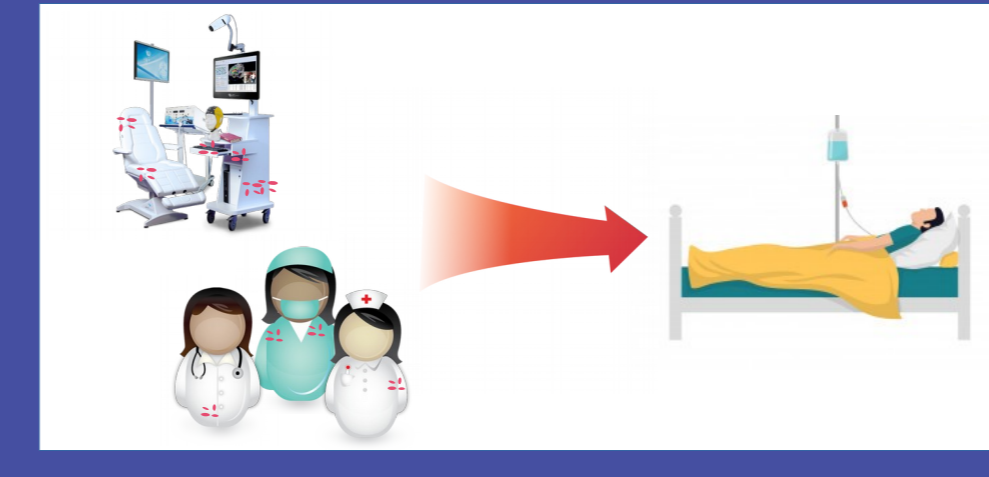
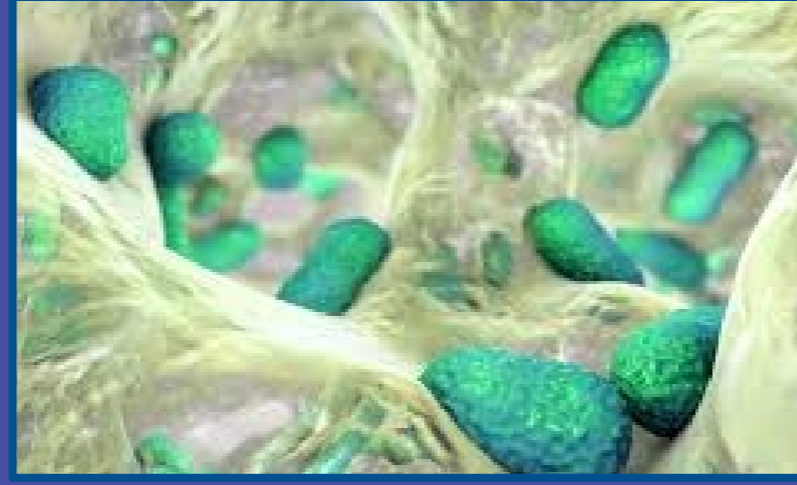


La bacteria *Acinetobacter baumannii* es un cocobacilo, gram negativo, estrictamente aerobio y patógeno responsable de entre el 2 y 10% de infecciones intrahospitalarias, encontrándose entre las bacterias **resistentes a antibióticos** más relevantes en todos los hospitales del mundo.

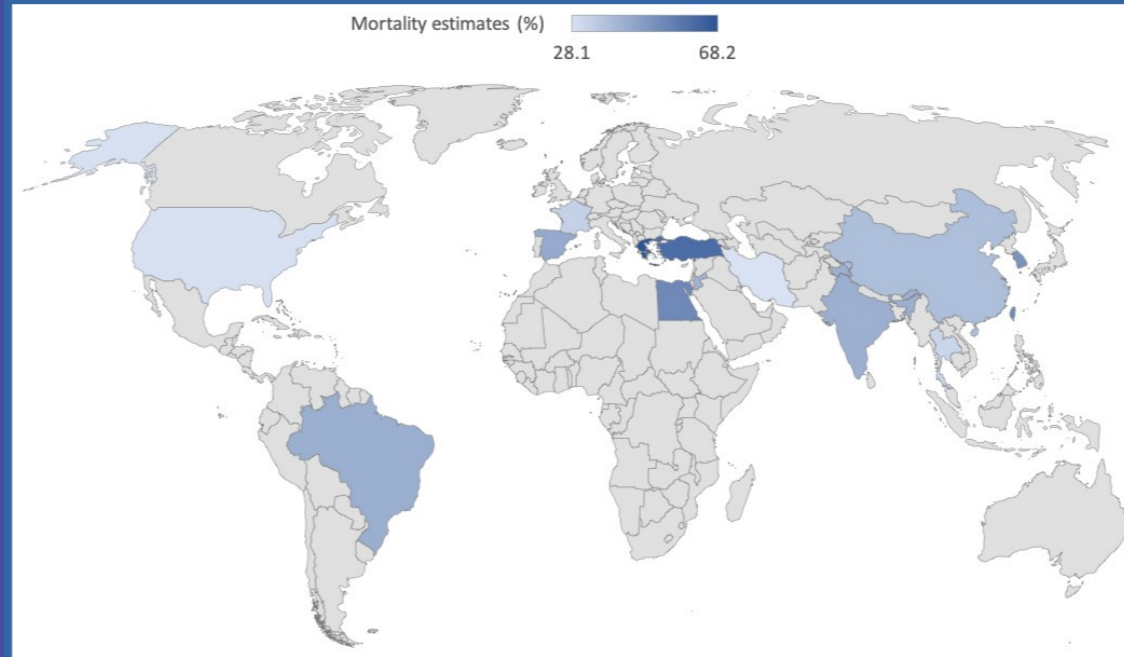


Esta bacteria tiene la capacidad de **sobrevivir durante largos períodos de tiempo** en el ambiente hospitalario e **introducirse fácilmente** al organismo del enfermo a través de lesiones como heridas abiertas o catéteres intravasculares

La infección por *A. baumannii* puede causar diversas **afecciones nosocomiales**

- Tracto respiratorio
- Tracto Urinario
- Meningitis secundaria
- Bacteriemia
- Edad avanzada
- Enfermedad cardiovascular
- Enfermedades respiratorias
- Inmunosupresión

Entre los **factores de riesgo** asociados a la infección por *A. baumannii* dentro del ámbito hospitalario encontramos:



Un estudio sobre la **tasa de mortalidad** de *A. baumannii* en infecciones respiratorias en función del período de tiempo y la localización geográfica demostró que esta va desde el **28% al 68%**, con una media global de **43,8%**, en función de los datos disponibles¹

Actualmente existen más de 4000 cepas de *A. baumannii* secuenciadas, las cuales comparten un core genoma de unos 2000 genes y poseen un pangenoma de unos 20000². La cepa usada como referencia en la mayoría de estudios es *A. baumannii* ATCC 17978.

Como consecuencia de esta situación surge la necesidad de **detectar nuevas dianas** en *Acinetobacter baumannii*, como factores de virulencia, que puedan servir de base para el desarrollo de nuevas terapias.

Objetivo

Detección de **genes diferencialmente expresados**, posibles candidatos a factores de virulencia.

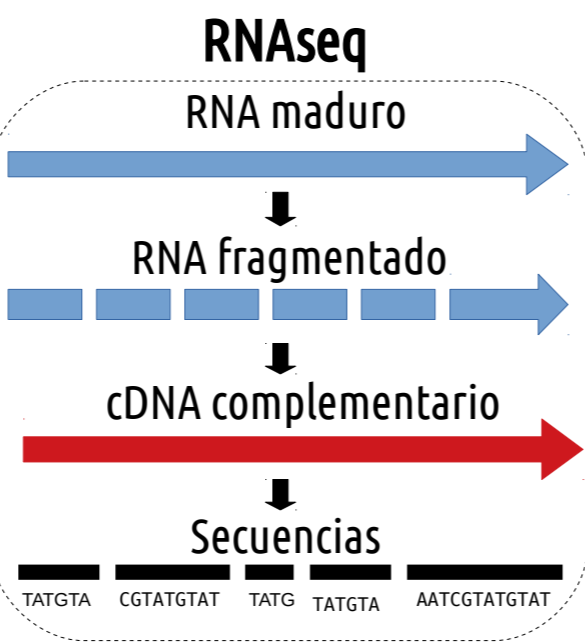
Conocer el comportamiento de la bacteria en **condiciones de contagio** puede aportarnos información sobre los mecanismos que emplea para llevar a cabo la infección. Entre estas condiciones encontramos la **hipoxia**, escasez de oxígeno en sangre o tejido, causada durante la inflamación debido a un mayor consumo de este por parte de las células del sistema inmunitario y los patógenos, unido a una reducción de la perfusión en respuesta a una herida o daño³.

- ¿Qué genes se están expresando?
- ¿Cuáles más?
- ¿Cuáles menos?

Metodología

1 Obtención de los datos

Se usaron datos procedentes de RNA-seq a partir de la cepa *A. baumannii* ATCC 17978 crecida en **dos condiciones diferentes: normoxia (21% O₂) y microaerobiosis (0,1-0,3% O₂)**, siendo la primera la situación control, mientras que la segunda es una de las condiciones a las que se enfrenta la bacteria cuando la infección ocurre, especialmente a través de una herida, durante la fase inflamatoria. Se tomaron tres réplicas de cada situación: control y tratamiento.



2 Análisis Bioinformático

Acinetobacter baumannii ATCC 17978 fue secuenciada por primera vez en 2007 obteniéndose una primera versión del genoma y, posteriormente, se resecuenció en 2015, obteniéndose una segunda versión.

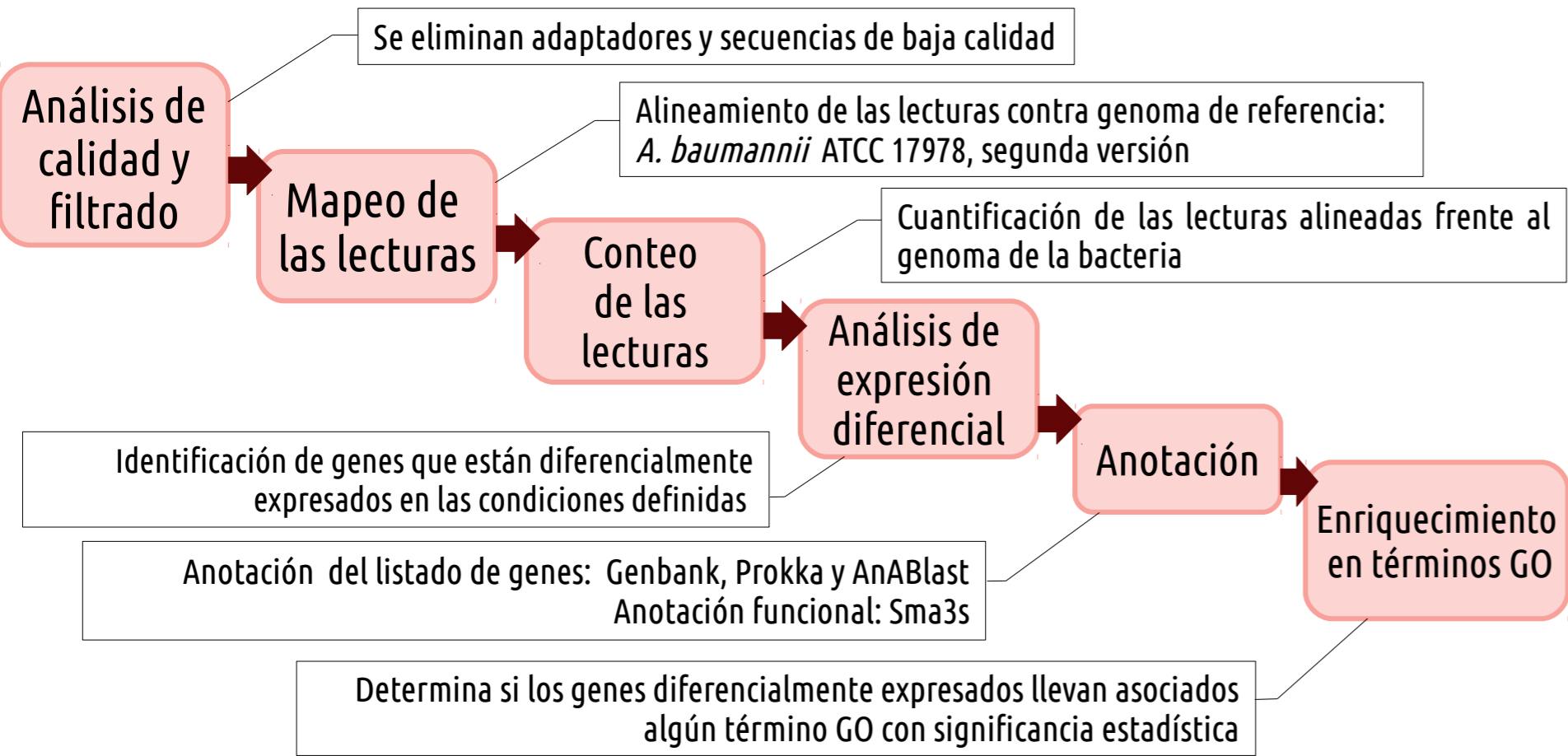
El primer objetivo del trabajo es **mejorar la anotación** del genoma de *A. baumannii* ATCC 17978 disponible para la segunda versión secuenciada, utilizando candidatos de tres fuentes: **GenBank, AnAblast y Prokka**, y finalmente la herramienta bioinformática **Sma3s**.



Imagen de un posible CDS predicho por AnAblast (c). Como se puede observar este no es predicho ni por Prokka (b) ni se encuentra en la anotación oficial de GenBank (a). El empleo de las tres herramientas permite tener en cuenta genes que se podrían haber omitido empleando solo una de ellas.

GenBank: fuente de la anotación oficial publicada para *A. baumannii* ATCC 17978 versión 2.
Prokka: anotador de genomas procariotas, se basa en la búsqueda de codones de inicio y STOP a la hora de predecir un CDS.
AnAblast: permite la anotación de genomas basándose en similitud de secuencias, teniendo en cuenta secuencias de bajo score.
 (La anotación funcional fue realizada empleando el programa Sma3s)

A continuación, los datos son sometidos a un **workflow** bioinformático empleando dicha anotación para **identificar los genes expresados diferencialmente en hipoxia, así como las rutas y procesos** en los que están implicados.

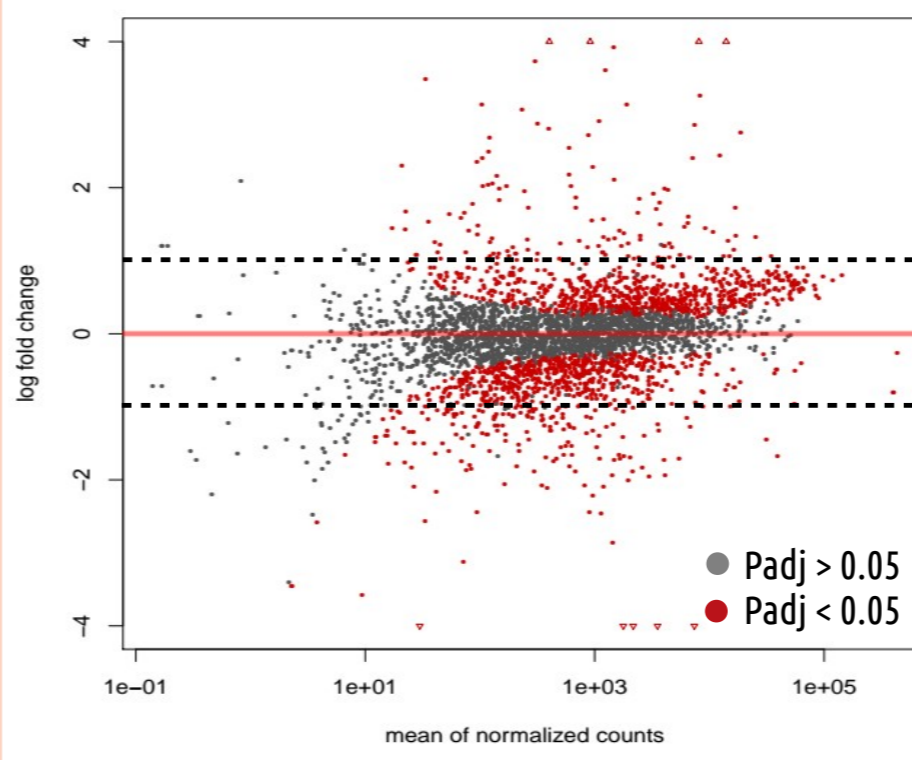


Bibliografía
 1. Mohd Sazly Lim S, Zainal Abidin A, Liew SM, Roberts JA, Sime FB. The global prevalence of multidrug-resistance among *Acinetobacter baumannii* causing hospital-acquired and ventilator-associated pneumonia and its associated mortality: A systematic review and meta-analysis. *Journal of Infection*. W.B. Saunders Ltd; 2019
 2. Mangas, E. L., Rubio, A., Álvarez-Marín, R., Labrador-Herrera, G., Pachón, J., Pachón-Ibáñez, M. E., ... & Pérez-Pulido, A. J. (2019). Pangenome of *Acinetobacter baumannii* uncovers two groups of genomes, one of them with genes involved in CRISPR/Cas defence systems associated with the absence of plasmids and exclusive genes for biofilm formation. *Microbial Genomics*, 5(11).
 3. Gil-Marqués, M. L., Pachón-Ibáñez, M. E., Pachón, J., & Smani, Y. (2018). Effect of hypoxia on the pathogenesis of *Acinetobacter baumannii* and *Pseudomonas aeruginosa* in vitro and in murine experimental models of infection. *Infection and immunity*, 86(10), e00543-18

Resultados

1 Expresión diferencial

Los genes que presentaron expresión diferencial fueron filtrados acorde al valor de fold change ($R2 \geq 1$) y a al p-valor ($p_{adj} < 0.05$).



MA-plot que representa la distribución de los genes diferencialmente expresados. El eje x representa la media normalizada de las "counts" es decir, del número de veces que se ha expresado determinado gen, y el eje y el valor de fold change. La línea discontinua indica el valor de fold change a partir del cual consideramos que los genes presentan expresión diferencial

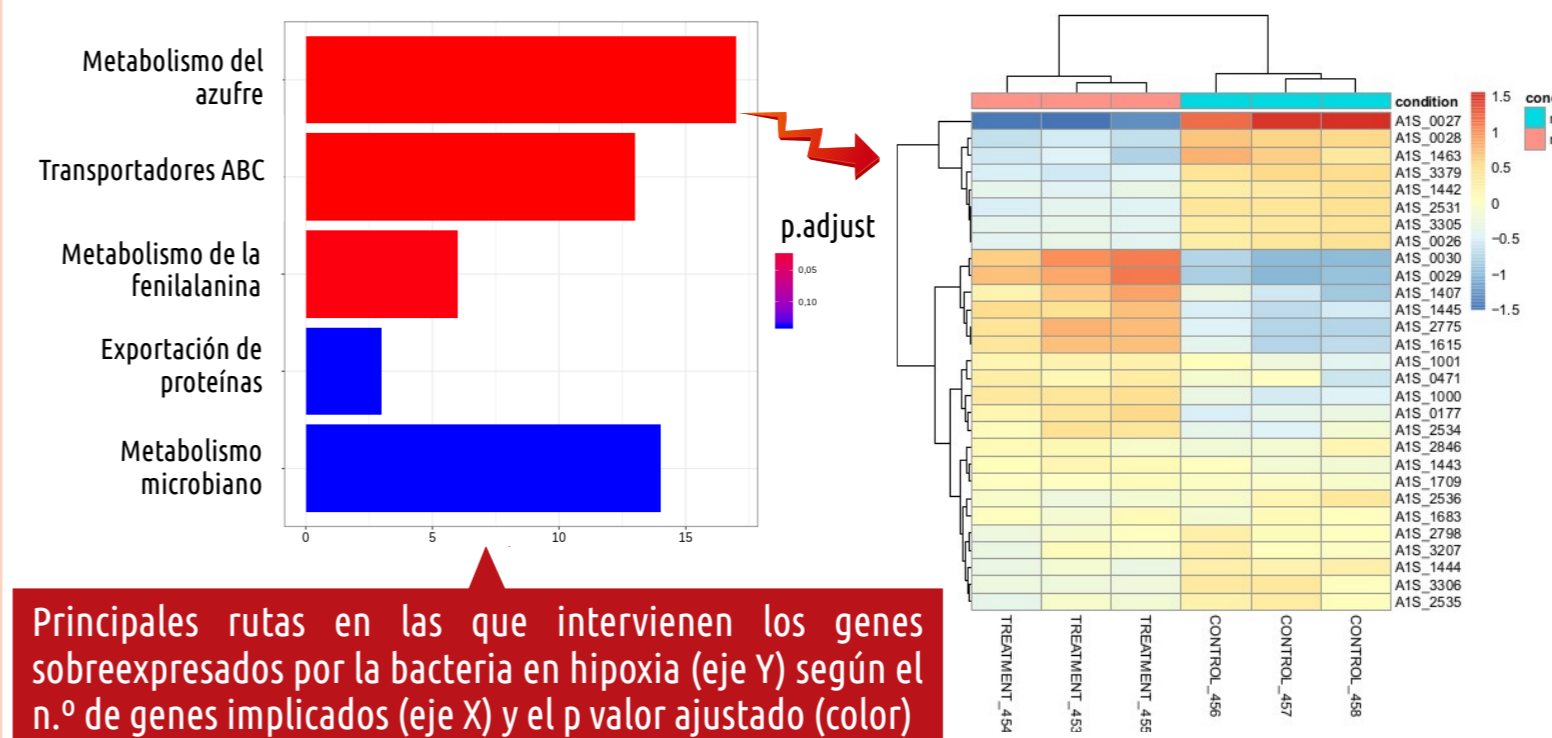
	Sobreexpresados	Subexpresados
Genbank	124	151
Prokka	3	7
Anablast	1	17
Total	128	175

Se encontraron un total de 303 genes expresados diferencialmente. De ellos, 128 se encontraron en sobreexpresión y 175 en subexpresión. Como se observa en la tabla entre estos tenemos genes provenientes de las tres fuentes empleadas para la anotación.

2 Enriquecimiento

Los genes considerados como diferencialmente expresados fueron sometidos a un análisis de enriquecimiento, el cual nos permite relacionar a estos con las rutas biológicas en las que están implicados. Para ello empleamos clusterProfiler entre otros paquetes de R, y la base de datos KEGG como fuente de anotación.

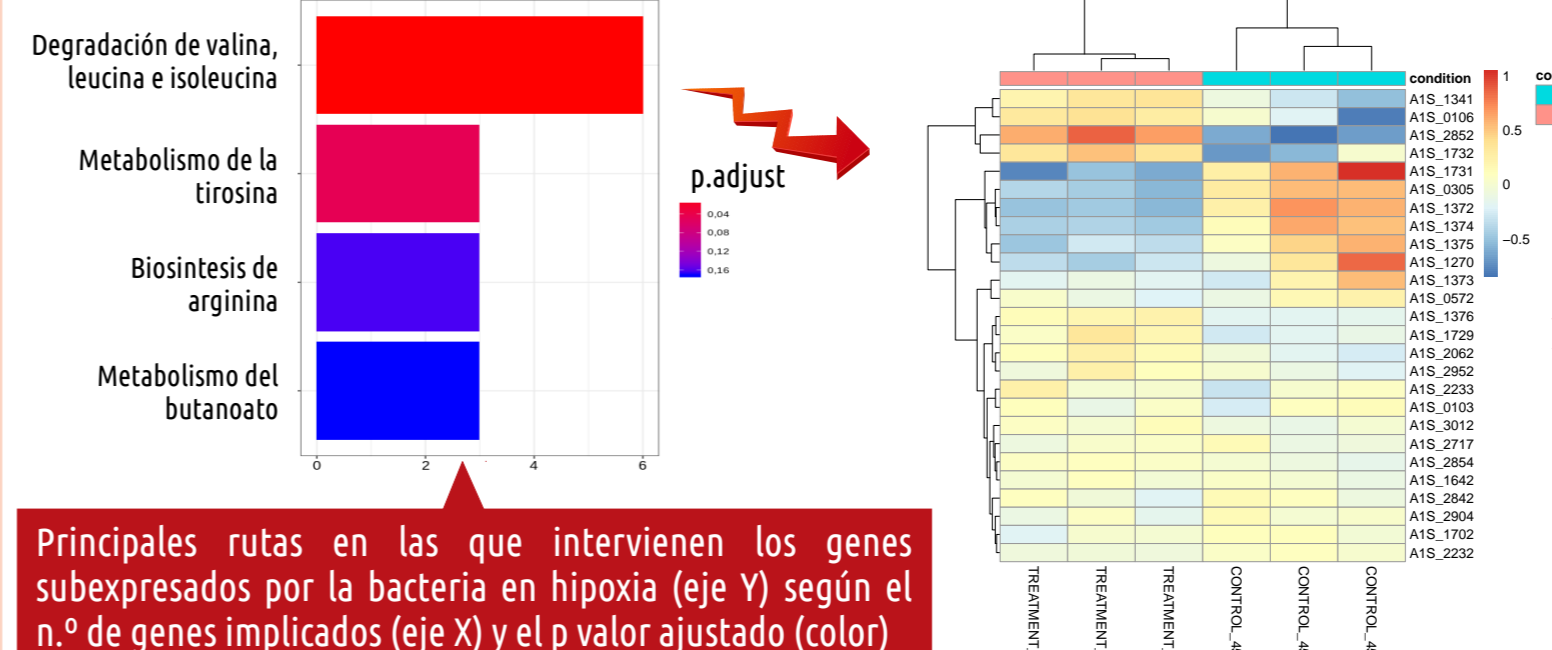
Enriquecimiento en términos GO de los genes sobreexpresados



Heatmap que muestra la expresión diferencial de los genes implicados en el metabolismo del azufre en *A. baumannii* ATCC 17978. Entre ellos destacamos A1S_0029 y A1S_0030, implicados en el transporte de azufre. También encontramos ambos genes dentro de la familia de transportadores ABC

Principales rutas en las que intervienen los genes sobreexpresados por la bacteria en hipoxia (eje Y) según el n.º de genes implicados (eje X) y el p valor ajustado (color)

Enriquecimiento en términos GO de los genes subexpresados



Heatmap que muestra la expresión diferencial de los genes implicados en la ruta de degradación de valina, leucina e isoleucina. Entre ellos encontramos el A1S_2852, correspondiente a una Acetil-coenzima A acetiltransferasa, participante en otras rutas como en biosíntesis de metabolitos secundarios.

Principales rutas en las que intervienen los genes subexpresados por la bacteria en hipoxia (eje Y) según el n.º de genes implicados (eje X) y el p valor ajustado (color)

Conclusiones

- Se confirma que la bacteria modifica su expresión génica en condiciones de baja disponibilidad de oxígeno, situación a la que se enfrenta durante la infección. Encontramos un total de 128 genes sobreexpresados y 175 en subexpresión.
- La bacteria sobreexpresa genes relacionados con rutas metabólicas del azufre, lo que sugiere que bajo hipoxia esta modifica su metabolismo para emplear este elemento como fuente de energía
- En hipoxia, la bacteria subexpresa genes relacionados con rutas que puedan suponer un gasto extra de energía, como la degradación de aminoácidos o la síntesis de metabolitos secundarios.