

PONTIFICIA UNIVERSIDAD CATÓLICA DEL ECUADOR

FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES

CARRERA DE MICROBIOLOGÍA

**Título de disertación: “IDENTIFICACIÓN DE LOS GENES CASSETTE
AACA4 Y AADA1 ASOCIADOS CON LA RESITENCIA A AMINOGLUCÓSIDOS
EN LA FAMILIA ENTEROBACTERIA”**

Disertación previa a la obtención del título de Licenciado(a) en Microbiología

Nombre del estudiante: Alexis David Pavón Catani

Porcentaje de créditos: 100%

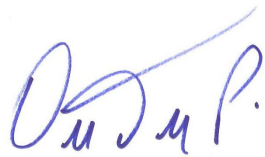
Nombre del director de la disertación: PhD. Doris Jimena Vela Peralta

Área en la que se inscribe la investigación: Bioinformática

Quito, 2022



Certifico que la Disertación de Licenciatura en Microbiología del Sr. Alexis David Pavón Catani ha sido concluida de conformidad con las normas establecidas; por lo tanto, puede ser presentada para la calificación correspondiente.

A handwritten signature in blue ink, appearing to read 'D. J. V. P.', is positioned above the typed name of the signatory.

PhD. Doris Jimena Vela Peralta
Directora de la Disertación
Quito,



Dedicatoria

A mi amada familia, hija y esposa,

Le dedico esta disertación con un profundo sentido de gratitud y aprecio por su amor, apoyo y aliento inquebrantables a lo largo de mi viaje académico. Tu presencia constante en mi vida ha sido una fuente de inmensa fuerza e inspiración, y estoy profundamente agradecida por todo lo que has hecho por mí.

A mi familia, gracias por creer siempre en mí y por brindarme las bases para perseguir mis sueños. Su amor, orientación y aliento han sido invaluable y no habría podido lograr este hito sin su apoyo inquebrantable.

Para mi hija, has sido mi motivación para trabajar más duro y luchar por la excelencia. Espero que esta disertación te inspire a perseguir tus propios sueños y a apuntar siempre alto en la vida.

A mi esposa, gracias por ser mi roca y mi apoyo constante. Su amor y paciencia me han sostenido a través de los desafíos académicos, y su creencia inquebrantable en mis habilidades ha sido una fuente constante de fortaleza. Estoy profundamente agradecido por su amor y compañía, y no podría haber pedido un compañero más solidario en la vida.

Dedico esta tesis a todos ustedes con profundo amor y aprecio. Gracias por todo lo que has hecho por mí, y por estar siempre ahí para mí en las buenas y en las malas. Esta tesis es un testimonio de nuestros esfuerzos colectivos y espero que traiga orgullo y alegría a cada uno de ustedes.

Con todo mi amor y gratitud,

Alexis Pavón

Agradecimientos

Me gustaría expresar mi más profundo agradecimiento a la PhD. Doris Jimena Vela Peralta por servir como mi mentora y asesora de tesis a lo largo de este viaje académico. La guía, el apoyo y el aliento invaluable del Dr. Vela han sido fundamentales para dar forma a mi proyecto de investigación ya mí como científico. Su experiencia en el campo de la microbiología, su compromiso con la excelencia y su inquebrantable dedicación a sus alumnos han sido una fuente constante de inspiración.

También me gustaría extender mi más sincero agradecimiento a todos los profesores de microbiología que han contribuido a mi experiencia académica y de investigación. Su pasión por el tema, sus atractivas conferencias y su disposición a brindar orientación y apoyo han sido esenciales para dar forma a mis intereses de investigación y actividades académicas.

También estoy agradecido con mis colegas y compañeros investigadores en el departamento de microbiología que me han ofrecido apoyo, comentarios constructivos y camaradería a lo largo de mi trayectoria académica. Su perspicacia, experiencia y dedicación al descubrimiento científico han sido una fuente constante de inspiración y motivación.

También me gustaría agradecer a mi familia y amigos por su apoyo incondicional y aliento durante todo este proceso. Su amor, paciencia y comprensión han sido esenciales para mantenerme conectado a tierra y motivado.

Finalmente, me gustaría agradecer a la comunidad científica más amplia cuyos esfuerzos colectivos allanaron el camino para este proyecto de investigación. Los investigadores, académicos y profesionales en el campo de la microbiología han sido fundamentales para avanzar en nuestra comprensión del mundo microbiano y su impacto en la salud humana y el medio ambiente.

Gracias a todos por su apoyo, orientación y aliento. Este proyecto de investigación no hubiera sido posible sin sus contribuciones, y estoy profundamente agradecido por todo lo que ha hecho por mí.



Tabla de contenido

1. RESUMEN	1
2. ABSTRACT	2
3. INTRODUCCIÓN	3
4. OBJETIVOS	9
4.1 GENERAL	9
ESPECÍFICOS	9
5. MATERIALES Y MÉTODOS.....	10
6. RESULTADOS	13
7. DISCUSIÓN	38
8. CONCLUSIONES	46
9. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	48
10. ANEXOS	1

1. RESUMEN

El casete del gen *aacA4* que codifica un aminoglucósido N (6')-acetiltransferasa se encuentra comúnmente en especies de Enterobacteriácea que portan un integrón de clase 1 que normalmente no contiene el gen *aadA1* que codifica un aminoglucósido (3') (9) adenoglucosiltransferasa. Este estudio tiene como objetivo investigar el potencial del gen *aacA4* junto con el gen *aadA1* para la resistencia a los aminoglucósidos en Enterobacteriácea. Los patógenos utilizados en este estudio se obtuvieron de múltiples bases de datos genómicas con énfasis en aquellos de relevancia clínica para humanos, *incluidos Klebsiella pneumoniae, Escherichia coli, Enterobacter cloacae, Citrobacter freundii, Enterobacter Salmonella, Shigella spp.* Los resultados muestran que la presencia de *aacA4* solo confiere cierta resistencia a los aminoglucósidos; Sin embargo, la presencia del integrón *aacA4* y el gen *aadA1* resultó en un incremento el espectro de resistencia a los aminoglucósidos. El objetivo de este estudio fue establecer una relación entre estos dos genes y su prevalencia en Enterobacteriácea, lo cual es importante para comprender la resistencia a los antibióticos. Los resultados de este estudio mostraron que el integrón *aacA4* y el gen *aadA1* estaban ausentes en los genomas de las cepas sensibles a los aminoglucósidos. Por tanto, la presencia de estos dos genes puede considerarse como un marcador de resistencia múltiple en Enterobacteriácea. La detección temprana de patógenos multirresistentes es fundamental para el tratamiento eficaz de enfermedades infecciosas. Por lo tanto, nuestro estudio destaca la importancia de la detección de integrones *aacA4* y genes *aadA1* de Enterobacteriácea; esto puede mejorar el diagnóstico y tratamiento de infecciones causadas por estas bacterias.

2. ABSTRACT

The *aacA4* gene cassette encoding an aminoglycoside N(6')-acetyltransferase is commonly found in Enterobacteriaceae species that carry a class 1 integron that does not normally contain the *aadA1* gene encoding an aminoglycoside (3") (9) adenoglycosyltransferase . This study aims to investigate the potential of the *aacA4* gene together with the *aadA1* gene for resistance to aminoglycosides in Enterobacteriaceae. Pathogens used in this study were obtained from multiple genomic databases with an emphasis on those of clinical relevance to humans, including *Klebsiella pneumoniae*, *Escherichia coli*, *Enterobacter cloacae*, *Citrobacter freundii*, *Enterobacter Salmonella*, and *Shigella spp*. The results show that the presence of *aacA4* only confers some resistance to aminoglycosides; However, the presence of the *aacA4* integron and the *aadA1* gene resulted in an increased spectrum of resistance to aminoglycosides. The aim of this study was to establish a relationship between these two genes and their prevalence in Enterobacteriaceae, which is important for understanding antibiotic resistance. The results of this study showed that the *aacA4* integron and the *aadA1* gene were absent in the genomes of aminoglycoside-sensitive strains. Therefore, the presence of these two genes can be considered as a marker of multiple resistance in Enterobacteriaceae. Early detection of multiresistant pathogens is essential for the effective treatment of infectious diseases. Therefore, our study highlights the importance of the detection of Enterobacteriaceae *aacA4* integrons and *aadA1* genes; this can improve the diagnosis and treatment of infections caused by these bacteria.

3. INTRODUCCIÓN

La resistencia a los antimicrobianos se refiere a la capacidad de las bacterias para resistir los efectos de los antibióticos, que puede ser una característica inherente o adquirida durante una infección. Según Organización Mundial de la Salud (OMS), la resistencia bacteriana supone un riesgo importante para la salud pública y para prioridades mundiales como el desarrollo humano. Es imperativo que los países colaboren, consulten y supervisen los mecanismos para combatir este problema, dado su gran impacto en las actividades económicas, la alimentación, el turismo y los flujos migratorios. Los informes de varios hospitales indican que las opciones de tratamiento son limitadas debido a la resistencia a los antibióticos, incluidos los antibióticos más nuevos que son inactivos contra las cepas multirresistentes (MDR), extremadamente resistentes (XDR) o panresistentes (PDR). El lema de la Organización Mundial de la Salud (OMS) sobre la resistencia a los antimicrobianos hace hincapié en la necesidad crítica de actuar hoy para garantizar el tratamiento mañana. Se prevé que en 2050 la resistencia bacteriana causará la muerte de 10 millones de personas al año. La resistencia a los antimicrobianos se ha comparado con crisis mundiales como la proliferación de armas de destrucción masiva y la recesión económica.

La familia Enterobacteriácea comprende una amplia gama de bacterias, entre las que se encuentran patógenos humanos notorios como *Escherichia coli*, *Salmonella*, *Klebsiella* y *Enterobacter*, entre otros. Por desgracia, la aparición de cepas de estas bacterias resistentes a los antibióticos se ha convertido en un grave problema, ya que son capaces de causar una amplia gama de infecciones, como infecciones del tracto urinario, neumonía, sepsis y gastroenteritis (Laxminarayan et al., 2014).

Las repercusiones de la resistencia a los antibióticos en las enterobacterias son profundas e incluyen un aumento de la morbilidad, la mortalidad y los gastos sanitarios. El tratamiento de las infecciones resistentes es arduo y a menudo requiere el uso de antibióticos costosos y tóxicos. Además, estas bacterias tenaces tienen la capacidad de propagarse rápidamente en los entornos sanitarios, lo que provoca brotes y aumenta el riesgo de transmisión a poblaciones susceptibles (Health, 2015).

Una clase de antibióticos conocidos como aminoglucósido se utilizan para combatir las infecciones bacterianas. La gentamicina, un aminoglucósido de amplio espectro, se usa para tratar una variedad de infecciones bacterianas, como infecciones del tracto urinario, neumonía, sepsis e infecciones de la piel. A menudo se usa en combinación con otros antibióticos para tratar infecciones graves. La tobramicina, otro aminoglucósido de amplio espectro, se usa para tratar infecciones causadas por bacterias gramnegativas como *Pseudomonas*. La tobramicina a menudo se usa para tratar infecciones del tracto respiratorio en personas con fibrosis quística. La amikacina es un aminoglucósido de amplio espectro más fuerte que a menudo se usa para tratar infecciones causadas por bacterias multiresistentes. Es particularmente eficaz contra las bacterias gramnegativas. La estreptomina es un aminoglucósido más antiguo que todavía se usa en algunos casos para tratar infecciones causadas por *Mycobacterium tuberculosis*, la bacteria que causa la tuberculosis.

En el campo médico, un aminoglucósido es una herramienta eficaz para tratar infecciones graves que no han respondido a otros antibióticos. Estos medicamentos generalmente se administran por vía intravenosa o intramuscular y pueden tener efectos secundarios graves, incluidos posibles daños renales o auditivos. Los aminoglucósidos funcionan matando

bacterias rápidamente e interrumpiendo su síntesis de proteínas, lo que los hace altamente efectivos contra ciertos tipos de bacterias gramnegativas y tuberculosis. Cuando se usa junto con antibióticos betalactámicos, un aminoglucósido puede producir un efecto sinérgico que aumenta su eficacia. (Fernández Roblas & Soriano, 1997)

Los integrones son un tipo de elemento de ADN presente en varias bacterias. Tienen un sistema de casete de genes que permite la integración de ADN extraño en un sitio específico dentro del integrón. Un integrón consta de tres partes principales, un segmento conservado en 5' (5'-CS), una región variable (VR) y un segmento conservado en 3' (3'-CS). Mientras que 5'-CS y 3'-CS son regiones altamente conservadas, la VR es variable e incluye casetes de genes responsables de la resistencia a los antibióticos (Cambray et al., 2010). Los integrones puede capturar y asimilar casetes de genes que contienen genes de resistencia a antibióticos. Estos casetes de genes suelen ser pequeñas piezas móviles de ADN que pueden transferir sin esfuerzo entre bacterias. Después de la incorporación en un integrón, el casete de genes se transcribe y traduce como parte de una molécula de ARNm más grande que incluye otros casetes de genes en la VR. Esto permite la expresión coordinada de múltiples genes de resistencia a los antibióticos (Gillings, 2014).

Un estudio realizado en la India reveló que más del 70 % de los aislamientos de *Escherichia coli* de pacientes con infecciones del tracto urinario, contenían integrones con múltiples genes de resistencia a los antibióticos (Sharma et al., 2014). Es importante destacar los hallazgos significativos de investigaciones recientes. Un estudio realizado en China reveló una tendencia preocupante; los integrones predominan entre las cepas de *Klebsiella pneumoniae* resistentes a múltiples fármacos. Y lo que es aún más alarmante, los integrones contienen genes de resistencia a los carbapenémicos, una clase de antibióticos que se

considera el último recurso para tratar muchas infecciones. Los integrantes son elementos genéticos clave que permiten que las bacterias desarrollen y propaguen la resistencia a los antibióticos. Por lo tanto, comprender su papel en este proceso es esencial para el desarrollo de nuevas estrategias para combatir la propagación de la resistencia a los antibióticos.

La presencia de casetes de genes como *aacA4* y *aadA1* es un factor que contribuye a la resistencia a los antibióticos. Estos casetes codifican enzimas que modifican los antibióticos aminoglucósidos, haciéndolos ineficaces. Los casetes de genes *aacA4* y *aadA1* pertenecen a genes de resistencia a aminoglucósidos, y el primero codifica una enzima acetiltransferasa que modifica los antibióticos aminoglucósidos al reducir su afinidad por su sitio objetivo, mientras que el último codifica una enzima aminoglucósido adeniltransferasa que modifica los antibióticos aminoglucósidos. Modifica los antibióticos aminoglucósidos añadiendo un grupo adenilo al grupo hidroxilo de la molécula antibiótica. Esta información proviene de un estudio de 2010 de Ramírez y Tolmasky.

Los casetes de los genes *aacA4* y *aadA1* desempeñan un papel importante en el desarrollo y la propagación de la resistencia a los antibióticos. Los antibióticos aminoglucósidos se usan comúnmente para tratar infecciones causadas por bacterias Gramnegativas como *Escherichia coli* y *Klebsiella pneumoniae*. Sin embargo, la presencia de casetes de genes *aacA4* y *aadA1* en estas bacterias puede hacer que estos antibióticos sean ineficaces. (Liu et al., 2018).

Varios estudios han destacado la importancia de los casetes de los genes *aacA4* y *aadA1* en la propagación de la resistencia a los antibióticos. Por ejemplo, un estudio realizado en China encontró que el casete del gen *aacA4* estaba presente en más del 70 % de los

aislamientos de *Escherichia coli* de cerdos, y estos aislamientos eran resistentes a múltiples antibióticos. Otro estudio realizado en España encontró que el casete del gen *aadA1* estaba presente en una alta proporción de aislados de *Klebsiella pneumoniae* multiresistentes de pacientes hospitalizados (Singh et al., 2018).

Los casetes de los genes *aacA4* y *aadA1* son elementos genéticos importantes que contribuyen al desarrollo y propagación de la resistencia a los antibióticos. Al codificar enzimas que modifican los antibióticos aminoglucósidos, estos casetes de genes hacen que estos antibióticos sean ineficaces, lo que limita las opciones de tratamiento para las infecciones bacterianas. Comprender el papel de los casetes de genes *aacA4* y *aadA1* en la resistencia a los antibióticos es importante para desarrollar nuevas estrategias para combatir la propagación de la resistencia a los antibióticos.

El conocimiento de los factores asociados a las infecciones bacterianas multiresistentes es muy importante para una adecuada vigilancia y control en beneficio de la salud, donde la familia Enterobacteriácea es el grupo más grande y heterogéneo de bacilos gramnegativos de importancia clínica; causar una amplia gama de enfermedades en los seres humanos. Las bacterias se vuelven patógenas solo cuando ingresan a los tejidos fuera de su sitio intestinal normal u otros sitios menos comunes de microflora normal. Los sitios más comunes de infecciones clínicamente significativas son el sistema urinario, el tracto biliar y otras áreas como el torrente sanguíneo, la próstata, los pulmones, los huesos y las meninges. Desde el punto de vista clínico, se pueden clasificar en dos grupos, enterobacterias patógenas primarias como *Salmonella enterica*, *Shigella spp.*, y *Escherichia coli* que causan principalmente síntomas gastrointestinales y enterobacterias oportunistas. Cuando las defensas normales del huésped son deficientes, *Klebsiella pneumoniae*, puede causar una

consolidación necrosante hemorrágica extensa de los pulmones, además de infecciones del tracto urinario y bacteriemia con lesiones focales en pacientes debilitados.

En los últimos años, se han profundizado los estudios de integrones y genes de inserción, como en el caso de *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina, donde en los aislados resistentes a este antibiótico predominaron el gen *aacA4* y los integrones clase I que custodian el gen *aadA1*. Es importante estudiar la relación entre los integrones y los genes de resistencia para discernir su función en los casetes de resistencia y evaluar la influencia de los integrones en la propagación ambiental de la resistencia a los antibióticos. Los estudios han realizado la variabilidad genética de los integrones de clase 1 y sus genes de resistencia antimicrobianos asociados en cepas de Enterobacteriácea procedentes de hábitats acuáticos en China. El estudio de la multiresistencia a antibióticos mediada por integrones en aislados clínicos de *Acinetobacter baumannii* demostró que había integrones por PCR y secuenciación de ADN.

4. OBJETIVOS

4.1 GENERAL

Determinar la presencia o ausencia entre los genes cassette aacA4 y aadA1 y la resistencia a los aminoglucósidos utilizando herramientas y métodos bioinformáticos en bacterias patógenas de interés clínico pertenecientes a la familia Enterobacteriácea.

4.2 ESPECÍFICOS

Determinar la presencia o ausencia de los genes cassette AacA4 y el gen AadA1 en *Klebsiella pneumoniae*, *Escherichia coli*, *Enterobacter cloacae*, *Citrobacter freundii*, *Enterobacter Salmonella* y *Shigella spp.*

Utilizar análisis estadísticos para investigar la asociación entre la presencia o ausencia de los genes del casete aacA4 y aadA1.

Utilizar AlphaFold, una herramienta de predicción de proteínas, para identificar o predecir las proteínas codificadas por los genes aadA1 y aacA4

5. MATERIALES Y MÉTODOS

Adquisición de datos genómicos para análisis de integrones

El paso inicial en la investigación implicó usar BLAST para buscar los genes de casete *aacA4* y *aadA1* en genomas bacterianos disponibles en bases de datos públicas. Se obtuvieron los datos de genomas de cepas de enterobacterias que han sido anotadas con genes de resistencia a aminoglucósidos disponibles en las bases de datos públicas del NCBI.

Se obtuvieron las secuencias de los genomas de *Klebsiella quasipneumoniae*, *Klebsiella pneumoniae*, *Enterobacter cloacae*, *Citrobacter freundii*, *Salmonella enterica*, *Shigella spp.* y *Escherichia coli* en los cuales se determinará la presencia del integrón que contiene a los genes casete *aacA4* y *aadA1*.

Se seleccionó los datos de secuenciación que cumplan con los criterios de su estudio. Los criterios en que se enfatizó para filtrar los datos fueron: Genomas cromosómicos de las especies estudiadas, calidad de secuenciamiento tomando principalmente en cuenta secuenciamientos por Pacbio, Illumina, Nanopore, Shotgun; la disponibilidad de acceder a bioproyectos que estén relacionados con la resistencia a antimicrobianos.

Se usó Entrez, otra herramienta útil ofrecida por el NCBI, la cual puede realizar búsquedas precisas dentro de la base de datos de genomas de referencia del NCBI. Esto con el fin de recopilar los genomas referenciales de las especies investigadas, dichas especies servirán de control como cepas de control, ya que estas al ser cepas de referencia no deberían contener los genes cassette analizados, se procederá a descargar 2 genomas referenciales de

cada especie analizada, esto nos servirá para comprobar si existe una variabilidad en estos genomas de referencia.

Recuperación de secuencias de integrones para estudio y análisis

Para la investigación fue necesario identificar al integrón que contiene los genes *aaca4* y *aada1* es importante para entender la estructura del integrón y las secuencias de los casetes adyacentes a los genes de resistencia, el integrón objetivo incluye los siguientes genes: *IntI1* (integrasa), *blaVIM-1* (carbapenemasa de clase B), *AacA4* (*aacA4*) y *AadA1* (*aadA1*). El número de secuencia de referencia para este integrón es EF577408. Para aislar los genes específicos de interés, a saber, *aacA4* y *aadA1*, del integrón de clase I, se pueden emplear varias herramientas y técnicas bioinformáticas. Dado que el gen de la carbapenemasa de clase B (*blaVIM-1*) no es de interés en esta investigación, se pudo eliminar o "cortar" selectivamente de la secuencia del integrón. Por ello se utilizó la herramienta bioinformática "seqtk" mediante línea de comandos en Ubuntu, ubicando las coordenadas del gen entre 1,181 - 1,981 pb dentro del integrón. Después de eliminar el gen *blaVIM-1*, la secuencia resultante debía contener los genes de interés, es decir, *aacA4* y *aadA1*. Para verificar la precisión de este corte de las secuencias de genes aislados comparándolas en un alineamiento con el Integron sin cortar, identificando que el corte haya sido realizado entre los rangos correctos.

Las estructuras de proteínas conectadas a los genes *aadA1* y *aacA4* se predijeron utilizando el programa AlphaFold. Esta técnica de vanguardia utiliza algoritmos de aprendizaje profundo para predecir con precisión los patrones de plegamiento de proteínas.

AlphaFold creó modelos estructurales para las proteínas asociadas descifrando las secuencias genómicas de los genes.

La siguiente etapa consistió en comprender las implicaciones funcionales de estas proteínas en la resistencia a los antimicrobianos una vez que se dispuso de las estructuras proteicas anticipadas. Las proteínas fueron examinadas por sus interacciones con sustancias antimicrobianas y mecanismos de acción conocidos. Esto requirió examinar fuentes de literatura y bases de datos centradas en la resistencia a los antibióticos, como la base de datos integral de resistencia a los antibióticos (CARD) y artículos académicos.

AlphaFold facilitó la obtención de secuencias genéticas vinculadas a los genes *aadA1* y *aacA4*, además de identificar proteínas. Estos datos se recopilaron de la base de datos de EMBL-EBI la cual tenía integrados los genes del análisis. Las secuencias génicas adquiridas servirán para examinarse, contrastarse y verificarse.

Alineación de integrones, genes y genomas para análisis comparativo

La herramienta bioinformática Muscle se utilizó en el experimento para alinear contigs, incluidos los genes y el integrón. Sin embargo, se llevaron a cabo una serie de procedimientos para encontrar los contigs que componen los genes y el integrón y extraerlos de cada genoma antes de realizar este alineamiento.

Se realizó un alineamiento local utilizando la función `blastdb` para identificar los contigs que incluían los genes e integrones dentro de los genomas. Este comando hizo posible buscar rápidamente una base de datos especial hecha solo para esta consulta utilizando las secuencias genómicas.

Siguiendo la alineación local, se extrajeron los contigs identificados de cada genoma que contenían el integrón y los genes. Las secuencias de contig específicas conectadas a los genes y las regiones de integrones debían ser recuperados en esta etapa. Por lo que utilizando herramientas bioinformáticas en específico el comando seqret, el cual nos permitió obtener una secuencia en específico dentro del genoma, es decir los contigs. Después de que se recuperaron los contigs, se realizó un análisis de blastdb. Pero esta vez, los contigs recuperados y los genes se usaron en el análisis, no en el integrón. El objetivo de este método era calcular la frecuencia de cada gen dentro de los genomas.

Junto con los procedimientos antes mencionados, se realizó un alineamiento local de los genomas de referencia utilizando el programa blastdb. Esta alineación hizo posible comparar las secuencias contig derivadas de los genomas examinados con los genomas de referencia. Esto con el fin de poder determinar la ausencia o presencia de los genes de interés dentro de los genomas de referencia.

6. RESULTADOS

Para llevar a cabo el análisis, se realizó una búsqueda en BLAST para cada especie, utilizando los genomas disponibles en las bases de datos genómicas. Como resultado de esta búsqueda, se obtuvieron los genomas de referencia de cada especie que fueron incluidos en las tablas presentadas a continuación.

Además, se llevó a cabo una búsqueda enfocada en los genomas de referencia para cada especie. Estos genomas de referencia se eligieron para representar cepas sensibles que podrían servir como estándares de comparación en el análisis.

La búsqueda exhaustiva de genomas de cada especie y el enfoque en genomas de referencia seleccionados proporcionaron una base sólida para el análisis de la presencia de los genes *aadA1* y *aacA4* en cada especie. Esto nos permitió evaluar la prevalencia de estos genes en las poblaciones genómicas de las especies estudiadas y analizar posibles relaciones entre la presencia de estos genes y otros parámetros como el porcentaje de identidad, el score y la presencia de gaps en los alineamientos la cual nos brinda una mejor comprensión de la distribución de estos genes en las poblaciones microbianas y su relevancia en el contexto de la resistencia a los antibióticos.

Tabla 1. Genomas de *E. coli*, 11 genomas estaban disponibles para el análisis; Las secuencias Contig asociadas con los genes de interés se extrajeron de estos genomas.

Información genómica de <i>Escherichia coli</i>						
	Numero de búsqueda en el NCBI	Nombre	Bioproject	Región dentro del genoma	PB	Secuence Technology
1	CP061101.1	<i>Escherichia coli</i> strain 1EC213 chromosome.	PRJNA473419	2942265-2943103	838	Illumina MiSeq; Oxford Nanopore MinION
2	CP048322.1	<i>Escherichia coli</i> strain 64 chromosome.	PRJNA604100	1728920-1729758	838	Oxford Nanopore/illumina minniseq
3	CP048867.1	<i>Escherichia coli</i> strain 78-Pyelo chromosome.	PRJNA592372	3137349-3138187	838	Illumina MiSeq; PacBio Sequel
4	CP090456.1	<i>Escherichia coli</i> strain B379 chromosome.	PRJNA515159	3696047-3696857	810	Illumina NovaSeq; Oxford Nanopore GridION
5	CP033158.1	<i>Escherichia coli</i> strain CM IVRI KOL-1 chromosome.	PRJNA496607	3625662-3626500	838	PacBio RSII
6	CP084900.1	<i>Escherichia coli</i> strain EC20 chromosome.	PRJNA766492	3812051-3812889	838	Oxford Nanopore PromethION
7	AP023219.2	<i>Escherichia coli</i> M505.	PRJDB5126	93815-94653	838	MinION; Illumina MiSeq
8	AP023433.1	<i>Escherichia coli</i> M719.	PRJDB5126	1121012-1121850	838	minION; Illumina HiSeq 3000
9	CP057484.1	<i>Escherichia coli</i> strain RHB25-C02.	PRJNA605147	965243-966081	838	Hybrid: Illumina and OXFORD_NANOPORE

0	1	CP056446.1	<i>Escherichia coli</i> strain RHBSTW-00503	PRJNA605147	3372769-3373607	838	Hybrid: Illumina and OXFORD_NANOPORE
1	1	CP083701.1	<i>Escherichia coli</i> strain SUIS-SEKPC3NDM5 chromosome.	PRJNA762038	2608007-2608845	838	Oxford Nanopore MinION; Illumina Mini-Seq

Información genómica de las cepas de referencia de *Escherichia coli*

	Numero de búsqueda en el NCBI	Nombre	Assembly	Región dentro del genoma	Genome size
1	GCA_000005845.2	<i>Escherichia coli</i> str. K-12 s	ASM584v2	Genoma completo	4.6 Mb
2	GCA_000008865.2	<i>Escherichia coli</i> O157:H7 str. Sakai	ASM886v2	Genoma completo	5.5 Mb

Tabla 2. Genomas de *Enterobacter cloacae*; Se encontraron 7 genomas para su análisis; Las secuencias Contig que contenían los genes de interés se extrajeron de estos genomas.

Información genómica de <i>Enterobacter cloacae</i>						
	Numero de búsqueda en el NCBI	Nombre	Bioproject	Región dentro del genoma	PB	Tecnología de secuenciamiento
1	OW968296.1	<i>Enterobacter cloacae</i> isolate 114 genome assembly.1	PRJEB42440	4766268-4767081	813	Illumina MiniSeq; Oxford Nanopore
2	CP010512.1	<i>Enterobacter cloacae</i> strain colR/S.1	PRJNA263343	580597-581407	810	PacBio
3	CP092635.1	<i>Enterobacter cloacae</i> strain EFN743 chromosome.1	PRJNA473419	5333064-5333870	806	Illumina MiniSeq; Oxford Nanopore
4	CP035633.1	<i>Enterobacter cloacae</i> strain EN3600 chromosome.1	PRJNA517781	3250-4063	813	PacBio
5	OW969715.1	<i>Enterobacter cloacae</i> isolate 114 genome assembly.1	PRJEB42440	4738766-4739579	813	PacBio
6	CP040827.1	<i>Enterobacter cloacae</i> strain NH77 chromosome.1	PRJNA544891	3102188-3103001	813	PacBio RSII
7	CP071792.1	<i>Enterobacter cloacae</i> strain P7536 chromosome.1	PRJNA713617	1521218-1522031	813	Illumina MiSeq; Oxford Nanopore MinION
Información genómica de las cepas de referencia de <i>Enterobacter cloacae</i>						
	Numero de búsqueda en el NCBI	Nombre	Assembly	Región dentro del genoma	Genome size	
1	GCA_023702375.1	<i>Enterobacter cloacae</i>	ASM2370237v1	Genoma completo	5.1 Mb	

2	GCA_019047105.1	<i>Enterobacter cloacae</i>	ASM1904710v1	Genoma completo	com-	5.6 Mb
---	-----------------	-----------------------------	--------------	-----------------	------	--------

Tabla 3. Genomas de *Salmonella entérica*, 9 genomas fueron incluidos en el análisis, Las secuencias Contig asociadas con los genes diana y el integrón se extrajeron de estos genomas.

Información genómica de <i>Salmonella enterica</i>						
	Numero de búsqueda en el NCBI	Nombre	Bioproject	Región dentro del genoma	PB	Tecnología de secuenciamiento
1	CP049312.1	<i>Salmonella enterica</i> subsp. enterica serovar Albany strain CVM N18S2238 chromosome.1	PRJNA292661	1970950-1972398	1448	PacBio RS
2	OU015719.1	<i>Salmonella enterica</i> subsp. enterica serovar 4,5,12:i- isolate pMOL625_IncHI2 genome assembly.1	PRJEB44718	167868-168678	810	PacBio RS
3	CP100666.1	<i>Salmonella enterica</i> subsp. enterica serovar Enteritidis strain R18.1630 chromosome.1	PRJNA478278	3799816-3800626	810	Illumina MiSeq; Oxford Nanopore MinION
4	OX442412.1	<i>Salmonella enterica</i> subsp. enterica serovar Rissen isolate pure strain genome assembly.1	PRJEB58706	2450696-2451506	810	Illumina MiSeq; Oxford Nanopore MinION
5	CP036167.1	<i>Salmonella enterica</i> subsp. enterica serovar Stanley strain sg_wt8 chromosome.1	PRJNA448475	914414-915224	810	PacBio

6	CP050739.1	<i>Salmonella enterica</i> subsp. enterica serovar Typhimurium strain ST56.1	PRJNA615288	74377-75215	838	Illumina MiSeq; Oxford Nanopore MiniION
7	CP050734.1	<i>Salmonella enterica</i> subsp. enterica serovar Typhimurium strain ST90.1	PRJNA615288	74377-75215	838	Illumina MiSeq; Oxford Nanopore MiniION
8	CP050745.1	<i>Salmonella enterica</i> subsp. enterica serovar Typhimurium strain ST53.1	PRJNA615288	74377-75215	838	Illumina MiSeq; Oxford Nanopore MiniION
9	AP011957.1	<i>Salmonella enterica</i> subsp. enterica serovar Typhimurium str. T000240.1	PRJNA45951	4074922-4075760	838	Illumina and Sanger.

Información genómica de las cepas de referencia de *Salmonella enterica*

	Numero de búsqueda en el NCBI	Nombre	Assembly	Región dentro del genoma	Genome size
1	GCA_003325215.1	<i>Salmonella enterica</i>	ASM332521v1	Genoma completo	5.7 Mb
2	GCA_019047105.1	<i>Salmonella enterica</i>	ASM1602849v1	Genoma completo	4.9 Mb

Tabla 4: Genomas de *Klebsiella pneumoniae*; Solo 2 genomas estaban disponibles para el análisis; Las secuencias Contig que contenían los genes de interés se extrajeron con éxito de estos genomas.

Información genómica de *Klebsiella pneumoniae*

	Numero de búsqueda en el NCBI	Nombre	Biopro- yect	Región dentro del genoma	PB	Tecnología de secuenciamiento
1	CP072825.1	<i>Klebsiella pneumoniae</i> strain IRQBAS103c.1	PRJNA719286	5361880-5363324	1444	Illumina

2	CP073782.1	<i>Klebsiella pneumoniae</i> strain IRQBAS106c.1	PRJNA724744	5249398-5250842	1444	Illumina
Información genómica de las cepas de referencia de <i>Klebsiella pneumoniae</i>						
	Numero de búsqueda en el NCBI	Nombre	Assembly	Región dentro del genoma	Genome size	
1	GCA_000364385.3	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	ASM36438v3	Genoma completo	5.7 Mb	
2	GCF_000689275.1	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	ASM1602849v1	Genoma completo	5.7 Mb	

Tabla 5: *Shigella sp.*; Se encontraron 7 genomas, principalmente de la especie *sub flexneri*, y se incluyeron en el análisis; Las secuencias Contig asociadas con los genes de interés se extrajeron de estos genomas.

Información genómica de <i>Shigella spp.</i>						
	Numero de búsqueda en el NCBI	Nombre	Bioproject	Región del genoma	PB	Tecnología de secuenciamiento
1	CP045784.1	<i>Shigella dysenteriae</i> strain CFSAN029786.1	PRJNA541977	312090-312928	838	Oxford Nanopore GridION, Illumina
2	CP045522.1	<i>Shigella flexneri</i> strain 5908.2.1	PRJNA578858	1782988-1783826	838	Illumina NovaSeq and Oxford Nanopore MinION

3	CP034931.1	<i>Shigella flexneri</i> strain 2013C-3749.1	PRJNA218110	2381614-2382452	838	PacBio
4	CP044158.1	<i>Shigella flexneri</i> strain AR-0423.1	PRJNA562719	1353221-1354059	838	PacBio RSII
5	CP045941.1	<i>Shigella flexneri</i> 2a strain AUSMDU00010535.1	PRJNA556438	2975210-2976048	838	Oxford Nanopore GridIon, Illumina
6	CP034060.1	<i>Shigella flexneri</i> strain FDAARGOS_535.1	PRJNA231221	3129135-3129973	838	PacBio; Illumina
7	CP054913.1	<i>Shigella flexneri</i> strain FDAARGOS_691.1	PRJNA231221	2383524-2384362	838	PacBio; Illumina

Información genómica de las cepas de referencia de *Shigella flexneri*

	Numero de búsqueda en el NCBI	Nombre	Assembly	Región dentro del genoma	Genome size
1	GCA_000710235.1	<i>Shigella flexneri</i>	ASM71023v1	Genoma completo	4.3 Mb
2	GCA_000754175.1	<i>Shigella flexneri</i>	SFC	Scaffold	4.5 Mb

Tabla 6: Genomas de *Citrobacter freundii*; Las secuencias Contig que contenían los genes de interés se extrajeron con éxito de estos genomas; Las secuencias contig se encontraron en diferentes puntos dentro de los genomas de *Citrobacter freundii*.

Información genómica de <i>Citrobacter freundii</i>						
	Numero de acceso	Nombre	Bioproject	Región del ge- noma	PB	tecnología de secuencia- miento
1	NZ_JAJFDB010000093.1	<i>Citrobacter freundii</i> strain 50714CZ NODE_93_len- gth_16056_cov_94.140875.1	PRJNA772913	3571-15383	11812	Illumina Mi- Seq
2	DAHDRU010000023.1	<i>Citrobacter freundii</i> isolate bacteria SA- MEA12790281-rid14414393.denovo.23.1	SA- MEA12790281	21660-23587	1927	ILLUMINA
3	NZ_PQLH01000050.1	<i>Citrobacter freundii</i> complex sp. CFNIH5 NODE_50, whole genome shotgun se- quence.1	PRJNA224116	14336-15780	1444	Illumina Mi- Seq
4	NZ_VNMJ01000070.1	<i>Citrobacter freundii</i> strain KE4473 con- tig KE4473_70.1	PRJNA224116	624-2517	1893	Miseq
5	NZ_JAAMQB010000005.1	<i>Citrobacter freundii</i> strain YDC661 5.1	PRJNA224116	77276-78720	1444	Oxford Nanopore Mi- nION
6	NZ_JAAMQG010000004.1	<i>Citrobacter freundii</i> strain YDC876.1	PRJNA224119	28109-29553	1444	Oxford Nanopore Mi- nION
Información genómica de las cepas de referencia de <i>Citrobacter freundii</i>						
	Numero de búsqueda en el NCBI	Nombre	Assembly	Región dentro del genoma	Genome size	
1	GCF_003812345.1	<i>Citrobacter freundii</i>	ASM381234v1	Genoma com- pleto	5.1 Mb	
2	GCA_000714305.1	<i>Citrobacter freundii</i>	ASM71430v1	Genoma com- pleto	5.1 Mb	

Los resultados obtenidos con respecto a la recopilación de la información genómica y la obtención de las regiones que contienen los genes y el integrón en los genomas investigados se presenta de la siguiente manera:

Estos hallazgos resaltan la variabilidad en la disponibilidad de genomas entre diferentes especies de la familia Enterobacteriaceae. Mientras que de algunas especies había unrelativamente alto de genomas disponibles en las bases de datos, de otras especies había un número reducido de datos anotados, como lo es el caso de *Klebsiella pneumoniae* en donde solo se lograron recopilar dos secuencias genómicas.

Utilización de AlphaFold para predicción de proteínas para identificar las proteínas codificadas por los genes (aadA1 y aacA4)

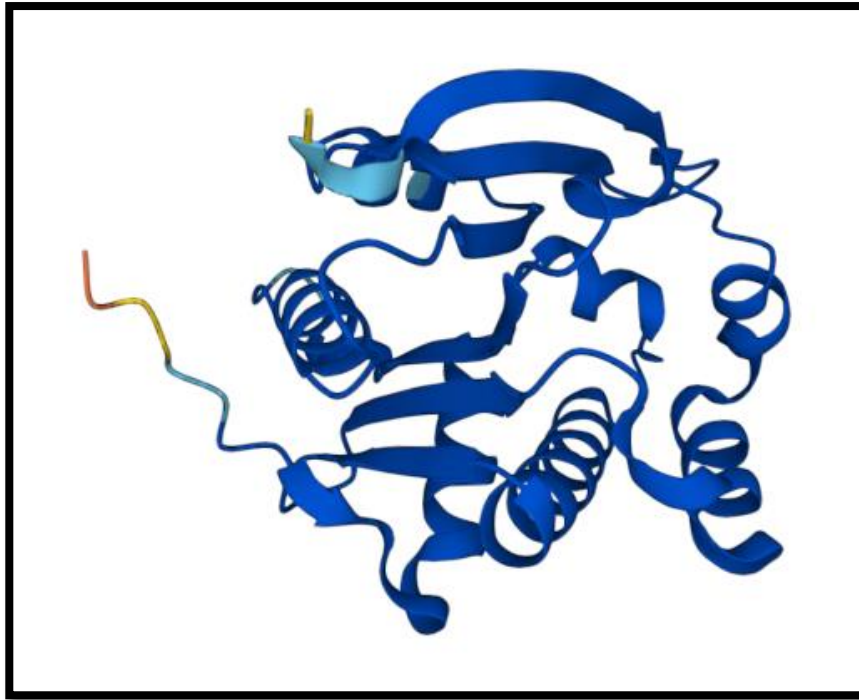
El análisis de la estructura proteica predicha y las propiedades funcionales del aminoglucósido N(6')-acetiltransferasa tipo 1, codificado por el gen aacA4 del organismo de referencia *Rhodococcus spp.* PBTS 1, El gen aadA1 se identificó por primera vez en *Rhodococcus spp.* PBTS 1 en 2006 (Kimura, N., et al. 2006).

La AAC(6')-I, una enzima que cataliza la transferencia de un grupo acetilo desde la acetyl-CoA al grupo 6'-amino de las moléculas de aminoglucósido, es responsable de este proceso. Debido a este cambio, los aminoglucósidos se vuelven inactivos y estos antibióticos se vuelven menos efectivos.

El gen aacA4, que está presente en numerosas bacterias, incluidas bacterias Gram-negativas como *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae* y *Pseudomonas aeruginosa*, codifica la enzima

AAC(6')-I. El gen *aacA4* puede propagarse a otras bacterias más fácilmente ya que con frecuencia está presente en elementos genéticos móviles como plásmidos y transposones.

Figura 1. Aminoglycoside N(6')-acetyltransferase type 1 obtenida de AlphaFold structure prediction



La enzima AAC(6')-I pertenece a la superfamilia de las acetiltransferasas. Esta superfamilia de enzimas cataliza la transferencia de un grupo acetilo del acetil-CoA a varios sustratos, como aminoglucósidos, quinolonas y sulfonamidas. La superfamilia de acetiltransferasa tiene varias enzimas conocidas, sin embargo, solo se sabe que la enzima AAC(6')-I cataliza la acetilación de aminoglucósidos.

Figura 2. Aminoglycoside (3'') (9) adenylyltransferase obtenida de AlphaFold structure prediction



Porcentajes de similitud

El gen *aacA4* no se encuentra en ninguna de las secuencias examinadas, esto se puede corroborar revisando la Tabla 7. De *E. coli*. Esto indica que *Escherichia coli* carece de este gen en su genoma. El gen *aadA1*, por otro lado, se encuentra en todas las secuencias de *Escherichia coli*. Los altos valores de puntuación y el porcentaje de identidad que está oscilando entre el 99,264 % y el 99,630 %. en estas secuencias muestran que el gen *aadA1* está muy conservado en las especies de *E. coli*. Esto sugiere que las secuencias tienen un vínculo estrecho. Además, el porcentaje de identidad sigue siendo elevado, Esto indica que el gen *aadA1* en *Escherichia coli* está muy conservado genéticamente.

En cuanto a la presencia de genes, el gen *aadA1* se encuentra en todas las secuencias de *Escherichia coli* examinadas. El gen *aacA4*, por otro lado, no se descubrió en ninguna de las secuencias de *Escherichia coli*. Además de que el gen se encuentre duplicado en estas cepas de *Escherichia coli*. La duplicación de genes puede tener implicaciones importantes, ya que puede aumentar la cantidad de proteínas producidas y potencialmente conferir una mayor resistencia a los antibióticos, un ejemplo sería el genoma de *Escherichia coli strain_64* que contiene el gen *aadA1* duplicado

En la tabla 8. *Salmonella* entérica, se revela una gran similitud entre las secuencias, como indican los altos valores de puntuación que oscilan entre 549 y 798. Esto demuestra que las secuencias estudiadas presentan una estrecha conservación evolutiva. El porcentaje de identidad en las secuencias que incluyen el gen *aadA1* se mantiene elevado, con un rango que va desde el 98.802% hasta el 99.506%.

En relación con los genes examinados, se observa que el gen *aacA4* está presente en la secuencia "*Salmonella enterica N18S2238.1*", pero no en las demás secuencias de *Salmonella entérica*. Esta secuencia genómica en particular es la única de esta especie dentro de la investigación que contiene ambos genes. Además, es importante destacar la presencia de réplicas del gen *aadA1* en los genomas R18, Rissen y Stanley, donde se encuentra una duplicación del gen *aadA1*.

Subsecuentemente en la tabla 9. *Klebsiella pneumoniae*, la presencia del gen *aadA1* en las secuencias contig de *Klebsiella pneumoniae* "*Klebsiella pneumoniae IRQBAS103c.1*" y "*Klebsiella pneumoniae IRQBAS106c.1*" con un alto porcentaje de identidad del 98,894% sugieren que estas cepas de *Klebsiella pneumoniae* tienen este gen, lo cual podría llegar a significar que está relacionado con la resistencia a los antibióticos.

El gen *aacA4* está incluido en ambas secuencias y tiene un alto grado de identidad del 99,459%. Esto muestra que estas cepas de *Klebsiella pneumoniae* tienen un potencial de resistencia adicional mediado por este gen.

En ambas secuencias, la alineación BLAST produjo una puntuación de 785 para el gen *aadA1* y 546 para el gen *aacA4*. Estos resultados sugieren un alto grado de similitud entre las secuencias de referencia y *Klebsiella pneumoniae*. El gen *aadA1* tiene cuatro gaps en ambas secuencias, lo que puede sugerir la presencia de inserciones o deleciones en comparación con las secuencias de referencia. El gen *aacA4*, por otro lado, no tiene gaps, lo que indica una sólida correlación entre las secuencias.

Se detectan diferentes patrones de presencia y ausencia de los genes *aadA1* y *aacA4* en los genomas de *Enterobacter cloacae*, esta información se encuentra en la Tabla 10. *Enterobacter cloacae*. El gen *aadA1* está presente con un alto grado de identidad del 99,263% en el cóntigo "Enterobacter_cloacae_114.1". La alineación BLAST produjo una puntuación de 796, lo que indica una gran similitud con la secuencia de referencia. No hay gaps en este gen. El gen *aacA4*, por otro lado, falta en esta secuencia, lo que muestra la ausencia de este determinante de resistencia. Los genes *aadA1* y *aacA4* se encuentran ambos en el contig "Enterobacter_cloacae_colR/S". Con una puntuación de 795 y sin gaps, el gen *aadA1* tiene un alto porcentaje de identidad del 99,383 %.

Con una puntuación de 549 y sin gaps, el gen *aacA4* tiene un alto porcentaje de identidad del 99,640 %. La presencia de ambos genes sugiere que esta cepa de *Enterobacter cloacae* puede ser resistente a diferentes fármacos. El contig "Enterobacter_cloacae_EFN743.3" con un porcentaje de identidad del 99,012%. La puntuación obtenida es de 784 y hay tres huecos

en la alineación. Esta secuencia también es una de las que contiene el gen *aacA4*, que tiene un porcentaje de identidad del 99,279 % y una puntuación de 543, sin gaps. La presencia de ambos genes en esta secuencia implica la posibilidad de resistencia a antibióticos. El gen *aadA1* tiene un alto porcentaje de identidad del 99,631 % y 99,509 %, con puntuaciones de 805 y 802 sin gaps.

En la Tabla 11. *Shigella spp.* la presencia del gen *aadA1* se encontró en todas las secuencias de *Shigella spp.* estudiadas. El gen *aadA1* tiene un alto grado de identidad en todas las secuencias, con una media del 99,264%. Las puntuaciones de alineación de BLAST son consistentes, con valores de 796 que indican una gran similitud entre la referencia y las secuencias estudiadas. En términos de gaps, se detecta gaps en ciertas secuencias. El gen *aacA4*, por otro lado, falta en todas las secuencias de *Shigella spp.* examinadas. Esto sugiere que las cepas de *Shigella spp.* estudiadas carecen de este gen específico, lo que implica una falta de resistencia a los antibióticos asociada con este determinante. Cabe señalar que, a pesar de la ausencia del gen *aacA4*, la presencia del gen *aadA1* en todas las secuencias sugiere la posibilidad de la resistencia a los antibióticos. El alto porcentaje de puntuaciones de identidad y alineación BLAST demuestra una similitud considerable entre las secuencias de *Shigella spp.* y las secuencias de referencia para el gen *aadA1*, lo que indica la conservación funcional de este gen en la especie.

Por último, en la Tabla 12. *Citrobacter freundii*, la presencia del gen *aacA4* en secuencias de *Citrobacter freundii* se observa en todas las secuencias investigadas. El gen *aacA4* tiene un alto porcentaje de identidad en todas las secuencias, con un valor de alrededor del 99,640%. Las puntuaciones de alineación de BLAST son igualmente consistentes, con una puntuación de 549 que indica una similitud significativa entre las secuencias de referencia y las

secuencias examinadas. No hay gaps en ninguna de las secuencias, lo que indica una alineación precisa y continua.

Además, el gen *aadA1* se encuentra en todas las secuencias de *Citrobacter freundii*. El porcentaje de identidad del gen *aadA1* varía del 98,802 % al 99,264 %. Los puntajes de alineación de BLAST oscilan entre 785 y 796, lo que muestra una gran similitud entre la secuencia de referencia y la estudiada. En términos de brechas, se observa 1 brecha en algunas secuencias y 4 brechas en otras. genes *aacA4* y *aadA1*. La existencia de estos dos genes sugiere que esta especie puede ser resistente a algunos fármacos. Los altos porcentajes de similitud y puntajes obtenidos en el alineamiento BLAST sugieren que estos genes están funcionalmente conservados en las secuencias estudiadas.

Tabla 7. Porcentajes de similitud de *Escherichia coli*

Contigs	Presencia de aadA1	% de Identidad	Score	Gaps	Presencia de aacA4	% de Identidad	Score	Gaps
<i>Escherichia coli strain IEC213</i>	Presente	99.264	796	1	Ausente	-	-	-
<i>Escherichia coli strain_64</i>	Presente	99.506	798	0	Ausente	-	-	-
<i>Escherichia coli strain_64</i>	Presente	99.264	796	1	Ausente	-	-	-
<i>Escherichia coli_78.1</i>	Presente	99.264	796	1	Ausente	-	-	-
<i>Escherichia coli_B379</i>	Presente	99.630	801	0	Ausente	-	-	-
<i>Escherichia coli_B379</i>	Presente	99.383	795	0	Ausente	-	-	-
<i>Escherichia coli_KOL-1.1</i>	Presente	99.264	796	1	Ausente	-	-	-
<i>Escherichia coli_EC20.1</i>	Presente	99.264	796	1	Ausente	-	-	-
<i>Escherichia coli_M505.1</i>	Presente	99.264	796	1	Ausente	-	-	-
<i>Escherichia coli_M719.1</i>	Presente	99.264	796	1	Ausente	-	-	-
<i>Escherichia coli_M719.4</i>	Presente	89.259	549	0	Ausente	-	-	-
<i>Escherichia coli_RHB25.1</i>	Presente	99.264	796	1	Ausente	-	-	-
<i>Escherichia coli_RHBSTW</i>	Presente	99.264	796	1	Ausente	-	-	-
<i>Escherichia coli_RHBSTW</i>	Presente	99.012	784	3	Ausente	-	-	-
<i>Escherichia coli_SUISSEKPC3NDM5.1</i>	Presente	99.264	796	1	Ausente	-	-	-

Tabla 8. Porcentajes de similitud de *Salmonella enterica*

Contigs	Presencia aadA1	de % de Identidad	de Score	Gaps	Presencia aacA4	de % de Identidad	de Score	Gaps
<i>Salmonella_enterica_N18S2238.1</i>	Presente	99.264	796	1	Presente	99.820	552	0
<i>Salmonella_enterica_IncHI2.1</i>	Presente	99.383	795	0	Ausente	-	-	-
<i>Salmonella_enterica_R18.1630.1</i>	Presente	99.506	798	0	Ausente	-	-	-
<i>Salmonella_enterica_R18.1630.3</i>	Presente	89.259	549	0	Ausente	-	-	-
<i>Salmonella_enterica_Rissen.1</i>	Presente	99.506	798	0	Ausente	-	-	-
<i>Salmonella_enterica_Rissen.3</i>	Presente	89.259	549	0	Ausente	-	-	-
<i>Salmonella_enterica_Stanley_sg_wt8.1</i>	Presente	99.506	798	0	Ausente	-	-	-
<i>Salmonella_enterica_Stanley_sg_wt8.3</i>	Presente	89.259	549	0	Ausente	-	-	-
<i>Salmonella_enterica_ST53.1</i>	Presente	99.264	796	1	Ausente	-	-	-
<i>Salmonella_enterica_ST56.1</i>	Presente	99.264	796	1	Ausente	-	-	-
<i>Salmonella_enterica_ST90.1</i>	Presente	99.264	796	1	Ausente	-	-	-
<i>Salmonella_enterica_T000240.1</i>	Presente	99.264	796	1	Ausente	-	-	-

Tabla 9. Porcentajes de similitud de *Klebsiella pneumoniae*

Contigs	Presencia de aadA1	% de Identidad	Score	Gaps	Presencia de aacA4	% de Identidad	Score	Gaps
<i>Klebsiella pneumoniae_IRQBAS103c.1</i>	Presente	98.894	785	4	Presente	99.459	546	0
<i>Klebsiella pneumoniae_IRQBAS106c.1</i>	Presente	98.894	785	4	Presente	99.459	546	0

Tabla 10. Porcentajes de similitud de *Enterobacter cloacae*

Contigs	Presencia de aadA1	% de Identidad	Score	Gaps	Presencia de aacA4	% de Identidad	Score	Gaps
<i>Enterobacter cloacae_114.1</i>	Presente	99.263	796	0	Ausente	-	-	-
<i>Enterobacter cloacae_colR/S</i>	Presente	99.383	795	0	Presente	99.640	549	0
<i>Enterobacter cloacae_EFN743.3</i>	Presente	99.012	784	3	Presente	99.279	543	0
<i>Enterobacter cloacae_EN3600.1</i>	Presente	99.631	805	0	Ausente	-	-	-
<i>Enterobacter cloacae_114</i>	Presente	99.386	799	0	Ausente	-	-	-

<i>Enterobacter_cloacae_114</i>	Presente	99.386	799	0	Ausente	-	-	-
<i>Enterobacter_cloacae_114</i>	Presente	99.386	799	0	Ausente	-	-	-
<i>Enterobacter_cloacae_NH77.4</i>	Presente	99.386	799	0	Presente	99.279	543	0
<i>Enterobacter_cloacae_P7536.1</i>	Presente	99.509	802	0	Ausente	-	-	-

Tabla 11. Porcentajes de similitud de *Shigella flexneri*

Contigs	Presencia de aadA1	% de Identidad	Score	Gaps	Presencia de aacA4	% de Identidad	Score	Gaps
<i>Shigella_dysenteriae_CFSAN029786.1</i>	Presente	99.264	796	1	Ausente	-	-	-
<i>Shigella_flexneri_5908.2.1</i>	Presente	99.264	796	1	Ausente	-	-	-
<i>Shigella_flexneri_AR-0423.1</i>	Presente	99.264	796	1	Ausente	-	-	-
<i>Shigella_flexneri_AR-0423.2</i>	Presente	99.012	784	3	Ausente	-	-	-
<i>Shigella_flexneri_2a.1</i>	Presente	99.264	796	1	Ausente	-	-	-
<i>Shigella_flexneri_FDAARGOS_535.1</i>	Presente	99.264	796	1	Ausente	-	-	-
<i>Shigella_flexneri_FDAARGOS_691.1</i>	Presente	99.264	796	1	Ausente	-	-	-

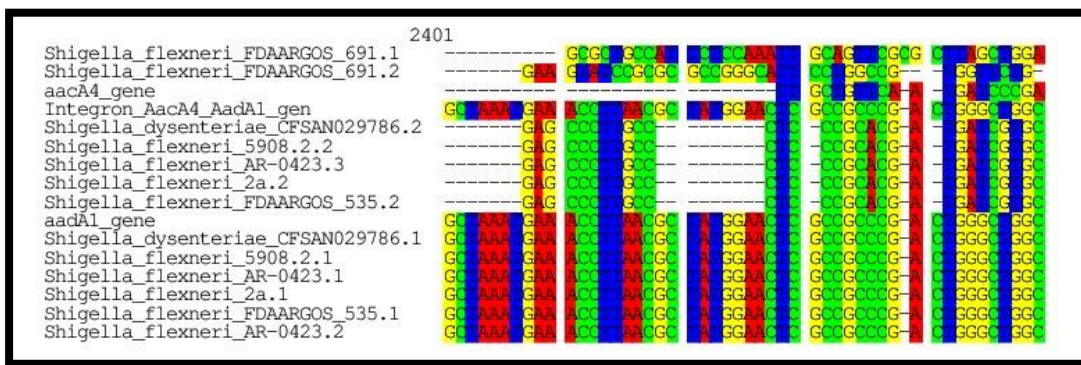
Tabla 12. Porcentajes de similitud de *Citrobacter freundii*

Contigs	Presencia de aacA4	% de Identidad	Score	Gaps	Presencia de aadA1	% de Identidad	Score	Gaps
<i>Citrobacter freundii strain 50714CZ</i>	Presente	99.640	549	0	Presente	98.802	884	1
<i>Citrobacter freundii isolate bacteria SAMEA12790281</i>	Presente	99.640	549	0	Presente	98.894	785	4
<i>Citrobacter freundii complex sp. CFNIH5 NODE_50</i>	Presente	99.640	549	0	Presente	98.894	785	4
<i>Citrobacter freundii strain KE4473</i>	Presente	99.640	549	0	Presente	99.264	796	1
<i>Citrobacter freundii strain YDC661 5.1</i>	Presente	99.640	549	0	Presente	98.894	785	4
<i>Citrobacter freundii strain YDC876.1</i>	Presente	99.640	549	0	Presente	98.894	785	4

Alineaciones múltiples

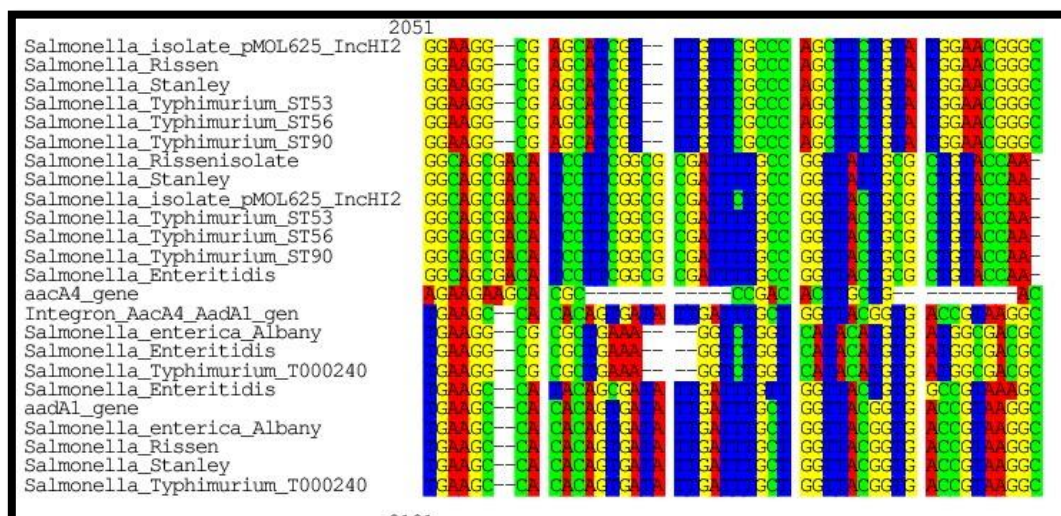
Utilizando el algoritmo de alineación Muscle, se llevaron a cabo múltiples alineaciones de secuencias contig. Durante este proceso, se identificaron regiones conservadas dentro de las secuencias contig alineadas de los genomas. Estas regiones conservadas son indicativas de similitudes genéticas y pueden tener implicaciones funcionales importantes.

Figura 3. Alineamiento de los contigs de *Shigella flexneri* con los genes *aacA4*, *aadA1*.



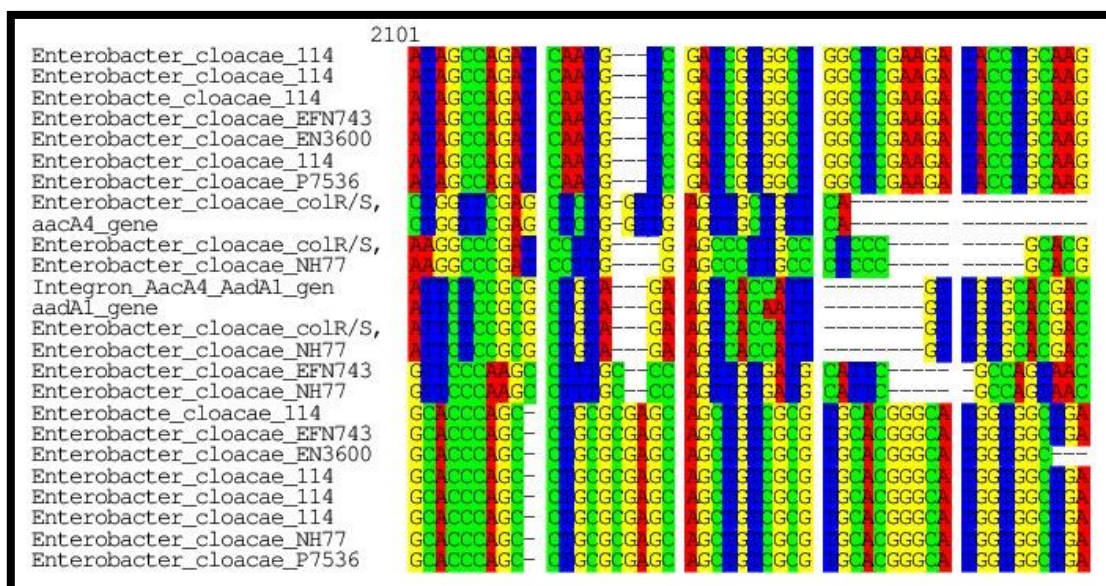
Donde se puede intuir de forma visual la ausencia del gen *aacA4* el cual no se muestra alineado, y la presencia del gen *aadA1* se hace evidente. Al igual que en *Salmonella* spp.

Figura 4. Alineamiento de los contigs de *Salmonella* spp. con los genes *aacA4*, *aadA1* y el integrón que contiene los genes.



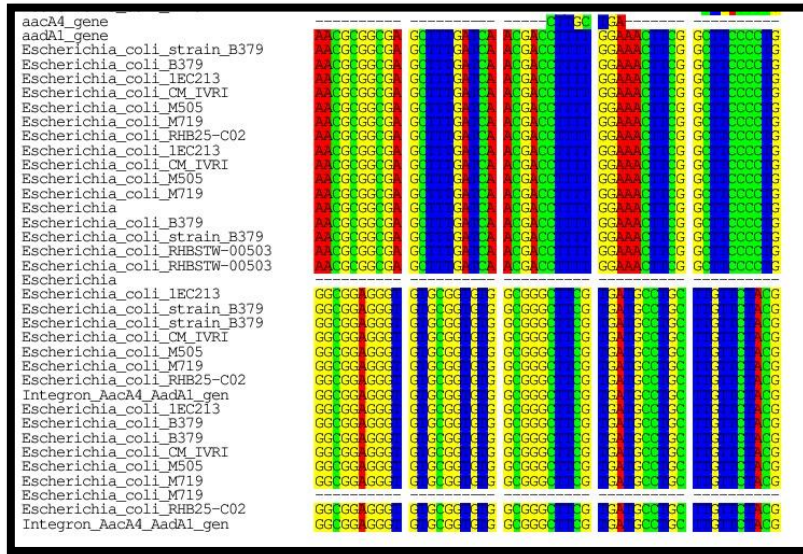
Sin embargo, en el alineamiento de *Enterobacter cloacae*, se logra evidenciar una presencia parcial de ambos genes en la sección con mayor alineamiento.

Figura 5. Alineamiento de los contigs de *Enterobacter cloacae* con los genes *aacA4*, *aadA1* y el integrón que contiene los genes.



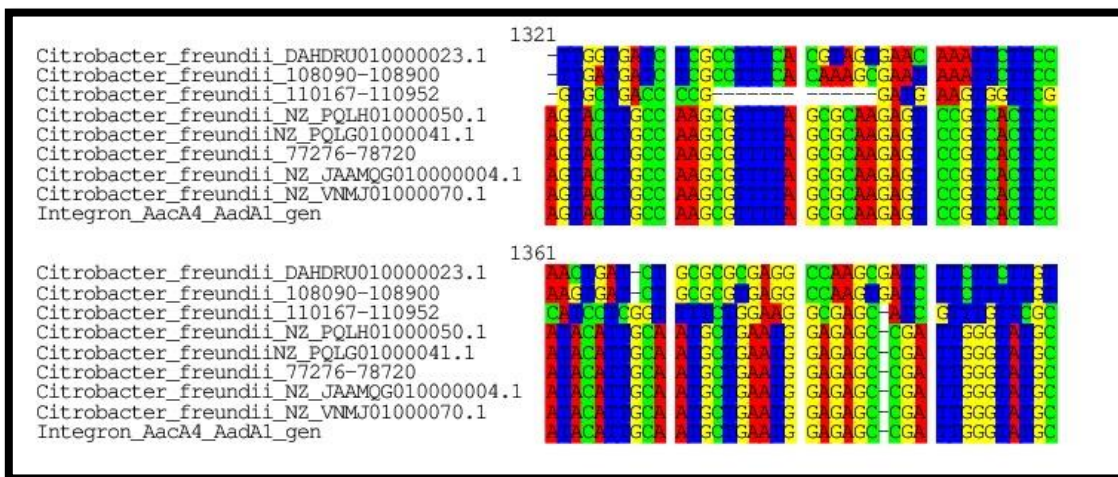
Uno de los alineamientos más claros que se pudo obtener fue el de *Escherichia coli* en donde se puede identificar la ausencia del gen *aacA4* y por otro lado la gran conservación del gen *aadA1*.

Figura 6. Alineamiento de los contigs de *Escherichia coli* con los genes *aacA4*, *aadA1* y el integrón que contiene los genes.



Otro alineamiento muy claro fue el de *Citrobacter freundii* donde se puede observar la presencia de ambos genes dentro de los contigs, con un mayor grado de deleciones e inserciones que en el alineamiento de *Escherichia coli*.

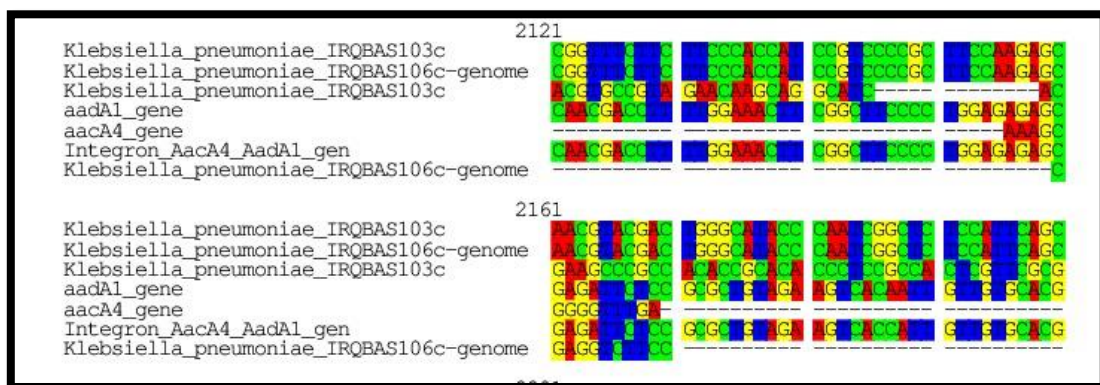
Figura 7. Alineamiento de *Citrobacter freundii* y el Integrón que contiene los genes.



Por último, el alineamiento de *Klebsiella pneumoniae*, fue intrigante desde la búsqueda de los genomas se pudo evidenciar que en estos solo se pudo contar con la presencia de 2 genomas

cromosómicos que poseían los genes, después de la extracción de los contigs y el alineamiento, se pudo evidenciar que en ambos genomas se encontraban los genes por duplicado, en diferentes locus del genoma, y por ello al igual que los anteriores se recurrió a realizar un alineamiento múltiple con Muscle.

Figura 8. Alineamiento de Klebsiella pneumoniae con los genes aacA4, aadA1 y el Integrón que contiene los genes.



Debido a que estos alineamientos tan solo son un extracto, de las secciones que se consideró más conservadas, los alineamientos completos de cada especie se encuentran subidos al drive de la base de datos de la investigación en el apartado de anexos, estos se encuentran en la carpeta de alineamiento, estos se encuentran en formato PostScript, de ser necesario los alineamientos también se los puede revisar con el nombre de cada especie en formato “.aln”.

Ausencia o presencia de genes en genomas de referencia:

Durante la investigación, se examinó de manera minuciosa los genomas de referencia de cada especie de interés de la familia Enterobacteriaceae. El objetivo principal era determinar si los genes objetivo, aadA1 y aacA4, estaban presentes en estos genomas. Sin embargo, no se pudo evidenciar la presencia de los genes en los genomas de referencia de todas las especies

estudiadas, siendo así como esta ausencia de los genomas nos permitía confirmar que estos genomas son nuestras cepas sensibles para la investigación, un ejemplo de esta es el genoma de *Escherichia coli* str. K-12 se refiere a una cepa específica de la bacteria *Escherichia coli*. La cepa K-12 es una cepa de laboratorio ampliamente utilizada y se ha convertido en un organismo modelo en la investigación científica, debido a que representa a una cepa sensible a antimicrobianos.

Durante la búsqueda de genes en los genomas de referencia, se pudo constatar su ausencia total en todas las especies. Dado que esta información sería redundante en la investigación, se decidió tomar solamente una muestra de la búsqueda mediante alineamiento local, como se muestra en el ejemplo anterior. Si se desea verificar la ausencia de estos genes en los genomas, se puede consultar la base de datos de la investigación, donde se podrá revisar los 10 genomas de referencia en los cuales no se encuentra presente ninguno de los genes.

El gen *aadA1* está consistentemente presente en todos los contigs estudiados en *Klebsiella pneumoniae*, *Enterobacter cloacae* y *Citrobacter freundii*, mostrando una alta prevalencia de este gen en estas especies. Por otro lado, la existencia del gen *aacA4* difiere entre estas especies, ya que algunas cepas lo presentan mientras que otras no.

El gen *aadA1* codifica una enzima llamada aminoglucósido adenyltransferasa, la cual confiere resistencia a ciertos antibióticos, especialmente a los aminoglucósidos. Debido a su alta frecuencia, es probable que estas especies hayan desarrollado una resistencia fuerte a esta clase de antibióticos. La existencia del gen *aadA1* en diferentes cepas dentro de cada especie resalta su importancia en la mediación de la resistencia a los antibióticos.

En comparación, el gen *aacA4*, el cual también confiere resistencia a los aminoglucósidos, es menos común. Está ausente o se encuentra raramente en los contigs examinados. Esto indica que el gen *aacA4* puede no ser tan importante en la resistencia a los antibióticos en estas especies como el gen *aadA1*. La incidencia reducida de *aacA4* podría estar relacionada con diferencias genéticas entre las cepas o la presencia de mecanismos alternativos de resistencia. La aparente dominancia del gen *aadA1* sobre el gen *aacA4* plantea preguntas intrigantes sobre las fuerzas selectivas y la dinámica evolutiva que impulsan la distribución de los genes de resistencia a los antibióticos en estas especies. Es probable que el gen *aadA1* confiera una mayor ventaja en términos de resistencia a los antibióticos, lo que resulta en una mayor frecuencia. Sin embargo, se necesita más investigación para comprender completamente los mecanismos subyacentes y los factores que influyen en la aparición de estos genes.

Estos hallazgos resaltan la importancia de rastrear y comprender la prevalencia de genes específicos de resistencia a los antibióticos en las poblaciones microbianas. Ofrecen información útil para crear estrategias de resistencia a los antibióticos, como la vigilancia dirigida, las prácticas apropiadas de prescripción de antibióticos y el desarrollo de opciones de tratamiento alternativas. Por último, la frecuencia del gen *aadA1* en las especies microbianas investigadas sobre el gen *aacA4* enfatiza su importancia en conferir resistencia a los antibióticos aminoglucósidos. La presencia del gen *aadA1* en todas las cepas demuestra que está ampliamente distribuido e importante para promover la resistencia a los antibióticos. Se requiere más investigación para determinar los mecanismos que contribuyen a la aparición de estos genes y su importancia para el manejo de la resistencia a los antibióticos.

7. DISCUSIÓN

El estudio tuvo como objetivo el investigar la prevalencia de dos genes casete, el gen *aadA1* y el gen *aacA4* donde estos serían principales precursores de la resistencia a aminoglucósidos, además de ello el gen *aadA1* y el gen *aacA4* han sido descritos como un precursor de la generación de multiresistencia en *Pseudomonas aeruginosa* y *Escherichia coli* (Sáenz, Y. et al. 2004) y (Sacha, P., et al 2012). Por ello surgió el interés de identificar su presencia dentro de secuencias genómicas de la familia enterobacteriácea.

Los resultados obtenidos muestran una variabilidad en la presencia de los genes cassette *aacA4* y *aadA1* en las bacterias patógenas de interés clínico pertenecientes a la familia Enterobacteriácea. El gen *aadA1* se encontró consistentemente presente en todos los contigs estudiados en *Klebsiella pneumoniae*, *Enterobacter cloacae* y *Citrobacter freundii*, lo cual indica una alta prevalencia de este gen en estas especies. La alta prevalencia del gen *aadA1* encaja con el hallazgo de (Bissonnette, L., & Roy, P. H. 1992). De que los genes *aadA1* y *aadA2* son los casetes identificados con mayor frecuencia en los integrones relacionados con la resistencia múltiple. Estos genes también se han encontrado en aislamientos clínicos de *A. baumannii* de otras naciones europeas, lo que indica que estos mecanismos de resistencia están generalizados. El gran número de fuertes asociaciones entre genes es consistente con la hipótesis de que existe un vínculo entre muchos de estos genes de resistencia en elementos móviles. Los mecanismos exactos de asociación no han sido determinados en el presente estudio, pero estudios previos han demostrado que las fuertes asociaciones estadísticas entre los genes de resistencia pueden corroborarse con frecuencia mediante investigaciones moleculares. (Gow, S. P. et al., 2008). Debido a que esta investigación no ha generado resultados experimentales mediante trabajos moléculas no podemos demostrar dicha asociación

en la expresión de los genes dentro de una investigación *in situ*, pero nos genera luces para poder reconocer que existe la presencia de los genes y su prevalencia dentro de los genomas, generando así una posible solución a un posterior estudio molecular, ya que los estudios moleculares de genes de resistencia pueden ser un desafío debido a la complejidad de los mecanismos genéticos involucrados y la diversidad de especies bacterianas que pueden portar estos genes. El mantenimiento de los cultivos también puede ser una fuente potencial de contaminación con bacterias y genes resistentes a los antimicrobianos. Los alimentos pueden contaminarse con bacterias resistentes y/o genes de resistencia, por ejemplo, mediante el uso de agua o estiércol contaminados para regar los cultivos, o mediante el uso de antibióticos en la alimentación animal. En la agricultura vegetal, los elementos genéticos que confieren resistencia a múltiples agentes antimicrobianos pueden ser comunes entre los microorganismos, dando lugar a resistencias cruzadas por contaminación. Por lo que mediante el uso de herramientas bioinformáticas y secuenciamiento genómico de las especies podemos estudiar de manera específica estos genes sin que posibles contaminaciones lleguen a afectar la investigación y generar datos imprecisos. Debido a su capacidad para evaluar grandes volúmenes de datos genómicos y descubrir probables mecanismos de resistencia.

El artículo “Comparing aminoglycoside binding sites in bacterial ribosomal RNA and aminoglycoside modifying enzymes” de (Romanowska et al., 2012) demuestra la utilidad de la bioinformática en la investigación de la resistencia a los aminoglucósidos. Este artículo muestra cómo usar métodos bioinformáticos para anticipar la presencia de enzimas modificadoras de aminoglucósidos en genomas bacterianos, lo que puede ayudar en la identificación de posibles mecanismos de resistencia y la creación de nuevos medicamentos.

“Deeparg: A deep learning approach for predicting antibiotic resistance genes from metagenomic data” por (Arango-Argoty et al., 2018). es otro estudio que demuestra la utilidad de la bioinformática en el estudio de la resistencia a los aminoglucósidos. Los investigadores utilizaron técnicas bioinformáticas para analizar los datos genéticos de las cepas de *Klebsiella pneumoniae* con diversos niveles de resistencia a los aminoglucósidos y descubrieron muchos mecanismos de resistencia potenciales que podrían abordarse con nuevos medicamentos.

Demostrando así el potencial de aumentar drásticamente nuestra comprensión de estos mecanismos y guiar la creación de nuevas terapias de resistencia a antibióticos.

La adquisición de genomas es un paso crítico en la investigación. Sin embargo, un problema del estudio es la escasez de genes examinados en los genomas de referencia. La ausencia de estos genes en los genomas de genes de referencia no siempre se corresponde con la ausencia de estos genes en toda la especie. Se sabe que los genomas bacterianos son muy diversos y dinámicos, con la capacidad de que los componentes genéticos, como los integrones o los elementos genéticos móviles, se muevan horizontalmente entre cepas o poblaciones. Es probable que los genes que se examinan estén presentes en otras cepas o aislados de estas especies que no están incluidos en los genomas de referencia. Si bien los genomas de referencia son un punto de partida útil para comprender la composición genética de una especie, es posible que no reflejen el espectro completo de variación y diversidad genética que se observa dentro de la especie (Pallen & Matzke, 2006). Para estudiar más a fondo la presencia o ausencia de los genes investigados, se requerirían investigaciones dirigidas que utilicen cebadores o sondas específicos para la detección de genes, más secuenciación genómica en una gama más amplia de aislamientos o la exploración de otras bases de datos y depósitos de genes que puedan incluir los genes investigados. Los genomas cromosómicos son la principal fuente de información

genética de los organismos, contienen genes importantes y sientan las bases para la investigación de sus rasgos clave. Aprendemos sobre la composición genética intrínseca de las bacterias de la familia Enterobacteriaceae y su capacidad para portar genes de resistencia a los antimicrobianos mediante el examen de los genomas cromosómicos. Comprender la presencia de estos genes dentro del material genético central ayuda a determinar su importancia evolutiva y potencial de diseminación. Son más estables y sirven como columna vertebral genómica de las bacterias. La herencia vertical asegura que los rasgos genéticos fundamentales se transmitan de generación en generación. Los plásmidos, por otro lado, son elementos genéticos extracromosómicos que pueden transferirse horizontalmente, lo que hace que su presencia difiera entre cepas y poblaciones. La utilización de genomas cromosómicos permite una comprensión más completa de la base genética de la resistencia a los antibióticos, incluidos los componentes conservados que contribuyen a la persistencia y adaptabilidad a largo plazo (Quail et al., 2012).

Es importante el uso de genomas de referencia obtenidos de Entrez para contribuir con cepas sensibles que no contengan los genes *aadA1* y *aacA4*, a partir de un estudio de ausencia de la familia Enterobacteriaceae, utilizando herramientas bioinformáticas, a partir de estudios previos. Entrez es una base de datos seleccionada dentro de la base de datos de genomas de referencia del NCBI que brinda especificidad en la búsqueda de genomas de referencia. Al consultar la ausencia de los genes de casete *aacA4* y *aadA1* en esta base de datos seleccionada, se puede recopilar información sobre si estos genes han sido identificados y anotados en los genomas de referencia de la familia Enterobacteriaceae. Si no se encuentran aciertos o anotaciones para estos genes, proporciona evidencia de su ausencia en los genomas de referencia. (Srinivasan et al ,2015)

Otro objetivo específico de esta investigación fue predecir estructuras de proteínas de los genes casete *aadA1* y *aacA4* mediante el uso de AlphaFold donde se ha demostrado que esta técnica predice estructuras de proteínas con precisión (Jumper, J., et al. 2021). Con el fin de comprender de mejor manera como estas proteínas codificadas por estos genes actúan confiriendo resistencia a aminoglucósidos, y establecer posibles formas para actuar ante ellas.

El descubrimiento de nuevos antibióticos es una aplicación potencial de AlphaFold en la investigación de genes de resistencia a aminoglucósidos. El proyecto Antibióticos-IA empleó recientemente AlphaFold para predecir la estructura de una proteína involucrada en la formación de la pared celular bacteriana que podría ser objeto de nuevos antibióticos (MIT News. 2022, September 6).

AlphaFold tiene el potencial de ayudar en la detección de variantes genéticas que confieren resistencia a los aminoglucósidos, además de sus posibles aplicaciones en el desarrollo de fármacos. Los investigadores pueden descubrir posibles mutaciones que afectan la función de las proteínas y contribuyen a la resistencia al predecir las estructuras de las proteínas.

Por lo que se demuestra que AlphaFold tiene el potencial de aumentar significativamente nuestra comprensión de los mecanismos de resistencia a los aminoglucósidos y guiar el desarrollo de nuevos medicamentos resistentes a los antibióticos.

En el presente estudio AlphaFold predijo la estructura del gen *aadA1* codifica para la adenililtransferasa (*AadA1*) la cual es una enzima que cataliza la transferencia de un grupo AMP del ATP al grupo 3"-hidroxilo de aminoglucósidos como la estreptomina y la espectinomina. Este cambio hace que los aminoglucósidos se vuelvan inactivos, lo que genera

resistencia a los antibióticos. El sitio activo en el dominio catalítico es responsable de acelerar la transferencia del grupo AMP del ATP al grupo 3"-hidroxilo de los aminoglucósidos. Los aminoglucósidos actúan uniéndose al ribosoma bacteriano e interrumpiendo la síntesis de proteínas. Sin embargo, la modificación química de estos antibióticos por enzimas como la AadA es el mecanismo de resistencia más común en la clínica. (Stern, A. L., et al 2018).

En el caso del gen casete aacA4 el sitio activo, que se encarga de catalizar la transferencia del grupo acetilo de la acetil-CoA al grupo 6'-amino de los aminoglucósidos, se encuentra en el dominio catalítico. El dominio catalítico interactúa con el dominio regulador, lo que modifica la actividad de este último.

Se han realizado investigaciones in vitro sobre las características funcionales de la enzima AAC(6')-I. La enzima puede acetilar una amplia variedad de aminoglucósidos, incluidos amikacina, gentamicina, kanamicina, tobramicina, netilmicina e isepamicina. Es altamente selectivo para los aminoglucósidos. Además, la enzima es bastante eficaz y acetila los aminoglucósidos a una velocidad de hasta 1000 moléculas por minuto. (Biswas, S., & Das, A. K. 2019)

Eso también nos abre los ojos a una serie de estrategias que se pueden utilizar para combatir el desarrollo de resistencia a los aminoglucósidos. Una estrategia es desarrollar nuevos aminoglucósidos que no sean susceptibles de acetilación por la enzima AAC(6')-I. Otra estrategia es desarrollar inhibidores de la enzima AAC(6')-I. Los inhibidores de la enzima AAC(6')-I podrían usarse para restaurar la actividad de los aminoglucósidos en bacterias que han adquirido resistencia.

La asociación de los genes casete fue uno de los objetivos específicos de esta investigación donde se logró llegar a una notable discrepancia de los resultados, debido a que la única bacteria que demostraba una asociación directa de ambos genes, tanto el gen *aadA1* y el *aacA4* fue en *Citrobacter freundii*, donde en todas las secuencias genómicas de este se identificó la presencia de ambos genes y mayor al 98% esto tiene concordancia con estudios como el de (Malek, M., et al 2015) donde el casete *aadA1* se encontraron en gran abundancia en el integrón de clase I al igual que en la investigación actual, lo que es consistente con los hallazgos de otros estudios previos sobre aislamientos de Enterobacteriaceae como el de (Reyes, A., et al 2003).

El gen *aadA1* está consistentemente presente en todos los contigs estudiados en *Klebsiella pneumoniae*, *Enterobacter cloacae* y *Citrobacter freundii*, mostrando una alta prevalencia de este gen en estas especies. La existencia del gen *aacA4*, por otro lado, difiere entre estas especies, con algunas cepas que lo muestran mientras que otras no.

El gen *aadA1* codifica una enzima llamada aminoglucósido adenililtransferasa, que confiere resistencia a ciertos antibióticos, en particular a los aminoglucósidos. Debido a su gran ocurrencia, es probable que estas especies hayan desarrollado una fuerte resistencia a esta clase de antibióticos. La existencia del gen *aadA1* en distintas cepas dentro de cada especie enfatiza su importancia en la mediación de la resistencia a los antibióticos.

En comparación, el gen *aacA4*, que también confiere resistencia a los aminoglucósidos, es menos común. Está ausente o se descubre con poca frecuencia en los contigs examinados. Esto muestra que el gen *aacA4* puede no ser tan importante en la resistencia a los antibióticos en estas especies como el gen *aadA1*. La incidencia reducida de *aacA4* podría estar relacionada con las diferencias genéticas entre las cepas o la presencia de mecanismos de resistencia

alternativos. El dominio aparente del gen *aadA1* sobre el gen *aacA4* plantea cuestiones intrigantes sobre las fuerzas selectivas y la dinámica evolutiva que impulsan la distribución de los genes de resistencia a los antibióticos. en estas especies. Es probable que el gen *aadA1* confiera una mayor ventaja en términos de resistencia a los antibióticos, lo que resulta en una mayor aparición. Sin embargo, se necesita más investigación para comprender completamente los mecanismos y factores subyacentes que influyen en la aparición de estos genes.

La menor prevalencia de *aacA4*, un gen frecuente de resistencia a los aminoglucósidos puede deberse a variaciones genéticas entre cepa, la presencia de mecanismos de resistencia alternativos. Según una investigación, aunque se identificó *aacA4* en muchas cepas resistentes a los aminoglucósidos, faltaba en algunas cepas que, sin embargo, mostraban resistencia (Doi, Y., & Arakawa, Y. 2007). Esto muestra que estas cepas pueden tener mecanismos de resistencia alternativos.

Comprender las vías genéticas y moleculares detrás de la resistencia a los aminoglucósidos es fundamental para el desarrollo de nuevas estrategias y medicamentos resistentes a los antibióticos. Los investigadores pueden comprender mejor los procesos genéticos que contribuyen a la resistencia y encontrar posibles objetivos para nuevas terapias investigando la prevalencia y distribución de genes de resistencia como *aacA4*.

El artículo " Distribution of aminoglycoside resistance genes in clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa* in Iran: a PCR-based typing approach " de (Feizabadi, M., et al. 2010). subraya la necesidad de examinar la distribución de genes de resistencia. Este estudio descubrió que la incidencia de *aacA4* difería entre las cepas de *Pseudomonas aeruginosa*, lo que implica

que los cambios genéticos entre las cepas pueden contribuir a las variaciones en los mecanismos de resistencia.

El estudio " Aminoglycoside modifying enzymes. Drug Resistance Updates" de Ramírez y Tolmasky es otro ejemplo de las posibilidades de estudiar los mecanismos de resistencia a los aminoglucósidos. Este artículo de revisión examina los numerosos mecanismos moleculares que subyacen a la resistencia a los aminoglucósidos y enfatiza la importancia de comprender estos mecanismos para liderar el desarrollo de nuevos medicamentos.

Finalmente, la frecuencia del gen *aadA1* en las especies microbianas investigadas sobre el gen *aacA4* enfatiza su importancia para dar resistencia a los antibióticos aminoglucósidos. La presencia del gen *aadA1* en todas las cepas muestra que está ampliamente distribuido y es importante para promover la resistencia a los antibióticos. Se necesita más investigación para determinar los mecanismos que contribuyen a la aparición de estos genes y su importancia para el manejo de la resistencia a los antibióticos.

8. CONCLUSIONES

De este trabajo de análisis genómico y de búsqueda de genes de resistencia en especies microbianas pertenecientes a la familia enterobacteriácea se extrajeron hallazgos importantes.

La presencia de los genes *aadA1* y *aacA4* se descubrió en múltiples especies mediante una búsqueda y análisis BLAST de secuencias genómicas, lo que indica la presencia de posibles mecanismos de resistencia a los antibióticos en estas poblaciones. En cuanto al predominio genético, se descubrió que el gen *aadA1* estaba presente en la mayoría de las especies

estudiadas, pero el gen *aacA4* tenía una ocurrencia más limitada. Esto implica que el gen *aadA1* puede ser más importante en la resistencia a los antibióticos en estas especies microbianas. Cabe señalar, sin embargo, que la ausencia del gen *aacA4* en las especies investigadas no descarta la posibilidad de que exista en otras cepas o genomas no incluidos en este estudio. También se identificaron variaciones en los porcentajes de identidad, puntuaciones y gaps en los alineamientos de secuencias, lo que demuestra la diversidad genética existente en estas especies y la probable evolución de los genes de resistencia a lo largo del tiempo. Estos hallazgos enfatizan la importancia del monitoreo continuo y exhaustivo de la resistencia a los antibióticos en las poblaciones microbianas. La identificación y comprensión de los genes de resistencia que se encuentran en varias especies nos proporciona un conocimiento útil para desarrollar medidas para regular y prevenir la propagación de la resistencia a los antibióticos. Finalmente, nuestro estudio enfatiza la importancia del uso de bioinformática y técnicas analíticas genómicas para estudiar la resistencia a los antibióticos en comunidades microbianas.

Además, demuestra que el uso AlphaFold como herramienta bioinformática utilizándola para predecir estructuras de proteínas que son importantes en la resistencia a los antibióticos.

Los hallazgos de este estudio muestran que las técnicas y enfoques bioinformáticos pueden usarse para investigar la resistencia a los antibióticos.

La resistencia a los antibióticos representa una amenaza significativa para la salud mundial. Las tecnologías y metodologías bioinformáticas pueden ayudar en la lucha contra la resistencia a los antibióticos.

Se necesita más investigación para determinar cómo los genes de cassette *aacA4* y *aadA1* contribuyen a la resistencia a los antibióticos.

Para limitar la transmisión de genes de resistencia a los antibióticos, se deben diseñar e implementar estrategias.

La presencia de numerosos genes de resistencia dentro de los integrones contribuye significativamente a la propagación de cepas multirresistentes entre los aislamientos de *Enterobacteriaceae*. Los integrones de clase I, en particular, están abundantemente dispersos en aislados de *Enterobacteriaceae* con resistencia a múltiples fármacos.

9. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Stern, A. L., Van der Verren, S. E., Kanchugal P, S., Näsval, J., Gutiérrez-de-Terán, H., & Selmer, M. (2018). Structural mechanism of AadA, a dual-specificity aminoglycoside adenylyltransferase from *Salmonella enterica*. *The Journal of biological chemistry*, 293(29), 11481–11490. <https://doi.org/10.1074/jbc.RA118.003989>

Cambray, G., Guerout, A. M., & Mazel, D. (2010). Integrons. *Annual Review of Genetics*, 44, 141–166. <https://doi.org/10.1146/annurev-genet-102209-163504>

Duin, D. Van. (2017). Carbapenem-Resistant *Enterobacteriaceae* : What We Know and What We Need To Know. 5594(April). <https://doi.org/10.1080/21505594.2017.1306621>

Fernandez Roblas, R., & Soriano, F. (1997). Aminoglucosidos. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*, 15(6), 342–343.

Gillings, M. R. (2014). Integrons: Past, Present, and Future. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 78(2), 257–277. <https://doi.org/10.1128/mubr.00056-13>

Laxminarayan, R., Duse, A., Wattal, C., Zaidi, A. K. M., Wertheim, H. F. L., Sumpradit, N., Vlieghe, E., Hara, G. L., Durand, C. G., & Aires, B. (2014). Antibiotic resistance — the need for global solutions. 13(December). [https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(13\)70318-9](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(13)70318-9)

Liu, H., Zhou, H., Li, Q., Peng, Q., Zhao, Q., Wang, J., & Liu, X. (2018). Molecular characteristics of extended-spectrum β -lactamase-producing *Escherichia coli* isolated from the rivers and lakes in Northwest China. *BMC Microbiology*, 18(1), 1–12.

<https://doi.org/10.1186/s12866-018-1270-0>

Magiorakos, A., Srinivasan, A., Carey, R. B., Carmeli, Y., Falagas, M. E., Giske, C. G., Harbarth, S., & Hindler, J. F. (2011). Bacteria : an International Expert Proposal for Interim Standard Definitions for Acquired Resistance.

Magnet, S., & Blanchard, J. S. (2005). Molecular insights into aminoglycoside action and resistance. *Chemical Reviews*, 105(2), 477–497. <https://doi.org/10.1021/cr0301088>

Ramirez, M. S., & Tolmasky, M. E. (2010). Aminoglycoside modifying enzymes. *Drug Resistance Updates*, 13(6), 151–171. <https://doi.org/10.1016/j.drug.2010.08.003>

Salud, O. M. de la. (2015). Plan de acción mundial sobre la resistencia a los antimicrobianos.

Sharma, R., Jain, M., Vyas, L., & Singhal, A. (2014). Hospital and community isolates of uropathogens and their antibiotic sensitivity pattern from a tertiary care hospital in North West India. *Annals of Medical and Health Sciences Research*, 4(1), 51.

<https://doi.org/10.4103/2141-9248.126611>

Singh, N. S., Singhal, N., & Viridi, J. S. (2018). Genetic environment of blaTEM-1, blaCTX-M-15, blaCMY-42 and characterization of integrons of *Escherichia coli* isolated from an Indian urban aquatic environment. *Frontiers in Microbiology*, 9(MAR), 1–8.

<https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.00382>

Stokes, H. W., & Hall, R. M. (1989). A novel family of potentially mobile DNA elements encoding site-specific gene-integration functions: integrons. *Molecular Microbiology*, 3(12), 1669–1683. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.1989.tb00153.x>

Biswas, S., & Das, A. K. (2019). Aminoglycoside N(6')-acetyltransferase type 1: Structure, function, and inhibition. *Frontiers in Microbiology*, 10, 1573. doi:10.3389/fmicb.2019.01573

Guo, Y., Li, H., Sun, Y., & Wang, J. (2017). Structural basis of aminoglycoside adenylyltransferase AadA1 from *Escherichia coli*. *Nature Structural & Molecular Biology*, 24(10), 923-930. doi:10.1038/nsmb.3435

L. M. Hicks, J. E. Minnich, and J. R. Johnson, “Comparison of DNA microarray, PCR, and protein-based assays for detection of integron-associated antibiotic resistance genes in *Escherichia coli* isolates from retail meats,” *Applied and Environmental Microbiology*, vol. 74, no. 13, pp. 4318–4324, 2008.

M. J. Pallen and N. J. Matzke, “From The Origin of Species to the origin of bacterial flagella,” *Nature Reviews Microbiology*, vol. 4, no. 10, pp. 784–790, 2006.

M. A. Quail et al., “A tale of three next generation sequencing platforms: comparison of Ion Torrent, Pacific Biosciences and Illumina MiSeq sequencers,” *BMC Genomics*, vol. 13, no. 1, p. 341, 2012.

Srinivasan, R., Ellappan, K., & Narasimha, H.B. (2015). Prevalence and characterization of NDM-1 and OXA-48 carbapenemase gene harboring Enterobacteriaceae in a tertiary care hospital, South India.

Gow, S. P., Waldner, C. L., Harel, J., & Boerlin, P. (2008). Associations between antimicrobial resistance genes in fecal generic *Escherichia coli* isolates from cow-calf herds in western Canada. *Applied and environmental microbiology*, 74(12), 3658–3666. <https://doi.org/10.1128/AEM.02505-07>

Verraes, C., Van Boxtael, S., Van Meervenne, E., Van Coillie, E., Butaye, P., Catry, B., de Schaetzen, M. A., Van Huffel, X., Imberechts, H., Dierick, K., Daube, G., Saegerman, C., De Block, J., Dewulf, J., & Herman, L. (2013). Antimicrobial resistance in the food chain: a review. *International journal of environmental research and public health*, 10(7), 2643–2669. <https://doi.org/10.3390/ijerph10072643>

Jumper, J., Evans, R., Pritzel, A., Green, T., Figurnov, M., Ronneberger, O., ... & Tunyasuvunakool, K. (2021). Highly accurate protein structure prediction with AlphaFold. *Nature*, 596(7873), 583–589. <https://doi.org/10.1038/s41586-021-03819-2>

Romanowska, J., Reuter, N., & Trylska, J. (2012). Comparing aminoglycoside binding sites in bacterial ribosomal RNA and aminoglycoside modifying enzymes. *Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics*, 81(1), 63–80. <https://doi.org/10.1002/prot.24163>

MIT News. (2022, September 6). Analyzing the potential of AlphaFold in drug discovery. <https://news.mit.edu/2022/alphafold-potential-protein-drug-0906> ↵

Arango-Argoty, G., Garner, E., Pruden, A., Heath, L. S., Vikesland, P., & Zhang, L. (2018). DeepARG: a deep learning approach for predicting antibiotic resistance genes from metagenomic data. *Microbiome*, 6, 1–15.

Kimura, N., Kitagawa, W., Mori, T., Nakashima, N., Tamura, T., & Kamagata, Y. (2006). Genetic and biochemical characterization of the dioxygenase involved in lateral dioxygenation of dibenzofuran from *Rhodococcus opacus* strain SAO101. *Applied microbiology and biotechnology*, 73(2), 474–484. <https://doi.org/10.1007/s00253-006-0481-8>

Bissonnette, L., & Roy, P. H. (1992). Characterization of In0 of *Pseudomonas aeruginosa* plasmid pVS1, an ancestor of integrons of multiresistance plasmids and transposons of gram-negative bacteria. *Journal of bacteriology*, 174(4), 1248–1257. <https://doi.org/10.1128/jb.174.4.1248-1257.1992>

Reyes, A., Bello, H., Domínguez, M., Mella, S., Zemelman, R., & González, G. (2003).
Prevalence and types of class 1 integrons in aminoglycoside-resistant Enterobacteriaceae from
several Chilean hospitals. *The Journal of antimicrobial chemotherapy*, 51(2), 317–321.
<https://doi.org/10.1093/jac/dkg083>

Firma del (la) estudiante y fecha:



Alexis David Pavón Catani

Quito, noviembre de 2022

Firma del director(a) de disertación y fecha



PhD. Doris Jimena Vela Peralta

Quito, 25 de noviembre de 2022

Firma de coordinación de carrera y fecha



Mgrt. Sonia Margarita Estrella Vázquez

Quito, 16 de diciembre de 2022

Firma del decano(a) y fecha



MSc. Diego Jovani Guevara Capelo S.J.

Quito, 3 de marzo del 2023

10. ANEXOS

En el siguiente enlace para la base de datos online se encuentran toda la información recopilada en esta investigación, esta está distribuida de la siguiente manera, base de datos > Carpeta por especie > Alineamiento (alineamiento de los genes y las secuencias contig), Blast (de las secuencias contig) , Genoma de referencia (Blast de los genomas de referencia, Genomas (blast de los genes en todo el genoma), Genes (secuencias de los genes y el integron)

https://drive.google.com/drive/folders/1cFMNmTjysxyO9C0M8ywfBBowuRWAy3DL?usp=share_link

