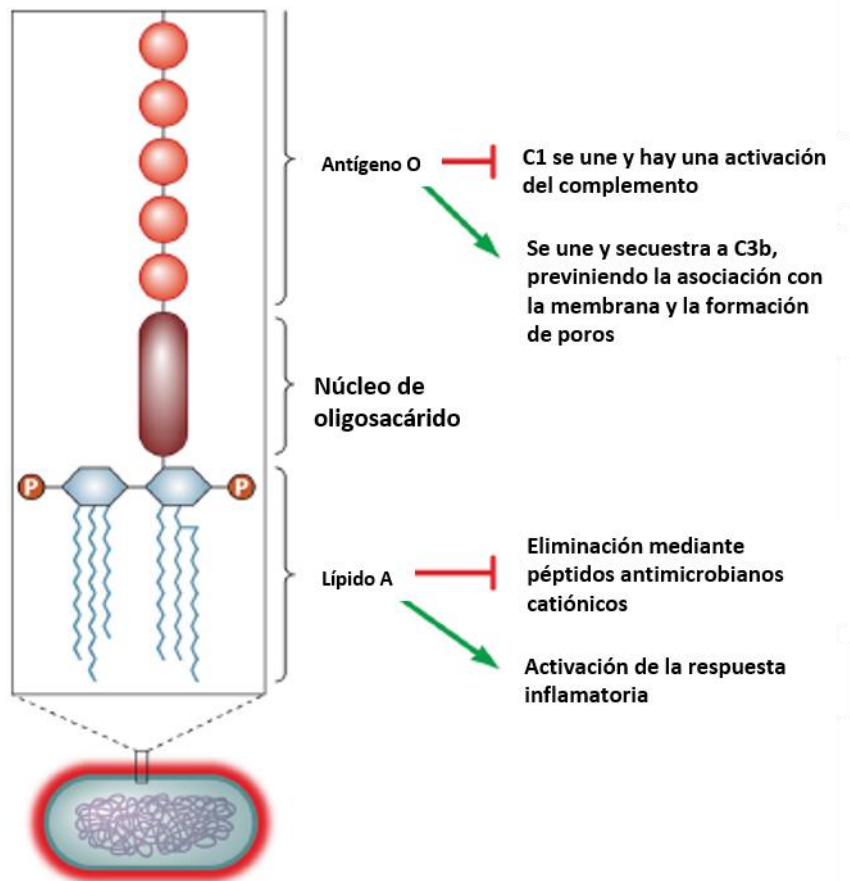


Fig 12. El LPS se compone de tres subunidades principales: lípido A, un núcleo de oligosacárido y antígeno O. El lípido A se inserta en la membrana bacteriana y es un activador potente de la inflamación. El lípido A también puede proteger contra la acción bactericida de péptidos antimicrobianos catiónicos. El antígeno O es la subunidad más externa de LPS. Tiene funciones importantes en la protección contra el complemento, incluida la prevención de la unión de C1q a las bacterias, que inhibe la activación posterior de la vía del complemento, así como la unión de C3b lejos de la membrana bacteriana externa. (Modificado de Paczosa y Mecsas, 2016).

El lípido A es la porción hidrofóbica de la molécula, esto le permite anclarse a la membrana externa; es un disacárido de glucosamina hexa-acetilado en el enlace β -1'-6. Por otra parte el núcleo oligosacárido, es el dominio que conecta al lípido A con el antígeno O, y se divide en núcleo interno y núcleo externo, el núcleo interno se encuentra unido al lípido A, además consiste en secuencias no repetidas de oligosacáridos, estas secuencias suelen estar formadas por Kdo (ácido 2-ceto-3-desoxioctanoico), L-glicero-D-mano-

heptosa (heptosas), el núcleo externo se une al antígeno O, y está constituido de azúcares comunes como hexosas y hexosaminas, estas últimas son el resultado de las modificaciones de las hexosas por fosforilaciones u otros sustituyentes tales como fosfoetanolaminas (Heinrichs , Yethon y Whitfield, 1998; Raetz y Whitfield, 2002); Por último se encuentra el antígeno O, el cual es un polisacárido extendido que se encuentra unido al núcleo de oligosacáridos; está formado por un repetido de dos a ocho azúcares (Kalynych, Morona y Cygler, 2014), este componente del LPS es la más diversa, ya que no únicamente difiere su composición y estructura entre especies, sino que también algunas Gram negativas no lo sintetizan como en el caso de la cepa *E. coli* K-12 (Stevenson *et al.*, 1994). Debido a lo anterior las moléculas de LPS compuestas únicamente de lípido A y el núcleo oligosacárido típicamente son referidas como lipooligosacáridos (LOS), antiguamente se ha hecho referencia a estos lipooligosacáridos (LOS) como LPS “rugoso”, el cual es diferente al LPS “suave” que incluye el antígeno O (Raetz y Whitfield, 2002). A pesar de que en su mayoría la estructura de LPS se encuentra conservada, hay variaciones que pueden ocurrir al nivel de especie; un ejemplo es la estructura del lípido A, ya que a pesar de estar conservada a nivel de especie, puede sufrir modificaciones en respuesta a las condiciones ambientales (Klein, Raina, 2015), sin embargo en *Klebsiella pneumoniae* dichas modificaciones no están presentes, por otra parte, sí presenta diferencias en la composición del núcleo de oligosacáridos, ya que se encuentra compuesto por 3 residuos Kdo, donde los dos primeros residuos son los que se unen a las glucosaminas del lípido A, el tercero se une al antígeno O, a su vez también están presentes moléculas de glucosaminas (GlcN) y Ácido galacturónico (GalA) además de heptosas (Vinogradov *et al.*, 2002).

1.7.6.2 Biosíntesis del LPS

1.7.6.2.1 Kdo2-lipid A biosíntesis

El proceso de síntesis del lípido A comienza en el citoplasma en presencia de la molécula precursora N-acetil glucosamina unida a un nucleótido

acarreador (UDP-GlcNAc). Este precursor UDP-GlcNAc es inicialmente acetilado por la enzima LpxA (Acil-[proteína portadora de acilo]--UDP-N-acetilglucosamina O-aciltransferasa) lo que da como resultado UDP-3-O-(acil)-GlcNAc (Anderson, Bulawa y Raetz, 1985). La enzima LpxA incorpora un grupo de 14 carbonos (Wyckoff *et al.*, 1998). La acetilación de UDP-GlcNAc no es favorable, sin embargo debido a que es el primer paso para la síntesis del lípido A, una segunda reacción es necesaria, la cual es irreversible, se trata de una deacilación llevada a cabo por la metaloenzima dependiente de Zn²⁺ LpxC que convierte UDP-3-O-(acil)-GlcNAc a UDP-3-O(acil)-GlcN (Anderson, Robertson, Macher y Raetz, 1988; Young *et al.*, 1995; Jackman, Raetz y Fierke, 1999), posteriormente UDP-3-O(acil)-GlcN es acetilado una segunda vez por la enzima LpxD (acetilasa) para dar origen a UDP-2,3-diacilglucosamina (Bartling, 2008), de igual manera que LpxA, LpxD es selectiva por los grupos donadores de B-hidroximiristato (Kelly, Stachula, Raetz y Anderson, 1993); después de la segunda acetilación la enzima LpxH remueve la uridina monofosfato (UMP) lo que genera 2,3-diacilglucosamina-1-fosfato, conocida también como lípido X (Babinski, Ribeiro y Raetz, 2002). La enzima LpxB añade el lípido X a una molécula UDP-2,3-diacilglucosamina mediante la formación de un enlace B 1'-6 lo que libera al transportador UDP (Uridina difosfato); el producto resultante es una glucosamina trece acetilada que se encuentra insertada en la cara interna de la membrana interna, a este disacárido comúnmente se le conoce como lípido A (Radika y Raetz, 1988). El disacárido lípido A es fosforilado en la posición 4' por la cinasa LpxK, produciendo entonces un lípido IV_A bifosforilado (Ray y Raetz, 1987), el siguiente paso consiste en la adición de dos grupos Kdo al núcleo de oligosacáridos del lípido IV_A, el cual está mediado por la enzima WaaA, la cual los añade secuencialmente al lípido IV_A a partir de su forma activada (Clementz y Raetz, 1991). Finalmente, dos eventos adicionales de acetilación son catalizados por las aciltransferasas LpxL y LpxM, en donde LpxL añade un grupo lauroil al grupo 2'-hidroximiristoil, subsecuentemente LpxM transfiere un grupo myristoil al hidroxil del grupo 3'-hidroximiristoil (Brozek y Raetz, 1990). Después de la acción secuencial de LpxL y LpxM se obtiene un lípido A

maduro hexa acetilado, el cual contiene los primeros dos residuos Kdo que conforman el núcleo interno que funcionará como un aceptor de grupos azúcares para así formarse el núcleo de oligosacáridos.

1.7.6.2.2 Biosíntesis del núcleo de oligosacáridos

El núcleo de oligosacáridos se divide en núcleo interno, el cual se encuentra próximo al lípido A; y núcleo externo, que es aquél al que se une el antígeno O (Raetz y Whitfield, 2002).

La composición del núcleo interno consiste en residuos Kdo (ácido 2-ceto-3-desoxioctanoico) y la presencia de grupos heptosas (L-glicero-D-manno-heptosa) (Amor, *et al.*, 2000; Qian, Garrett y Raetz, 2014). Mientras que por su parte el núcleo externo está conformado por una serie de hexosas generalmente, sin embargo, sus componentes son menos conservados en comparación con el núcleo interno (Amor, *et al.*, 2000; Qian, Garrett y Raetz, 2014).

1.7.6.2.3 Síntesis del núcleo interno

El primer paso en la síntesis del núcleo de oligosacáridos es realizado por la enzima WaaA (ácido 3-deoxi-D-manno-octulosónico transferasa), que añade los primeros dos grupos Kdo a la glucosamina del Lípido A, este suceso se lleva a cabo antes de la acetilación final que concluye la síntesis del lípido A (Belunis y Raetz, 1992). El núcleo interno es extendido por la acción de WaaC y WaaF a partir de la adición de dos residuos de heptosas (Gronow, Brabetz y Brade, 2000; Whitfield, Kaniuk y Frirdich, 2003), para que esta reacción se lleve a cabo, ADP-L-glicero-D-manno-heptosa generalmente participa como donador del sustrato para las reacciones de glicosilación del núcleo interno (Gronow, Brabetz y Brade, 2000). Las enzimas WaaP, WaaQ y WaaY catalizan en orden las últimas reacciones de la síntesis del núcleo interno del núcleo de oligosacáridos; por su parte WaaP fosforila la primera heptosa del núcleo interno, dicha heptosa fue añadida por WaaC previamente (Yethon *et al.*,

1998, Yethon y Whitfield, 2001), WaaQ transfiere una heptosa adicional a la segunda heptosa presente en el núcleo interno incorporada por WaaF y por último esta heptosa es fosforilada por la kinasa WaaY (Belunis y Raetz, 1992).

1.7.6.2.4 Síntesis del núcleo externo

La síntesis del núcleo externo comienza cuando un grupo glucosa se incorpora a la segunda heptosa, la adición es realizada por WaaG, al utilizar UDP-glucosa como sustrato donador. De manera siguiente las enzimas glicosiltransferasas WaaO y WaaB actúan sobre la glucosa y de manera independiente añaden un grupo glucosa y galactosa respectivamente, los cuales obtiene de grupos UDP donadores (Whitfield, Kaniuk y Frirdich, 2003). El último residuo de glucosa es adicionado por la enzima WaaJ, sin embargo, para que se lleve a cabo este paso es esencial la presencia del grupo galactosa, que está presente por la acción de WaaB (Whitfield, Kaniuk y Frirdich, 2003). Mediante la adición de un grupo heptosa a la penúltima glucosa se completa el último paso de la síntesis del núcleo externo del núcleo de oligosacáridos, este paso es mediado por la enzima glicosiltransferasa WaaU (Heinrichs, Yethon y Whitfield, 1998; Whitfield, Kaniuk y Frirdich, 2003), este grupo heptosa final es importante ya que sirve como aceptor del antígeno O. Una vez que la estructura lípido A-núcleo de oligosacáridos está completa es translocada a la cara externa de la membrana interna (Bertani y Ruiz, 2018).

1.8 Particularidades de *K. pneumoniae*

Al comparar las estructuras del LPS entre bacterias como *E. coli*, *S. enterica* (*Salmonella*) con *K. pneumoniae* es evidente las diferencias en las estructuras centrales internas y externas, Fig 13.

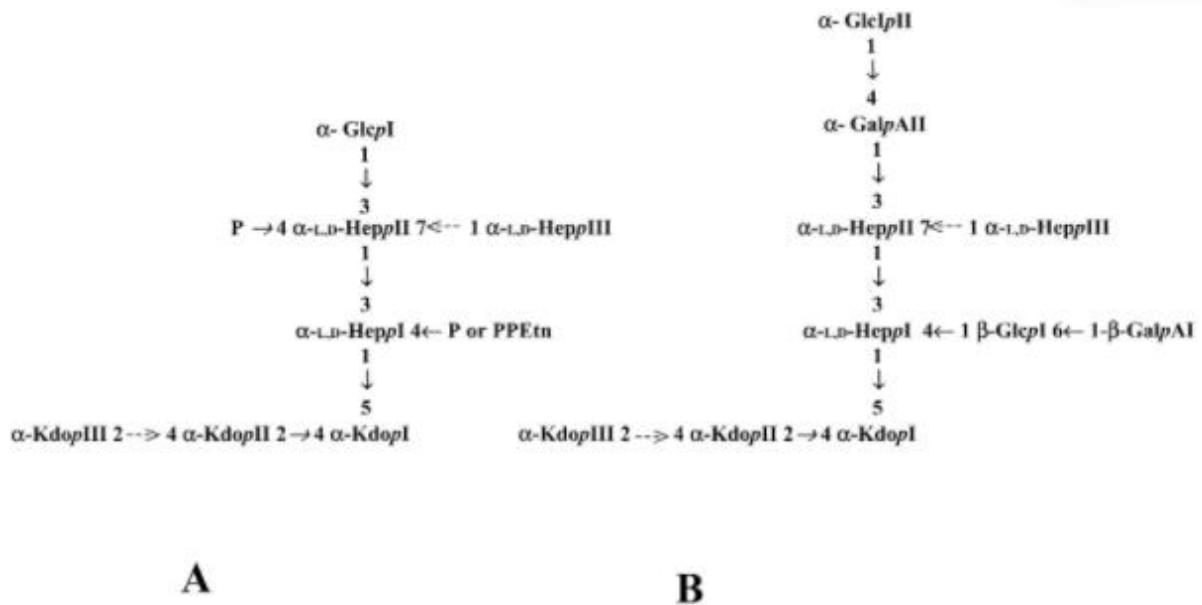


Fig 13. Comparación estructural del LPS de *E.coli*, *S. enterica* (A) y *K.pneumoniae* (B). Las flechas discontinuas indican modificaciones que no son estequiométricas o se limitan a un tipo de LPS particular (Regué *et al.*, 2001).

En las tres especies mencionadas, la estructura del núcleo interno contiene dos residuos de ácido 3-desoxi-d-mano octulopiranosónico (Kdop) y tres residuos del glicero-d-mano-heptopiranososa (Heppl, HepplI y HepplII). Las diferencias más llamativas que presenta *K. pneumoniae* son la ausencia de grupos fosforilo, la sustitución de Heppl en la posición O-4 por un disacárido de ácido β -d-galactopiranosónico- (1 \rightarrow 6) - β -d glucopiranososa (β -d-GalpAl- (1 \rightarrow 6) di- β -d-Glcpl) y sustitución de Glcpl en HepplI en la posición O-3 por un residuo α -d GalpAll (Regué *et al.*, 2001)

La ausencia de grupos fosforilo se ve sustituido por la unión de B-glucosa a la heptosa y a su vez se encuentra unida en el C6 Ácido galacturónico (B-GalA) (Regué *et al.*, 2001). En la mayoría de los miembros de las *Enterobacteriaceae*, incluidas *E. coli* y *Salmonella*, la cadena principal del núcleo interno de oligosacárido del lipopolisacárido está modificada por grupos fosforilo. Las cargas negativas proporcionadas por estos residuos son importantes para mantener la función de barrera de la membrana externa. Los mutantes que carecen de la región central de heptosa y los residuos de fosfato muestran defectos pleiotrópicos conocidos colectivamente como

fenotipo rugoso profundo, caracterizado por cambios en la estructura y función de la membrana externa (Nikaido y Vaara, 1985). *Klebsiella pneumoniae* carece de residuos fosforilo en el núcleo interno de oligosacárido, pero en cambio contiene ácido galacturónico (GalA). De acuerdo con los resultados de Fridich y colaboradores en el 2005 el mutante carente de GalA mostró características de un fenotipo rugoso profundo, exhibiendo una hipersensibilidad a los compuestos hidrófobos y polimixina B, un perfil de la membrana externa alterado y la liberación de la enzima periplásmica β -lactamasa. Estos resultados indican que la carga negativa proporcionada por los grupos carboxilo del ácido galacturónico juega un papel equivalente a los residuos de fosfato presentes en el núcleo interno del oligosacárido que participan en el establecimiento de la integridad de la membrana externa en *E. coli* y *Salmonella* (Fridich, Bouwman, Vinogradov y Whitfield, 2005).

Durante la síntesis del núcleo interno del LPS en *E. coli*, así como *S. enterica*, éste es extendido por la acción de WaaC y WaaF, ya que codifican para una ADP-L-glicero-D-manno-heptosa, la cual participa como donador del sustrato para las reacciones de glicosilación del núcleo interno (Gronow, Brabetz y Brade, 2000); sin embargo en *K. pneumoniae*, waaC y waaF codifican para una ADP-heptosa-heptosiltransferasa I y una ADP-heptosa-heptosiltransferasa II respectivamente (Regué *et al.*, 2001).

Mediante el análisis de monosacáridos del núcleo de oligosacáridos, se encontró la presencia de B-Glc, α -GlcN, LD-Hep, Kdo y α -GalA, en ocho serotipos de *K. pneumoniae* (Vinogradov y Perry, 2001); por lo que la síntesis del núcleo externo del núcleo de oligosacáridos difiere en gran medida en comparación a la biosíntesis anteriormente explicada.

Recordando la síntesis del núcleo externo, este comienza con la adición de un grupo glucosa, esta acción es realizada por las proteínas WaaG que pertenecen a la familia 4 de glicosiltransferasas (Carbohydrate Active Enzymes Database, 2021), el gen waaG codifica para una α -1,3-glucosiltransferasa I (WaaG) que transfiere glucosa de UDP-glucosa al residuo

de l-glicero-d-mano-heptosa-II (HepII) del núcleo interno del LPS (Heinrichs, Yethon y Whitfield, 1998), una vez incorporada la glucosa actúa una galactosiltransferasa transfiriendo D-galactosa a la glucosa previamente incorporada (Rothfield, Osborn y Horecker, 1964; Müller, Hinckley y Rothfield, 1972), sin embargo, en *K. pneumoniae* la síntesis del núcleo externo no comienza con la adición de un grupo glucosa, en su lugar un grupo α -GalA es añadido por una proteína WabG que comparte un 26% de identidad y un 44% de similaridad con la proteína WaaG de *E.coli* (Izquierdo *et al.*, 2003); de manera siguiente al proceso, se adiciona un grupo α -GlcN en la posición 1-4 de α -GalA, posteriormente un grupo α -Kdo es incorporado en la posición 2-6 y a este puede estar unido desde una a cuatro heptosas, dependiendo del serotipo; esto es importante ya que la presencia de Kdo y por ende de las heptosas permitirán la unión del antígeno O al núcleo de oligosacáridos (Vinogradov y Perry, 2001).

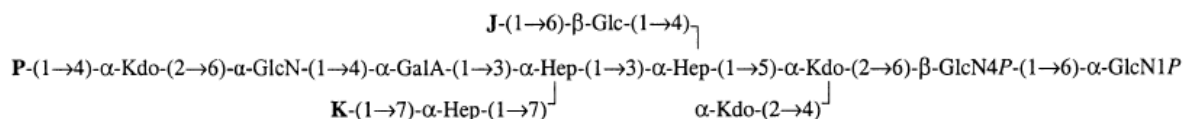


Fig 14. LPS de *K. pneumoniae*. Todos los LPS de *K.pneumoniae* presentan estructuras similares, difiriendo solamente en el número y posición de β -D-ácido galacturónico (β -GalA), donde P es H o α -Heptosa; J, K es H o bien β -GalA (Vinogradov y Perry, 2001).

1.8.1 WabG en *K. pneumoniae*

En comparación con otras estructuras de lipopolisacáridos entre la familia Enterobacteriaceae, en *K. pneumoniae* el primer residuo que constituye el núcleo externo de LPS es D-GalA (ácido galacturónico), el cual se encuentra unido por un enlace α 1,3 a L-D-HepII. *wabG* pertenece al cluster de genes *waa*, y presenta una similitud del 44% y un nivel de identidad de 26% con la proteína WaaG de *E. coli* (Izquierdo *et al.*, 2003); en *K.pneumoniae* se le llama *wabG* al gen, ya que a diferencia de *waaG* que codifica para una

glucosiltransferasa que utiliza un UDP-Glc como sustrato donador, *wabG* codifica para una ácido galacturónico transferasa, la cual emplea UDP-GalA como sustrato donador, el cual es el resultado de la expresión del gen *uge* (uridin difosfato galacturonato 4-epimerasa) en *K. pneumoniae* (Regué *et al.*, 2001), Fig 15.

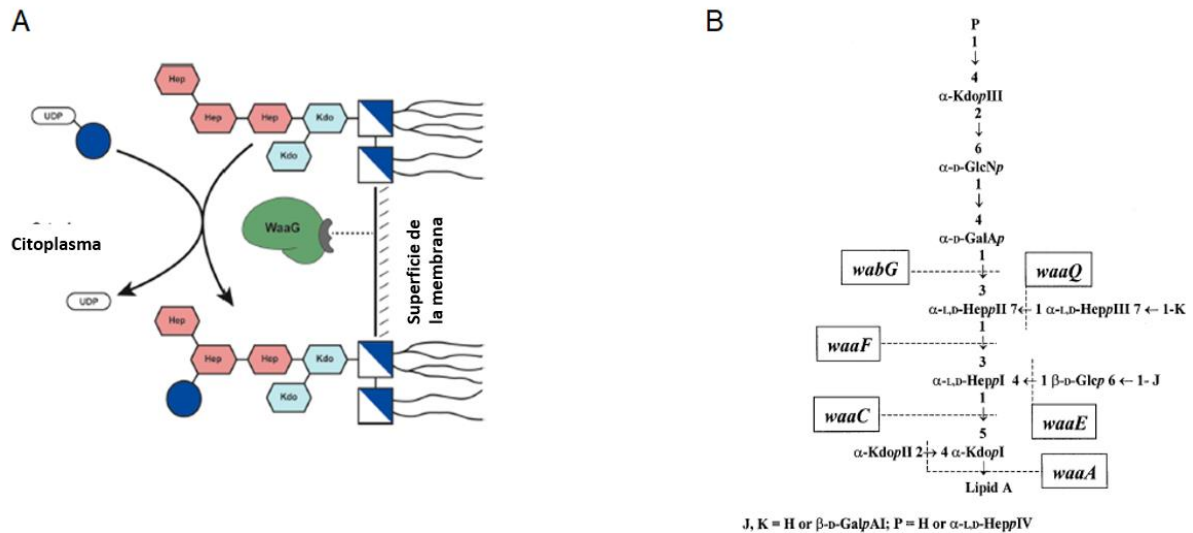


Fig 15. Representación de WaaG en *E. coli* y *wabG* en *K. pneumoniae*. A) Esquema de la glucosiltransferasa WaaG en *E.coli* transfiriendo un residuo de glucosa a partir de un donador UDP-Glc (Uridina difosfato glucosa) a una heptosa-II que forma parte del núcleo interno del LPS, modificado de Muheim *et al.*, 2016. B) Se muestran los genes involucrados en la síntesis del LPS, donde *wabG* codifica para una ácido galacturónico transferasa, la cual transfiere un ácido galacturónico a partir de un UDP-GalA a una heptosa-II que constituye en núcleo interno del LPS en *K. pneumoniae* (Izquierdo *et al.*, 2003).

Dentro del cluster *waa* (genes implicados en la biosíntesis de LPS), *orf8* es el que codifica para el gen *wabG*, su posición dentro del genoma de *K. pneumoniae* es en los pares de bases 8613–9740, mientras que el tamaño de la proteína que sintetizan es de 42.559 Kda (Regue *et al.*, 2001), Fig 16.

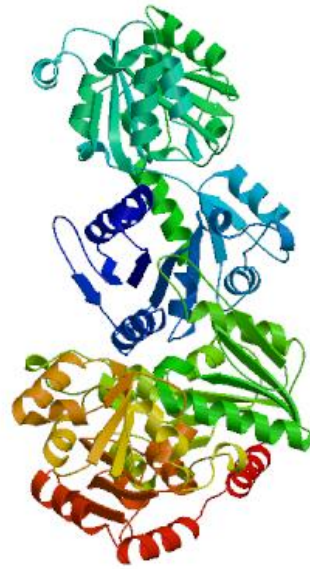


Fig 16. Estructura tridimensional de la proteína WabG generada por análisis in silico.

1.8.2 *waaG* codifica para proteínas glucosiltransferasas (GT) de la familia 4

Las proteínas WaaG pertenecen a la familia 4 de glucosiltransferasas (Carbohydrate Active Enzymes, 2021), la cual es una α -1,3-glucosiltransferasa I (WaaG) que transfiere glucosa de UDP-glucosa al residuo de 1-glicero-d-mano-heptosa-II (HepII) del núcleo interno del LPS (Heinrichs, Yethon y Whitfield, 1998). Las glucosiltransferasas (GT) son enzimas que catalizan la adición de varios sacáridos a otras biomoléculas. Las GT abarcan un gran grupo de enzimas que tienen andamios estructurales similares, pero que han evolucionado para utilizar una gran diversidad de sustratos. A menudo, las glucosiltransferasas (GT) actúan de manera secuencial para construir un polímero complejo; el producto de una GT por tanto es el sustrato aceptor de la siguiente GT. Varias funciones celulares, tales como: almacenamiento de energía, estructura de la pared celular, interacciones célula-célula, señalización, hospedero-patógeno y glicosilación de proteínas, dependen de carbohidratos complejos y polisacáridos. Debido a esto, la biosíntesis de estos oligosacáridos y polisacáridos químicamente diversos requiere el uso de múltiples glucosiltransferasas (GT) (Varki *et al.*, 1999; Lairson, Henrissat, Davies y Withers, 2008; Albesa-Jové *et al.*, 2014).

Existen alrededor de 300,000 GT conocidas (Carbohydrate Active Enzymes Database, 2021), a pesar de la gran diversidad de sus secuencias, las GT se pueden clasificar en tres clases estructurales: GT-A, GT-B y GT-C (Cote y Taylor, 2017), Fig 17. A pesar de sus diferencias estructurales las GT catalizan la formación de un enlace glicosídico, donde un nucleótido de azúcar de alta energía dona un monosacárido a una molécula aceptora, como UDP-Glc. Este aceptor puede ser una variedad de moléculas, como oligosacáridos, monosacáridos, proteínas, lípidos y otros (Sinnot, 1990; Varki *et al.*, 1999)

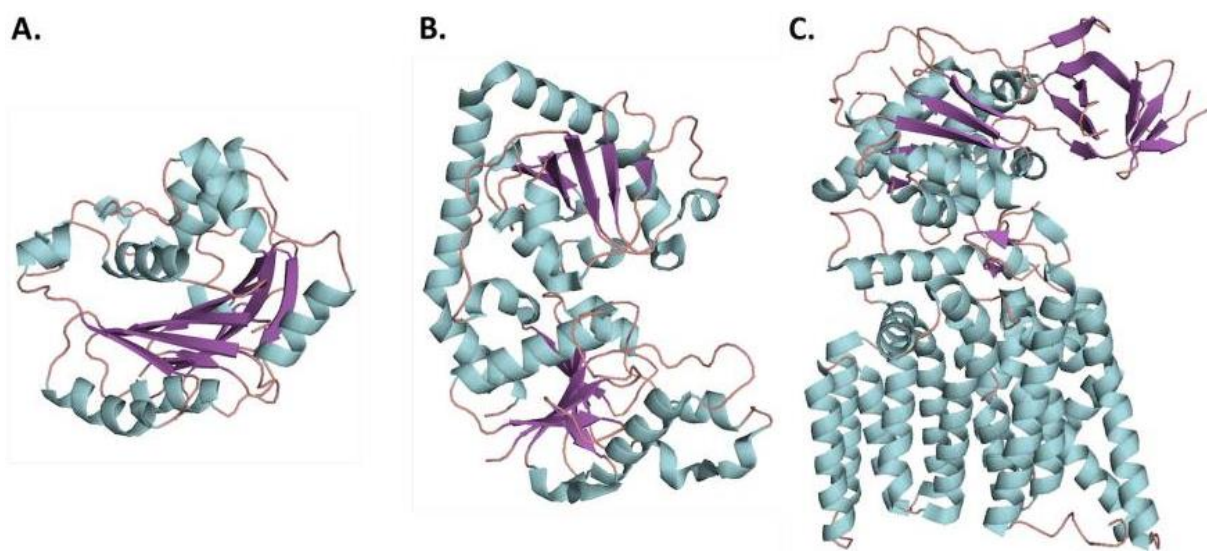


Fig 17. Estructuras representativas de las primeras enzimas glicosiltransferasa (GT) cristalizadas en cada familia estructural. En color salmón se muestran bucles, mientras que en azul se designan las hélices α y por último las láminas β se señalan en color púrpura. (A) Estructura correspondiente a GT-A de *Bacillus subtilis*, PDB: 1QGQ; (B) Estructura de GT-B representado por el bacteriófago T4 β -glucosiltransferas, PDB: 1JG7; (C) Estructura de GT-C de *Campylobacter lari*, PDB: 3RCE (Cote y Taylor, 2017).

1.8.2.1 Mecanismo catalítico de las GT

Independientemente de su estructura, las glucosiltransferasas catalizan la transferencia mediante el mecanismo de “inversión” o “retención” de un grupo glicosilo al carbono anomérico con respecto a los sustratos y productos de reacción (Lairson, Henrissat, Davies y Withers, 2008), Fig 18.

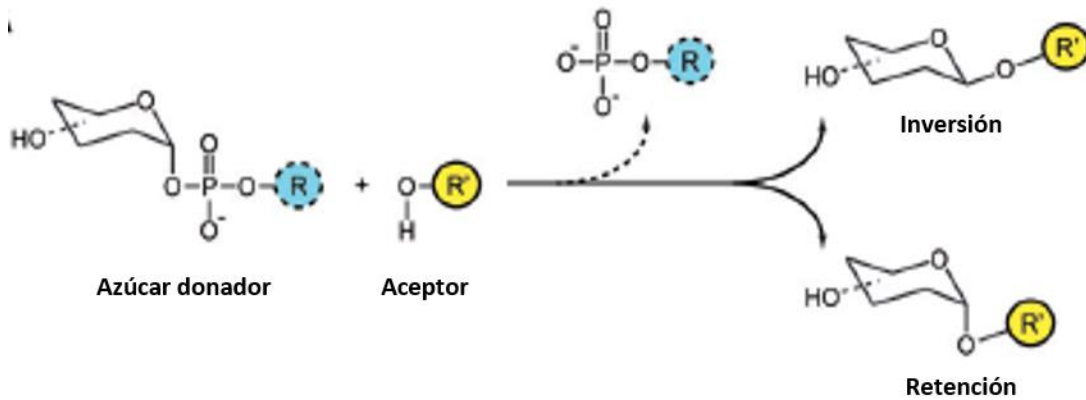


Fig 18. Mecanismos catalíticos en GT, se muestran los mecanismos de inversión y retención. Modificado de Lairson, Henrissat, Davies y Withers, 2008

El mecanismo de catálisis mediante inversión consiste en el empleo de un mecanismo de reacción de sustitución nucleofílica o SN₂, lo que implica dos reacciones sincrónicas donde un enlace se forma y otro se rompe, ya que el carbono bajo ataque nucleofílico entra bajo un estado de transición pentacoordinado, una vez formado el nuevo enlace con el grupo entrante, el grupo saliente es empujado al lado opuesto, por lo que el producto se forma con la inversión de la geometría tetraédrica en el átomo central (Hamlin, Swart y Bickelhaupt, 2018). Sin embargo, generalmente se acepta que la reacción tiene un estado de transición similar al ión oxocarbenio (grupo carbonilo protonado o alquilado) que se define más correctamente como un mecanismo similar al SN₁ (reacción de sustitución) parcialmente asociado. SN₁ se lleva a cabo mediante tres pasos, donde el primero consiste en la separación del grupo saliente, puede ser un ion, del resto de la estructura, posteriormente se lleva a cabo un ataque nucleofílico por un ion oxonio para finalizar la reacción con una desprotonación mediante la remoción de un ion hidrógeno del sitio donde se llevó a cabo el ataque nucleofílico (McMurray, 1992; Rini, Enko y Varki, 2009), Fig 19.



Fig 19. Ejemplificación del mecanismo de catálisis por inversión; donde el mecanismo de reacción llevado a cabo es S_N2 , con un estado de transición similar al ion oxocarbenio. Modificado de Albesa-Jové *et al.*, 2014.

La catálisis por retención es un mecanismo de reacción S_Ni , donde la salida del grupo saliente y el ataque nucleofílico ocurren en la misma cara del azúcar, lo que implica un mecanismo de un solo paso a través de la formación de un estado de transición similar al oxocarbenio con formación de enlaces glucósidos aceptor C1-O asíncronos y enlace fosfato C1-O desglose; ya que el ion oxocarbenio se presenta de forma corta actuando como intermediario para así permitir el rearrreglo nuclear para el ataque nucleofílico adecuado (Albesa-Jové *et al.*, 2014), Fig 19. Se sabe que las familias GT-A y GT-B tienen enzimas con catálisis de inversión y retención. Las GT-B pertenecientes a la familia 4 presentan un mecanismo catalítico de retención (Albesa-Jové *et al.*, 2014).

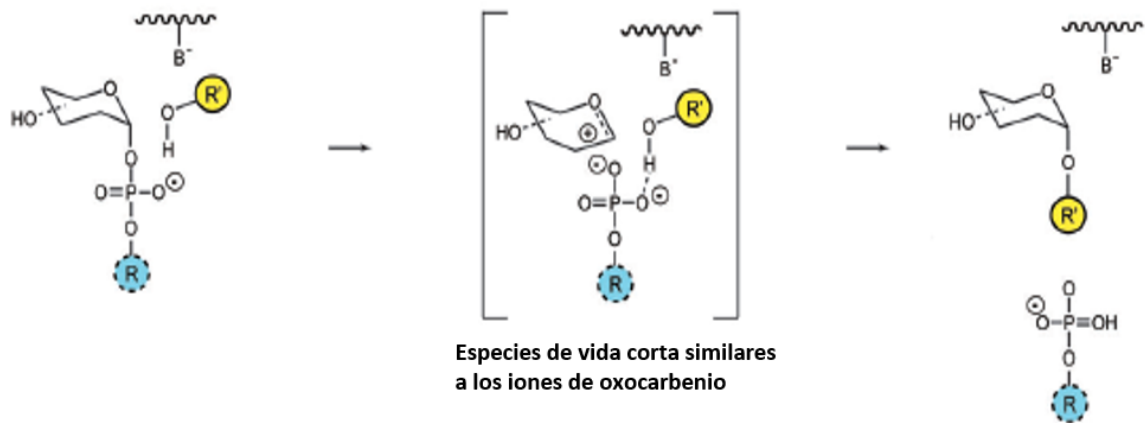


Fig 19. Mecanismo catalítico de retención, presente en las enzimas GT-B pertenecientes a la familia 4. Modificado de Albesa-Jové *et al.*, 2014.

1.8.2.2 Estructura de GT-B y su asociación a la membrana interna en la región periplásmica

GT-B (glucosiltransferasa B) al igual que GT-A presenta un sitio de unión de nucleótidos o plegado de Rossmann, este dominio contiene dos conjuntos de unidades β - α - β - α - β , que juntas forman una sola hoja paralela flanqueada por α -hélices. Un bucle largo, o cruce, frecuentemente entre las cadenas 3 y 4 crea una cavidad natural que participa en la unión del anillo de nucleótidos. Ahora bien, en el caso particular de GT-B, este tipo de enzima presenta dos dominios plegados de Rossmann separados por una cavidad profunda en la cual está presente el centro catalítico. Por otra parte, generalmente es aceptado que en las enzimas GT-B el nucleótido donador de azúcar principalmente se une al dominio C-terminal de la proteína, mientras que el dominio N-terminal está involucrado en el reconocimiento del sustrato aceptor (Albesa-Jové *et al.*, 2014).

Las enzimas GT-B asociadas a la membrana representan un grupo especializado de GT con la notable capacidad de reconocer los sustratos donadores y aceptores de nucleótidos mono o difosfo-azúcares hidrófilos solubles en agua, principalmente en forma de lípidos hidrófobos y proteínas asociadas a la membrana (Forneris y Mattevi, 2008). Dentro de la familia GT-B existen dos tipos de asociación: la monotópica y periférica. En el caso de la

enzima GT-B para la cual codifica WaaG, es del tipo monotópica (Albesa-Jové *et al.*, 2014). Las enzimas monotópicas son un tipo de ecto proteína perteneciente a la clasificación de proteínas integrales, cuyo dominio hidrofílico sobresale por uno u otro lado de la bicapa, pero no por ambos lados de ella (López, Infante y Trejo, 1986). La asociación de las enzimas monotópicas con la membrana plasmática consiste en una serie de pasos; en el primero, la unión del péptido se inicia mediante la atracción electrostática de los residuos cargados positivamente a la membrana aniónica, los residuos cargados positivamente están presentes en su mayoría en el dominio N-terminal de la proteína (López-Arcilla, Infante, y Trejos, 1986). Dependiendo de la carga del péptido y la fuerza del potencial de superficie de la membrana, la atracción electrostática aumentaría significativamente la concentración de proteína cerca de la superficie de la membrana, en comparación con la fracción soluble. El siguiente paso implica la transición del péptido probablemente al plano de unión. La ubicación exacta de esta capa es difícil de definir y depende del equilibrio hidrófobo / hidrófilo de los grupos moleculares y las fuerzas involucradas. El tercer paso en el proceso de unión es un cambio de la conformación del péptido unido, Fig 20. En muchos casos, los péptidos están en una conformación de espiral aleatoria en solución, pero adoptan una conformación α -helicoidal cuando se asocian a la membrana lipídica (Leventin y Silvius, 1998; Albesa-Jové *et al.*, 2014). La penetración del péptido / proteína depende de la naturaleza química de los lípidos, péptidos y carbohidratos involucrados y también de la naturaleza mecanicista de los procesos investigados, en los que tanto la ubicación como el momento de la asociación de membranas pueden controlarse estrictamente (Albesa-Jové *et al.*, 2014).

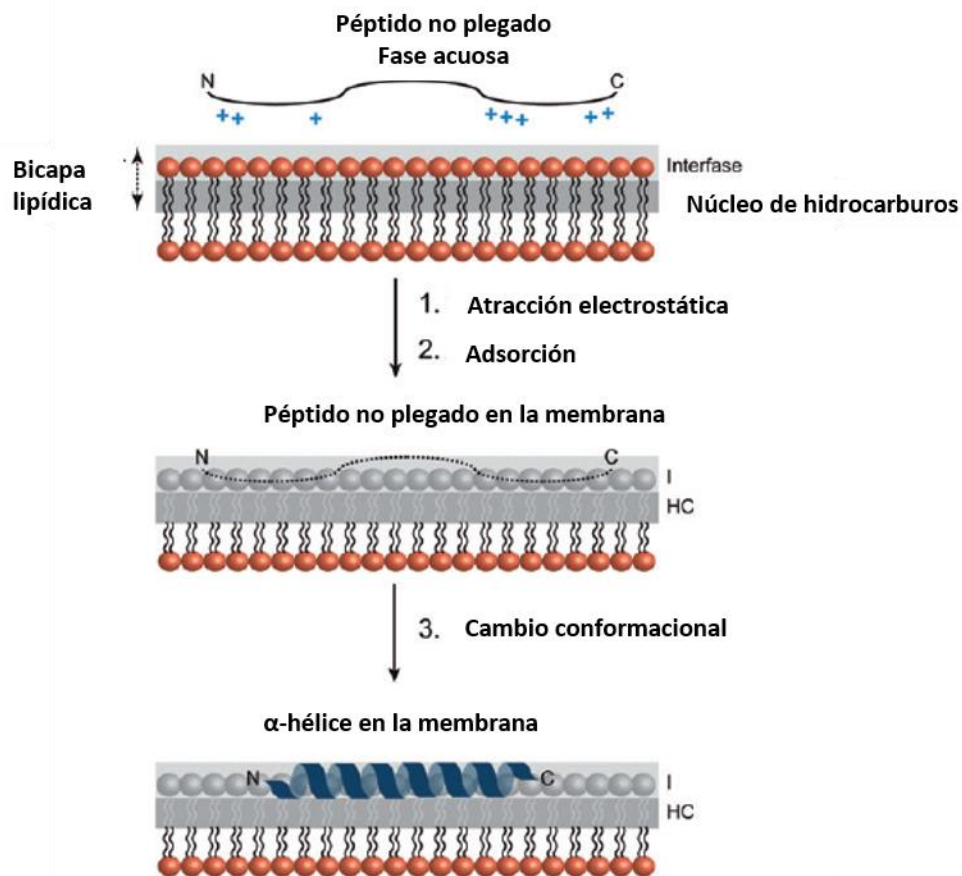


Fig 20. Reconocimiento molecular de un péptido en la superficie de la membrana plasmática. Se muestra una representación esquemática de los diferentes pasos involucrados en el proceso de unión del péptido a la superficie de la membrana. Modificado de Albesa-Jové *et al.*, 2014.

1.8.3 Gen *uge* (uridin difosfato galacturonato 4-epimerasa) en *K. pneumoniae*

Los genes implicados en la biosíntesis del núcleo del LPS de *K. pneumoniae* así, como en otras Enterobacteriaceae, se encuentran en el cluster *waa* (también conocido como *rfa*) (Regué *et al.*, 2001). La comparación de las estructuras conocidas del núcleo del LPS de la familia Enterobacteriaceae revela que el primer residuo del núcleo externo podría ser glucosa (Gluc) o un residuo de ácido galacturónico (GalA) (Regué *et al.*, 2004). Donde para el caso específico de *K. pneumoniae* el primer residuo que presenta es GalA, ya que presenta una sustitución de la L-glicero-D-manoheptopiranososa II en la posición

O-3 por un residuo de ácido -D-galacturónico (Radziejewska-Lebrecht *et al.*, 1994; Regue *et al.*, 2001).

Sin embargo, para que GalA sea añadido es necesario un sustrato UDP-GalA, producto de la actividad enzimática de una uridin difosfato galacturonato 4-epimerasa (UDPGLE) codificada por *uge*, que permite la producción de un UDP-GalA a partir de uridin 5'-difosfato α -D-ácido glucorónico (UDP-GlcA), el cual es el intermediario principal de diversos metabolismos incluyendo la biosíntesis de monosacáridos esenciales, polisacáridos y metabolitos secundarios (Freeze, Hart y Schaar, 2017).

1.8.3.1 Actividad de la enzima uridin difosfato galacturonato 4-epimerasa

La enzima UDP-galacturonato-4-epimerasa (UDP-GLE) cataliza la reacción de UDP-GlcA a UDP-GalA; pertenece a la superfamilia de proteínas deshidrogenasa / reductasa de cadena corta (SDR) (Kavanagh, Jörnvall, Persson y Oppermann, 2008), a la subclase extendida de SDR que se diferencian del tipo de SDR canónico por tener la coenzima NAD + estrechamente unida a su estructura (Liu, Vanhooke y Frey, 1996). La característica común de su mecanismo parece ser un intermedio transitorio de ácido UDP-4-ceto-hexosa-urónico que se forma a partir de la extracción de protones de UDP-GlcA del C4-OH junto con transferencia de hidruro al complejo enzima-NAD (Gatzeva-Topalova, May y Sousa, 2005; Allard, Giraud y Naismith, 2001; Thoden, Henderson, Fridovich-Keil y Holden, 2002). Además, únicamente UDP-GLE evita la descarboxilación de UDP-GlcA, ya que es capaz de catalizar la re-adición del hidruro en la posición ecuatorial del C4 para lograr el cambio de D-glucosa a D-galactosa en estereoquímica (Broach, Gu y Bar-Peled, 2011). El primer paso es la unión del ácido uridina difosfato glucurónico (UDP-GlcA) a la enzima libre (E-NAD⁺), para posteriormente sufrir una carboxilación, se sugiere que la carboxilación del sustrato UDP-GlcA no sirve únicamente para el reconocimiento del sitio de unión, sino que también está involucrado en el posicionamiento correcto del sustrato para que el evento catalítico se lleve a cabo; ya una vez carboxilado UDP-GlcA, es

sometido a una red de puentes de hidrógeno coordinado por 4 residuos, Thr126, Ser127, Ser128 y Thr178 que participan en el alineamiento de manera ecuatorial del sustrato dentro del sitio activo. Tyr149 juega un papel importante en el alineamiento del sustrato para que tanto la carboxilación como la extracción del hidruro a NAD^+ sea llevado a cabo. La transferencia de hidruro de C4-H a NAD^+ genera el complejo $\text{E}^*\text{-NADH}$ y ácido ceto-hexosa-urónico UDP-4 como intermedio de reacción. Este intermedio 4-ceto gira alrededor de la columna vertebral de fosfato del sustrato colocando la cara opuesta del grupo 4-ceto hacia NADH . La transferencia de hidruro de NADH produce el producto ácido uridina difosfato galacturónico (UDP-GalA), el cual se libera de la enzima generando nuevamente el complejo E-NAD^+ (Borg, Dennig, Weber, y Nidetzky, 2020). Fig 21.

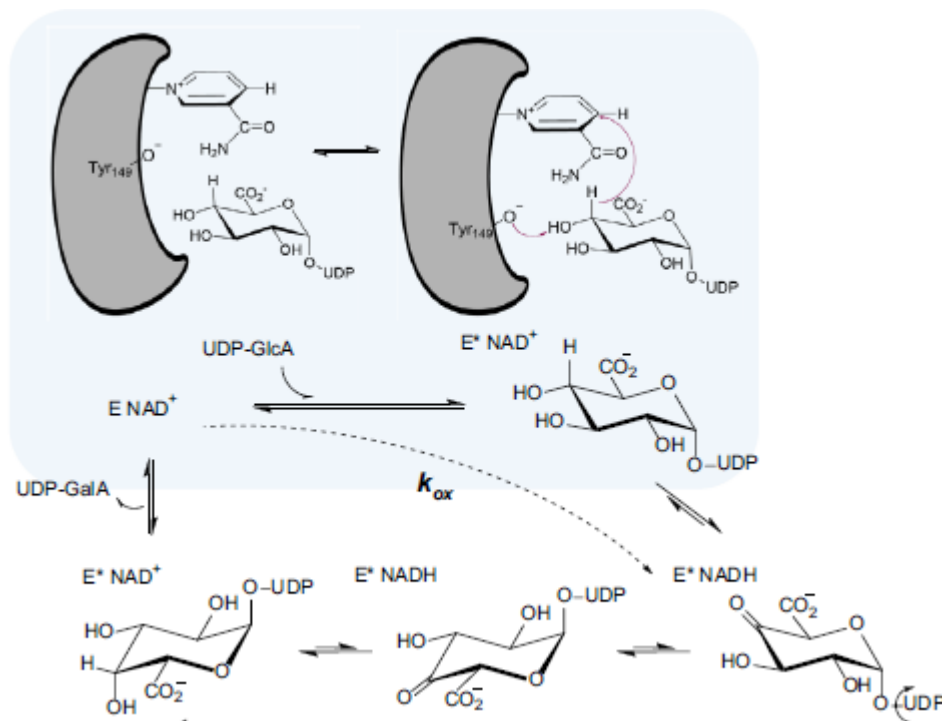


Fig 21. Mecanismo cinético propuesto para UDP-GLE. El primer paso es la unión del ácido uridina difosfato glucurónico (UDP-GlcA) a la enzima libre (E-NAD^+), incluido un cambio conformacional lento (resaltado con fondo gris) en la enzima a $\text{E}^*\text{-NAD}^+$. La transferencia de hidruro de C4-H a NAD^+ produce $\text{E}^*\text{-NADH}$ y ácido ceto-hexosa-urónico UDP-4 como intermedio de reacción. Este intermedio 4-ceto gira alrededor de la columna vertebral de fosfato del sustrato colocando la cara opuesta del grupo

4-ceto hacia NADH. La transferencia de hidruro de NADH produce el producto ácido uridina difosfato galacturónico (UDP-GalA) que se libera de la enzima regeneradora E-NAD⁺ (Borg, Dennig, Weber, y Nidetzky, 2020).

1.8.3.1.1 Biosíntesis del polisacárido O

El antígeno O es el componente del LPS con mayor diversidad, por ello se hablará de los aspectos más conservados de la biosíntesis del antígeno O y su subsecuente ligación con la molécula del núcleo de oligosacáridos-Lípido A. El polisacárido O es el dominio hidrofílico e inmunodominante del LPS, consiste en un número variable de unidades repetidas de oligosacáridos que se proyecta desde el núcleo hacia el exterior de la superficie bacteriana (Raetz y Whitfield, 2002), es extremadamente variable inter e intraespecie, esta variabilidad recae en la unión, naturaleza y orden de los diferentes azúcares que lo constituyen (Lerouge y Vanderleyden, 2001). El antígeno O posee una cadena polisacárida que varía en su longitud, llegando hasta 40 unidades repetidas de didesoxihexosas, sin embargo, al menos 20 diferentes moléculas de azúcar pueden constituirlo; a diferencia del núcleo de oligosacáridos que es sintetizado directamente en la molécula de Lípido A, el antígeno O es sintetizado de manera independiente de esta estructura. Los mecanismos para la biosíntesis y ensamblaje del antígeno O varían entre los diferentes organismos y cepas, sin embargo, se pueden generalizar en tres tipos: la vía dependiente del Wzy (vía especial de los heteropolímeros), el mecanismo de los transportadores ABC, y la vía dependiente de sintasa, esta última se ha identificado en una sola especie de *Salmonella*, además se encuentra pobremente descrita (Raetz y Whitfield, 2002; Kalynychn, Morona y Cygler, 2014). Los genes involucrados en esta vía se encuentran generalmente en el locus *rfb* del cromosoma bacteriano y se clasifican en tres grupos: los genes que intervienen en la biosíntesis de azúcares de nucleótidos, el grupo de genes que codifican a las glicosiltransferasas y los genes que intervienen en el procesamiento del antígeno O denominados *wzx* que codifica para la translocasa Wzx, por su parte el gen *wzy* codifica para la polimerasa Wzy y por último *wzz* codifica la proteína Wzz que regula la longitud de la cadena

del antígeno O (Samuel y Reeves, 2003; Valdano, 2003). El primer paso en la síntesis del antígeno O se encuentra bien conservada y consiste en la transferencia de un azúcar monofosfato a la molécula transportadora undecaprenil fosfato (Und-P) presente en la cara interna de la membrana interna. El mecanismo Wzy involucra la síntesis individual de las subunidades repetidas O sobre la cara citosólica, seguido por su translocación a la cara periplásmica de la membrana interna, es en esta región donde las subunidades comienzan a polimerizarse formando un polisacárido, este posteriormente se une al núcleo del oligosacárido del lípido A con la liberación de undecaprenol fosfato (Und-PP) (McGrath y Osborn, 1991; Whitfield, 2006). Las unidades O son polimerizadas por la proteína Wzy y transportadas por la translocasa Wzx, mientras que la proteína Wzz regula el número de unidades O que se unen al núcleo de oligosacáridos-Lípido A (Reeves y Wang, 2002; Franco y Reeves, 1998).

El segundo mecanismo de biosíntesis del LPS es el de los transportadores ABC, vía predominante en la síntesis de los antígenos O homopolímeros; estos transportadores utilizan la energía del ATP para transportar las moléculas a través de la membrana. Por su parte el núcleo de los transportadores ABC consiste en cuatro dominios: dos transmembranales y dos unidos a nucleótidos, que contienen secuencias conservadas involucradas en la unión e hidrólisis del ATP. La síntesis del antígeno O comienza en la cara citosólica de la membrana y el alargamiento de polímero es mediado por glicosiltransferasas. Las glicosiltransferasas primero polimerizan el antígeno O en una molécula Und-PP acarreadora presente en la cara citosólica de la membrana interna (Bertani y Ruiz, 2018), la cual es activada mediante la donación de un azúcar. El polímero naciente es transportado a través de la membrana citoplasmática por las proteínas transportadoras ABC para posteriormente unirse al núcleo oligosacárido-lípidoA (Keenleyside y Whitfield, 1999).

Los transportadores ABC son responsables de la exportación de la gran variedad de glicoconjugados a la superficie celular, esto incluye al antígeno O. Los transportadores son proteínas transmembranales como la proteína Wzm

y Wzt, que se unen a nucleótidos. Wzt presenta un dominio N-terminal convencional ABC y un dominio C-terminal, este último es un elemento estructural único que determina la especificidad del transporte del antígeno O, por lo que ambos dominios son necesarios para la exportación. Estudios *In vitro*, han demostrado que el dominio C-terminal de Wzt se une al antígeno O al reconocer un residuo no reductor localizado en la parte terminal del polímero. Por su parte el polímero N-terminal y C-terminal pueden funcionar en *trans*, siendo ambos requeridos para el transporte (Bertani y Ruiz, 2018).

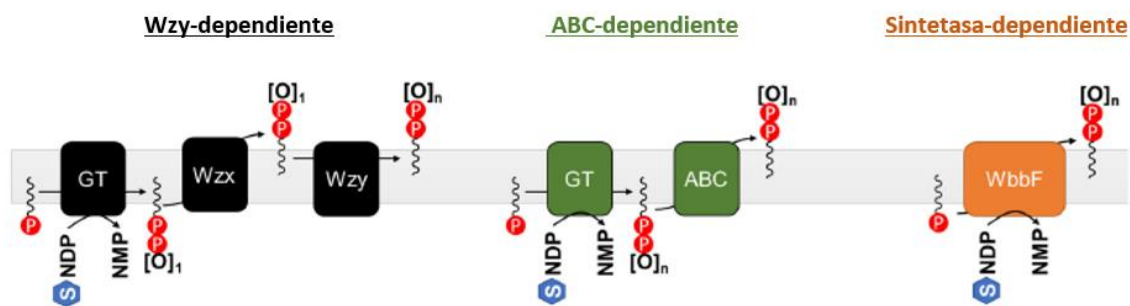


Fig 22. Resumen de las diferentes vías de síntesis del antígeno O. GT hace referencia a las glicosiltransferasas requeridas para la síntesis del antígeno O. [O] representa unidades de repetidos del antígeno O, a su vez el subíndice n indica el número de repetidos presentes. Unidades individuales de azúcar son representadas por "S" localizada en el interior de un hexágono, los cuales se muestran unidos a un nucleótido acarreador arbitrario NDP. El acarreador del lípido es Und-P. Modificado de Bertani y Ruiz, 2018.

1.8.4 Transporte del LPS

La molécula núcleo oligosacárido-lípido A y el antígeno O ligado a Und-P son componentes del LPS; sintetizados de manera independiente en la cara citosólica de la membrana interna. Mediante el uso de diferentes mecanismos estas estructuras son transportadas de manera independiente la una de la otra a través de la membrana a la cara periplásmica de la membrana interna. Una vez presente en el espacio periplásmico, el antígeno O está ligado a la molécula núcleo oligosacárido-lípido A por la acción de una ligasa WaaL. La molécula LPS resultante es posteriormente transportada a través del espacio

periplásmico hasta la membrana externa para ensamblarse de manera correcta a la superficie bacteriana (Bertani y Ruiz, 2018).

1.8.4.1 Transporte a través de la membrana interna mediado por MsbA

Una vez sintetizada la molécula de núcleo oligosacárido-lípidoA en la cara citosólica, es transportada a la cara periplásmica de la membrana interna, este proceso es mediado por el homodímero flipasa de núcleo A dependiente de ATP (MsbA), el cual es una flipasa perteneciente a la superfamilia del transportador ABC. MsbA se encuentra constituido por dos subunidades, cada subunidad presenta un dominio transmembranal (TMD) y un dominio de unión a nucleótido (NBD). Los dominios TMD de ambas subunidades son los que interactúan con el LPS para su translocación a través de la membrana interna, mientras que a los dominios NBD se une a la vez que se hidroliza ATP (Mi *et al.*, 2017).

La molécula de LPS ingresa directamente después de la hidrólisis de ATP en el dominio NBD a una amplia cavidad formada entre las subunidades TMD de MsbA, el interior de MsbA está presente una región hidrofílica formada por la interacción de los residuos de los dominios TMD con las glucosaminas y los grupos fosfatos presentes en el núcleo interno del núcleo de oligosacáridos del LPS y una región hidrofóbica formada por los residuos de TM1 y TM6 de los dominios TMD que interaccionan con las cadenas acil perteneciente al lípido A de la molécula LPS para evitar que interaccionen con la región periplásmica que es hidrofílica (Mi *et al.*, 2017) Fig 23.

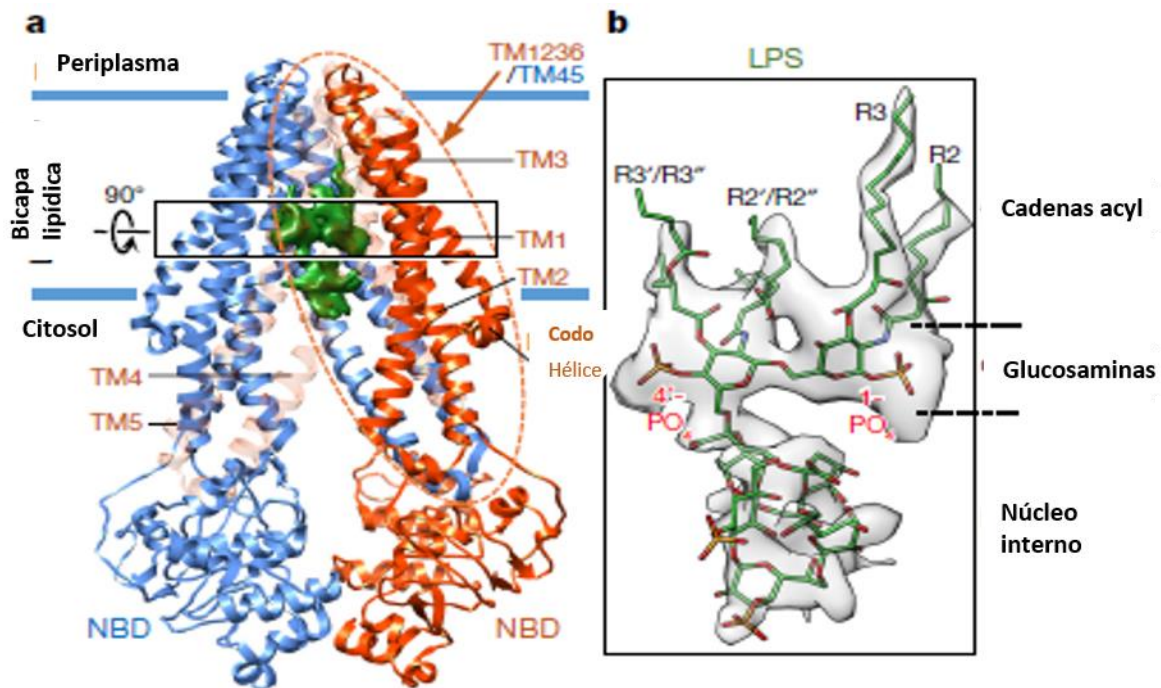


Fig 23. La imagen muestra la representación cuaternaria de unión del LPS a MsbA. a) Las subunidades de MsbA se representan con los colores azul y naranja, las líneas azules representan la membrana. Las helices del dominio TMD, TM4, TM5 y TM6 se muestran transparentes para que el LPS en verde sea visible. b) Indica la posición de LPS en MsbA, así como la interacción de las cadenas acil con los dominios TM1 y TM6 (Mi *et al.*, 2017)

De manera que a través de interacciones hidrofílicas e hidrofóbicas que se llevan a cabo en el interior de MsbA el LPS atraviesa la membrana interna para posteriormente ser volteado hacia la cara situada en el espacio periplásmico. Las interacciones entre los dominios TMD con el LPS junto con la hidrólisis del ATP llevada a cabo por el dominio NBD de MsbA generan un cambio conformacional en MsbA que conlleva a que la oquedad en la cual se encuentra el LPS quede expuesto al espacio periplásmico, a su vez por interacción de cargas el LPS es volteado y se acomoda de manera que la parte del lípido A quede en el interior de la membrana interna, mientras que la región de perteneciente al núcleo oligosacárido queda expuesta al espacio periplásmico (Mi *et al.*, 2017). Por otra parte, MsbA es más eficiente en voltear a la molécula de LPS cuando el glicolípido presenta las últimas

cadena acil añadidas por las enzimas LpxL y LpxM posterior a la adición de los dos primeros dos residuos Kdo, Fig 24.

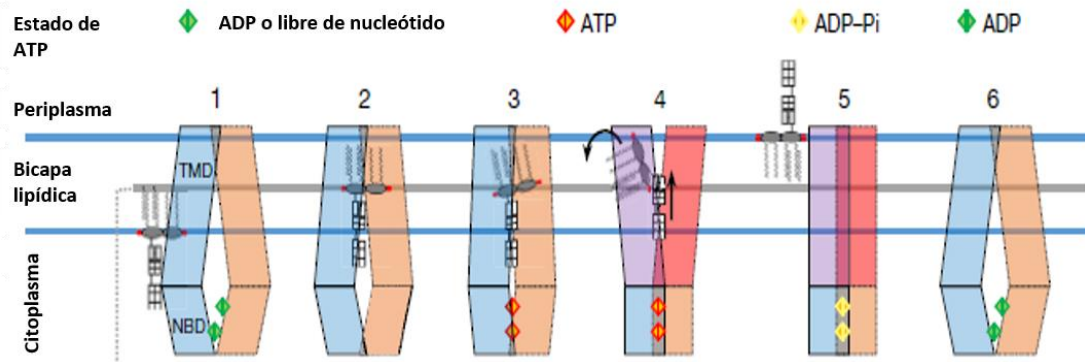


Fig 24. Modelo representativo del proceso por el cual el LPS es volteado hacia la cara situada en el espacio periplásmico. Las líneas azules representan la membrana plasmática. Las subunidades de MsbA en conformación orientada hacia el interior se muestra en azul y naranja. La unión de ATP induce un reordenamiento en los TMD, de color púrpura y rojo. ADP, ATP y ADP con γ -fosfato se muestran como diamantes en verde, rojo y amarillo, respectivamente. Las flechas negras indican los movimientos propuestos de los residuos hidrófilos e hidrófobos (Mi *et al.*, 2017).

1.8.4.2 Transporte de la membrana interna hacia la membrana externa mediante el sistema Lpt (Sistema de exportación del LPS).

Posterior al transporte a través de la membrana interna mediante MsbA y la adición del antígeno O en la cara periplásmica de la membrana interna, el LPS debe ser transportado a través del espacio periplásmico y la membrana externa. Este proceso necesita la extracción del LPS de la membrana interna, así como la protección de sus grupos acil mientras atraviesa el espacio periplásmico, para finalmente ser translocado a través de la membrana externa y posicionarse en la cara externa de la membrana externa. Los procesos mencionados son llevados a cabo por el complejo proteico Lpt (sistema de exportación del LPS). El complejo Lpt está compuesto por 7 diferentes proteínas que abarcan todos los compartimientos de la célula: LptB se encuentra en citoplasma; LptF, LptG y LptC están presentes en la

membrana interna; LptA se localiza en el periplasma, mientras que LptD y LptE se ubican en la membrana externa (Raetz y Whitfield, 2002). El dímero formado por LptB junto con las proteínas LptF y LptG forman el transportador ABC LptB₂FG. Por su parte, el LptB está constituido por un dominio de unión a nucleótidos (NDBs) al cual se une e hidroliza ATP citoplasmático necesario para la activación del transporte del LPS de la membrana interna hasta la membrana externa (Yakushi *et al.*, 2000). El dominio transmembranal (TMD) de LptB₂FG está formado por las proteínas LptF y LptG. Cada uno de los TMDs de LptF y LptG consisten en seis hélices transmembranales (TM1-6) donde la TM1 de cada dominio se encuentra interconectada con la TM5 del otro. Las hélices 12TM correspondientes de las proteínas LptF-G están dobladas hacia afuera, creando de esta manera una cavidad central con forma de V, Fig 25 (Luo *et al.*, 2017).

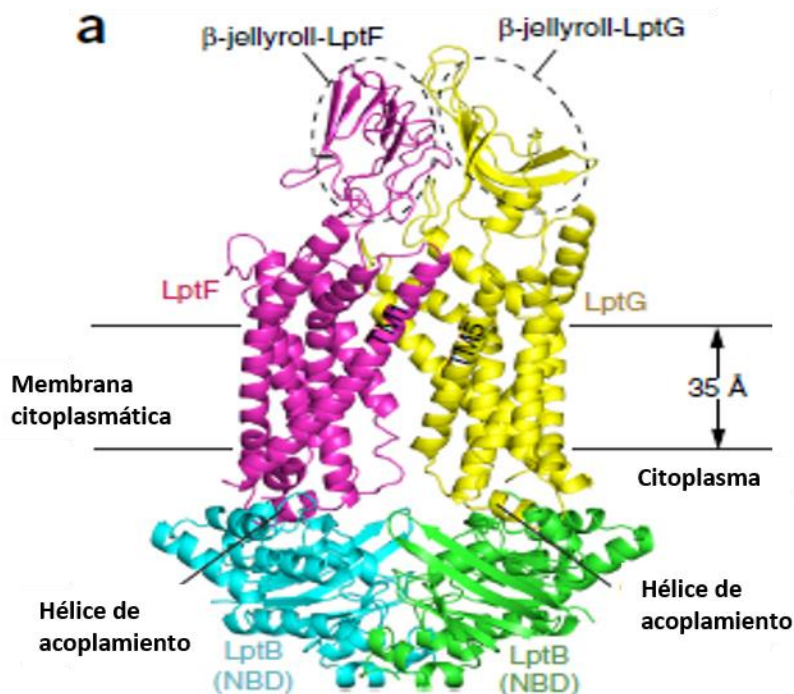


Fig 25. Estructura del transportador del LPS LptB₂FG. La imagen corresponde a la estructura cuaternaria del transportador LptB₂FG, LptF se representa con el color violeta, LptG se muestra con el color amarillo y ambas moléculas de LptB en la coloración verde y azul celeste (Luo *et al.*, 2017).

El transportador LptB₂FG extrae y transporta el LPS mediante el cambio de un estado relajado a uno activo, donde el relajado corresponde al momento en el que no hay ATP unido al dominio NBD, el estado activo es en el cual el ATP se encuentra unido a NBD y por tanto la hidrólisis de ATP se lleva a cabo. Primeramente, tiene que unirse ATP a LptB para que las proteínas diméricas se acerquen, generando un cambio conformacional de los dominios TMD de LptF y LptG, permitiendo la entrada del lípido A del LPS a la cavidad V. Posterior a la hidrólisis de ATP y a la liberación de ADP, el lípido A es expulsado a los dominios periplásmicos de LptF y LptG; la liberación de ADP promueve que LptB₂FG regrese al estado de relajación (Luo *et al.*, 2017), Fig 26.

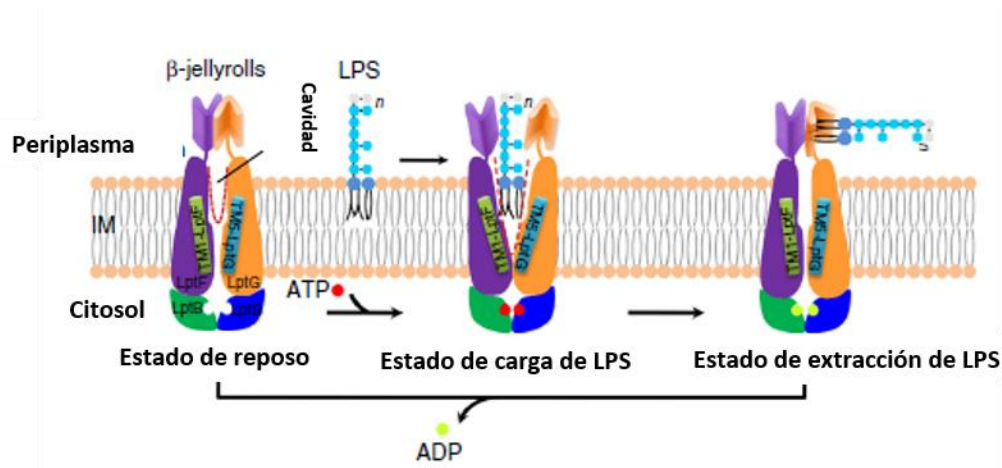


Fig 26. Modelo representativo de la extracción de LPS por LptB₂FG. El transportador de LPS LptB₂FG puede extraer y transportar LPS a través de un estado libre de nucleótidos (estado de reposo), un estado unido a ATP (estado cargado de LPS) y un estado hidrolizado de ATP. Modificada de Luo *et al.*, 2017.

1.9 Respuesta inmunológica tras la interacción con el LPS

Los sistemas inmunológicos se han desarrollado para proteger a los organismos multicelulares de la agresión endógena y exógena. De manera que sus principales funciones son la defensa contra microorganismos y la inmunovigilancia contra los tumores, enfermedades autoinmunes y alergias (Sampath, 2018). Durante la evolución, se han desarrollado dos sistemas inmunológicos generales para detectar sustancias extrañas, a saber, la inmunidad innata (natural) y la inmunidad adaptativa (adquirida). El Sistema Inmune Innato (SII) es la primera línea de defensa del hospedero, se basa en receptores codificados por la línea germinal que reconocen los patrones moleculares conservados que se encuentran en los microorganismos (Murray, Rosenthal y Pfaller, 2013). Posee mecanismos preexistentes que se activan de manera rápida y que preceden a la Inmunidad Adaptativa en la respuesta defensiva. Además, responde de la misma manera frente a diferentes estímulos infecciosos y posee una especificidad limitada, es decir, distingue estructuras comunes a grupos de microorganismos, pero no distingue diferencias finas entre ellos (Paola, 2012). El Sistema Inmune Innato (SII) es el más antiguo y está presente en todos organismos multicelulares, incluso plantas e insectos (Sampath, 2018). Por su parte el sistema inmune adaptativo (SIA) está presente en los vertebrados, es específico para distintas moléculas y se caracteriza por mejorar la capacidad defensiva frente a exposiciones sucesivas. Esta respuesta posee memoria, ya que es recordada por el sistema inmune. Por otra parte, es específica a cada microorganismo o molécula no infecciosa, por lo que es capaz de distinguir las características existentes entre estas, a comparación de SII (Paola, 2012).

En las bacterias Gramnegativas como *K. pneumoniae*, uno de los componentes más importante es la endotoxina, la cual está presente en la membrana externa de la bacteria y que además forma parte del LPS. Primeramente, podemos definir endotoxina como una sustancia tóxica termoestable que es liberada una vez que hay lisis de la bacteria que lo presenta (Beutler y Reitschel, 2003). Como ya se había mencionado anteriormente el LPS está formado por el lípido A con característica

hidrofóbica y la región O que es un polisacárido hidrofílico. La toxicidad está asociada al componente lipídico (Lípido A), mientras que la respuesta inmune está asociada al polisacárido (Needham y Trent, 2013). Las bacterias Gram negativas inducen la respuesta inflamatoria cuando el LPS es liberado de la membrana de la bacteria como consecuencia de la multiplicación o lisis, entra en contacto con varias proteínas del hospedero, en el caso particular de la lisis, una vez que el LPS es liberado dentro del entorno acuoso del huésped, estas moléculas anfipáticas se agregan espontáneamente como micelas, posteriormente una proteína de unión a polisacáridos (LBP) presente en el plasma se une a los monómeros de LPS que se encuentran en las micelas para transferirlos a CD14 (Antígeno de diferenciación de monocitos CD14) (Qureshi, Gros y Malo, 1999), LBP funciona como una opsonina y es la encargada de capturar al LPS y formar el complejo LPS-LBP facilitando la asociación del LPS con el receptor CD14 (Raetz y Whitfield, 2002). CD14 (Antígeno de diferenciación de monocitos CD14) es un receptor de LPS presente en monocitos, macrófagos, polimorfonucleares y células endoteliales que no poseen dominio intracitoplasmático (Paola, 2012); existe de dos maneras, como una proteína unida a glicerol fosfatidil inositol presente en la superficie de las células del huésped o bien se puede encontrar de forma soluble en la circulación (Murray, Rosenthal y Pfaller 2013) su función principal es transferir el LPS al complejo encargado de su reconocimiento (Heuman, Glauser y Calandra, 1998). El complejo lípido A/CD14 activa la síntesis de TNF- α (Wright *et al.*, 1990) mediante el reconocimiento del complejo Lípido A/CD14 por el receptor TLR4/MD-2, lo que representa el primer paso conocido en la transducción de señales (Raetz y Whitfield, 2002). Sin embargo, la interacción del Lípido A con TLR4 (Receptor tipo Toll 4) también involucra otras proteínas además de CD14, como lo es CD18 y MD-2; CD18 también desempeña un papel en el reconocimiento del LPS, sin embargo, a diferencia de CD14, CD18 tiene una menor eficiencia a comparación de CD14 para la unión con el LPS, por otra parte, la interacción de los complejos LPS-LBP con CD14 en los macrófagos parece estar acoplada a las respuestas secretoras de los leucocitos (Wright, 1991), Fig 27.

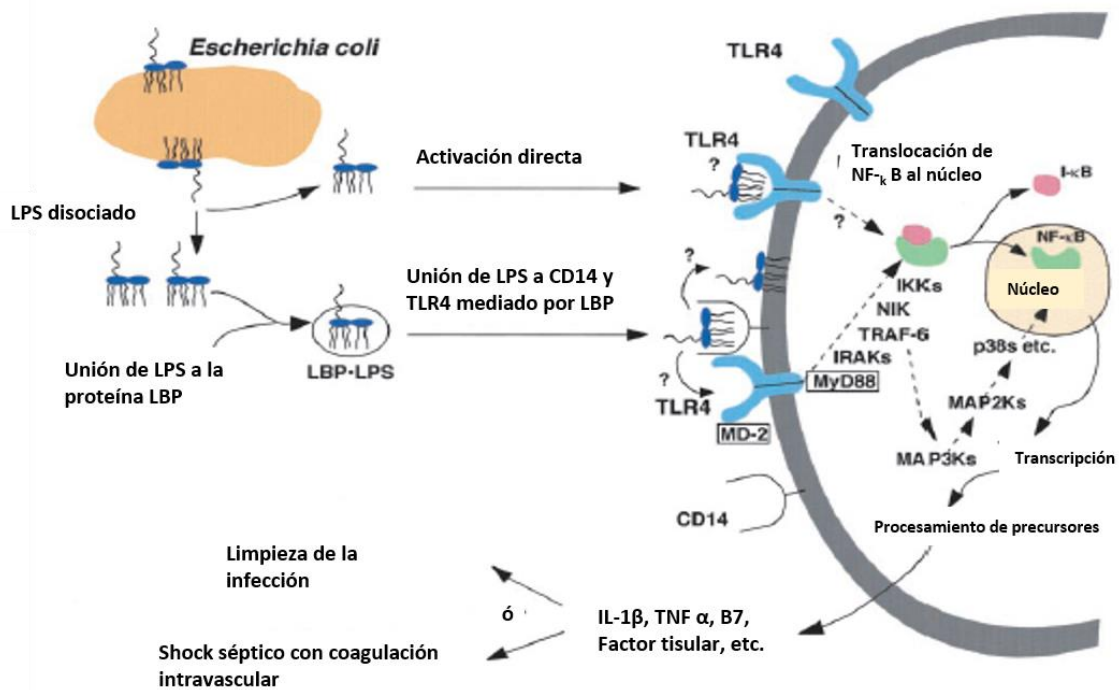


Fig 27. Detección de lípido A por el receptor de inmunidad innata TLR4 de células animales. Especulamos que el receptor TLR4 puede oligomerizarse tras la unión del lípido A. La respuesta inflamatoria mediada por TLR4 es beneficiosa para combatir infecciones localizadas, pero puede ser perjudicial en la sepsis sistémica abrumadora (Raetz y Whitfield, 2002).

MD-2 (Antígeno linfocítico) es una proteína soluble que se asocia con el receptor TLR4 (Receptor tipo Toll 4), se sabe que su ausencia impide que se desencadene la respuesta generada por el LPS aunque TLR4 esté presente; por otra parte, la proteína MD-2 es capaz de unirse al LPS en ausencia de TLR4, originando en una proporción menor una respuesta del LPS sobre las células del hospedero a comparación de la respuesta generada cuando el complejo TLR4/MD-2 se encuentra presente. Por tanto, es visible la importancia de la presencia de TLR4 ya que es esencial para el reconocimiento, así como para la magnitud de la respuesta generada por el LPS (Shimazu, 1999). TLR4 es una proteína perteneciente a la familia de receptores TOLL o TLRs (Sensores de reconocimiento de membrana), la cual está combinada en su estructura con repetidos de leucinas (LRRs), por lo que el dominio es conocido como Dominio

TIR (Takeda y Akira, 2004), en estudios con receptores TOLL de mamíferos y de *Drosophila* han mostrado que ambos dominios TIR activan cascadas de señalización que culminan en la translocación del factor de transcripción NF- κ B2 (Subunidad 2 del factor nuclear NF-kappa-B), el cual regula genes responsables de la respuesta innata, así como de la respuesta adaptativa (Qureshi, Gros y Malo, 1999).

Una vez que el complejo LPS-TLR4/MD-2 se ha formado, TLR4 sufre una oligomerización, posteriormente se inicia una reacción que comienza con la interacción de proteínas celulares que poseen dominios TIR, las cuales median la relación entre el TLR4 y las proteínas celulares de transducción del LPS (Lu, Yeh y Ohashi, 2008), como lo son: proteína de diferenciación mieloide (MyD88), proteína adaptadora del dominio TIR (TIRAP), proteína adaptadora asociada al dominio TIR inductora de interferón β (TRIF), molécula adaptadora relacionada con el TRIF (TRAM) y proteína inhibidora de la señal del TRIF (SARM) (O'Neill y Bowie, 2007; Lu, Yeh y Ohashi, 2008).

Las vías de señalización de TLR, comparten un adaptador en común, MyD88, el cual también participa en la activación de la respuesta innata, ya que su presencia es esencial para la inducción de citocinas inflamatorias (Medzhitov *et al.*, 1998), que son activadas por los TLRs; la señal de transducción del LPS a través de TLRs ha sido dividida en dos rutas, la dependiente de MyD88 y la vía dependiente de la proteína TRIF; cada una genera reacciones diferentes, ya que la vía dependiente de MyD88 es responsable de la expresión de citocinas proinflamatorias mientras que la vía independiente de MyD88 media la inducción de interferones de tipo I y genes inducibles por interferón, al final ambas vías concuerdan en un punto donde activan el factor de transcripción nuclear (NF- κ B) (Lu, Yeh y Ohashi, 2008), Fig 28.

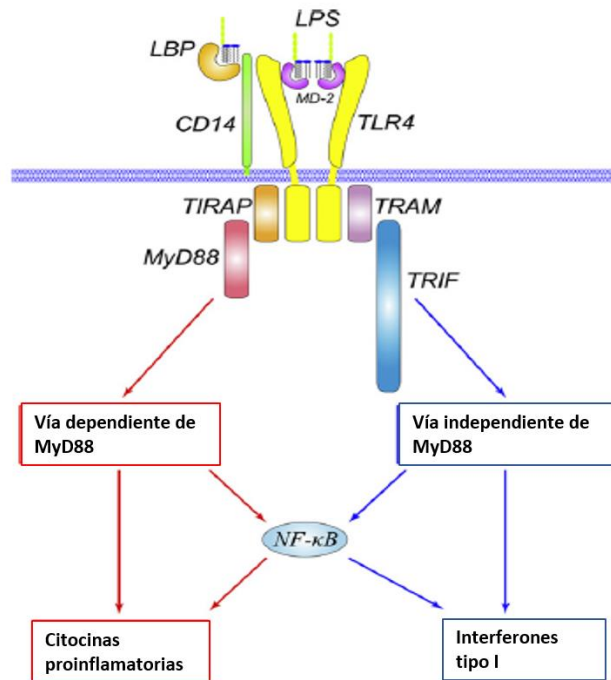


Fig 28. Visión general de la vía de señalización LPS/TLR4. Donde el reconocimiento del LPS es facilitado por acción de LBP y CD14, para posteriormente interactuar con el complejo receptor TLR4/MD-2. Las vías de señalización LPS/TLR4 pueden separarse en dos vías, la vía dependiente de MyD88 y la vía independiente de MyD88 (o dependiente de la proteína TRIF) (Lu, Yeh y Ohashi, 2008).

En condiciones normales (ausencia de LPS) el factor de transcripción nuclear (NF-κB) se encuentra en el citoplasma de forma inactiva unido al inhibidor del factor κB (factor kappa B), también conocido como IκB (Pedreira, García-Prieto, Albaiceta, y Taboada, 2006), sin embargo, posterior a la señal emitida por las proteínas MyD88 o TRIF las quinasas del IκB (IKK, quinasas inhibitoras del factor nuclear kappa B) son activadas, fosforilan a IκB separándolo de NF-κB y por tanto activándolo; por lo que una vez activo se transloca al núcleo celular (O'Neill y Bowie, 2007), donde se une a la región promotora de los genes de respuesta inflamatoria generando la transcripción de interferones del tipo I si la activación fue por la vía del TRIF, pero si fue activada por la vía de la proteína MyD88 hay activación de citoquinas proinflamatorias (IL-1 y IL6 y TNFα), (Pedreira, García-Prieto, Albaiceta, y Taboada, 2006; Lu, Yeh y Ohashi, 2008) Fig 28.

En la vía dependiente de la proteína TRIF; se ha observado que la estimulación realizada por el LPS conlleva a la activación del factor de transcripción IRF-3, IRF-3 induce la expresión de la proteína interferón β (IFN- β); por su parte IFN- β , activa Stat1, lo que genera la activación de varios genes IFN (Akira y Takeda, 2004). Los interferones son glicoproteínas también conocidas como citocinas, moléculas empleadas para la comunicación entre células para desencadenar las defensas protectoras del sistema inmunitario que participan en la erradicación de patógenos, además estimulan el crecimiento y diferenciación de linfocitos y monocitos hacia células efectoras involucradas en la eliminación eficaz de los microorganismos (Morrison y Ryan, 1987 ; Paola, 2012). Además de las citocinas otros factores también son secretados, tales como el factor de necrosis tumoral (TNF), la interleucina (IL) y la IL-6, posteriormente a la estimulación de los fagocitos mononucleares con LPS, Fig 29. Estas sustancias inducen la respuesta de fase aguda y preparan el sistema inmunológico para una actividad rápida. Aunque las respuestas secretoras al LPS suelen ser beneficiosas, las respuestas exageradas pueden ser fatales. En el fenómeno del choque endotóxico, los pacientes y los animales de experimentación primero presentan una neutropenia, seguida de fiebre, inducción de la respuesta de fase aguda, coagulación diseminada, insuficiencia orgánica múltiple y una caída catastrófica de la presión arterial (Morrison y Ryan, 1987; Pedreira, García-Prieto, Albaiceta, y Taboada, 2006).

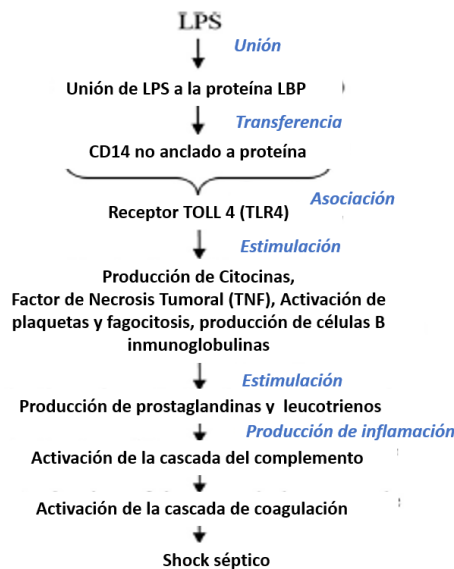


Fig. 29. Señalización y activación del sistema inmune en organismos superiores, (Wright, 1991).

2 Importancia de la caracterización molecular de *wabG* y *uge*.

Debido a que *wabG* (ácido galacturónico transferasa) codifica para una enzima que participa en la síntesis del LPS (Lipopolisacárido) en *K.pneumoniae*, es un gen potencial para el desarrollo de inhibidores que interactúen con él para así evitar el desarrollo del LPS, generando un fenotipo rugoso, como lo demostró izquierdo al deletar *wabG* en *K.pneumoniae* (Izquierdo *et al.*, 2003); además la delección del gen *waaG* en *E.coli* que comparte un porcentaje de similitud con *wabG* de *K. pneumoniae* causa un incremento en la susceptibilidad de 3 clases de antibióticos, Rifampicina, Cloristina y Cloranfenicol (Liu *et al.*, 2010). Por otra parte, recordando que el LPS en conjunto con la membrana externa de las bacterias gramnegativas contribuye a la difusión lenta de componentes lipofílicos, al generarse un LPS rugoso, la membrana externa llena los vacíos con lípidos normales (Nikaido, 2003), lo que genera que esta membrana sea susceptible a una difusión más rápida de componentes y por lo tanto la bacteria es más susceptible.

Ahora bien, una forma de inhibir la actividad de *wabG* en caso de que este gen no sea deletado, es mediante el uso de sustratos que compitan por el sitio activo de la Glucosiltransferasa (GT) que reconoce el sustrato donador; una sustancia a considerar es 4-(2-amino-1,3-thiazol-4-yl) fenol, ya que puede inhibir considerablemente la actividad de WaaG en *E.coli* (Muheim *et al.*, 2016). Se requieren más estudios con respecto a la sustancia de inhibición para *K. pneumoniae*, siempre y cuando no se comprometan los sitios activos del resto de las GT presentes en el cuerpo humano.

Por otra parte, debido a que el gen *uge* codifica para una enzima uridin difosfato galacturonato-4-epimerasa, la cual es esencial para la formación de monosacáridos UDP-GalA necesarios para que a su vez *wabG* pueda usarlo como sustrato y transferir GalA (ácido galacturónico) al LPS continuando con la biosíntesis del mismo; por otra parte, si *uge* se deletara, la estabilidad del LPS se vería comprometida primeramente debido a que el monosacárido GalA ya no se sintetizaría y por ende el producto codificado por *wabG* no podría llevar a cabo la síntesis del núcleo interno del LPS; por otra parte, ya que en el caso específico de *K. pneumoniae* presenta ácido galacturónico en lugar de grupos fosforilos en el núcleo interno del LPS, al eliminarse *uge* se generaría un fenotipo rugoso profundo, exhibiendo una hipersensibilidad a los compuestos hidrófobos y polimixina B, un perfil de la membrana externa alterado y la liberación de la enzima periplásmica β -lactamasa (Firdich, Bouwman, Vinogradov Whitfield, 2005). Estos resultados indican que la carga negativa proporcionada por los grupos carboxilo del ácido galacturónico juega un papel equivalente a los residuos de fosfato de oligosacárido del núcleo en el establecimiento de la integridad de la membrana externa en *E. coli* y *Salmonella*.

3 REFERENCIAS

- Albesa-Jove, D., Giganti, D., Jackson, M., Alzari, P., y Guerin, M. (2013). *Structure-function relationships of membrane-associated GT-B glycosyltransferases. Glycobiology, 24(2), 108–124.* doi:10.1093/glycob/cwt101
- Allard, S. T. M., Giraud, M.-F., y Naismith, J. H. (2001). *Epimerases: structure, function and mechanism. Cellular and Molecular Life Sciences, 58(11), 1650–1665.* doi:10.1007/pl00000803
- Allen, B., Gerlach, G., y Clegg, S. (1991). *Nucleotide sequence and functions of mrk determinants necessary for expression of type 3 fimbriae in Klebsiella pneumoniae. Journal of Bacteriology, 173, 916–920.*
- Amor, K., Heinrichs, D., Firdich, E., Ziebell, K., Johnson, R., y Whitfield, C., (2000). *Distribution of core oligosaccharide types in lipopolysaccharides from Escherichia coli. Infection and immunity, 68(3), 1116–24.* PubMed PMID: ; PMID: PMC97256.10678915
- Anderson, M., Bulawa, C., y Raetz, C. (1985). *The biosynthesis of gram-negative endotoxin. Formation of lipid A precursors from UDP-GlcNAc in extracts of Escherichia coli. Journal of Biological Chemistry, 260(29), 15536–41.* PubMed PMID: .3905795
- Anderson, M., Robertson, A., Macher, I., y Raetz, C. (1988). *Biosynthesis of lipid A in Escherichia coli: identification of UDP-3-O-[(R)-3-hydroxymyristoyl]-alpha-D-glucosamine as a precursor of UDP-N2, O3-bis[(R)-3-hydroxymyristoyl]-alpha-D-glucosamine. Biochemistry, 27(6), 1908–17.* PubMed PMID: .3288280
- Arenas, E., Gutiérrez, A., Salazar, L., Polanco, J., y Gómez, A. (2009). *Construcción de una filogenia molecular para las especies de los géneros Klebsiella y Raoultella basada en los genes ARNr 16S y ARN polimerasa subunidad. Revista Ciencias de la Salud, 7(2), 22-29.* http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1692-72732009000200004&lng=en&lng=es.
- Arias-Flores R., Rosado-Quiab U., Vargas-Valerio A., y Grajales-Muñiz C. (2016). *Los microorganismos causantes de infecciones nosocomiales en el Instituto Mexicano del Seguro Social [Microorganisms responsible of nosocomial infections in the Mexican Social Security Institute]. Revista Médica del Instituto Mexicano del Seguro Social. 54(1), 20-4.* PMID: 26820194.
- Babinski, K., Ribeiro, A., y Raetz, C. (2002). *The Escherichia coli gene encoding the UDP-2,3-diacetylglucosamine pyrophosphatase of lipid A biosynthesis. Journal of Biological Chemistry, 277(29), 25937–46.* doi: 10.1074/jbc.M204067200. PubMed PMID: .12000770
- Bachman, M., Miller, V., y Weiser, J. (2009). *Mucosal lipocalin 2 has pro-inflammatory and iron-sequestering effects in response to bacterial*

enterobactin. *PLoS Pathogens*, 5(10), e1000622. <http://dx.doi.org/10.1371/journal.ppat.1000622>.

Bachman, M., Oyler, J., Burns, S., Caza, M., Lépine, F., Dozois, C., y Weiser, J. (2011). *Klebsiella pneumoniae* Yersiniabactin Promotes Respiratory Tract Infection through Evasion of Lipocalin 2. *Infection and Immunity*, 79(8), 3309–3316. doi:10.1128/iai.05114-11

Bartling, C., y Raetz, C. (2008). Steady-State Kinetics and Mechanism of LpxD, the N-Acyltransferase of Lipid A Biosynthesis†. *Biochemistry*, 47(19), 5290–5302. doi:10.1021/bi800240r

Belunis, C., y Raetz, C. (1992). Biosynthesis of endotoxins. Purification and catalytic properties of 3-deoxy-D-manno-octulosonic acid transferase from *Escherichia coli*. *Journal of Biological Chemistry*, 267(14), 9988–97. PubMed PMID: .1577828

Bertani, B., y Ruiz, N. (2018). Function and biogenesis of lipopolysaccharides. *EcoSal Plus*, 8(1), 1-33. doi:10.1128/ecosalplus.ESP-0001-2018.

Beutler, B., y Rietschel, E. (2003). Innate immune sensing and its roots: the story of endotoxin. *Nature Reviews Immunology*, 3(2), 169–176. doi:10.1038/nri1004

Beveridge T. J. (1999). Structures of gram-negative cell walls and their derived membrane vesicles. *Journal of bacteriology*, 181(16), 4725–4733. <https://doi.org/10.1128/JB.181.16.4725-4733.1999>

Borg, A., Dennig, A., Weber, H., y Nidetzky, B. (2020). Mechanistic characterization of UDP-glucuronic acid 4-epimerase. *The FEBS Journal*. doi:10.1111/febs.15478

Brenner, D., Krieg, N., Staley, J., Garrity, G., y Bergey, D. (2005). *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology* (2nd. ed.). New York: Springer.

Broach, B., Gu, X., y Bar-Peled, M. (2011). Biosynthesis of UDP-glucuronic acid and UDP-galacturonic acid in *Bacillus cereus* subsp. cytotoxicus NVH 391-98. *FEBS Journal*, 279(1), 100–112. doi:10.1111/j.1742-4658.2011.08402.x

Brock, J., Williams, P., Liceaga, J., y Wooldridge, K. (1991). Relative availability of transferrin-bound iron and cell-derived iron to aerobactin- producing and enterochelin-producing strains of *Escherichia coli* and to other microorganisms. *Infection and Immunity*, 59, 3185–3190.

Brozek, K., y Raetz, C. (1990). Biosynthesis of lipid A in *Escherichia coli*. Acyl carrier protein-dependent incorporation of laurate and myristate. *Journal of Biological Chemistry*, 265(26), 15410–7. PubMed PMID: .2203778

Bullen, J., Rogers, H., y Griffiths, E. (1972). *Iron Binding Proteins and Infection. British Journal of Haematology*, 23(4), 389–392. doi:10.1111/j.1365-2141.1972.tb07073.x

Carbohydrate Research, 338, 2431-2447.

Carbohydrates Active Enzymes (5 de mayo de 2021). GlycosylTransferase Family 4. <http://www.cazy.org/GT4.html>

Caroff, M., y Karibian, D. (2003). *Structure of bacterial lipopolysaccharides.*

Carpenter, T., Parkin, J., y Khalid, S. (2016). *The Free Energy of Small Solute Permeation through the Escherichia coli Outer Membrane Has a Distinctly Asymmetric Profile. The Journal of Physical Chemistry Letters*, 7(17), 3446–3451. doi:10.1021/acs.jpcllett.6b01399

Casewell, M., y Phillips, I. (1977). *Hands as route of transmission for Klebsiella species. BMJ*, 2(6098), 1315–1317. doi:10.1136/bmj.2.6098.1315

Casewell, M., y Phillips, I. (1978). *Epidemiological patterns of klebsiella colonization and infection in an intensive care ward, Journal of Hygiene*, 80, 295–300.

Clementz, T., y Raetz, C. (1991). *A gene coding for 3-deoxy-D-manno-octulosonic-acid transferase in Escherichia coli. Identification, mapping, cloning, and sequencing. Journal of Biological Chemistry*, 266(15), 9687–96. PubMed PMID: .2033061

Confer, A., y Ayalew, S. (2013). *The OmpA family of proteins: Roles in bacterial pathogenesis and immunity. Veterinary Microbiology*, 163(3-4), 207–222. doi:10.1016/j.vetmic.2012.08.019

Cote, J., y Taylor, E. (2017). *The Glycosyltransferases of LPS Core: A Review of Four Heptosyltransferase Enzymes in Context. International Journal of Molecular Sciences*, 18(11), 2256. doi:10.3390/ijms18112256

Cowan, S., Schirmer, T., Rummel, G., Steiert, M., Ghosh, R., Pauptit, R., Jansonius, J., y Rosenbusch, J. (1992). *Crystal structures explain functional properties of two E. coli porins. Nature*, 358(6389), 727-33 <https://doi.org/10.1038/358727a0>

Cowan, S., Steel, K., Shaw, C., y Duguid, J. (1960). *A Classification of the Klebsiella Group. Journal of General Microbiology*, 23(3), 601–612. doi:10.1099/00221287-23-3-601

Davies, D. (2003). *Understanding biofilm resistance to antibacterial agents. Nature Reviews Drug Discovery*, 2(2), 114–122. doi:10.1038/nrd1008

Di Martino, P., Livrelli, V., Siroi, D., Joly, B., y Darfeuille-Michaud, A. (1996). *A new fimbrial antigen harbored by CAZ-5/SHV-4-producing Klebsiella pneumoniae*

strains involved in nosocomial infections. *Infection and immunity*, 64(6), 2266–2273. <https://doi.org/10.1128/iai.64.6.2266-2273.1996>

Domenico, P., Salo, R., Cross, A., y Cunha, B. (1994). Polysaccharide capsule-mediated resistance to opsonophagocytosis in *Klebsiella pneumoniae*. *Infection and Immunity*, 62, 4495–4499.

Doumith, M., Ellington, M., Livermore, D., y Woodford, N. (2009). Molecular mechanisms disrupting porin expression in ertapenem-resistant *Klebsiella* and *Enterobacter* spp. clinical isolates from the UK. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 63(4), 659–667. doi:10.1093/jac/dkp029

Doumith, M., Ellington, M., Livermore, D., y Woodford, N. (2009). Molecular mechanisms disrupting porin expression in ertapenem-resistant *Klebsiella* and *Enterobacter* spp. clinical isolates from the UK. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 63(4), 659–667. doi:10.1093/jac/dkp029

Drancourt, M., Bollet, C., Carta, A. y Rousselier, P. (2001). Phylogenetic analyses of *Klebsiella* species delineate *Klebsiella* and *Raoultella* gen. nov., with description of *Raoultella ornithinolytica* comb. nov., *Raoultella terrigena* comb. nov. and *Raoultella planticola* comb. nov. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 51, 925–932

Dutzler, R., Rummel, G., Albertí, S., Hernández-Allés, S., Phale, P., Rosenbusch, J., ... Schirmer, T. (1999). Crystal structure and functional characterization of OmpK36, the osmoporin of *Klebsiella pneumoniae*. *Structure*, 7(4), 425–434. doi:10.1016/s0969-2126(99)80055-0

Favre-Bonte, S., Darfeuille-Michaud, A., y Forestier, C. (1995). Aggregative adherence of *Klebsiella pneumoniae* to human intestine-407 cells. *Infection and Immunity*, 63(4), 1318–28. doi: 10.1128/iai.63.4.1318-1328.1995. PMID: 7890389; PMCID: PMC173153.

Firon, N., Ofek, I., y Sharon, N. (1983). Carbohydrate specificity of the surface lectins of *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, and *Salmonella typhimurium*. *Carbohydrate Research*, 120, 235–249. doi:10.1016/0008-6215(83)88019-7

Fomeris, F., y Mattevi, A. (2008). *Enzymes Without Borders: Mobilizing Substrates, Delivering Products*. *Science*, 321(5886), 213–216. doi:10.1126/science.1151118

François, P., Vaudaux, P., y Lew, P. D. (1998). Role of Plasma and Extracellular Matrix Proteins in the Physiopathology of Foreign Body Infections. *Annals of Vascular Surgery*, 12(1), 34–40. doi:10.1007/s100169900112

Freeze, H., Hart, G., y Schaar, R. (2017). Glycosylation precursors. In *Essentials of Glycobiology* (Varki A, Cummings RD, Esko JD, Stanley P, Hart GW, Aebi M, Darvill AG, Kinoshita T, Packer NH, Prestegard JH, Schnaar RL y Seeberger PH, eds), 3rd edn. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY. pp 1–25.

Friedlaender, C. (1882). Ueber die Schizomyceten bei der acuten fibrösen Pneumonie. *Archiv Für Pathologische Anatomie Und Physiologie Und Für Klinische Medicin*, 87(2), 319–324. doi:10.1007/bf01880516

Firdich, E., Bouwman, C., Vinogradov, E., y Whitfield, C. (2005). The Role of Galacturonic Acid in Outer Membrane Stability in *Klebsiella pneumoniae*. *Journal of Biological Chemistry*, 280(30), 27604–27612. doi:10.1074/jbc.m504987200

Gatzeva-Topalova, P. Z., May, A. P., y Sousa, M. C. (2005). Structure and Mechanism of ArnA: Conformational Change Implies Ordered Dehydrogenase Mechanism in Key Enzyme for Polymyxin Resistance. *Structure*, 13(6), 929–942. doi:10.1016/j.str.2005.03.018

Goetz, D., Holmes, M., Borregaard, N., Bluhm, M., Raymond, K., y Strong, R. (2002). The Neutrophil Lipocalin NGAL Is a Bacteriostatic Agent that Interferes with Siderophore-Mediated Iron Acquisition. *Molecular Cell*, 10(5), 1033–1043. doi:10.1016/s1097-2765(02)00708-6

Green, E. R., y Mecsas, J. (2015). Bacterial Secretion Systems: An Overview . *Virulence Mechanisms of Bacterial Pathogens*, Fifth Edition, 215–239. doi:10.1128/microbiolspec.vmbf-0012-2015

Gronow, S., Brabetz, y W., Brade, H. (2000). Comparative functional characterization in vitro of heptosyltransferase I (WaaC) and II (WaaF) from *Escherichia coli*. *Eur J Biochem*, 267(22), 6602–11. PubMed PMID: .11054112

Hamlin, T., Swart, M., y Bickelhaupt, F. (2018). Nucleophilic Substitution (SN 2): Dependence on Nucleophile, Leaving Group, Central Atom, Substituents, and Solvent. *ChemPhysChem*, 19(11), 1315–1330. doi:10.1002/cphc.201701363

Heinrichs, D., Yethon, J., y Whitfield, C. (1998). Molecular basis for structural diversity in the core regions of the lipopolysaccharides of *Escherichia coli* and *Salmonella enterica*. *Molecular Microbiology*, 30(2), 221–32. PubMed PMID: .9791168

Hernandez-Alles, S., Conejo, M., Pascual, A., Tomas, J., Benedi, V., Martinez-Martinez, L. (2000). Relationship between outer membrane alterations and susceptibility to antimicrobial agents in isogenic strains of *Klebsiella pneumoniae*. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 46, 273–277. <http://dx.doi.org/10.1093/jac/46.2.273>.

Heumann, D., Glauser, M., y Calandra, T. (1998). Molecular basis of host—pathogen interaction in septic shock. *Current Opinion in Microbiology*, 1(1), 49–55. doi:10.1016/s1369-5274(98)80142-2

Hsieh, P.-F., Liu, J.-Y., Pan, Y.-J., Wu, M.-C., Lin, T.-L., Huang, Y.-T., y Wang, J.-T. (2013). *Klebsiella pneumoniae* Peptidoglycan-Associated Lipoprotein and Murein Lipoprotein Contribute to Serum Resistance, Antiphagocytosis, and

Proinflammatory Cytokine Stimulation. *Journal of Infectious Diseases*, 208(10), 1580–1589. doi:10.1093/infdis/jit384

Hsu, C.-R., Lin, T.-L., Chen, Y.-C., Chou, H.-C., y Wang, J.-T. (2011). The role of *Klebsiella pneumoniae rmpA* in capsular polysaccharide synthesis and virulence revisited. *Microbiology*, 157(12), 3446–3457. doi:10.1099/mic.0.050336-0

Izquierdo, L., Coderch, N., Pique, N., Bedini, E., Corsaro, M. M., Merino, S., ... Regue, M. (2003). The *Klebsiella pneumoniae wabG* Gene: Role in Biosynthesis of the Core Lipopolysaccharide and Virulence. *Journal of Bacteriology*, 185(24), 7213–7221. doi:10.1128/jb.185.24.7213-7221.2003

Jackman, J., Raetz, C., y Fierke, C. (1999). UDP-3-O-(R-3-Hydroxymyristoyl)-N-acetylglucosamine Deacetylase of *Escherichia coli* a Zinc Metalloenzyme†. *Biochemistry*, 38(6), 1902–1911. doi:10.1021/bi982339s

Jeannin, P., Magistrelli, G., Goetsch, L., Haeuw, J.-F., Thieblemont, N., Bonnefoy, J.-Y., y Delneste, Y. (2002). Outer membrane protein A (OmpA): a new pathogen-associated molecular pattern that interacts with antigen presenting cells—impact on vaccine strategies. *Vaccine*, 20, A23–A27. doi:10.1016/s0264-410x(02)00383-3

Kaiser, G. (2021). *Microbiology*. Libretext. Retrieved January, 2021, from <https://bio.libretexts.org/@go/page/3148>

Kalynych, S., Morona, R., y Cygler, M. (2014). Progress in understanding the assembly process of bacterial O-antigen. *FEMS Microbiology Reviews*, 38(5), 1048–1065. doi:10.1111/1574-6976.12070

Kavanagh, K. L., Jörnvall, H., Persson, B., y Oppermann, U. (2008). Medium- and short-chain dehydrogenase/reductase gene and protein families. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 65(24), 3895–3906. doi:10.1007/s00018-008-8588-y

Kelly, T., Stachula, S., Raetz, C., y Anderson, M. (1993). The *firA* gene of *Escherichia coli* encodes UDP-3-O-(R-3-hydroxymyristoyl)-glucosamine N-acyltransferase. The third step of endotoxin biosynthesis. *Journal of Biological Chemistry*, 268(26), 19866–74. PubMed PMID: .8366125

Klein, G., y Raina, S. (2015). Regulated Control of the Assembly and Diversity of LPS by Noncoding sRNAs. *BioMed Research International*, 2015, 1–16. doi:10.1155/2015/153561

Kollef, M. H. (2004). Prevention of hospital-associated pneumonia and ventilator-associated pneumonia. *Critical Care Medicine*, 32(6), 1396–1405. doi:10.1097/01.ccm.0000128569.09113.fb

Lairson, L., Henrissat, B., Davies, G., y Withers, S. (2008). Glycosyltransferases: Structures, Functions, and Mechanisms. *Annual Review of Biochemistry*, 77(1), 521–555. doi:10.1146/annurev.biochem.76.061005.0923

Lairson., L, Henrissat, B., Davies, G., y Withers, S. (2008). *Glycosyltransferases: Structures, functions and mechanisms*. *Annual Review Biochemistry*, 77,521–555. Review

Lawlor, M., O'Connor, C., y Miller, V. (2007). *Yersiniabactin Is a Virulence Factor for Klebsiella pneumoniae during Pulmonary Infection*. *Infection and Immunity*, 75(3), 1463–1472. doi:10.1128/iai.00372-06

Leventis, R., y Silviu, J. (1998). *Lipid-binding characteristics of the polybasic carboxy-terminal sequence of K-ras4B*. *Biochemistry*, 37,7640–7648.

Liu, A., Tran, L., Becket, E., Lee, K., Chinn, L., Park, E., ... Miller, J. H. (2010). *Antibiotic Sensitivity Profiles Determined with an Escherichia coli Gene Knockout Collection: Generating an Antibiotic Bar Code*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 54(4), 1393–1403. doi:10.1128/aac.00906-09

Liu, Y., Vanhooke, J. L., y Frey, P. A. (1996). *UDP-Galactose 4-Epimerase: NAD⁺ Content and a Charge-Transfer Band Associated with the Substrate-Induced Conformational Transition†*. *Biochemistry*, 35(23), 7615–7620. doi:10.1021/bi960102v

López-Arcilla, C., Infante, C., y Trejos, M. (1986). *La membrana plasmática (La relación Estructura - Función)*. *Revista de la Universidad de La Salle*, (12), 25-50.

Lu, Y.-C., Yeh, W.-C., y Ohashi, P. (2008). *LPS/TLR4 signal transduction pathway*. *Cytokine*, 42(2), 145–151. doi:10.1016/j.cyto.2008.01.006

Luo, Q., Yang, X., Yu, S., Shi, H., Wang, K., Xiao, L., Zhu, G., Sun, C., Li, T., Li, D., Zhang, X., Zhou, M., y Huang, Y. (2017). *Structural basis for lipopolysaccharide extraction by ABC transporter LptB2FG*. *Nature Structural y Molecular Biology*. 24(5):469–74. doi: 10.1038/nsmb.3399. PubMed PMID: .28394325

March, C., Moranta, D., Regueiro, V., Llobet, E., Tomás, A., Garmendia, J., y Bengoechea, J. A. (2011). *Klebsiella pneumoniae Outer Membrane Protein A Is Required to Prevent the Activation of Airway Epithelial Cells*. *Journal of Biological Chemistry*, 286(12), 9956–9967. doi:10.1074/jbc.m110.181008

Martin, R. M., y Bachman, M. A. (2018). *Colonization, Infection, and the Accessory Genome of Klebsiella pneumoniae*. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 8. doi:10.3389/fcimb.2018.00004

McGrath, B., y Osborn, M. (1991). *Localization of the terminal steps of O-antigen synthesis in Salmonella typhimurium*. *Journal of Bacteriology*, 173(2), 649–54. PubMed PMID: ; PMCID: PMC207056.1987157

McMurry, J. (1992), *Organic Chemistry* (3rd ed.), Belmont: Wadsworth, ISBN 0-534-16218-5

Medzhitov, R., Preston-Hurlburt, P., Kopp, E., Stadlen, A., Chen, C., Ghosh, S., y Janeway, C. (1998). *MyD88 Is an Adaptor Protein in the hToll/IL-1 Receptor Family Signaling Pathways*. *Molecular Cell*, 2(2), 253–258. doi:10.1016/s1097-2765(00)80136-7

Mi, W., Li, Y., Yoon, S., Ernst, R., Walz, T., y Liao, M. (2017). *Structural basis of MsbA-mediated lipopolysaccharide transport*. *Nature*, 549(7671), 233–237. doi:10.1038/nature23649

Michael, T. (2009). *Brock, biología de los microorganismos 12/e*. Pearson Educación. ISBN 978-84-7829-097-0. Consultado el 18 de agosto de 2020.

Miethke, M., y Marahiel, M. (2007). *Siderophore-Based Iron Acquisition and Pathogen Control*. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 71(3), 413–451. doi:10.1128/mnbr.00012-07

Miranda García, M. C. (2013). *Escherichia coli portador de betalactamasas de espectro extendido: resistencia*. *Sanidad Militar*, 69(4), 244–248. doi:10.4321/s1887-85712013000400003

Morrison, D., y Ryan, J. (1987). *Mechanisms*. *Annual Review of Medicine*, 38(1), 417–432. doi:10.1146/annurev.me.38.020187.002221

Morrissey, I., Hackel, M., Badal, R., Bouchillon, S., Hawser, S., y Biedenbach, D. (2013). *A Review of Ten Years of the Study for Monitoring Antimicrobial Resistance Trends (SMART) from 2002 to 2011*. *Pharmaceuticals (Basel)*, 6, 1335–1346.

Muheim, C., Bakali, A., Engström, O., Wieslander, Å., Daley, D., y Widmalm, G. (2016). *Identification of a Fragment-Based Scaffold that Inhibits the Glycosyltransferase WaaG from Escherichia coli*. *Antibiotics (Basel)*, 5(1), 10. doi: 10.3390/antibiotics5010010. PMID: 27025525; PMCID: PMC4810412.

Müller E, Hinckley A, y Rothfield L. (1972). *Studies of phospholipid-requiring bacterial enzymes. 3. Purification and properties of uridine diphosphate glucose:lipopolysaccharide glucosyltransferase I*. *Journal of Biological Chemistry*, 247(8), 2614–22. PMID: 4553445.

Murray, P., Rosenthal, K., y Pfaller, M. (2013). *Medical Microbiology*. Elsevier, United States.

Nassif, X., y Sansonetti, P. (1986). *Correlation of the virulence of Klebsiella pneumoniae K1 and K2 with the presence of a plasmid encoding aerobactin*. *Infection and Immunity*, 54, 603–608.

Needham, B. D., y Trent, M. S. (2013). *Fortifying the barrier: the impact of lipid A remodelling on bacterial pathogenesis*. *Nature Reviews Microbiology*, 11(7), 467–481. doi:10.1038/nrmicro3047

Nikaido, H. (2003). *Molecular Basis of Bacterial Outer Membrane Permeability Revisited*. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 67(4), 593–656. doi:10.1128/mnbr.67.4.593-656.2003

Nikaido, H., y Vaara, M. (1985). Molecular basis of bacterial outer membrane permeability. *Microbiological Reviews*, 49(1), 1–32.

Nordmann, P., Dortet, L., y Poirel, L. (2012). Carbapenem resistance in *Enterobacteriaceae*: here is the storm! *Trends in Molecular Medicine*, 18(5), 263–272. doi:10.1016/j.molmed.2012.03.003

Nordmann, P., Naas, T., y Poirel, L. (2011). Global Spread of Carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae*. *Emerging Infectious Diseases*, 17(10), 1791–1798. doi:10.3201/eid1710.110655

O'Neill, L., y Bowie, A. (2007). The family of five: TIR-domain-containing adaptors in Toll-like receptor signalling. *Nature Reviews Immunology*, 7(5), 353–364. doi:10.1038/nri2079

Octavia, S., y Lan, R. (2014). The Family *Enterobacteriaceae*. *The Prokaryotes*, 225–286. doi:10.1007/978-3-642-38922-1_167

Ofek, I., Mirelman, D., y Sharon, N. (1977). Adherence of *Escherichia coli* to human mucosal cells mediated by mannose receptors. *Nature*, 265(5595), 623–625. doi:10.1038/265623a0

Paczosa, M., y Mecsas, J. (2016). *Klebsiella pneumoniae*: Going on the Offense with a Strong Defense. *Microbiology and Molecular Biology*, 80(3), 629–650.

Pagès, J.-M., James, C. E., y Winterhalter, M. (2008). The porin and the permeating antibiotic: a selective diffusion barrier in Gram-negative bacteria. *Nature Reviews Microbiology*, 6(12), 893–903. doi:10.1038/nrmicro1994

Pan, Y.-J., Fang, H.-C., Yang, H.-C., Lin, T.-L., Hsieh, P.-F., Tsai, F.-C., ... Wang, J.-T. (2008). Capsular Polysaccharide Synthesis Regions in *Klebsiella pneumoniae* Serotype K57 and a New Capsular Serotype. *Journal of Clinical Microbiology*, 46(7), 2231–2240. doi:10.1128/jcm.01716-07

Paola, T. P. (2012). Visión panorámica del sistema inmune. *Revista Médica Clínica Las Condes*, 23(4), 446–457. doi:10.1016/s0716-8640(12)70335-8

Pautsch, A., Schulz, G. (1998). Structure of the outer membrane protein A transmembrane domain. *Natural Structural y Molecular Biology*, 5, 1013–7.

Pedreira, P., García-Prieto, E., Albaiceta, G., y Taboada, F. (2006). Respuesta inflamatoria y apoptosis en la lesión pulmonar aguda. *Medicina Intensiva*, 30(6), 268–275. doi:10.1016/s0210-5691(06)74523-5

Perry, R., Balbo, P., Jones, H., Fetherston, J., y DeMoll, E. (1999). *Yersiniabactin from Yersinia pestis: biochemical characterization of the siderophore and its role in iron transport and regulation. Microbiology, 145(5), 1181–1190.*

Pichavant, M., Delneste, Y., Jeannin, P., Fourneau, C., Bricchet, A., Tonnel, A.-B., y Gosset, P. (2003). *Outer Membrane Protein A from Klebsiella pneumoniae Activates Bronchial Epithelial Cells: Implication in Neutrophil Recruitment. The Journal of Immunology, 171(12), 6697–6705. doi:10.4049/jimmunol.171.12.6697*

Pitout, J., Nordmann, P., y Poirel, L. (2015). *Carbapenemase-producing Klebsiella pneumoniae: a key pathogen set for global nosocomial dominance. Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 59(10), 5873-5884.*

Podschun, R., y Ullmann, U. (1998). *Klebsiella spp. as Nosocomial Pathogens: Epidemiology, Taxonomy, Typing Methods, and Pathogenicity Factors. Clinical Microbiology Reviews, 11(4), 589–603. doi:10.1128/cmr.11.4.589*

Poirel, L., Heritier, C., Spicq, C., y Nordmann, P. (2004). *In vivo acquisition of high-level resistance to imipenem in Escherichia coli. Journal of Clinical Microbiology, 42, 3831-3833*

Pomakova, D., Hsiao, C., Beanan, J., Olson, R., MacDonald, U., Keynan, Y., Russo, T. (2012). *Clinical and phenotypic differences between classic and hypervirulent Klebsiella pneumonia: an emerging and underrecognized pathogenic variant. European Journal of Clinical Microbiology y Infectious Diseases, 31, 981–989. http://dx.doi.org/10.1007/s10096-011-1396-6.*

Qian, J., Garrett, T., y Raetz, C. (2014). *In vitro assembly of the outer core of the lipopolysaccharide from Escherichia coli K-12 and Salmonella typhimurium. Biochemistry, 53(8), 1250–62. doi: 10.1021/bi4015665. PubMed PMID: ; PMCID: PMC3985525.24479701*

Qureshi, S., Gros, P., y Malo, D. (1999). *Host resistance to infection: genetic control of lipopolysaccharide responsiveness by Toll-like receptor genes. Trends in Genetics, 15(8), 291–294. doi:10.1016/s0168-9525(99)01782-5*

Radika, K., y Raetz, C. (1988). *Purification and properties of lipid A disaccharide synthase of Escherichia coli. Journal of Biological Chemistry, 263(29), 14859–67. PubMed PMID: .3049593*

Radziejewska-Lebrecht, J., Shashkov, A., Stroobant, V., Wartenberg, K., Wart, C., y Mayer, H. (1994). *The inner core region of Yersinia enterocolitica. Journal of Biochemistry, 221, 343–351. doi: 10.1111/j.1432-1033.1994.tb18746.x*

Raetz, C. R. H., y Whitfield, C. (2002). *Lipopolysaccharide Endotoxins. Annual Review of Biochemistry, 71(1), 635–700. doi:10.1146/annurev.biochem.71.110601.1354*

Ray, B., y Raetz, C. (1987). *The Biosynthesis of Gram-Negative Endotoxin - a Novel Kinase in Escherichia-Coli Membranes That Incorporates the 4'-*

Phosphate of Lipid-A. *Journal of Biological Chemistry*, 262(3), 1122–8. PubMed PMID: .3027079

Raymond, K., Dertz, E., y Kim, S. (2003). *Enterobactin: an archetype for microbial iron transport. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 100(7), 3584–3588. <https://doi.org/10.1073/pnas.0630018100>

Regue, M., Climent, N., Abitiu, N., Coderch, N., Merino, S., Izquierdo, L., Altarriba, M., y Tomás, J. M. (2001). *Genetic Characterization of the Klebsiella pneumoniae waa Gene Cluster, Involved in Core Lipopolysaccharide Biosynthesis. Journal of Bacteriology*, 183(12), 3564–3573. doi:10.1128/jb.183.12.3564-3573.2001

Regué, M., Climent, N., Abitiu, N., Coderch, N., Merino, S., Izquierdo, L., Altarriba, M., y Tomas, J. M. (2001). *Genetic Characterization of the Klebsiella pneumoniae waa Gene Cluster, Involved in Core Lipopolysaccharide Biosynthesis. Journal of Bacteriology*, 183(12), 3564–3573. doi:10.1128/jb.183.12.3564-3573.2001

Regue, M., Hita, B., Pique, N., Izquierdo, L., Merino, S., Fresno, S., ... Tomas, J. M. (2003). *A Gene, uge, Is Essential for Klebsiella pneumoniae Virulence. Infection and Immunity*, 72(1), 54–61. doi:10.1128/iai.72.1.54-61.2004

Regueiro, V., Moranta, D., Frank, C., Larrarte, E., Margareto, J., March, C., Garmendia, J., y Bengoechea, J. (2011). *Klebsiella pneumoniae subverts the activation of inflammatory responses in a NOD1-dependent manner. Cellular Microbiology*, 13, 135–153. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1462-5822.2010.01526.x>.

Rini, J., Esko, J., y Varki, A. (2009). *Glycosyltransferases and Glycan-processing Enzymes*. In: Varki A, Cummings RD, Esko JD, et al., editors. *Essentials of Glycobiology*. 2nd edition. Cold Spring Harbor (NY): Cold Spring Harbor Laboratory Press; Chapter 5. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK1921/>

Rothfield, L., Osborn, M., y Horecker, B. (1964). *Biosynthesis of Bacterial Lipopolysaccharide. II. Incorporation of Glucose and Galactose Catalyzed by particulate and soluble enzymes in Salmonella. Journal of Biological Chemistry*, 239,2788-95. PMID: 14217875.

Sampath, V. (2018). *Bacterial endotoxin-lipopolysaccharide; structure, function and its role in immunity in vertebrates and invertebrates. Agriculture and Natural Resources*, 52(2), 115–120. doi:10.1016/j.anres.2018.08.002

Schroll, C., Barken, K., Krogfelt, K., y Struve, C. (2010). *Role of type 1 and type 3 fimbriae in Klebsiella pneumoniae biofilm formation. BMC Microbiology*, 10(1), 179. doi:10.1186/1471-2180-10-179

Shimazu, R., Akashi, S., Nagafuku, M., Ogata, M., Nagai, Y., Fukudome, K., Miyake, K., y Kimoto, M. (1999). *“MD-2 a molecule that confers*

lipopolysaccharide responsiveness on Toll- Like receptor 4". *Journal of Experimental Medicine*, 189, 1777–1782.

Sinnott, M. L. (1990). *Catalytic mechanism of enzymic glycosyl transfer*. *Chemical Reviews*, 90(7), 1171–1202. doi:10.1021/cr00105a006

Sizar, O., y Unakal, C. (2021). *Gram Positive Bacteria*. StatPearls Publishing; 2021 Jan.

Stahlhut, S., Struve, C., Krogfelt, K., y Reisner, A. (2012). *Biofilm formation of Klebsiella pneumoniae on urethral catheters requires either type 1 or type 3 fimbriae*. *FEMS Immunology y Medical Microbiology*, 65(2), 350–359. doi:10.1111/j.1574-695x.2012.00965.x

Stahlhut, S., Tchesnokova, V., Struve, C., Weissman, S., Chattopadhyay, S., Yakovenko, O., ... Krogfelt, K. (2009). *Comparative Structure-Function Analysis of Mannose-Specific FimH Adhesins from Klebsiella pneumoniae and Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology*, 191(21), 6592–6601. doi:10.1128/jb.00786-09

Stevenson, G., Neal, B., Liu, D., Hobbs, M., Packer, N., Batley, M., Redmond, J., Lindquist, L., y Reeves, P. (1994). *Structure of the O antigen of Escherichia coli K-12 and the sequence of its rfb gene cluster*, *Journal of Bacteriology*, 176(13), 4144–56. PubMed PMID: ; PMCID: PMC205614.7517391

Takeda, K., y Akira, S. (2004). *TLR signaling pathways*. *Seminars in Immunology*, 16(1), 3–9. doi:10.1016/j.smim.2003.10.003

Thoden, J. B., Henderson, J. M., Fridovich-Keil, J. L., y Holden, H. M. (2002). *Structural Analysis of the Y299C Mutant of Escherichia coli UDP-galactose 4-Epimerase*. *Journal of Biological Chemistry*, 277(30), 27528–27534. doi:10.1074/jbc.m204413200

Tsai, Y., Fung, C., Lin, J., Chen, J., Chang, F., Chen, T., y Siu, L. (2011). *Klebsiella pneumoniae outer membrane porins OmpK35 and OmpK36 play roles in both antimicrobial resistance and virulence*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 55, 1485–1493. <http://dx.doi.org/10.1128/AAC.01275-10>.

Varki, A., Cummings, R., Esko, J., Freeze, H., Hart, G., y Marth, J., (1999). *Essentials of Glycobiology*. Cold Spring Harbor Laboratory Press; Cold Spring Harbor, NY, USA, pp. 253–262. Chapter 17 (Glycosyltransferases).

Vernet, V., Philippon, A., Madoulet, C., Vistelle, R., Jaussaud, R., y Chippaux, C. (1995). *Virulence factors (aerobactin and mucoid phenotype) in Klebsiella pneumoniae and Escherichia coli blood culture isolates*. *FEMS Microbiology Letters*, 130(1), 51–57. doi:10.1111/j.1574-6968.1995.tb07697.x

Vinogradov, E., y Perry, M. (2001). *Structural analysis of the core region of lipopolysaccharides from eight serotypes of Klebsiella pneumoniae*. *Carbohydrate research*, 335, 291-296.

Vinogradov, E., Fridrich, E., MacLean, L., Perry, M., Petersen, B., Duus, J., y Whitfield, C. (2002). *Structures of Lipopolysaccharides from Klebsiella pneumoniae*. *Journal of Biological Chemistry*, 277(28), 25070–25081. doi:10.1074/jbc.m202683200

Weiser, J., y Gotschlich, E. (1991). Outer membrane protein A (OmpA) contributes to serum resistance and pathogenicity of *Escherichia coli* K-1. *Infection and Immunity*, 59, 2252–8. doi: [10.1128/iai.59.7.2252-2258.1991](https://doi.org/10.1128/iai.59.7.2252-2258.1991)

Whitfield, C. (2006). *Biosynthesis and assembly of capsular polysaccharides in Escherichia coli*. *Annu Rev Biochem*, 75, 39–68. doi: 10.1146/annurev.biochem.75.103004.142545. PubMed PMID: .16756484

Whitfield, C., Kaniuk, N., y Fridrich, E. (2003). *Molecular insights into the assembly and diversity of the outer core oligosaccharide in lipopolysaccharides from Escherichia coli and Salmonella*. *Journal of Endotoxin Research*, 9(4), 244–9. doi: 10.1179/096805103225001440. PubMed PMID: .12935355

Wright, S. (1991). *Multiple receptors for endotoxin*. *Current Opinion in Immunology*, 3(1), 83–90. doi:10.1016/0952-7915(91)90082-c

Wright, S., Ramos, R., Tobias, P., Ulevitch, R., y Mathison, J. (1990). CD14, a receptor for complexes of lipopolysaccharide (LPS) and LPS binding protein. *Science*, 249(4975), 1431–1433. doi:10.1126/science.1698311

Wyckoff, T., Lin, S., Cotter, R., Dotson, G., y Raetz, C. (1998). *Hydrocarbon Rulers in UDP-N-acetylglucosamine Acyltransferases*. *Journal of Biological Chemistry*, 273(49), 32369–32372. doi:10.1074/jbc.273.49.32369

Yethon, J., y Whitfield, C. (2001). *Purification and characterization of WaaP from Escherichia coli, a lipopolysaccharide kinase essential for outer membrane stability*. *Journal of Biological Chemistry*, 276(8), 5498–504. doi: 10.1074/jbc.M008255200. PubMed PMID: .11069912

Yethon, J., Heinrichs, D., Monteiro, M., Perry, M., y Whitfield, C. (1998). *Involvement of waaY, waaQ, and waaP in the modification of Escherichia coli lipopolysaccharide and their role in the formation of a stable outer membrane*. *Journal of Biological Chemistry*, 273(41), 26310–6. doi: DOI 10.1074/jbc.273.41.26310. PubMed PMID: .9756860

Yoshida, K., Matsumoto, T., Tateda, K., Uchida, K., Tsujimoto, S., y Yamaguchi, K. (2000). *Role of bacterial capsule in local and systemic inflammatory responses of mice during pulmonary infection with Klebsiella pneumoniae*. *Journal of Medical Microbiology*, 49, 1003–1010. <http://dx.doi.org/10.1099/0022-1317-49-11-1003>.

Yoshida, K., Matsumoto, T., Tateda, K., Uchida, K., Tsujimoto, S., y Yamaguchi, K. (2001). *Induction of interleukin-10 and down-regulation of cytokine production by Klebsiella pneumoniae capsule in mice with pulmonary*

infection. *Journal of Medical Microbiology*, 50, 456–461. <http://dx.doi.org/10.1099/0022-1317-50-5-456>.

Young, K., Silver, L., Bramhill, D., Cameron, P., Eveland, S., Raetz, C., Hyland, S., y Anderson, M. (1995). The *envA* permeability/cell division gene of *Escherichia coli* encodes the second enzyme of lipid A biosynthesis. UDP-3-O-(R-3-hydroxymyristoyl)-N-acetylglucosamine deacetylase. *Journal of Biological Chemistry*, 270(51), 30384–91. PubMed PMID: .8530464

Zhang, G., Meredith, T. C., y Kahne, D. (2013). On the essentiality of lipopolysaccharide to Gram-negative bacteria. *Current Opinion in Microbiology*, 16(6), 779–785. doi:10.1016/j.mib.2013.09.007

Yakushi, T., Masuda, K., Narita, S., Matsuyama, S., y Tokuda, H. (2000). A new ABC transporter mediating the detachment of lipid-modified proteins from membranes. *Nature Cell Biology*, 2(4), 212–218. doi:10.1038/35008635

Levin, P. A., y Angert, E. R. (2015). *Small but Mighty: Cell Size and Bacteria*. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 7(7), a019216. doi:10.1101/cshperspect.a019216

Klemm, P., y Schembri, M. A. (2000). Fimbrial surface display systems in bacteria: from vaccines to random libraries. *Microbiology*, 146(12), 3025–3032. <http://dx.doi.org/10.1099/00221287-146-12-3025>.