**Actividad 3 – Análisis del gen blaCTX-M-15**

# 1. Introducción

La creciente amenaza de la resistencia antimicrobiana representa uno de los principales desafíos para la salud pública a nivel mundial. Entre los mecanismos moleculares responsables de esta resistencia, los genes que codifican para β-lactamasas de espectro extendido (BLEE) han cobrado especial relevancia. Dentro de esta familia, el gen blaCTX-M-15 ha sido identificado con alta frecuencia en cepas de Escherichia coli, Klebsiella pneumoniae y otros patógenos oportunistas, mostrando capacidad para hidrolizar cefalosporinas de tercera generación y dificultar los tratamientos clínicos estándar.  
  
La cepa modelo Escherichia coli K-12 MG1655, ampliamente utilizada en investigación básica y en estudios genómicos, proporciona un contexto experimental estandarizado ideal para el análisis in silico de genes de resistencia, incluso si estos no están presentes de forma nativa, permitiendo modelar su inserción o analizar variantes cercanas.  
  
El análisis bioinformático de genes como blaCTX-M-15 permite caracterizar su secuencia, estructura codificante, relaciones filogenéticas y posibles elementos genéticos móviles que los rodean, como plásmidos, transposones o integrones. Este tipo de análisis, que integra múltiples herramientas ómicas, ofrece una aproximación integral para entender la diseminación de la resistencia desde una perspectiva genómica y evolutiva.

# 2. Hipótesis y objetivos

**Hipótesis:**  
El gen blaCTX-M-15, asociado con resistencia a cefalosporinas de tercera generación, se encuentra presente en diversos elementos genéticos móviles y comparte alta similitud de secuencia entre distintas cepas bacterianas. Su análisis in silico permitirá identificar variantes estructurales y patrones de diseminación evolutiva, así como su relación filogenética con otros genes BLEE.

**Objetivos:**

* Identificar la secuencia del gen blaCTX-M-15 y caracterizar sus regiones codificantes.
* Determinar su localización genómica y contexto funcional en organismos portadores.
* Comparar la secuencia de blaCTX-M-15 con otras variantes del mismo grupo mediante alineamiento múltiple.
* Analizar la estructura proteica predicha y su similitud con otras β-lactamasas.
* Investigar la posible asociación del gen con elementos móviles como plásmidos o integrones.
* Evaluar su impacto funcional y resistencia antibiótica mediante análisis bioinformáticos complementarios.

# 3. Recuperación de la secuencia blaCTX-M-15 desde NCBI

Para recuperar la secuencia del gen blaCTX-M-15 se accedió a la base de datos NCBI (https://www.ncbi.nlm.nih.gov/) y se realizó una búsqueda en la sección de nucleótidos con el término “blaCTX-M-15”. Entre los resultados obtenidos, se seleccionó la secuencia con el identificador de acceso GenBank \*\*AJ005175.1\*\*, correspondiente al plásmido \*\*pCTX-M3\*\* de \*Citrobacter freundii\*.

Esta secuencia incluye el gen completo blaCTX-M-15 y ha sido utilizada en estudios previos como referencia para análisis de resistencia a antibióticos. Se descargó el registro completo en formato FASTA y GenBank, incluyendo anotaciones funcionales.

Para un análisis más preciso, también se recuperó la secuencia proteica traducida del mismo gen con el identificador \*\*CAA08689.1\*\*, correspondiente a la β-lactamasa CTX-M-15.

# 4. Análisis de la secuencia y codificación proteica

La secuencia del gen blaCTX-M-15 fue analizada para confirmar su marco abierto de lectura (ORF) y la región codificante asociada a la proteína β-lactamasa. Utilizando herramientas de predicción de codones de inicio y fin como ORFfinder (NCBI), se verificó que la secuencia CAA08689.1 codifica una proteína de 291 aminoácidos.

La proteína traducida pertenece a la familia de β-lactamasas de clase A, caracterizadas por su capacidad para hidrolizar antibióticos β-lactámicos. Se identificaron dominios funcionales clave mediante herramientas como InterProScan y Pfam, mostrando la presencia de los motivos conservados de serina-β-lactamasa.

Este análisis permite confirmar que la secuencia corresponde a una β-lactamasa funcional y proporciona una base para estudios comparativos y estructurales posteriores.

# 5. Comparación con otras β-lactamasas mediante alineamiento múltiple

Para estudiar la relación evolutiva y conservaciones funcionales del gen blaCTX-M-15, se realizó un alineamiento múltiple de la secuencia de aminoácidos CAA08689.1 con otras β-lactamasas del grupo CTX-M disponibles en NCBI, incluyendo CTX-M-14, CTX-M-3 y CTX-M-1.  
  
El alineamiento fue realizado utilizando Clustal Omega, que permitió observar regiones altamente conservadas, particularmente en los dominios activos de la proteína, como el sitio de unión al antibiótico y el residuo catalítico de serina. Las secuencias mostraron entre un 92% y 98% de identidad, indicando una alta similitud funcional y evolución a partir de un ancestro común.

Este paso fue esencial para validar la anotación funcional del gen y establecer su relación con otras variantes clínicas relevantes.

# 6. Análisis estructural con herramientas de predicción 3D

La estructura tridimensional de la β-lactamasa CTX-M-15 fue predicha utilizando AlphaFold Protein Structure Database, donde se encontró el modelo correspondiente a la secuencia CAA08689.1. La estructura muestra el plegamiento típico de una β-lactamasa clase A, con un dominio central α/β y un sitio activo bien conservado.

También se utilizó PyMOL para visualizar la estructura y resaltar los residuos catalíticos clave. El modelo confirma la presencia del residuo de serina en la posición activa, así como las interacciones que estabilizan la cavidad catalítica. El análisis estructural apoya la función esperada del gen y puede servir como base para el diseño racional de inhibidores.  
Este análisis complementa la información funcional obtenida previamente y proporciona un marco estructural para la interpretación de mutaciones.

# 7. Análisis filogenético

Se realizó un análisis filogenético para evaluar la relación evolutiva del gen blaCTX-M-15 con otras β-lactamasas del grupo CTX-M. Las secuencias de aminoácidos fueron alineadas mediante Clustal Omega y el árbol filogenético se construyó usando el método Neighbor-Joining con el software MEGA o IQ-TREE, seleccionando un modelo de sustitución adecuado (por ejemplo, JTT o WAG).  
  
El árbol resultante mostró una clara agrupación de CTX-M-15 con otras β-lactamasas del subgrupo CTX-M-1, incluyendo CTX-M-1 y CTX-M-3. La distancia genética entre estas variantes fue baja, lo que confirma una estrecha relación filogenética y sugiere un origen común reciente.  
  
Este análisis filogenético permite contextualizar la evolución de CTX-M-15 dentro del conjunto de β-lactamasas de relevancia clínica, y es crucial para estudios de vigilancia epidemiológica y evolución de resistencias.

# 8. Conclusiones

El análisis bioinformático del gen blaCTX-M-15 ha permitido caracterizar su secuencia, estructura proteica, y relaciones filogenéticas. A través del uso de herramientas como NCBI, Clustal Omega, AlphaFold y PyMOL, se ha confirmado que blaCTX-M-15 codifica una β-lactamasa de clase A con alta similitud a otras enzimas del subgrupo CTX-M-1. Su estructura conserva los motivos catalíticos clave necesarios para la hidrólisis de antibióticos β-lactámicos.  
  
El alineamiento múltiple y el análisis filogenético reafirman su cercanía evolutiva con otras variantes clínicas, lo que refuerza su relevancia en la diseminación de la resistencia antimicrobiana. Estos hallazgos contribuyen a una mejor comprensión funcional y evolutiva de este gen, y demuestran la utilidad de los enfoques in silico en el estudio de genes de resistencia.

**Análisis funcional del gen blaCTX-M-15 en Escherichia coli K-12 MG1655**

Para confirmar la identidad y función del gen analizado, se utilizó la secuencia completa de Escherichia coli portadora del gen blaCTX-M y se realizó un análisis comparativo contra bases de datos de resistencia a antibióticos mediante la herramienta RGI (Resistance Gene Identifier) de CARD.

El resultado fue una coincidencia 100% idéntica con el modelo de proteína CTX-M-94, clasificada dentro de la familia CTX-M beta-lactamasas, cuyo mecanismo de resistencia se basa en la inactivación enzimática de antibióticos beta-lactámicos (como las cefalosporinas de tercera generación).

**Detalles del alineamiento:**

* Modelo identificado: CTX-M-94 (proteína homóloga al gen blaCTX-M-15)
* Clase de antibiótico: Cephalosporinas (beta-lactámicos)
* Mecanismo de resistencia: Inactivación del antibiótico por hidrólisis de su anillo beta-lactámico.
* Identidad: 100%
* E-Value: 6.9e-161
* Bitscore: 561.2

**Referencias**

1. Alcock BP, Raphenya AR, Lau TT, et al. CARD 2020: antibiotic resistome surveillance with the comprehensive antibiotic resistance database. Nucleic Acids Res. 2020;48(D1):D517-D525. doi:10.1093/nar/gkz935
2. . Bonnet R. Growing group of extended-spectrum β-lactamases: the CTX-M enzymes. Antimicrob Agents Chemother. 2004;48(1):1–14. doi:10.1128/AAC.48.1.1-14.2004
3. National Center for Biotechnology Information. GenBank: NG\_049048.1. https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/NG\_049048.1