Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, A.C.

ANÁLISIS DE LOS GENES QUE CODIFICAN PARA PROTEÍNAS HIPOTÉTICAS ADYACENTES A LA TOXINA PIRAB^{vp} DE *Vibrio parahaemolyticus* CAUSANTE DE LA ENFERMEDAD DE LA NECROSIS AGUDA DEL HEPATOPÁNCREAS

Por:

Jesús Tonatiuh Osuna López

TESIS APROBADA POR LA

COORDINACIÓN DE ACUICULTURA Y MANEJO AMBIENTAL

Como requisito parcial para obtener el grado de:

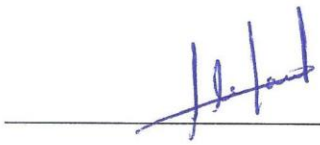
MAESTRO EN CIENCIAS

Mazatlán, Sinaloa. Enero 2020

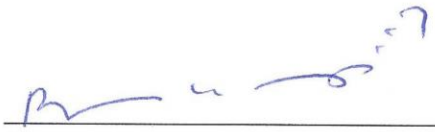
APROBACIÓN

Los miembros del comité designado para la revisión de tesis de Jesús Tonatiuh Osuna López la han encontrado satisfactoria y recomiendan que sea aceptada como requisito parcial para obtener el grado de Maestría en Ciencias.

Dra. Sonia Araceli Soto Rodríguez
Directora de tesis



Dra. Silvia Alejandra García Gasca
Integrante de comité de tesis



Dr. Bruno Gómez Gil Rodríguez Sala
Integrante de comité de tesis

Dr. Raúl Antonio Llera Herrera
Integrante de comité de tesis

DECLARACIÓN INSTITUCIONAL

La información generada en la tesis "Análisis de los Genes que Codifican para Proteínas Hipotéticas Adyacentes a la Toxina PIRABvp de *Vibrio parahaemolyticus* Causante de la Enfermedad de la Necrosis Aguda del Hepatopáncreas" es propiedad intelectual del Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, A.C. (CIAD). Se permiten y agradecen las citas breves del material contenido en esta tesis sin permiso especial del autor Jesús Tonatiuh Osuna López, siempre y cuando se dé crédito correspondiente. Para la reproducción parcial o total de la tesis con fines académicos, se deberá contar con la autorización escrita de quien ocupe la titularidad de la Dirección General del CIAD.

La publicación en comunicaciones científicas o de divulgación popular de los datos contenidos en esta tesis, deberá dar los créditos al CIAD, previa autorización escrita del manuscrito en cuestión del director(a) de tesis.

CENTRO DE INVESTIGACIÓN EN ALIMENTACIÓN Y DESARROLLO, A.C.
Coordinación de Programas Académicos

CIAD

Dr. Pablo Wong González
Director General

AGRADECIMIENTOS

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) por el apoyo otorgado con la beca para la realización de posgrado.

Al Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo (CIAD), por otórgame la oportunidad de realizar mis estudios de maestría en su programa de posgrado.

A la Dra. Sonia Soto Rodríguez por su dirección, confianza y conocimiento brindado durante la maestría.

A los miembros del comité de tesis; Dra. Silvia Alejandra García Gasca, Dr. Bruno Gómez Gil Rodríguez Sala y Dr. Raúl Antonio Llera Herrera, por el apoyo, su guía, sus aportaciones y apreciables obervaciones.

A la M. en C. Karla Guadalupe Aguilar Rendon por el apoyo y enseñanzas brindadas en la experimentación de este trabajo.

A la M. en C. Rubí Hernandez Cornejo por su apoyo en el adiestramiento en técnicas de biología molecular.

A la Q.F.B. María del Carmen Bolan Mejía por sus enzeñansas en técnicas de bacteriología.

A la I. P. Francis Isela Marrujo López por sus aportaciones en el trabajo experimental.

A la M. en C. Karen Enciso Ibarra por su ayuda en el laboratorio de genómica microbiana.

Al M.V.Z. Rodolfo Lozano Olvera por su apoyo y aportaciones en el trabajo experimental.

Al Dr. Norberto Vivanco Pérez y la Dra. María de Jesús Duran Avelar por brindarme su apoyo y permirtir realizar experimentación en el laboratorio que coordinan de la Universidad Autonoma de Nayarit.

A mis compañeros de laboratorio Karlita, Marcelo, Anita y Luis.

A mis compañeros de generación y amigos; Lizbeth, Dulce, Karem, Oscar, Victor, Fernando y Pablo por los momentos que convivimos.

Y a todos los que me apoyaron en alguna ocasión durante el posgrado, gracias.

DEDICATORIA

A mi familia por ser mi motor para seguir adelante, por su apoyo en todo momento y por el amor que de cualquier manera recibo de ustedes, gracias.

CONTENIDO

APROBACIÓN..... 2

DECLARACIÓN INSTITUCIONAL..... 3

AGRADECIMIENTOS..... 4

DEDICATORIA..... 5

CONTENIDO……... 6

LISTA DE FIGURAS……..... 8

LISTA DE CUADROS……... 9

RESUMEN……..... 10

ABSTRACT…….. 11

1. INTRODUCCIÓN……..... 12

2. ANTECEDENTES……..... 14

2.1 Toxinas PirAvp y PirBvp Causantes de AHPND en Camarón……..... 14

2.2 Genes que Codifican para Proteínas Hipotéticas……..... 17

2.3 Toxinas Bacterianas en Plásmidos de Virulencia……..... 18

3. HIPOTESIS…….. 20

4. OBJETIVOS……..... 21

4.1 Objetivo General…….. 21

4.2 Objetivos Específicos…….. 21

5. METODOLOGÍA……... 22

5.1 Caracterización *in silico* de la Posible Función de las Proteínas Hipotéticas (*hp1, hp2 y hp3*) y *cwsp*……..... 22

5.1.1 Búsqueda de Homología con Secuencias Caracterizadas..... 22

5.1.2 Búsqueda de Localización Subcelular, Predicción de Proteínas Factores de Virulencia y Péptidos de Señal..... 23

5.1.3 Características Fisicoquímicas de las Proteínas..... 23

5.2 Diseño de Oligonucleótidos……..... 23

5.2.1 Elaboración de Curva Estándar……..... 25

5.3 Cepa Bacteriana……... 25

5.4 Cultivo *in vitro* de *Vibrio parahaemolyticus* M0904…….. 26

5.5 Preparación del Inóculo……..... 26

5.6 Diseño Experimental de Cultivo *in vitro*..... 27

5.6.1 Cinética Bacteriana…….. 27

5.6.2 Análisis de la Expresión de los Genes……..... 28

5.6.2.1 Extracción de ARN y síntesis de ADN complementario..... 28

5.6.2.2 Expresión génica por reacción en cadena de la polimerasa con transcripción inversa (RT-qPCR)…… 28

5.6.3 Cuantificación de las Toxinas PirAvp y PirBvp……..... 29
5.6.3.1 Precipitación y purificación de las proteínas……... 29
5.6.3.2 Cuantificación de la proteína total……... 30
5.6.3.3 Ensayo de inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA) indirecto..... 30
5.7 Desafío de Camarones Juveniles (*Penaeus vannamei*) con *Vibrio parahaemolyticus* M0904……... 31
5.7.1 Aclimatación……... 32
5.7.2 Infección Experimental……..... 32
5.7.3 Colecta de Muestras..... 33
5.8 Cuantificación de las Toxinas $PirA^{vp}$ y $PirB^{vp}$…… 33
5.9 Análisis Estadístico……..... 33

6. RESULTADOS…… 35
6.1 Análisis de la Posible Función de los Genes *hp1, hp2, hp3* y *cwsp*…… 35
6.2 Cultivo *in vitro* de *Vibrio parahaemolyticus* M0904…….. 38
6.2.1 Cinética Bacteriana……..... 38
6.2.2 Análisis de la Expresión Génica *in vitro*……. 39
6.2.3 Cuantificación de las Toxinas $PirA^{vp}$ y $PirB^{vp}$……..... 43
6.3 Ensayo de desafío de *Vibrio parahaemolyticus* M0904 con *Penaeus vannamei*..... 45
6.3.1 Cinética Bacteriana…….. 45
6.3.2 Cuantificación de las Toxinas $PirA^{vp}$ y $PirB^{vp}$……..... 46
6.3.3 Sobrevivencia de Camarones *Penaeus vannamei* en Desafío con *Vibrio parahaemolyticus* M0904…….. 47

7. DISCUSIÓN……..…….…….... 49

8. CONCLUSIONES…..…….. 54

9. RECOMENDACIONES...……..... 55

10. BIBLIOGRAFÍA……..…….. 56

11. ANEXOS……. 63
11.1. Material de Apoyo para Analisis Bioinformáticos y Experimentación..... 63
11.2. Protocolos de Experimentación……..... 71

LISTA DE FIGURAS

Figura		Pagina
1	Plásmido de virulencia pVA1. Secuencia del primer plásmido de virulencia reportado relacionado a la Enfermedad de la Necrosis Aguda del Hepatopáncreas…….	15
2	Esquema de Transposón PirAB-Tn903. Secuencia de los genes hipotéticos *hp1*, *hp2*, *hp3* y *cwsp* adyacente a los genes *pirA* y *pirB* encontrados dentro del transposón compuesto PirAB-Tn903……..	16
3	Curva de crecimiento de *Vibrio parahaemolyticus* M0904……...	39
4	Expresión relativa de los genes $pirA^{vp}$ y $pirB^{vp}$ de Vp M0904 con relación a genes plasmídicos a través del tiempo post inoculación……	40
5	Expresión relativa de los genes *hp1*, *hp2*, *hp3*, *pirA*, *pirB* y *cwsp* del transposón compuesto PirAB-Tn903 de Vp M0904 a través del tiempo post inoculación…….....	41
6	Concentración de toxinas $PirA^{vp}$ y $PirB^{vp}$ durante la cinética de *Vibrio parahaemolyticus* M0904 *in vitro*…….	43
7	Concentración de proteína total con relación a curva patrón de concentración de BSA durante la cinética de *Vibrio parahaemolyticus* M0904 *in vitro*……...	44
8	Cinética de densidad bacteriana de colonias verdes y amarillas durante ensayo de desafío de *Vibrio parahaemolyticus* M0904 con *Penaeus vannamei*……...	45
9	Concentración de toxinas $PirA^{vp}$ y $PirB^{vp}$ durante ensayo de desafío *Vibrio parahaemolyticus* M0904 con *Penaeus vannamei*…….....	47
10	Curva de sobrevivencia Kaplan-Meier de camarones *Penaeus vannamei* desafiados con *Vibrio parahaemolyticus* M0904……..	48

LISTA DE CUADROS

Cuadro		Pagina
1	Cepas del genero *Vibrio* que comparten el transposón PirAB-Tn903…….....	17
2	Oligonucleótidos diseñados para cuantificación de la expresión de los genes *hp1, hp2, hp3, cwsp, pirA^{vp}* y *pirB^{vp}* qPCR……	24
3	Protocolo de amplificación de los genes *hp1, hp2, hp3, cwsp, pirA^{vp}, pirB^{vp}*, SSU y *hpR* por reacción de PCR punto final…….	25
4	Matriz de trabajo para cuantificación de expresión los genes *hp1, hp2, hp3, cwsp, pirA^{vp}* y *pirB^{vp}* en cinetica de *Vibrio parahaemolyticus* M0904…….....	29
5	Programa de amplificación de ADN complementario por qPCR para expresión génica……..	29
6	Resultados de similitudes de las secuencias de aminoácidos de los genes *hp1, hp2, hp3* y *cwsp* con secuencias de proteínas anotadas…….	35
7	Lista de las predicciones de localización sub celular de las proteínas traducidas de los genes *hp1, hp2, hp*3 y *cwsp* de *V. parahaemolyticus* M0904…….....	36
8	Características fisicoquímicas de las proteínas hipotéticas Hp1, Hp2, Hp3 y Cwsp……...	37
9	Coeficientes de correlación de Spearman de la expresión relativa de los genes *hp1, hp2, hp3, pirA, pirB* y *cwsp*…….....	42

RESUMEN

Recientemente el cultivo de camarón ha sido afectado por la enfermedad emergente Enfermedad de la Necrosis Aguda del Hepatopancreas (AHPND, por sus siglas en inglés). Se han identificado cepas del género *Vibrio* como el agente causal de la enfermedad (AHPND +). Su principal factor de virulencia es la producción de la toxina PirAB, cuyos genes (*pirA* y *pirB)* se encuentran en el transposón compuesto PirAB-tn903 del plásmido pVA1, flanqueados por los genes hipotéticos *hp1*, *cwsp* y *hp2* en sentido ascendente de *pirA* y *hp3* en sentido descendente de *pirB*. En el actual estudio se utilizó la cepa *Vibrio parahaemolyticus* M0904 AHPND+ (Vp M0904), para elucidar la relación que existe en la expresión de los genes *pirA* y *pirB* y los genes que codifican las proteínas hipotéticas bajo condiciones *in vitro* e *in vivo*. Se sembró un cultivo *in vitro* de Vp M0904 y se tomaron muestras a las 0, 3, 6, 9, 12, 15, 18 y 24 horas post inoculación, se midió el nivel de expresión por RT-qPCR de los genes antes mencionados y la concentración de las toxinas PirA y PirB, por método de ELISA indirecto. Se encontró que los genes *hp2*, *pirA* y *pirB* se expresan diferencialmente a través del tiempo; en cambio *hp1*, *cwsp* y *hp3* se expresan de forma similar a través del tiempo. Así mismo, los niveles de expresión génica de *pirA* y *pirB* fueron más altos en todos los tiempos y mostraron relación directa con la cinética de crecimiento de Vp M0904, a medida que aumenta la densidad bacteriana se incrementa su expresión. Por su parte, la toxina PirB tuvo mayor concentración que PirA en todos los tiempos de la cinética, diferente a lo encontrado en los niveles de expresión génica, lo que propone una posible regulación de la concentración de la toxina. Se realizó, además un desafío con Vp M0904 en camarones juveniles (*Penaeus vannamei*), donde se tomaron muestras a los tiempos 0, 6, 9, 12, 15 y 24 post inoculación y se midió la concentración de las toxinas PirA y PirB empleando la misma metodología. Los resultados mostraron un comportamiento similar al ensayo *in vitro*, donde PirB tuvo una concentración mayor que PirA, en los tiempos de medición del ensayo *in vivo*.

Palabras claves: *Vibrio parahaemolyticus,* AHPND, toxinas PirA y pirB, proteínas hipotéticas.

ABSTRACT

An emerging disease, known as Acute Hepatopancreatic Necrosis Disease (AHPND) has recently affected shrimp farming. Strains of the genus Vibrio have been identified as the causative agent of the disease (AHPND +). The main virulence factor is the production of PirAB toxin, whose genes (*pirA* and *pirB*) are found in the PirAB-tn903 composite transposon of plasmid pVA1, flanked by the hypothetical genes *hp1*, *cwsp* and *hp2* upstream of pirA and *hp3* downstream of pirB. In the current study the *Vibrio parahaemolyticus* strain M0904 AHPND + (Vp M0904) was used to elucidate the relationship between the expression of *pirA* and *pirB* genes and the hypothetical protein genes under *in vitro* and *in vivo* conditions. An *in vitro* culture of Vp M0904 was set-up, and samples were taken at 0, 3, 6, 9, 12, 15, 18 and 24 hours post inoculation, gene expression was measured by RT-qPCR, and the concentrations of the toxins PirA and PirB were measured by indirect ELISA. The results show that the *hp2*, *pirA* and *pirB* genes are differentially expressed over time, while *hp1*, *cwsp* and *hp3* are expressed at the same levels over time. Likewise, *pirA* and *pirB* showed a relationship with the growth kinetics of Vp M0904, as their expression increased with bacterial density, and gene expression levels were higher than those of *hp1*, *hp2*, *cwsp* and *hp3* at all time-points. The PirB toxin showed higher concentration than PirA at all times during the kinetics of Vp M0903, which was different from the levels of gene expression, suggesting a possible regulation of the toxin concentration. A challenge was also performed with Vp M0904 in juvenile shrimp (*Penaeus vannamei*), where samples were taken 0, 6, 9, 12, 15 and 24 hours post infection. The concentration of PirA and PirB toxins was measured using the same methodology. The results showed a similar behavior to the *in vitro* test, in which PirB showed higher concentration than PirA during the in vivo assay.

Keywords: *Vibrio parahaemolyticus*, AHPND, PirA and PirB toxins, hypothetical proteins.

1. INTRODUCCIÓN

El camarón es el segundo producto acuícola más comercializado a nivel mundial, su cultivo es una fuente importante de ingresos de divisas para varios países de Asia y América Latina (SOFIA, 2018). Sin embargo, la intensificación de su cultivo se ha acompañado con el desarrollo de enfermedades infecciosas que se traducen en grandes pérdidas económicas (Li *et al.,* 2018).

Recientemente, se detectaron cepas del género *Vibrio* como el agente causal de la enfermedad emergente en camarón denominada Enfermedad de la Necrosis Aguda del Hepatopáncreas (AHPND por sus siglas en inglés). AHPND es considerada una de las enfermedades de mayor impacto a nivel mundial, debido a que ha causado mortalidades masivas traducidas en pérdidas millonarias en la industria del camarón en Asia y América Latina (Nunan *et* al., 2014; De La Peña *et al*., 2015; Restrepo *et al.,* 2016). AHPND se caracteriza por manifestar descamación masiva de las células de los túbulos del hepatopáncreas como signo patognomónico, produciendo disfunción del órgano y posterior muerte del organismo (Tran *et al*., 2013; Joshi *et al.*, 2014; Soto-Rodriguez *et al*., 2015).

Las cepas del genero *Vibrio* reportadas como causantes de esta enfermedad (AHPND+) portan en común un plásmido de virulencia de ~70 kbp denominado pVA1 (Han *et al*., 2015; Lee *et al*., 2015). En la secuencia de nucleótidos de pVA1 se detectaron dos genes (*pirA* y *pirB)* que son homólogos a los genes que codifican para la toxina binaria entomopatógena PirAB, solamente descritas en bacterias del genero *Photorhabdus.* Estos genes codifican para las toxinas $PirA^{vp}$ y $PirB^{vp}$ (Lee *et al*., 2015), que también han sido caracterizadas como el principal factor de virulencia de las cepas AHPND+ (Tran *et al*., 2013). Los genes $pirA^{vp}$ y $pirB^{vp}$ se encuentran en una región flanqueada por dos transposas idénticas en sentidos opuestos denominada transposón compuesto PirAB-tn903 (Xiao *et al*., 2017), en esta misma región están ubicados los genes que codifican la proteína hipotética 1 (*hp1*), proteína hipotética 2 (*hp2*) y gen putativo de anclaje a pared celular (*cwsp*, por sus siglas en Inglés) en sentido ascendente del promotor de $pirA^{vp}$ y en sentido descendente (downstream en Inglés) del gen $pirB^{vp}$ se encuentra el gen que codifica la proteína hipotética 3 (*hp3*).

Estudios sobre genes que codifican para toxinas bacterianas, demostraron que genes adyacentes regulan su transcripción. Por ejemplo el gen *pBt108* funciona como factor sigma para la

transcripción de *cry4Aa* de *Bacillus thuringensis* (Berry *et al*., 2002). *Clostridium botullinum* produce diferentes subtipos de neurotoxinas (BoNT), los subtipos BoNT/A y BoNT/B dependen de regulación transcripcional por el gen adyacente en sentido ascendente *botR* (Smith *et al*., 2007). Con la finalidad de comprender el mecanismo de producción de las toxinas PirA^{vp} y PirB^{vp}, este estudio se enfocó en evaluar la relación entre la expresión de los genes (*hp1, hp2, hp3, cwsp*) y (*pirA*^{vp} y *pirB*^{vp}) y la producción de la toxina PirAB^{vp} de *Vibrio parahaemolyticus* M0904 bajo condiciones de cultivo *in vitro* y durante un desafío con camarones juveniles infectados con Vp M0904.

2. ANTECEDENTES

2.1 Toxinas PirA^{vp} y PirB^{vp} Causantes de AHPND en Camarón

En 2009, las unidades de producción camaronícolas en China fueron afectadas por una enfermedad emergente, en sus inicios llamada como Síndrome de la Mortalidad Temprana (EMS, por sus siglas en inglés) (Flegel, 2012). El nombre hace alusión a la rápida muerte de los organismos, comúnmente entre 20 a 30 días después de su siembra, donde las especies de camarón susceptibles a la enfermedad son *Penaeus vannamei* y *Penaeus monodon* (Lightner, 2012; Flegel, 2012; Leaño *et al*., 2012). Los organismos presentan signos clínicos característicos como letargia, anorexia, tracto vacío, hepatopáncreas pálido y cromatóforos expandidos (Soto-Rodríguez *et al*., 2015; Lai *et al*., 2015).

El análisis histológico de los organismos afectados mostró que la enfermedad se puede dividir en tres etapas, en la etapa inicial se observa una elongación de las células del epitelio hacia el lumen del túbulo, la etapa aguda se estableció como el signo patognomónico de la enfermedad (Soto-Rodriguez *et al*., 2015), que consta de descamación masiva de las células del epitelio de los túbulos del hepatopáncreas con necrosis severa y la etapa terminal donde el tejido se encuentra en estado de necrosis total, provocando una colonización bacteriana secundaria y muerte del organismos (Tran *et al*., 2013; Soto-Rodriguez *et al*., 2015).

Las primeras cepas causantes de AHPND (AHPND +) fueron aisladas en China desde 2009 de brotes en unidades de producción de camarón (Lightner *et al*., 2012), posteriormente se suscitaron casos en Vietnam (2010) (Kondo *et al*., 2015), Malasia (2011) (Foo et al., 2017), Tailandia y Filipinas (2012) (Joshi *et al*., 2014; De La Peña *et al*., 2015) hasta en 2013 llegar al continente americano a México (Nunan *et al*., 2014), países Latinoamericanos (Restrepo *et al*., 2016) y recientemente Estados Unidos (Dhar *et al*., 2019). De acuerdo a análisis filogenéticos de estas cepas, pertenecen al género *Vibrio* del clado Harveyi, en su mayoría son *Vibrio parahaemolyticus* (Kondo *et al*., 2015; Liu *et al*., 2015; Gómez Gil *et al*., 2014; Han *et al*., 2015a).

Investigaciones posteriores revelaron que las cepas AHPND+ portan un plásmido de virulencia de ~70 kb denominado pVA1 (Fig. 1), en su secuencia de nucleótidos dos de sus genes tienen una

homología del 33% con los genes que codifican para las toxinas entomopatógenas PirAB de bacterias del genero *Photorhabdus* (Yang *et al.*, 2014), a las cuales llamaron *pirA*^{vp} y *pirB*^{vp}.

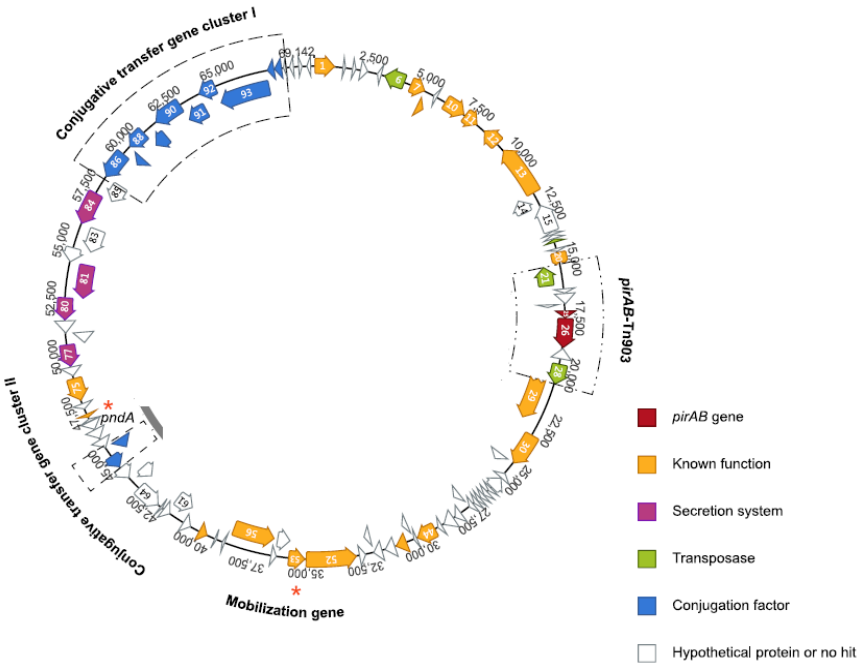


Figura 1. Plásmido de virulencia pVA1. Secuencia de genes de pVA1 donde se muestran los grupos de genes incluidos *pirA*^{vp} y *pirB*^{vp} (Xiao *et al.*, 2017*).*

Los genes *pirA*^{vp} y *pirB*^{vp} codifican para toxinas de 12 y 56 kDa, denominados PirA^{vp} y PirB^{vp}, respectivamente, se asume que son el principal factor de virulencia por el cual cepas de *V. parahaemolyticus* AHPND+ pueden inducir la enfermedad AHPND (Tran *et al.*, 2013; Lee *et al.*, 2015). Duran Avelar y colaboradores (2017) reportaron que no solo especies del género *Vibrio* portan los genes *pirA*^{vp} y *pirB*^{vp}, al demostrar que cepas de *Micrococcus luteus* 5157 y 5240 resultaron positivas al método AP4, el cual amplifica una región que abarca el gen *pirA*^{vp} y una pequeña parte de *pirB*^{vp} y sirve como rápida detección de AHPND por PCR (Dangtip *et al*., 2015). Una cepa de la especie *Shewanella violacea* porta el gen *pirB*, con una homología del 57% a *pirB*^{vp} de cepas AHPND+ (Xiao *et al.*, 2017). Recientemente Restrepo y colaboradores (2016), reportaron el plásmido de virulencia pVA1-like en *Vibrio punensis.*

Han y colaboradores (2015) reportaron que los genes *pirA*^{vp} y *pirB*^{vp}, se encuentran en una región de ~5.5 kbp que está delimitada por dos secuencias de inserción (IS) idénticas y orientadas inversamente, formando un transposón compuesto llamado Tn6264. Posteriormente, se describió que en la misma secuencia y en sentido ascendente del promotor de *pirA*^{vp} se encuentran los genes que se catalogan como proteínas hipotéticas denominados *hp1*, *hp2* y el gen putativo de anclaje a pared celular (*cwsp*, por sus siglas en inglés) y el gen proteína hipotética *hp3* en sentido descendente de *pirB*^{vp}. El nombre de la región cambio a transposón compuesto PirAB-Tn903 de 5427 pb (Figura 2), por su similitud con los IS encontrados en *Escherichia coli*, IS903 (Derbyshire, *et al*., 1987; Xiao *et al*., 2017).

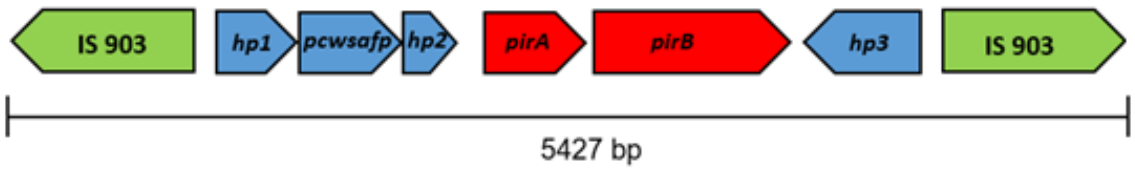


Figura 2. Secuencia de los genes hipotéticos *hp1*, *hp2*, *hp3* y *cwsp* adyacente a los genes *pirA* y *pirB* encontrados dentro del transposón compuesto PirAB-Tn903.

El contenido de G + C de PirAB-Tn903 es menor que las regiones restantes del plásmido lo que indica que fue adquirido recientemente por posible transferencia horizontal de genes (Han *et al*., 2015). Su secuencia se encuentra conservada en otras cepas AHPND+ con una identidad del 99 al 100% y un E-value de 0 (Cuadro 1).

Por otro lado, se ha reportado que el plásmido pVA1 posee diferentes números de copias por la bacteria portadora (Han *et al*., 2015b), como también, *Vibrio parahaemolyticus* M0904 mostro tener diferentes números de copias del plásmido pVA1 durante un experimento de desafío con camarones, llegando a tener 12 copias a las 12 y 24 horas post inoculación, para después decaer a 5 copias a las 48 horas post inoculación (Aguilar Rendón, 2018). Vargas Aguilar (2015), reporto que la expresión de los genes *pirA*^{vp} y *pirB*^{vp} de *Vibrio parahaemolyticus* M0904 se dio a las 12 y 24 horas post inoculación, lo que podría estar relaciona con el número de copias del plásmido pVA1.

Cuadro 1. Cepas del género *Vibrio* que comparten el transposón PirAB-Tn903.

Especie	Cepa	Plásmido	Cobertura	E-value	Identidad
Vibrio parahaemolyticus	20130629002S01	pVPGX1	100%	0	100%
Vibrio parahaemolyticus	VPE61	pVPE61a	100%	0	100%
Vibrio parahaemolyticus	3HP	pVA1	100%	0	100%
Vibrio parahaemolyticus	13-028/A3	pVPA3-1	100%	0	100%
Vibrio parahaemolyticus	160807	pVPWZ2	100%	0	99%
Vibrio parahaemolyticus	PB1937	p1937-1	100%	0	99%
Vibrio parahaemolyticus	v110	pV110	100%	0	99%
Vibrio parahaemolyticus	-	-	100%	0	100%
Vibrio parahaemolyticus	R14	pVpR14	100%	0	100%
Vibrio owensii	1700302	pVOWZ2	100%	0	100%
Vibrio owensii	V180403	pVOWZ3	100%	0	100%
Vibrio owensii	SH14	pVHvo	100%	0	99%
Vibrio campbellii	170502	pVCZS	100%	0	100%
Vibrio campbellii	LA16-V1	pLA16-2	100%	0	99%
Vibrio campbellii	20130629003S01	pVCGX1	100%	0	99%

2.2 Genes que Codifican para Proteínas Hipotéticas

Caracterizar la función de proteínas con función desconocida, provenientes de información de nuevos genomas es un reto para la bioinformática (Pellegrini *et al*., 1999; Eisentein *et al*., 2000). Sin embargo, con el avance de la secuenciación de genomas, la aparición de los llamados genes "proteína hipotética", también ha aumentado y su anotación funcional ha quedado rezagada (Sivashankari *et al*., 2006).

Un gen "proteína hipotética" se puede definir como una secuencia de nucleótidos que podrían ser expresados, ya que presentan un marco de lectura abierto, pero no se conoce la función de estas proteínas (Ijaq *et al*., 2019).

La búsqueda de la función de las proteínas hipotéticas representa un reto para la anotación funcional, debido a que la mayoría de los predictores de función *in silico* no muestran homología significativa para poder asignar una función, llegando a pensar que los genes anotados como proteína hipotética son errores de predicción de anotación (Koonin *et* al., 1997; Brenner, 1999). Sin embargo, han surgido diferentes opiniones acerca de estos genes para poder asignar una posible función, por ejemplo, si una proteína hipotética se encuentra conservada en varios genomas, esta

deja de ser hipotética y pasara a ser proteína hipotética conservada (Natale *et al*., 2000). Ejemplos de proteínas hipotéticas conservadas son los genes *mesJ*, *yggJ*, *ygbO* de las cepas *Escherichia coli* y *Bacillus subtilis* (Galperin *et al*., 2004), estos ejemplos dejan de manifiesto que los genes que se anotan como proteínas hipotéticas tienen una función en el organismo, sin embargo, aún es desconocida dicha función.

Por otro lado, una predicción general de la función puede realizarse tomando en cuenta motivos proteicos conservados, similitud de secuencia a una proteína caracterizada *in silico* o presencia de características estructurales con ligera similitud a otras proteínas (Galperin *et al*., 2001).

El estudio de los genes que codifican para proteína hipotética necesita de un seguimiento bioinformático de carácter imprescindible, sin embargo, es necesario apoyarse de análisis experimentales para poder tener un acercamiento de su función biológica (Galperin *et al*., 2001).

2.3 Toxinas Bacterianas en Plásmidos de Virulencia

Las toxinas bacterianas son moléculas capaces de lograr múltiples tareas desempeñándose como factores moleculares exógenos del receptor blanco, estos pueden dirigirse a células específicas en un organismo, donde forman poros en membranas de células receptoras o modificar componentes intracelulares (Ladant, *et al*., 2005). Existen distintos ejemplos de toxinas bacterianas cuyos genes pueden encontrarse en el cromosoma o en plásmidos, un ejemplo es la neurotoxina del tétanos TeTx (Raffestin *et al*., 2005), una de las proteínas más toxicas que afectan al humano, es producida por cepas de la especie *Clostridium tetani* en la fase exponencial de su crecimiento. La toxina se activa por un corte proteolítico haciéndola afín a su receptor neuronal donde desencadena la enfermedad (Masuyer *et al*., 2017). El gen que codifica para la toxina (*tetX*) se encuentra en el plásmido pE88 de 74 kbp (Caleo y Schiavo, 2009). El inicio de la transcripción de *tetX* es promovido por el regulador transcripcional TetR, cuyo gen (*tetR*) es adyacente en sentido ascendente del gen *tetX*, este regulador funciona como factor sigma promoviendo la unión de la ARN polimerasa al promotor del gen codifica para TeTx (Caleo y Schiavo, 2009).

Otro ejemplo son las cepas de la especie *Bacillus thuringiensis* que producen las endotoxinas tipo Cry y Cyt durante el proceso de esporulación (Jones, 2006). Existen alrededor de 50 subgrupos

primarios de toxinas Cry, todas comparten una estructura característica general que consta del dominio I de formación de poros, dominio II de unión a receptor y dominio III de unión a azúcar (Grochulski *et al.,* 1995; Morse *et al.,* 2001; Galitsky *et al.,* 2001). El mega plásmido pBtoxis porta los múltiples genes que codifican para las toxinas, genes de regulación y modificación trancripcional y de funciones para el plásmido (Berry *et al.*, 2002). Algunos transcritos de genes *cry* se ven favorecidos por una modificación postranscripcional, terminando en una estructura "tallo-bucle" que protegerá al ARNm de la enzima exoribonucleasa, este proceso desencadena en una mayor producción de toxina (Schnepf *et al*., 1998).

Por otro lado, la enfermedad del "ántrax" es causada por cepas específicas de *Bacillus anthrancis*. La forma vegetativa de *B. anthrancis* secreta tres polipéptidos, llamados antígeno protector (PA), factor letal (LF) y factor de edema (FE) (Riojas *et al*., 2015). El plásmido pXO1 contiene en su secuencia de nucleótidos una región de ~44 kbp reportada como isla putativa de patogenicidad, donde se encuentran los genes que codifican para las toxinas antes mencionadas (*lef*, *pagA* y *cyA*, respectivamente) (Okinaka *et al*., 1999). La mayor expresión de los genes *lef*, *pagA* y *cyA* es durante la fase exponencial, esta producción se debe al regulador tranpscripcional AtxA, promoviendo la transcripción de los genes *lef, pagA* y *cyA*. El gen que codifica para el regulador AtxA (*atxA*), se encuentra dentro de la isla putativa de patogenicidad, cercano al gen *cya* (Okinaka *et al*., 1999).

3. HIPOTESIS

Con base a estudios realizados de toxinas bacterianas codificadas en plásmidos, donde han encontrado que genes adyacentes a los genes de las toxinas han funcionado como reguladores transcripcionales, se plantean las siguientes hipótesis:

“Al menos uno de los genes hipotéticos (*hp1*, *hp2* y *hp3*), así como el gen “proteína de anclaje a pared celular” (*cwsp*) es co-expresado con los genes $pirA^{vp}$ y $pirB^{vp}$”.

“Existe correlación entre los niveles de expresión génica de $pirA^{vp}$ y $pirB^{vp}$ y la concentración de la toxina $PirA^{vp}$ y $PirB^{vp}$”.

4. OBJETIVOS

4.1 Objetivo General

Demostrar si hay relación entre la expresión de los genes *hp1*, *hp2*, *hp3*, *cwsp*, *pirA*^{vp} y *pirB*^{vp} contenidos en el plásmido pVA1 y la concentración de toxinas PirA^{vp} y PirB^{vp} de la cepa *Vibrio parahaemolyticus* M0904 AHPND+.

4.2 Objetivos Específicos

1. Establecer *in silico* la estructura y posible función de las proteínas hipotéticas *hp1*, *hp2* y *hp3* y *cwsp*.
2. Cuantificar la expresión de los genes *hp1*, *hp2*, *hp3*, *cwsp*, *pirA*^{vp} y *pirB*^{vp} y medir la concentración de las toxinas PirA^{vp} y PirB^{vp} de la cepa *Vibrio paharaemolyticus* M0904 AHPND+ en diferentes tiempos bajo condiciones *in vitro* e *in vivo* durante un desafío con camarones juveniles (*Penaeus vannamei*).

5. METODOLOGÍA

5.1 Caracterización *in silico* de la Posible Función de las Proteínas Hipotéticas (*hp1, hp2 y hp3) y cwsp*

5.1.1 Búsqueda de Homología con Secuencias Caracterizadas

Se extrajeron las secuencias de los genes *hp1*, *hp2*, *hp3* y *cwsp* de la cepa *V. parahaemolyticus* M0904 utilizando el software Geneious R7 (http://www.geneious.com). Posteriormente se generó la secuencia traducida a aminoácidos de cada uno de los genes para utilizarse como secuencias de entrada para las herramientas y programas bioinformáticos utilizados (ANEXO 1).

Posteriormente, se utilizó la herramienta BLAST "basic logical aligment search tool" (Altschul *et al*., 1990) contra la base de datos de "The NCBI BioSystems database" (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/biosystems), tratando de buscar una homología de secuencias de aminoácidos contra otras proteínas caracterizadas en la base de datos. La base de datos "Pfam protein database" (http://pfam.xfam.org) fue utilizada para buscar una posible función con base al alineamiento generado, este programa posee colecciones de familias de proteínas ya anotadas (Finn *et al*., 2009). "InterProScan" (http://www.ebi.ac.uk/interpro) es una herramienta útil para obtener información sobre familias de proteínas, dominios y sitios funcionales del péptido (Quevillon *et al*., 2005). "The PROSITE database" (https://prosite.expasy.org) se utilizó para buscar si existe algún dominio conservado de las secuencias problema, basándose en las anotaciones depositadas en la base de datos (Hulo *et al*., 2006). La base de datos "The UniProt" (https://www.uniprot.org/) se utilizó para determinar que las secuencias que estábamos buscando no tenían redundancia. Se realizaron alineamientos contra la base de datos Protein Data Base (https://www.rcsb.org/) para buscar motivos conservados con ayuda de alineamientos múltiples (Berman *et al*., 2002), al igual que MOTIF (https://www.genome.jp/tools/motif/) que encuentra motivos estructurales secundarios conservados. Phyre2 (http://sbg.bio.ic.ac.uk/~phyre2/html/) se utilizó para buscar la posible estructura y modelaje con base a la secuencia de aminoácidos (Kelley *et al*., 2015) de las proteínas hipotéticas *hp1*, *hp2*, *hp3* y *cwsp*.

5.1.2 Búsqueda de Localización Subcelular, Predicción de Proteínas Factores de Virulencia y Péptidos de Señal

La búsqueda de la localización subcelular de las proteínas hipotéticas se realizó utilizando PSORT-B" (https://www.psort.org/psortb/) y CELLO2GO (http://cello.life.nctu.edu.tw/cello2go/), los cuales predicen de acuerdo a la secuencia una posible localización dentro de la célula bacteriana. La asignación como factores de virulencia fue realizada con VICMpred (http://crdd.osdd.net/raghava/vicmpred/) predice si la secuencia analizada, tiene una función como factor de virulencia, función metabólica o proceso celular. El análisis de una posible función como péptido de señal se realizó utilizando el programa SignalP 4.1 (Nielsen, 2017), que predice la presencia y localización de sitios de escisión de péptidos de señal. TMHMM v 2.0 server (Krogh *et al*. 2001) y HMMTOP (Tusnady *et al*., 2001) se usaron para la predicción de las hélices transmembrana en las proteínas analizadas.

5.1.3 Características Fisicoquímicas de las Proteínas

Para conocer las características fisicoquímicas teóricas (peso molecular, índice alifático, punto isoeléctrico e índice de inestabilidad) de las secuencias de aminoácidos de cada proteína hipotética de interés se utilizó "Protein Identification and Analysis Tools on ExPASy server" (ProtParam) (https://web.expasy.org/protparam/).

5.2 Diseño de Oligonucleótidos

Se diseñaron 8 pares de oligonucleótidos utilizando la plataforma Primer3 (Untergasser 2012) (Cuadro 2), correspondientes a los genes *hp1*, *hp2*, *hp3*, *cwsp*, $pirA^{vp}$ y $pirB^{vp}$ y a los genes de referencia del plásmido pVA1, SSU ribosomal protein y *hpR*. Los criterios de selección fueron

valores de temperatura de desnaturalización (Tm, por sus siglas en inglés) entre 60-65°C, un tamaño de la secuencia de máximo 25 nucleótidos, el producto del amplicón no debe de alcanzar los 200 pares de bases (bp), para una mayor eficiencia de la amplificación (Udvardi *et al.*, 2008). Con respecto a los genes de referencia, fueron seleccionados dos genes plasmídicos, ya que los genes estudiados se localizan en el plásmido pVA1, además que estudios previos reportaron que el plásmido pVA1 de Vp M0904 tiene diferentes número de copias a través del tiempo de manera distinta (Aguilar Rendon, 2018). Se verificó que su secuencia solo estuviera presente en el plásmido pVA1 y que no tuviera copia en el plásmido 2 del genoma de M0904, para evitar sobreestimación de la abundancia del transcrito de los genes.

Cuadro 2. Oligonucleótidos diseñados en este trabajo para la cuantificación de la expresión de los genes *hp1*, *hp2*, *hp3*, *cwsp*, *pirA*^{vp} y *pirB*^{vp} qPCR

Gen	Sentido	Secuencia de nucleótidos	%GC	Tamaño de amplicón (bp)
hpR	Forward	TGCCGAGTTATCACATCACG	50	198
	Reverse	AAGTATCGTTCCAGCCGTCA	50	
SSU	Forward	TGCTACATCTCGTGGAGTCG	55	189
	Reverse	GTGCCAGTGGAAGCCATATT	50	
pirA	Forward	GCGTCACAGAAGTAGACAGC	55	192
	Reverse	CAGGGCGTTGTAAATGGT	50	
pirB	Forward	CATGGCTTGTGGTCTGGATT	50	167
	Reverse	ACGAGCACCCATCACTTCAT	50	
hp1	Forward	CGGAGCATGATAATTTAGTG	40	129
	Reverse	CAGTTCGTAACATTGCATGA	40	
hp2	Forward	GGTGGTTGCACCGTAAAT	50	103
	Reverse	CCGTTTCGCTTGTTTCTT	44	
hp3	Forward	GATTTGATCCCTGTGTATGG	45	238
	Reverse	TATCTTGATGAGTGCAAACG	40	
cwsp	Forward	AAGTCGGCTGTATGATGTGT	45	189
	Reverse	CAATTCCGTTGTCTCCATAC	45	

5.2.1 Elaboración de Curva Estándar

Cada par de oligonucleótidos fue sometido primero a una reacción de PCR punto final en el termociclador Applied Biosystems SimpliAmp®Thermal Cycle (Cuadro 3). El amplicón generado se utilizó como ADN muestra para generar la curva estándar de amplificación de los oligonucleótidos por qPCR (ANEXO 1 C, D).

Cuadro 3. Protocolo de amplificación de los genes *hp1*, *hp2*, *hp3*, *cwsp*, *pirA*^{vp}, *pirB*^{vp}, SSU y *hpR* por reacción de PCR punto final.

Etapa	Temperatura	Tiempo (min)	Numero de ciclos
Activación de la enzima Taq DNA Polymerase, Thermo Scientific ®.	95°C	3:00	1
Desnaturalización del ADN dúplex.	95°C	0:35	40
Alineamiento y extensión.	60°C	0:30	
Disociación del producto de amplificación.	75°C	7:00	1

El amplicón se diluyó en agua DEPC libre de nucleasas en proporciones de 10^{-4}, 10^{-5}, 10^{-6}, 10^{-7}, 10^{-8}, 10^{-9}, 10^{-10}, las cuales sirvieron como los puntos de la curva estándar (Derveaux *et al*., 2010). La curva estándar sirve para establecer la eficiencia de la amplificación y determinar si existen productos y dímeros de amplificación de los oligonucleótidos (ANEXO 2).

5.3 Cepa Bacteriana

Tanto para los ensayos *in vitro* como *in vivo*, se utilizó la cepa de *Vibrio parahaemolyticus* M0904

(Vp M0904) causante de AHPND, perteneciente a la Colección del Laboratorio de Bacteriología del CIAD, Coordinación Mazatlán. *V. parahaemolyticus* M0904 fue aislada del hepatopáncreas de camarones afectados por AHPND provenientes de granjas de Sinaloa, México (Soto-Rodriguez et al., 2015).

5.4 Cultivo *in vitro* de *Vibrio parahaemolyticus* M0904

Para el cumplimiento de la cuantificación de la expresión de los genes *hp1, hp2, hp3, cwsp, pirA*^{vp} y *pirB*^{vp}, así como la concentración de las toxinas PirA^{vp} y PirB^{vp} en condiciones de de cultivo *in vitro*, se realizó un cultivo bacteriológico de la cepa *Vibrio parahaemolyticus* M0904 en medio Tripticasa de soya (DIBICO®) (TSB) adicionando 2.5% NaCl (TSB+). En el ensayo se midió la expresión de los genes *hp1, hp2, hp3, cwsp, pirA*^{vp} y *pirB*^{vp} y la concentración de las PirA^{vp} y PirB^{vp} a diferentes tiempos correlacionándose con la densidad bacteriana a cada tiempo de muestreo.

5.5 Preparación del Inóculo

La cepa M0904 criopreservada a -80°C, se reactivó en 10 mL de medio Tripticasa de soya (DIBICO®) (TSB) adicionando 2.5% NaCl (TSB+) e incubadas a 30°C durante 16 h con agitación constante de 100 revoluciones por minuto (rpm). Posteriormente se tomaron 0.1 mL del cultivo y se colocaron en 9.9 mL de caldo TSB+ para tener una densidad final de aproximadamente 10^7 UFC/mL, este cultivo se incubó nuevamente a 30°C durante 16 h con agitación de 100 rpm. Al término de la incubación se centrifugó a 2360 g durante 20 min a 20°C. Posteriormente se obtuvieron las células lavadas de acuerdo a Aguilar Rendón, 2018, Concluido el tercer lavado, se ajustó la suspensión bacteriana a una densidad óptica (DO) de 1.5 (λ=600 nm) equivalente aproximadamente a 1 x 10^9 UFC/ml.

5.6 Diseño Experimental de Cultivo *in vitro*

El ensayo fue realizado en paralelo, utilizando seis matraces de 500 mL con un volumen final de 300 mL de medio TSB+, los cuales se dividieron en dos conjuntos. Tres matraces fueron inoculados con 100 µL del inoculo de células lavadas de *V. parahaemolyticus* M0904 a una densidad de 9.07 x 10^8 UFC/mL, obtenido en condiciones de esterilidad bajo cámara de flujo laminar y se incubaron a 30°C con agitación constante de 100 rpm. En los tiempos 0, 3, 6, 9, 12 y 24 horas pos inoculación se colectaron 15 mL de muestra. Se preparó un segundo inóculo y se incubó durante 16 horas a 30°C con agitación constante de 100 rpm, se centrifugó el cultivo a 2360 g durante 20 minutos a 4°C y se descartó el sobrenadante, el pelet bacteriano se re suspendió en 10 mL de SSE, se repitió este paso hasta completar tres lavados. Se inocularon 100 µL del segundo inoculo bacteriano a una densidad de 7.43 x 10^8 UFC/mL a cada uno de los matraces del segundo conjunto y se incubaron a 30°C con agitación constante de 100 rpm, de este conjunto de matraces se tomaron las muestras de los tiempos 15 y 18 post inoculación.

De cada muestra, 5 mL fueron destinados para la estimación de la cinética de crecimiento, 10 ml restantes fueron centrifugados a 2360 g durante 20 minutos a 4°C, el pelet bacteriano se utilizó para extracción de ARN total agregando 500 µl de TRIsure™ (Bioline, Londres, Reino Unido) y posterior congelación durante 48 horas a -20°C. El sobrenadante se utilizó para la cuantificación de las toxinas $PirA^{vp}$ y $PirB^{vp}$ por método de Ensayo por inmuno absorción ligado a enzimas (ELISA) indirecto (Engvall & Perlmann, 1972).

5.6.1 Cinética Bacteriana

Se utilizó la técnica de conteo total viable (CTV) para estimar la densidad real de todas las réplicas de cada tiempo de muestreo. Se realizaron diluciones seriales de cada muestra con SSE y se inoculó en agar tiosulfato citrato bilis sacarosa (TCBS) (Difco™ TCBS agar) por duplicado bajo condiciones de esterilidad, las placas fueron incubadas a 30°C durante 24 horas. Después se realizó el conteo de las colonias verdes y se reportó en términos de unidades formadoras de colonias por

mililitro (UFC/mL). La DO se realizó por triplicado en espectrofotómetro Hach ® DR/2010, midiendo a λ=600 nm, para determinar la correlación entre UFC/mL y DO.

5.6.2 Análisis de la expresión de los genes

5.6.2.1 Extracción de ARN y síntesis de ADN complementario. Posterior a la centrifugación de cada una de las muestras el botón bacteriano fue preservado adicionando 500 µL de reactivo TRIsure™ (Bioline, Londres, Reino Unido) fue mantenido en congelación a –20°C durante dos días para posterior extracción de ARN de acuerdo al protocolo de TRIsure™ (Bioline, Londres, Reino Unido) (ANEXO 2 A). Las muestras de ARN obtenido fueron digeridas con la enzima DNAsa l (RQ1 Kit, Promega, EUA) (ANEXO 2 B), una vez obtenido ARN libre de ADN genómico, se cuantificó cada una de las muestras en espectrofotómetro DS-11 (DeNovix, EUA). Para la síntesis de ADN complementario, se hizo una normalización del ARN a una concentración de 1 µg y después se procedió a la síntesis del ADN complementario por transcripción inversa utilizando la enzima transcriptasa reversa M-MLV (Promega ®, EUA) (ANEXO 2 C).

5.6.2.2 Expresión génica por reacción en cadena de la polimerasa con transcripción inversa (RT-qPCR). La evaluación de la expresión de los genes *hp1*, *hp2*, *hp3*, *cwsp*, $pirA^{vp}$ y $pirB^{vp}$ se realizó por la técnica de RT-qPCR (Bustin, 2002), utilizando el termociclador tiempo real CFX-96 Touch Real-Time PCR detection system (BIO-RAD, EUA) y el colorante fluorescente de ADN de doble cadena SYBR® Green Master Mix (BIO-RAD, EUA).

Cada tiempo de muestreo se utilizó como un tratamiento en la matriz de base de datos de expresión génica (Cuadro 4), cada réplica de cada tiempo refiere a una muestra, y cada muestra tuvo dos replicas técnicas en la corrida de la qPCR. Las proporciones de cada tubo de reacción fueron; SYBR® Green 2.5 µL, oligonucleótido forward 0.5 µL, oligonucleótido reverse 0.5 µL y ADN complementario 1.5 µL, el volumen final de cada tubo de reacción de 5 µL. Todas las corridas de muestras para cada gen fueron realizadas con el mismo protocolo de amplificación (Cuadro 5).

Los datos obtenidos fueron analizados con el modelo matemático $2^{-\Delta ct}$, el cual utiliza el número 2 asumiendo el 100% de eficiencia en la amplificación exponencial por PCR en todas las muestras,

este número es elevado a la potencia de la diferencia entre el ciclo umbral (CT, por sus siglas en inglés) del gen de interés y el CT del gen de referencia o normalizador (Livak y Schmittgen, 2001; Rao *et al*., 2013). Su fórmula está representada de la siguiente manera:

$$\text{Expresión relativa por método } \Delta ct = 2^{-(\text{CT interés} - \text{CT gen referencia})}.$$

Cuadro 4. Matriz de trabajo para cuantificación de expresión los genes *hp1*, *hp2*, *hp3*, *cwsp*, *pirA*^{vp} y *pirB*^{vp} en cinética de *Vibrio parahaemolyticus* M0904.

	Horas post inoculación de muestreo						
	3	6	9	12	15	18	24
Réplicas por tiempo	T1R1	T2R1	T3R1	T4R1	T6R1	T7R1	T5R1
	T1R2	T2R2	T3R2	T4R2	T6R2	T7R2	T5R2
	T1R3	T2R3	T3R4	T4R3	T6R3	T7R3	T5R3

Cuadro 5. Programa de amplificación de ADN complementario por qPCR para expresión génica.

Etapa	Temperatura	Tiempo	No. Ciclos
Activación de la enzima	95°C	35 seg	1
Desnaturalización del ADN	95°C	20 seg	40
Alineamiento y extensión	60°C	30 seg	
Disociación del producto de amplificación	65-90°C	-	1

5.6.3 Cuantificación de las Toxinas PirA^{vp} y PirB^{vp}

5.6.3.1 Precipitación y purificación de las proteínas. Se utilizó la metodología de precipitación de las toxinas descrita por Sirikharin y colaboradores (2015), con ajustes en concentración de sulfato

de amonio ($(NH_4)_2SO_4$), donde se definió por ensayos de laboratorio, que las toxinas $PirA^{vp}$ y $PirB^{vp}$ precipitan a 50% de $(NH_4)_2SO_4$, basándonos en el efecto de precipitación salina de proteínas o salting out (Duong-ly y Gabelli, 2014). El sobrenadante de todas las muestras centrifugadas se pasó a tubos de 15 mL que contenían 5g de $(NH_4)_2SO_4$), obteniendo una solución final al 50% (p/v) de $(NH_4)_2SO_4$. Se solubilizaron las muestras con agitación mecánica y posteriormente se preservaron a 4°C por 1 mes. Posteriormente se centrifugaron a 12,000 g a 4°C por 10 minutos, se descartó el líquido sobrenadante y el precipitado de proteína fue re-suspendido en 1 mL de agua de mar estéril y filtrada (AMEF) con filtro de 0.45 µm (GN-6 Metricel®, PALL, EUA).
Las muestras suspendidas en 1 mL se agregaron a membranas de diálisis con poros de 3 a 6 kD (Dialysis Membrane Tubing 3500 MWCO, SPECTRA/POR™, EUA) y se colocaron en frascos estériles para dializar contra 100 mL de AMEF a temperatura ambiente con agitación de 100 rpm, se realizaron un total de 6 recambios de AMEF cada 8 horas. Al término de la diálisis las muestras se colocaron en microtubos de 1.7 mL, y se concentraron por evaporación utilizando el concentrador por temperatura y centrifugación (Concentrator 5301, Eppendorf, EUA).

5.6.3.2 Cuantificación de la proteína total. Se tomaron 15 µL por triplicado de cada una de las muestras dializadas y se agregaron individualmente en pocillos de placa de 96 pocillos (Costar®, fondo plano, EUA), posteriormente se agregaron 200 µL de reactivo Bradford (Bio-Rad Protein Assay, EUA) y se dejó reaccionar durante 15 minutos y después se leyó en espectrofotómetro a 620 nm de longitud de onda. Para determinar la concentración de las muestras, se construyó una curva patrón de concentración de albumina de suero bovina (BSA, Sigma®, EUA) de 50 µg a 400 µg (ANEXO 1, E).

5.6.3.3 Ensayo de inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA) indirecto. Las muestras concentradas se solubilizaron con 1 mL de buffer de carbonatos (Na_2HCO_3, Na_2CO_3, pH 9.6) y se utilizó como la solución de recubrimiento. Se prepararon las curvas patrón utilizando las proteínas recombinantes rPirA y rPirB, previamente obtenidas en el laboratorio de bacteriología, CIAD, Unidad Mazatlán. Se realizaron diluciones seriales 1:2 con solución de recubrimiento de las proteínas recombinantes, rPirA quedó en concentraciones de 22.97, 45.94, 91.88, 183.76 y 397.53

ng/mL, mientras que rPirB en 16.56, 33.12, 66.25, 132.50, 265.23. En cada curva patrón la menor concentración se utilizó como el punto 1, y la mayor concentración como el punto 5 (ver ANEXO 1, F)

Se llenaron dos placas de 96 pocillos (Costar®, fondo plano, EUA) para la cuantificación de $PirA^{vp}$ y $PirB^{vp}$, con 100 µL por pocillo de muestras solubilizadas en solución de recubrimiento por cuadruplicado (ANEXO 1, H). Se incubaron a 4°C durante 16 horas, pasado el tiempo se descartó el líquido y se hicieron tres lavados con 150 µl de solución de lavado (buffer de fosfatos salino 1x NaCl, KCl, Na_2HPO_4, KH_2PO_4 0.05% Tween-20 [PBS-T], pH 7.4), posteriormente se bloquearon los pocillos con 100µL de solución de bloqueo (PBS-T, 1% gelatina) y se incubó cada placa a 37°C por una hora. Se realizaron tres lavados al terminó del bloqueo seguido de una nueva incubación a 37°C por una hora con 100 µL PBS-T galactosa 200 mM en la placa de cuantificación de $PirA^{vp}$ para bloquear el reconocimiento de $PirB^{vp}$ y 100 µL con el anticuerpo policlonal anti $PirB^{vp}$ (pAbs-$PirB^{vp}$) en la placa de cuantificación de $PirB^{vp}$ diluido 1:5000.

Pasado el tiempo se descartó el líquido de las placas y se realizaron tres lavados, la placa de cuantificación de $PirA^{vp}$ se incubo con 100 µl por pocillo de anticuerpo primario anti $PirA^{vp}$ (pAbs-$PirA^{vp}$) en proporción 1:40000, al mismo tiempo se agregaron 100 µL por pocillo de anticuerpo secundario anti-rabbit acoplado a peroxidasa (Invitrogen, EUA) 1:3000 en la placa de cuantificación de $PirB^{vp}$, las placas fueron incubadas a 37°C por una hora. Se descartó el líquido de los pocillos y se efectuaron tres lavados con PBS-T, la placa de cuantificación de $PirA^{vp}$ se sometió a incubación con exposición del anticuerpo secundario anti-rabbit (Invitrogen, EUA) durante una hora a 37°C.

El acoplamiento de los anticuerpos se detectó agregando 100 µL del sustrato peróxido de hidrógeno (H_2O_2) al 10% disuelto en buffer de citrato (Na_2HPO_4, $C_6H_8O_7$) mezclado con el cromógeno orto-fenilendiamina (OPD) 0.4 mg/mL. La reacción procedió durante 5 minutos en oscuridad y posteriormente se detuvo la reacción adicionando 50 µl de ácido sulfúrico (H_2SO_4) 4 N, e inmediatamente se midió la absorbancia de la placa en lector a 490 nm de longitud de onda.

5.7 Desafío de Camarones Juveniles (*Penaeus vannamei*) con *Vibrio parahaemolyticus* M0904

Para el cumplimiento del segundo objetivo, se llevó a cabo el análisis de la expresión de los genes

hp1, *hp2*, *hp3*, *cwsp*, *pirA*^{vp} y *pirB*^{vp} y la cuantificación de la concentración de las toxinas PirA^{vp} y PirB^{vp} en condiciones de infección experimental con *Vibrio parahaemolyticus* M0904 en juveniles de *Penaeus vannamei*. Se utilizó una densidad de 10^6, probada en trabajos anteriores teniendo como resultado mortalidades a las cuatro horas post infección (H.P.I.) (Aguilar Rendón, 2018), esperando tener niveles cuantificables de ARN y toxina disponible en la matriz de agua.

5.7.1 Aclimatación

Se trabajó con camarones juveniles de 0.3 g promedio, provenientes de un laboratorio comercial de producción. Fueron aclimatados durante cinco días antes del desafío en acuarios de 56 L con agua de mar a una salinidad de 30.5 g/L, temperatura de 30° ± 0.5 °C y, fotoperiodo de 12 horas luz/12 horas oscuridad. Recibieron alimentación con un adieta comercial del 10% de su biomasa total fraccionada en tres raciones diarias.

5.7.2 Infección Experimental

La infección de camarones juveniles con *V. parahaemolyticus* M0904 se realizó por el método de inmersión (Soto-Rodríguez *et al*., 2015) a una densidad final de 1.36 x 10^6 de *V. parahaemolyticus* M0904 empleando el método de células lavadas descrito anteriormente. Se tuvieron cuatro réplicas experimentales inoculadas con la bacteria y cuatro réplicas sin adición de bacterias como control negativo. Los camarones se colocaron en acuarios con 8 L de agua de mar pasada por UV, cada uno con 8 camarones de 0.3 g ± 0.035 g, aireación individual y temperatura controlada de 30°C. Los camarones fueron alimentados siguiendo el mismo protocolo descrito anteriormente. Para evitar la acumulación de materia orgánica, los camarones se dejaron de alimentar 18 horas antes de la infección.

5.7.3 Colecta de Muestras

Durante el ensayo se tomaron 45 mL de fondo de agua de los acuarios en los tiempos 0 (antes de la infección), 30 minutos post infección, 6, 9, 12, 15 y 24 h.p.i. de cada réplica del tratamiento y control negativo. El muestreo fue aleatorio en 6 secciones del fondo del acuario. De cada muestra, 1 mL fue utilizado para estimar la cinética bacteriana por el método CTV y el resto fue centrifugado a 2,571 g, el pellet bacteriano se descartó y el sobrenadante se colocó en otro tubo con 22 g de $(NH_4)_2SO_4$ para precipitar proteínas y posterior diálisis. La cinética bacteriana de Vp M0904 en condiciones de desafío con camarones se realizó por el método de CTV y la concentración de Toxina PirA y PirB se realizó utilizando la misma metodología como se describió previamente.

5.8 Cuantificación de las Toxinas $PirA^{vp}$ y $PirB^{vp}$

A cada muestra se le adicionó 22.5 g de $(NH_4)_2SO_4$ para obtener una solución final al 50% (p/v), se solubilizó el sulfato de amonio y se preservaron las muestras durante tres días a 4°C. Posteriormente, se siguió el mismo para la precipitación y purificación de las toxinas descrito anteriormente.

En el ensayo de ELISA indirecto se siguió exactamente el mismo protocolo de trabajo de cuantificación de concentración de toxinas $PirA^{vp}$ y $PirB^{vp}$ que las muestras provenientes de cultivo *in vitro*. El llenado de las placas de cuantificación de las toxinas también fue similar con excepción en los tiempos de muestre (ANEXO 1 I).

5.9 Análisis Estadístico

Los datos de expresión relativa de los genes *hp1*, *hp2*, *hp3*, *cwsp*, $pirA^{vp}$ y $pirB^{vp}$ de Vp M0904 en condiciones *in vitro* y en condiciones de desafío con camarones, fueron analizados utilizando el

programa RStudio (2018). Se determinó si los datos tenían una distribución normal realizando una prueba de Shapiro Wilk, de acuerdo a los resultados se procedió a aplicar una prueba de ANOVA de una vía no paramétrica Kruskal Wallis, para saber si existen diferencias significativas en la expresión de los genes. Una vez obtenido los genes que se expresaron diferencialmente bajo la variable tiempo, se ejecutó la prueba aposteriori no paramétrica de comparación múltiple de Dunn, para ver qué tiempos específicamente tienen una expresión diferencialmente significativa.

Por último se realizó la prueba de correlación no paramétrica de Spearman comparando los rangos de los niveles de su expresión génica uno contra uno, para determinar si existe una correlación entre la expresión de los genes *hp1, hp2, hp3, cwsp, pirA*^{vp} y *pirB*^{vp}.

Finalmente, se realizó un análisis de sobrevivencia utilizando el programa GRAPHPAD PRISM ver. 7.0, al mismo tiempo se obtuvo la curva de sobrevivencia Kaplan-Meier utilizando un intervalo de confianza del 95% y nivel de significancia del 0.01 para determinar si existe una diferencia en cuanto a sobrevivencia del tratamiento con respecto al control.

6. RESULTADOS

6.1 Análisis de la Posible Función de los Genes *hp1*, *hp2*, *hp3* y *cwsp*

El análisis de alineamientos utilizando la herramienta BLAST de los genes *hp1*, *hp2*, *hp3* y *cwsp* con la base de datos de NCBI mostró que las secuencias con el resultado más significativo de comparación son proteínas no caracterizadas de la misma especie (*Vibrio parahaemolyticus*). Por otro lado, la búsqueda de dominios conservados en herramientas bioinformáticas como Pfam, InterProScan, UniprotK, PDB, PROSITE y MOTIF mostró bajos niveles de confianza en las predicciones. Sin embargo, de acuerdo a los resultados la proteína del gen *hp3* podría tener funciones enzimáticas. La traducción a proteína del gen *cwsp* expone una posibilidad de proteína de membrana de señalización que reacciona a diferentes cambios en el ambiente del organismo, en este caso Vp M0904 (Cuadro 6).

Cuadro 6. Resultados de similitudes de las secuencias de aminoácidos de los genes *hp1*, *hp2*, *hp3* y *cwsp* con secuencias de proteínas anotadas.

Gen	**Homología de secuencias (NCBI)**	**Dominios conservados**						**Estructura (Phyre2)**
		Pfam	InterProScan	UniprotK	PDB	PROSITE	MOTIF	
Hp1	PNC *Vp.*	SR	SR	PNC *Smittium culicis*	Adenosil metionina descarboxsilasa *Thermotoga maritima*	SR	UvrA, Subunidad de la ATPasa	Toxina Cdia *Escherichia coli*
hp2	PNC *Vp.*	SR	SR	PNC Vibrio fago Douglas	TrmB regulador transcripcional *Thermococcus litoralis*	SR	Superfamilia de las ferrinas	Nucleoplasmina, proteína de estructura viral

hp3	PNC *Vp.*	SR	SR	Proteína de la familia de aspartato amino transferasa *Marinicaulis flavus*	Proteína estructural *Homo sapiens*	Sitio activo de aldehído deshidrogenasa	SR	Fosfoglucosa isomerasa
cwsp	PNC *Vp.*	SR	SR	PNC *Paraglacieco la* sp.	Proteína de señalización Caprin2 *Homo sapiens*	Sitio de unión a lípidos de lipoproteína de membrana procariota	Lipoproteína de membrana externa LpoB	Supe familia de factor de necrosis tumoral *Homo sapiens*

Vp: *Vibrio parahemolyticus*; SR: Sin resultado; PNC: Proteína no caracterizada.

Los genes *hp2* y *cwsp* se anotaron como proteínas citoplasmática y de membrana celular, respectivamente, con alto nivel de confiabilidad. Ambas proteínas contienen en su secuencia N terminal un sitio de escisión por señal peptidasa, anotándose como péptidos de señal. La proteína del gen *cwsp* sería *in silico* una lipoproteína de señal que atraviesa la membrana, aumentando su confiabilidad al mostrar una hélice transmembrana, así mismo, su función predice una proteína que interviene en el proceso celular, entre los cuales destaca modificaciones postraduccionales, que son comunes en un péptido de señal (Nielsen y Krogh, 1998). Mientras que *hp2* funcionaría como péptido de señal, ubicado en el citoplasma de la bacteria. La búsqueda de hélices transmembranales *in silico* predijo que la proteína traducida del gen *hp3* contiene al menos una hélice que atraviesa la membrana celular, proponiéndose como una proteína estructural (Cuadro 7).

Cuadro 7. Lista de las predicciones de localización sub-celular de las proteínas traducidas de los genes *hp1, hp2, hp*3 y *cwsp* de *V. parahaemolyticus* M0904.

Gen	**Localización sub celular**		**Factores de virulencia** VICMpred	**Signal P** (péptido de señal)	**Secretome P** (proteína secretora)	**Hélices transmembranales**	
	PSORT B	CELLO				HMMTOP	TMHMM

hp1	Citoplasmática	Citoplasma	Proceso celular	No	No	No presentes	No presentes
hp2	Desconocida.	Citoplasma	Factor de virulencia	Lipoproteína/Péptido de señal	No	No presentes	No presentes
hp3	Desconocida.	Citoplasma	Factor de virulencia	No	No	3 Hélices TM	1 Hélice TM
cwsp	Membrana citoplasmática.	Membrana interna	Proceso celular	Lipoproteína/Péptido de señal	No	1 Hélice TM	No presentes

En resumen, de acuerdo al análisis *in silico* se puede decir que la proteína Hp1, contiene características poco estudiadas, por lo que sus resultados aparecen como proteína no caracterizada o niveles bajos de predicción. Por otro lado, la proteína Cwsp contiene dominios conservados como sitio de corte de peptidasa de señal, así como de sitio de unión a lípidos de carbohidratos lo que sugiere que es una proteína que podría estar anclada a la membrana celular con actividad postraduccional durante procesos celulares.

La caracterización fisicoquímica *in silico* de las proteínas hipotéticas Hp1, Hp2, Hp3 y Cwsp fueron realizados utilizando ProtParam (Cuadro 8). Este análisis sirve para encontrar de manera teórica los parámetros de peso molecular basado en la secuencia de aminoácidos expresado en kilo Daltones; punto isoeléctrico, pH al cual la proteína tenga carga neta de 0 y no interaccione con las moléculas del ambiente; coeficiente de extinción, indica cuánta luz absorbe una proteína a una determinada longitud de onda; índice de inestabilidad, provee la estabilidad teórica de una proteína "*in vitro*"; índice alifático, calcula el volumen relativo ocupado por las cadenas laterales alifáticas; promedio general de hidropaticidad, escala que calcula la hidrofobicidad e hidrofilicidad de una proteína con base a sus aminoácidos polares y apolares.

Conocer estas características apoya al conocimiento de la proteína individual para ser estudiada *in vitro* y para compararse con las características que se predijeron de su posible función, ya que la función de una proteína y sus características fisicoquímicas están ligadas.

Cuadro 8. Características fisicoquímicas de las proteínas hipotéticas Hp1, Hp2, Hp3 y Cwsp.

Nombre	Peso molecular (Da)	Punto isoeléctrico teórico	Coeficiente de extinción	Índice de inestabilidad	Clasificación	Índice alifático	Promedio general de hidropaticidad
hp1	8024.31	6.9	1490	31.74	Estable	108.82	-0.496
hp2	5580.34	4.31	5500	37.04	Estable	80.2	0.018
hp3	24162.48	9.14	16180	50.7	Inestable	72.94	-0.358
cwsp	17135.88	4.63	14565	30.97	Estable	106.08	0.415

Los resultados del análisis de índice de inestabilidad muestra que las proteínas traducidas de los genes hipotéticos pueden ser estables para trabajarse de manera experimental, mostrando valores del índice de inestabilidad menores a 40, a excepción de *hp3* el cual se muestra como una proteína putativamente inestable para análisis experimental (Guruprasad *et al*., 1990). El punto isoeléctrico de cada una de las proteínas varía, donde solo Hp3 es la única proteína que llega a su punto isoeléctrico a pH alcalino. El índice alifático señaló que las proteínas Hp1 y Cwsp contienen un valor mayor, por lo tanto tienen mayor termoestabilidad y capacidad de ser estables en diferentes condiciones, contrario a Hp3 que tiene un valor de índice más bajo (Ikai *et al*., 1980). Por último, el promedio general expuso que las proteínas Hp1 y Hp3 son solubles en ambiente acuoso, mientras que Hp2 y Cwsp son hidrófobas, siendo Cwsp la más soluble en ambientes apolares (Kyte *et al.*, 1982).

6.2 Cultivo *in vitro* de *Vibrio parahaemolyticus* M0904

6.2.1 Cinética Bacteriana

La cinética de crecimiento de la cepa Vp M0904 fue calculada con dos grupos de matraces como se explicó en metodología, se obtuvieron dos inóculos, del primer inóculo de 9.08 x 10^8 UFC/mL se cuantificó la densidad bacteriana de las horas 0, 3 6, 9 y 12 post inoculación, las horas 15, 18 y 24 post inoculación se calcularon a partir del segundo inóculo con densidad de 7.4 x 10^8. La cinética muestra una fase exponencial pronunciada a partir de la hora 1 hasta las 6 horas post inoculación

(Figura 3), posteriormente a partir de la hora 12 la densidad bacteriana permaneció constante a 10^9 UFC/mL. También se generó un gráfico de la estimación indirecta de crecimiento por DO, donde la tendencia muestra una fase exponencial de la hora 1 a la hora 6 post inoculación, seguido de un ligero ascenso de la hora 6 a la hora 9 post inoculación. De la hora 18 a la 24 se muestra un ascenso por la acumulación de células muertas y viables. Se encontró una alta correlación entre DO y CTV (r^2 = 0.9114, n = 8) entre ambos estimadores de densidad (ANEXO 1 J).

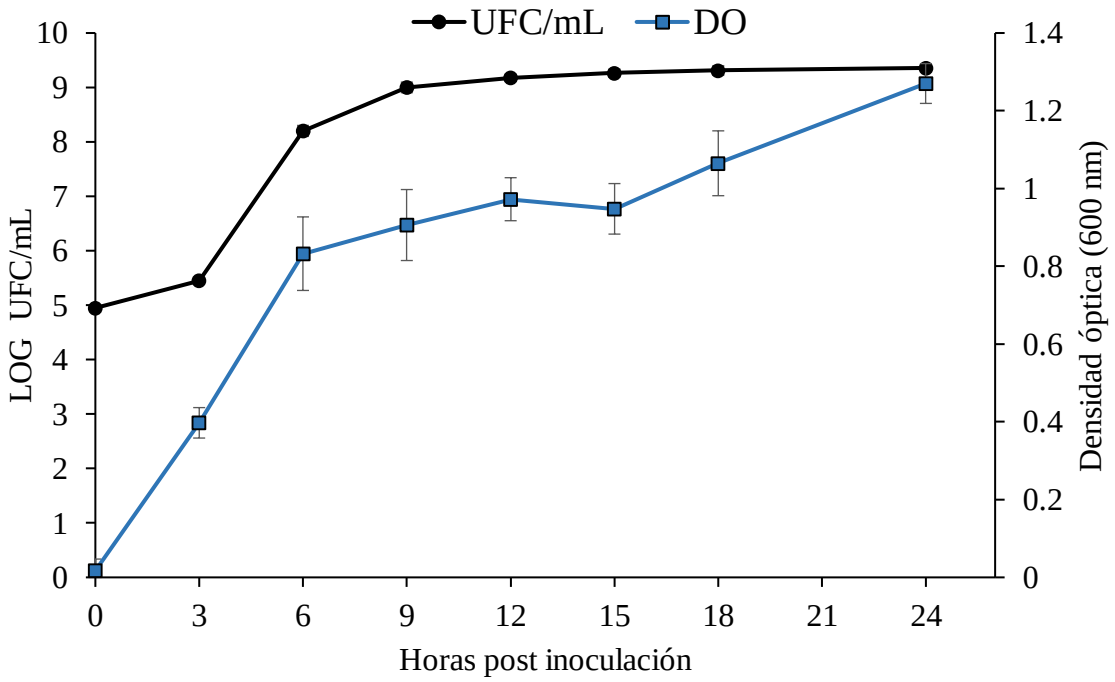


Figura 3. Curva de crecimiento de *Vibrio parahaemolyticus* M0904. Las barras de error indican desviación estándar n = 3.

6.2.2 Análisis de la Expresión Génica *in vitro*

El análisis de correlación de Spearman de las unidades de expresión relativa de los genes $pirA^{vp}$ y $pirB^{vp}$ exhibe que hay una alta correlación significativa (*rho* = 0.8129, *p* = 0.000006, n = 21) en cada uno de los tiempos durante la cinética de crecimiento de Vp M0904. El gráfico de expresión

de los genes *pirA*^{vp} y *pirB*^{vp} muestra que los genes se expresan de forma similar con respecto al tiempo (Figura 4). El tiempo de mayor expresión fue a las 12 horas post inoculación, mismo tiempo en el que existen diferencias significativas en su expresión con respecto a las otras horas (p = 0.02, n = 3).

Se observó una correlación entre la expresión génica de *pirA*^{vp} y *pirB*^{vp} y la densidad bacteriana hasta las 12 horas post inoculación. Sin embargo a partir de las 15 horas post inoculación, la expresión de ambos genes disminuye drásticamente, mientras que la densidad permanece constante.

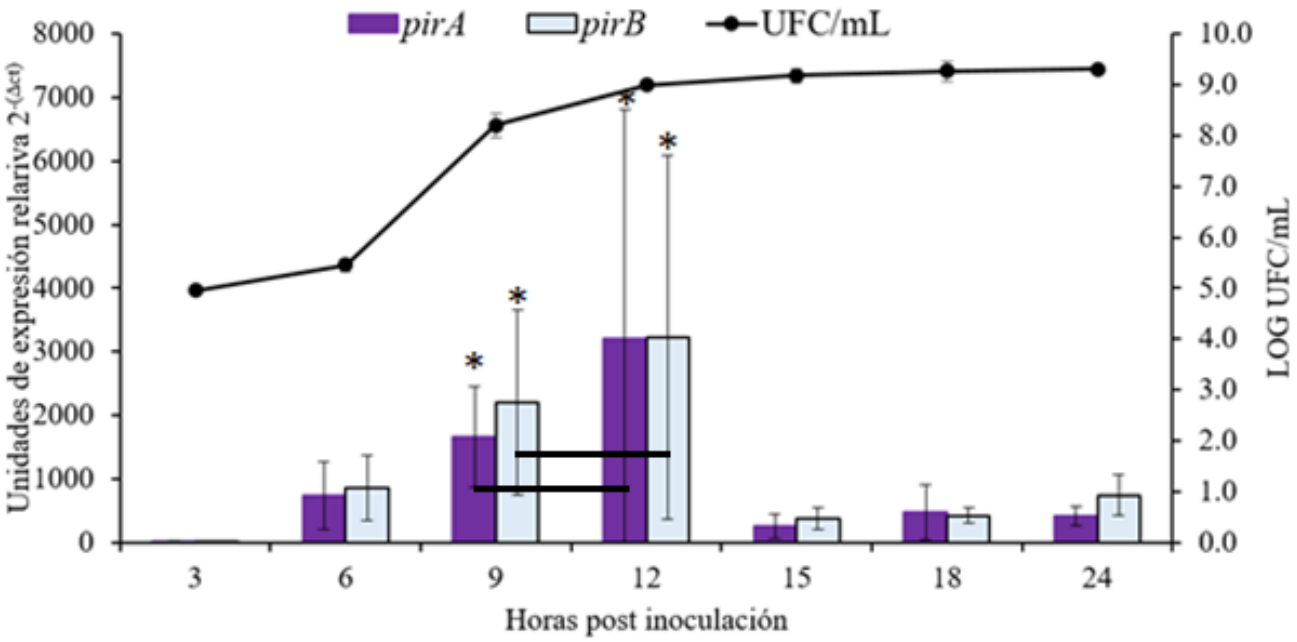
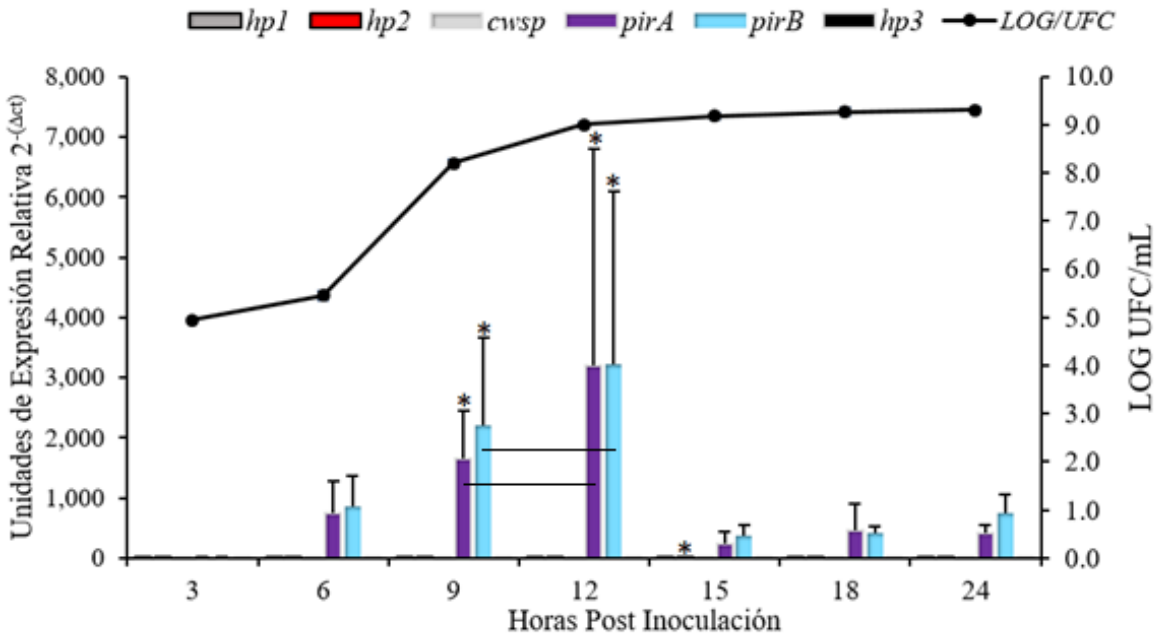


Figura 4. Expresión relativa de los genes *pirA*^{vp} y *pirB*^{vp} de Vp M0904 con relación a genes plasmídicos a través del tiempo post inoculación. Las Barras de error indican la desviación estándar, n = 3. Los asteriscos representan diferencias significativas entre pirA y pirB y la densidad bacteriana para cada tiempo (p = 0.02, n = 3).

Durante la secuencia de la expresión génica de cada uno de los genes ubicados en el transposón compuesto PirAB-Tn903 se observó una sobreexpresión de los genes *pirA* y *pirB* con respecto a los genes *hp1*, *hp2*, *hp3* y *cwsp* hasta las 18 h.p.i. (Figura 5, A y B). Esta sobreexpresión de los

genes de las toxinas sobre los otros genes mencionados, es más notable en la Figura 5, B, donde se muestra la expresión de los genes de PirAB-Tn903 ponderados en el logaritmo de la expresión, el cual ayudó a visualizar la alta sobre expresión de los genes *pirA* y *pirB.* Por otro lado, a diferencia de los genes pirA y pirB, los demás genes no muestran una correlación entre su expresión y el aumento de la densidad bacteriana durante la cinética (Figura 5, B).

A



B

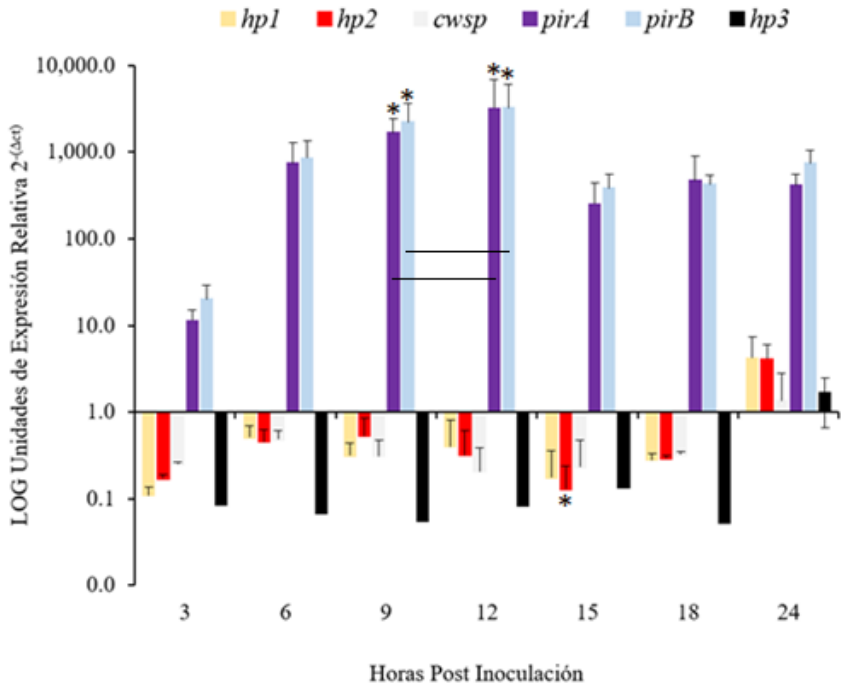


Figura 5. Expresión relativa de los genes *hp1*, *hp2*, *hp3*, *pirA*, *pirB* y *cwsp* del transposón compuesto PirAB-Tn903 de Vp M0904 a través del tiempo post inoculación. A) Expresión relativa de los genes en unidades sin logaritmo. B). Logaritmo de la expresión relativa de los genes Las Barras de error indican desviación estándar, n = 3. Los asteriscos indican diferencias significativas para cada gen individual para tiempo (p <0.05, n= 3).

Del mismo modo, al correlacionar la expresión de cada uno de los genes uno contra uno, se encontró que los genes hipotéticos *hp1* y *hp2* se encuentran altamente correlacionados (*rho* = 0.9324, p = 0.000004, n = 3), el gen *pirA* tiene una correlación moderada, aunque significativa, con hp2 (*rho* = 0.5103, p = 0.0194, n = 3), *pirB* muestra correlación con hp1 y hp2 (Tabla 9). Mientras que el gen *cwsp* tiene una alta de correlación con los genes *hp1* y *hp2*, sin embargo su correlación es mayor con *hp1*, lo que apoya la teoría que forman parte de un operon. Por último hp3 no tiene ninguna correlación con ningún gen analizado.

Cuadro 9. Coeficientes de correlación de Spearman de la expresión relativa de los genes *hp1*, *hp2*, *hp3*, *pirA*, *pirB* y *cwsp*.

	hp1	*hp2*	*hp3*	*pirA*^{vp}	*pirB*^{vp}	*cwsp*
hp1	-	*rho* = 0.9324 *p* = 0.000004	*rho* = 0.2935 *p* = 0.1960	*rho* = 0.4389 *p* = 0.0478	*rho* = 0.6090909 *p* = 0.0049	*rho* = 0.8233 *p* = 0.000002
hp2	-	-	*rho* = 0.2194 *p* = 0.3375	*rho* = 0.5103 *p* = 0.0194	*rho* = 0.5987 *p* = 0.0049	*rho* = 0.7805 *p* = 0.00004
hp3	-	-	-	*rho* = - 0.1077 *p* = 0.6409	*rho* = - 0.0142 *p* = 0.9528	*rho* = 0.3350 *p* = 0.1378
pirA^{vp}	-	-	-	-	*rho* = 0.8129 *p* = 0.000006	*rho* = 0.1012 *p* = 0.6614
pirB^{vp}	-	-	-	-	-	*rho* = 0.2857 *p* = 0.2086
cwsp	-	-	-	-	-	-

Los coeficientes de correlación van de 0 a 1, siendo 1 una correlación total y 0 correlación nula. Los valores mayores a 0.8 indican alta correlación y los valores negativos indican correlación negativa. Coeficiente de correlación de Sperman (*rho);* probabilidad de correlación correcta (*p*).

Así mismo, se encontró que los genes *hp1*, *hp3* y *cwsp* no se expresan significativamente diferente a través del tiempo post infección ($p > 0.05$, n = 3), solo *hp2* mostró tener una expresión diferencial a la hora 15 post inoculación ($p < 0.05$, n = 3).

6.2.3 Cuantificación de las Toxinas PirA^{vp} y PirB^{vp}

La concentración de las toxinas fue obtenida con base a la curva patrón de concentración de cada una de las toxinas recombinantes por separado (ANEXO 1, E). En la serie de concentración de toxinas PirA^{vp} y PirB^{vp} se pueden observar distintos valores durante la cinética de Vp M0904. PirB^{vp} se detectó con mayor concentración, con una concentración máxima a la hora 15 post inoculación de 19 ng/mL (Figura 6). La concentración de la toxina PirA^{vp} mantuvo valores por debajo de los 2 ng/ml, así mismo se detectó hasta la hora 9 post inoculación de la cinética de Vp M0904, mientras que a la hora 15 ya no fue detectable por esta técnica. No se observa una relación entre la concentración de las toxinas y la cinética bacteriana.

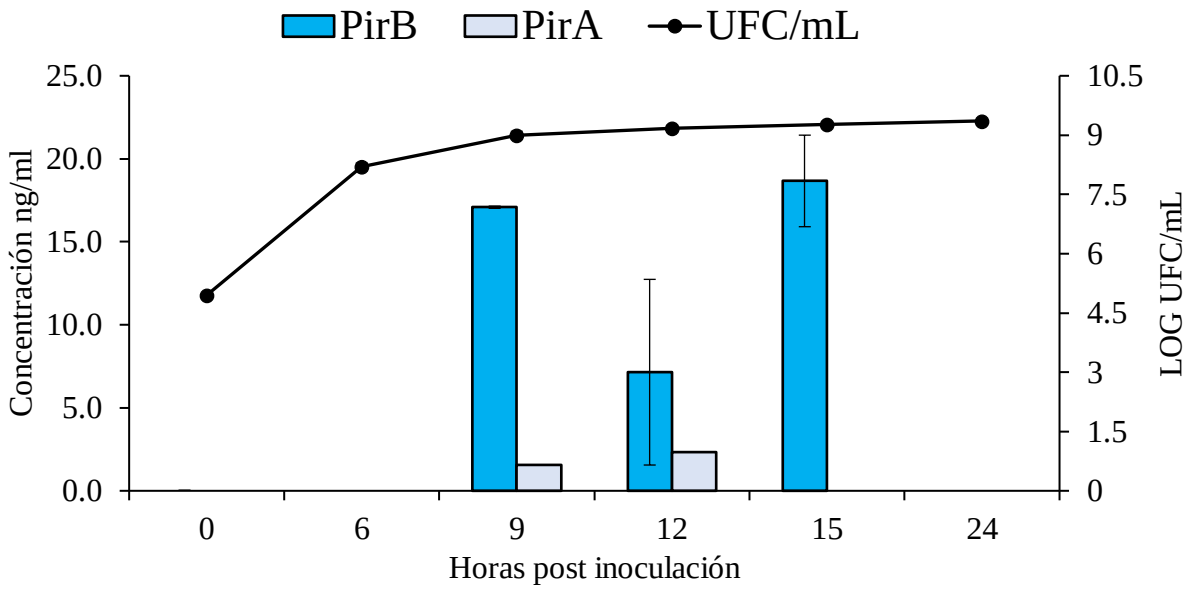


Figura 6. Concentración de toxinas PirA^{vp} y PirB^{vp} durante la cinética de *Vibrio parahaemolyticus* M0904 *in vitro*. Barras de error indican desviación estándar (n = 3).

La proteína total del medio durante la cinética de Vp M0904 se mantuvo constante hasta la hora 9, donde inicia un aumento, siendo la hora 12 post inoculación el pico mayor de concentración, posteriormente la proteína total sufre una caída de concentración a la hora 15, donde se detectó una mayor concentración de PirB^{vp} (Figura 7).

La estimación de la proteína total se calculó con base a una curva patrón de concentración de BSA (ANEXO 1 J).

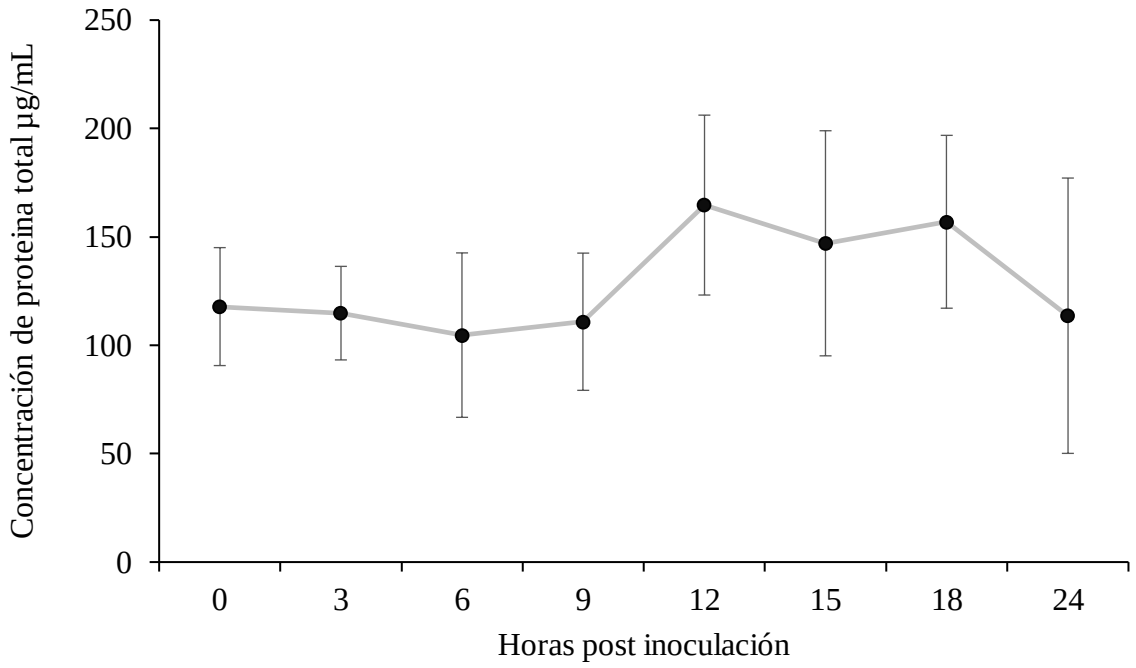


Figura 7. Concentración de proteína total con relación a curva patrón de concentración de BSA durante la cinética de *Vibrio parahaemolyticus* M0904 *in vitro*. Barras de error indican desviación estándar (n = 3).

Se observa una relación no significativa entre la concentración de proteína total y la concentración de la toxina $PirA^{vp}$, a las 9 y 12 h. p. i., $PirA^{vp}$ tiene una concentración detectable a las 9 horas y aumenta su concentración a las 12 h.p.i. sin embargo, a la hora 15 fue imposible detectarla. Por otro lado, $PirB^{vp}$ solamente muestra relación al detectarse en los puntos de mayor concentración de proteína total.

6.3 Ensayo de desafío de *Vibrio parahaemolyticus* M0904 con *Penaeus vannamei*

6.3.1 Cinética Bacteriana

Se calcularon las unidades formadoras de colonias verdes y amarillas en placas TCBS, donde se asumió que las colonias verdes corresponden a Vp M0904 y las colonias amarillas a otras especies

de *Vibrio*, al crecer solamente colonias amarillas en los controles negativos sin infección de Vp M0904 y en los acuarios infectados tener crecimiento de colonias verdes y amarillas. La densidad que se cuantificó pasados los primeros 30 minutos post inoculación fue de 2.7 x 10^5 UFC/mL para las colonias verdes y 1.01 x 10^3 UFC/mL de las colonias amarillas. La densidad de las colonias verdes se mantuvo constante durante las 15 horas post inoculación, posteriormente no fue posible cuantificar la densidad bacteriana, las diluciones para cuantificar fueron altas, por lo que se asume que la densidad bacteriana se mantuvo del orden de 10^5 UFC/mL. Mientras que la densidad de las colonias amarillas siguió un curso de crecimiento durante las primeras 9 horas, para después no poder ser detectada a la hora 12 post inoculación.

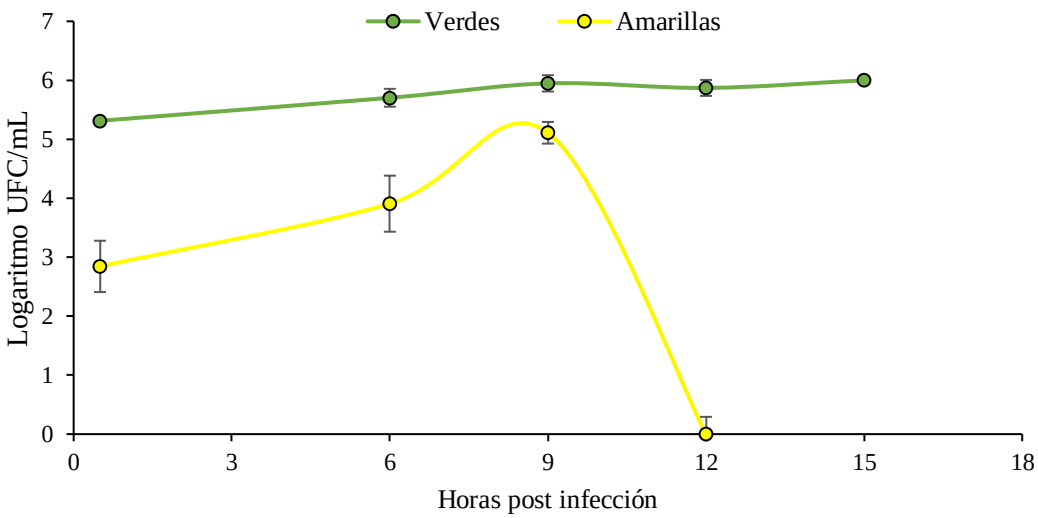


Figura 8. Cinética de densidad bacteriana de colonias verdes y amarillas durante ensayo de desafío de *Vibrio parahaemolyticus* M0904 con *Penaeus vannamei*.

6.3.2 Cuantificación de las Toxinas PirA^{vp} y PirB^{vp}

La concentración de las toxinas fue obtenida con base a la curva patrón de concentración de cada una de las proteínas por separado (ANEXO 1, F). Se encontraron diferencias en la concentración

de toxina durante el ensayo de desafío, siendo de nuevo PirB^{vp} la proteína con mayor concentración en todos los tiempos, manteniéndose con una concentración constante entre 100 y 120 ng/mL a los tiempos 0.5, 6 y 12 horas post inoculación (Figura 9).

Existe una coherencia de concentración de las toxinas, ya que de las 0.5 a las 6 h. p. i. se observó un aumento de su concentración de 103 a 112 ng/mL para PirB y PirA de 43 a 89 ng/mL, sin significancia estadística. Posteriormente, ambas toxinas decaen en concentración a la hora 12 post inoculación, PirA muestra fluctuaciones de concentración más altas que la toxina PirB. Al realizar una comparación entre la densidad bacteriana de colonias verdes que corresponden a Vp M0904 y la concentración de toxina, ambas variables muestran correlación, puesto que la densidad bacteriana pasada la primera media post infección del ensayo de desafío es menor a la densidad después de 6 h.p.i., el caso es similar en la concentración de las toxinas. Posteriormente la densidad y la concentración a las 12 horas se encuentran ligeramente disminuida.

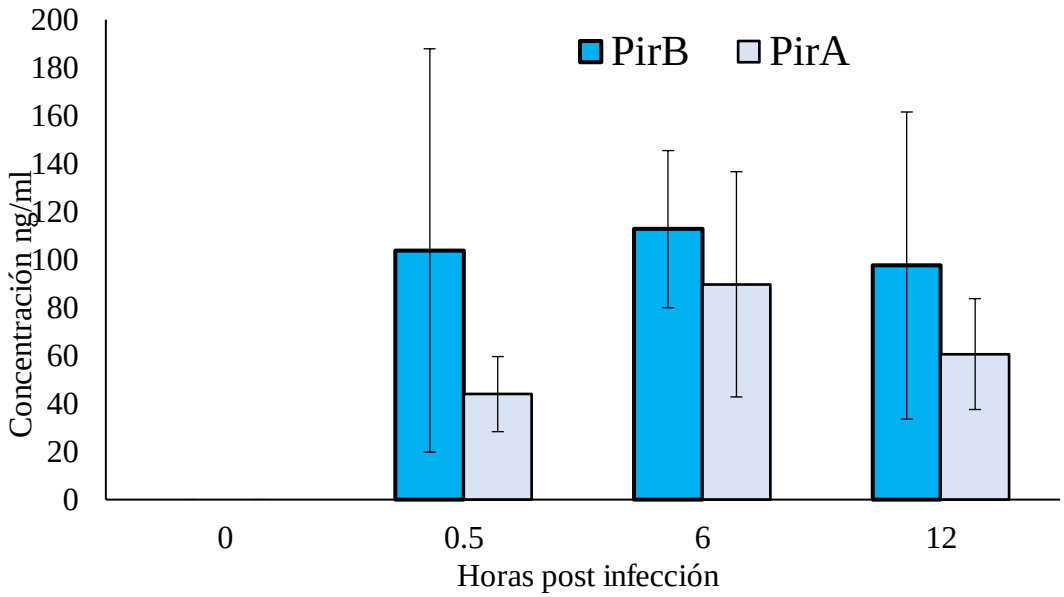


Figura 9. Concentración de toxinas PirA^{vp} y PirB^{vp} durante ensayo de desafío *Vibrio parahaemolyticus* M0904 con *Penaeus vannamei*. Barras de error indican desviación estándar (n=3).

Por otro lado se obtuvo mayor concentración no significativa a los 30 minutos post infección de PirB^{vp} que a la hora 12 post inoculación, lo que difiere de la toxina PirA^{vp}, que se encuentra en una menor concentración al inicio del desafío que a la hora 12 post inoculación (Figura 9).

6.3.3 Sobrevivencia de Camarones *Penaeus vannamei* en Desafío con *Vibrio parahaemolyticus* M0904

La primera mortalidad se obtuvo a la hora 3 post infección (Figura 10), así mismo, se observó que los organismos a partir las primeras horas exhibían signos clínicos característicos de la enfermedad como nado errático, estado de letargia y cromatóforos expandidos, así como el hepatopáncreas pálido e intestino vacío. A la hora 12 post inoculación se registró un fuerte aumento de la mortalidad de los organismos, a partir de esa hora se disminuyó sobrevivencia hasta llegar al 33% a la hora 24 post infección.

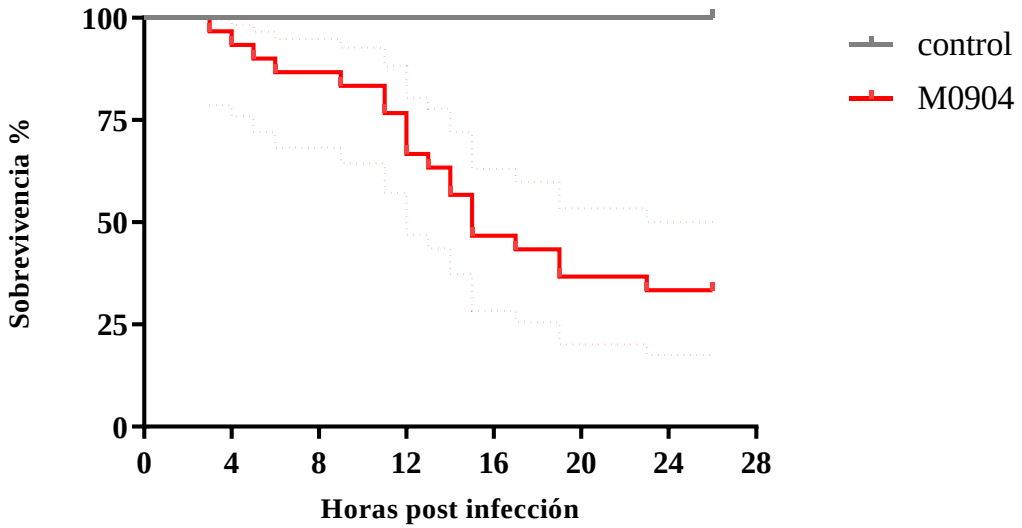


Figura 10. Curva de sobrevivencia Kaplan-Meier de camarones *Penaeus vannamei* desafiados con *Vibrio parahaemolyticus* M0904**.** Líneas punteadas indican intervalo de confianza del 95%.

7 . DISCUSIÓN

Con base a los resultados obtenidos no es posible asignar una función específica *in silico* a las proteínas hipotéticas *hp1*, *hp2* y *hp3* con alta confiabilidad. Así mismo, tampoco fue posible elucidar una función más específica de la proteína putativa de anclaje a pared celular (*cwsp*), ya que el resultado final de los programas utilizados arrojo distintos aspectos de una misma secuencia problema. Estos resultados coinciden con los de Shahbaaz y colaboradores (2013), donde trabajaron con la caracterización de la función *in silico* del proteoma hipotético de *Haemophilus influenzae* Rd KW20, obteniendo como resultado una cantidad de proteínas hipotéticas caracterizadas con alta confiabilidad y otra cantidad sin asignación de función con alta confiabilidad. Otras investigaciones realizadas al respecto concuerdan con los resultados, demostrando que hay una gran cantidad de genes anotados como proteínas hipotéticas que no es posible caracterizar la función *in silico* con alta fidelidad utilizando las herramientas bioinformáticas disponibles hasta el momento (Raj *et al*., 2017; Prava *et al*., 2018).

Por otro lado, *cwsp* fue consistente en los resultados mostrándose como una lipoproteína de membrana, las cuales tienen la capacidad de facilitar el anclaje de proteínas hidrofílicas a través de interacciones hidrófobas (Kovacs-Simons *et al*., 2011). Así mismo, la proteína Cwsp, es probable que tenga tareas de procesos celulares como translocación de proteínas, hacia la membrana, entre ellas pudiesen estar las toxinas PirA y PirB, de acuerdo a sus dominios de péptido de señal y lipoproteína de membrana LpoB (Coleman *et al*., 1985). Así mismo, la proteína Hp2 al funcionar también como un péptido de señal, podría intervenir en algún proceso de la expresión de las toxinas PirA y PirB, la expresión de los genes *hp2*, $pirA^{vp}$ y $pirB^{vp}$ presentó una correlación moderada con una significancia alta.

Este estudio analizó dos escenarios, la capacidad de *Vibrio parahaemolyticus* M0904 para expresar los genes de estudio en cultivo *in vitro*, así como el seguimiento de su crecimiento. Se observó que durante el cultivo *in vitro* Vp M0904 fue capaz de alcanzar la fase exponencial en un periodo corto de tiempo, resultado similar al que observó Aguilar Rendón (2018), poniendo de manifiesto el dato reproducible de la curva de crecimiento de Vp M0904.

Al contrario, bajo condiciones de desafío, Vp M0904 registró una densidad constante durante el bioensayo de 10^5 UFC/mL, un dato que difiere de lo observado por Vargas (2015) y Aguilar

Rendón (2018), que presenciaron un aumento de la densidad de al menos un orden de magnitud de la densidad inicial de muestras de agua de desafío con camarones. La densidad constante mostrada en este estudio puede deberse a que la cantidad de organismos desafiados durante el experimento fue menor a estudios previamente realizados, el aporte de nutrientes por parte de desechos de los camarones fue mínimo, lo que implica un estado de crecimiento lento, en ambientes acuáticos donde los nutrientes son limitados (Brown *et al*., 1977). La densidad constante mostrada en este estudio puede deberse a que la cantidad de organismos desafiados durante el experimento fue menor a estudios previamente realizados, específicamente 5 organismos por estanque menos que en el estudio de Vargas Aguilar (2015) y 12 menos que el trabajo de Aguilar Rendón (2018). Lo que podría implicar un estado de crecimiento lento ya que se desarrolló en un ambiente acuático donde los nutrientes son limitados (Brown *et al*., 1977).

Los genes analizados en el actual estudio *hp1*, *hp2*, *hp3*, *cwsp*, *pirA*^{vp} y *pirB*^{vp} tienen la característica en común de localizarse dentro de una secuencia del tipo transposón compuesto llamado PirAB-Tn903, que se ha reportado como específica de cepas causantes de la enfermedad AHPND (Han *et al*., 2015; Xiao *et al*., 2017). Así mismo, ésta secuencia pertenece únicamente al plásmido pVA-1, a diferencia de otras secuencias del plásmido pVA-1 que también se encuentran en un segundo plásmido de cepas AHPND+ y cepas inocuas (Theethakaew *et al*., 2019), lo que llevó a generar la hipótesis de que al menos uno de los genes dentro de PirAB-Tn903 se está co-expresando con *pirA*^{vp} y *pirB*^{vp}". Con base a los hallazgos obtenidos en el actual estudio se rechaza esta hipótesis y deja en manifiesto que ninguno de los genes *hp1*, *hp2*, *hp3* y *cwsp* se co-expresa los genes de la toxina *pirA*^{vp} y *pirB*^{vp}.

Se encontró una correlación positiva entre la expresión de los genes *hp1* vs *hp2*; *cwsp* vs *hp1 y cwsp vs hp2*, con alta significancia. De acuerdo a la literatura, la transcripción de un operón bacteriano depende de la misma secuencia promotora, su expresión es policistronica y la función de los genes que se están transcribiendo es coordinada y en algunos casos relacionada (Dancin *et al*., 1980; Newbury *et al*., 1987). Por lo anterior, se propone que con base a los resultados obtenidos, *hp1, hp2* y *cwsp* forman parte de un operón que realiza funciones relacionadas. Por otro lado, *hp3* resultó no correlacionarse con ninguno de los genes hipotéticos y al mismo tiempo tener una correlación negativa con los genes *pirA*^{vp} y *pirB*^{vp}. Sin embargo, ninguno de sus valores de correlación tienen significancia estadística. Cabe destacar que el gen *hp3* no se encuentra en el operón de los otros genes putativos, además su sentido es 3' a 5' hacia el gen *pirB*, siendo el único

gen codificante de su promotor. Por otro parte, los genes de las toxinas PirA^{vp} y PirB^{vp} están sobre-expresados con relación al resto de los genes analizados y también poseen una alta correlación positiva con una significancia alta, dato que difiere de lo encontrado por Vargas-Aguilar (2015), quien encontró una expresión del gen *pirB^{vp}* significativamente alta en comparación al gen *pirA^{vp}*. Sin embargo, a nivel proteína, la concentración de toxina PirB^{vp} tuvo mayor expresión que PirA^{vp}. Por otro lado, Feng y colaboradores (2017), cuantificaron la expresión génica de *pirA^{vp}*, de diferentes cepas AHPND+ cultivadas *in vitro*, encontraron que la cepa más virulenta mostro mayores niveles de expresión de *pirA*. Así mismo, Dong y colaboradores (2019), reportaron la expresión cualitativa de los genes *pirA^{vp}* y *pirB^{vp}* provenientes de muestras de tejidos de hepatopáncreas y estómago de camarón sometidos a ensayo de desafío con cepas AHPND+. Encontraron un grosor de las bandas de los dos genes similares. La cepa Vp M0904 utilizada en este estudio es una cepa altamente virulenta (Soto Rodriguez *et al*., 2015), lo que propone una relación a los altos niveles de expresión de los genes *pirA* y *pirB*. Los resultados de este estudio, y los reportados por Dong y colaboradores (2019) permiten asumir que la expresión *pirA^{vp}* y *pirB^{vp}* se encuentra coordinada.

Finalmente, la expresión de *pirA^{vp}* tiene una correlación moderada con *hp2* con significancia alta, mientras que *pirB^{vp}* se correlaciona con *hp1* y *hp2* ambos significativamente. El factor común de correlación para los genes de la toxina en este ensayo es el gen *hp2* quien tiene un dominio conservado de péptido de señal. Se ha demostrado que bacterias gram negativas utilizan distintos sistemas de secreción de proteínas en los cuales están involucrados diferentes maquinarias de secreción, uno de estos casos es dependiente de péptidos de señal, además de otros componentes para el éxito de la secreción (Lory 1992; Binet *et al*., 1997). El gen *cwsp* también contiene dominio de péptido de señal, así como de lipoproteína, lo que lleva a proponer que posiblemente el operón putativo de *hp1, hp2* y *cwsp* participa en la secreción de las toxinas PirA^{vp} y PirB^{vp} u otras proteínas del plásmido pVA-1. La expresión de los genes *pirA^{vp}* y *pirB^{vp}* fue 1000 órdenes de magnitud mayor que el resto de los genes estudiados a la hora 12 post inoculación, a ese mismo tiempo se encontró una densidad bacteriana de 1.46 x 10^9 UFC/mL, hora a partir de la cual se alcanza la fase estacionaria de la cinética de crecimiento de Vp M0904. Estos resultados muestran que los altos niveles de expresión de estos genes dependen de la etapa de crecimiento en que se encuentra Vp M0904, dicho así, la expresión de los genes de las toxinas esta correlacionada con la densidad bacteriana, a mayor crecimiento bacteriano mayor será la expresión de los genes *in vitro* hasta

alcanzar la fase estacionaria, posteriormente la expresión de los genes decae. Existe la posibilidad que un activador de la transcripción de estos genes este proporcionando la sobre expresión de estos genes, como se ha reportado en otros casos. Por ejemplo, Kuroda y colaboradores (1993), encontraron que *Bacillus subtilis* transcribe altos niveles de la enzima autolisina con ayuda del factor sigma D. Otro ejemplo es el factor sigma S, el cual actúa sobre genes dirigidos para su expresión en la fase estacionaria, entre ellos la catalasa II, de *Escherichia coli* (Gentry *et al*., 1993). Así mismo, el plásmido pVA-1 de acuerdo a distintos estudios, ha demostrado ser multicopia (Tinwonger *et al*., 2016; Aguilar Rendón, 2018), lo que podría relacionarse a la expresión diferencial a través del tiempo de los genes $pirA^{vp}$ y $pirB^{vp}$ reportado en el actual estudio. Aguilar Rendón (2018), reporto que el plásmido pVA-1 de Vp M0904 puede alcanzar 12 copias a las 12 y 24 h.p.i., para después decaer hasta 5 copias a la hora 48 post inoculación, en condiciones de desafío Vp M0904 con camarones. Lo que posiblemente se relacione a la máxima expresión de los genes $pirA^{vp}$ y $pirB^{vp}$ a la hora 12 post inoculación *in vitro* reportada en el actual estudio.

Con relación a la concentración de las toxinas $PirA^{vp}$ y $PirB^{vp}$ se comportó de manera similar en cultivo *in vitro* y en condiciones de desafío Vp M0904, donde $PirB^{vp}$ fue detectable con mayor concentración en ambos escenarios. Así mismo, la concentración *in vivo* fue 10 veces mayor que la concentración obtenida del cultivo *in vitro*. Un resultado similar fue obtenido por Jonson y colaboradores (1990), donde midieron la producción de diferentes proteínas del complejo de la toxina colérica (CT) en cultivo *in vitro* y en infección a conejos por *Vibrio cholerae* biotipo clásico. Encontraron que la concentración de CT fue altamente mayor cuando se midió *in vivo* en comparación a la concentración obtenida *in vitro.* Estos hallazgos dejan en manifiesto la posibilidad de que existe una regulación de la producción de la toxina $PirAB^{vp}$ provocada por las variables del ambiente al cual fue sometido Vp M0904. Otra posible explicación es que la diferencia de concentraciones podría deberse a errores metodológicos, como el largo almacenamiento y condiciones de conservación de las proteínas estudiadas.

La mayor mortalidad durante el ensayo de desafío de camarones con Vp M0904 se presentó a la hora 12 h.p.i. un dato que se asemeja al reportado por Soto-Rodríguez y colaboradores (2015), mostrando reproducibilidad del experimento puesto que la densidad de los inóculos de infección fueron de la orden 1.3×10^6 UFC/mL. Se presentaron mortalidades a partir de las 3 horas post inoculación, otros estudios han reportado resultados similares (Soto-Rodríguez *et al*., 2015; Aguilar-Rendón, 2018). Al corroborar este dato con la concentración de toxina pasados los 30

minutos post inoculación, permite proponer que el tiempo promedio de intoxicación a una concentración de toxina de 100 ng/mL para PirB y 40 ng/mL PirA está entre las 3 y 4 horas post inoculación. Por otro lado, la concentración mayor de PirB en comparación con PirA es consistente en otros estudios, por ejemplo Lai y colaboradores (2015), calcularon la concentración de las dos toxinas de muestras de ensayo de desafío de *Penaeus vannamei* con 5HP *Vibrio parahaemolyticus* AHPND+, las muestras de hepatopáncreas a las horas 6, 12, 18 y 24 horas post inoculación, mostraron una mayor concentración de PirB con respecto PirA. Posterior a ese tiempo, ya no fue posible detectarse.

8 CONCLUSIONES

- No fue posible asignar una función *in silico* a las proteínas hipotéticas *hp1*, *hp2* y *hp3*, tampoco fue posible asignar una función más específica de la proteína putativa de anclaje a pared celular (*cwsp*).
- Existe una alta correlación positiva y significativa entre los genes *hp1* y *hp2; cwsp* y *hp1* y entre *cwsp* y *hp2*. En cambio el gen *hp3* no mostró correlación con ninguno de los genes estudiados.
- Los genes *hp1*, *hp2* y *cwsp* aparentemente son parte de un operón con funciones coordinadas, por su alta correlación positiva y significativa y tener un solo promotor de expresión.
- La expresión de los genes $pirA^{vp}$ y $pirB^{vp}$ tienen una alta correlación positiva y se sobre-expresan en relación a los otros genes del transposón PirAB-tn903 en los tiempos 3, 6, 9, 12, 15, 18 y 24 horas post inoculación de la cinética de *Vibrio parahaemolyticus* M0904.
- La concentración de la toxina $PirB^{vp}$ fue siempre mayor que la concentración de la toxina $PirA^{vp}$, obteniéndose una proporción promedio de ~ 65:1 en ensayo *in vitro* mientras que en condiciones *in vivo* se obtuvo una proporción promedio de ~2:1 de $PirB^{vp}$ con respecto a $PirA^{vp}$.

9 RECOMENDACIONES

- Es necesario conocer la estructura putativa de las proteínas Hp1, Hp2, Hp3 y Cwsp para asumir una función más dirigida. Primeramente identificar la secuencia por MALDI-TOF, y posteriormente cristalización de las proteínas.
- Para seguir con la investigación del posible factor transcripcional que está propiciando la sobreexpresión de los genes *pirA*^{vp} y *pirB*^{vp}, se necesitan utilizar herramientas como transcriptómica para determinar las rutas que se encuentran activadas en las mismas condiciones.
- Caracterizar el proteoma hipotético de Vp M0904, para determinar si existen genes con características de factores transcripcionales.
- Hacer un análisis de los genes transcripcionales putativos de interacción proteína-proteína con la intención de determinar si existe la posibilidad de que las toxinas PirA^{vp} y PirB^{vp} estén teniendo una modificación transcripcional.

10 BIBLIOGRAFIAS

Aguilar Rendon, K. (2018). Virulencia diferencial de Vibrio parahaemolyticus causante de la enfermedad de la necrosis aguda del hepatopancreas (tesis de maestria). Centro de investigación en alimentación y desarrollo, Mazatlan, México.

Altschul, S. F., Gish, W., Miller, W., Myers, E. W., & Lipman, D. J. (1990). Basic local alignment search tool. Journal of molecular biology, 215(3), 403-410.

Berry, C., O'Neil, S., Ben-Dov, E., Jones, A. F., Murphy, L., Quail, M. A., Holden, M. T. G., Harris, D., Zaritsky, A. & Parkhill, J. (2002). Complete sequence and organization of pBtoxis, the toxin-coding plasmid of Bacillus thuringiensis subsp. Israelensis. Applied and environmental microbiology, 68(10), 5082-5095.

Berman, H. M., Battistuz, T., Bhat, T. N., Bluhm, W. F., Bourne, P. E., Burkhardt, K., ... & Fagan, P. (2002). The protein data bank. Acta Crystallographica Section D: Biological Crystallography, 58(6), 899-907.

Binet, R., Letoffe, S., Ghigo, J. M., Delepelaire, P., & Wandersman, C. (1997). Protein secretion by gram-negative bacterial ABC exporters. Folia microbiologica, 42(3), 179-183.

Brenner, S. E. (1999). Errors in genome annotation. Trends in Genetics, 15(4), 132-133.

Brown, C. M., Ellwood, D. C., & Hunter, J. R. (1977). Growth of bacteria at surfaces: influence of nutrient limitation. FEMS Microbiology Letters, 1(3), 163-166.

Bustin, S. A. (2002). INVITED REVIEW Quantification of Mrna using real-time reverse transcription PCR (RT-PCR): trends and problems. Journal of molecular endocrinology, 29, 23-39.

Caleo, M., & Schiavo, G. (2009). Central effects of tetanus and botulinum neurotoxins. Toxicon, 54(5), 593-599.

Coleman, J., Inukai, M., & Inouye, M. (1985). Dual functions of the signal peptide in protein transfer across the membrane. Cell, 43(1), 351-360.

Dhar, A. K., Piamsomboon, P., Caro, L. F. A., Kanrar, S., Adami Jr, R., & Juan, Y. S. (2019). First report of acute hepatopancreatic necrosis disease (AHPND) occurring in the USA. Diseases of aquatic organisms, 132(3), 241-247.

Danchin, A., & Ullmann, A. (1980). The coordinate expression of polycistronic operons in bacteria. Trends in Biochemical Sciences, 5(2), 51-52.

Dangtip, S., Sirikharin, R., Sanguanrut, P., Thitamadee, S., Sritunyalucksana, K., Taengchaiyaphum, S., Mavichak, R., Proespraiwong, P. & Flegel, T. W. (2015). AP4 method for two-tube nested PCR detection of AHPND isolates of Vibrio parahaemolyticus. Aquaculture Reports, 2, 158-162.

De La Peña, L. D., Cabillon, N. A. R., Catedral, D. D., Amar, E. C., Usero, R. C., Monotilla, W. D., Calpe, A.T., Fernandez, D.D. & Saloma, C. P. (2015). Acute hepatopancreatic necrosis disease (AHPND) outbreaks in Penaeus vannamei and P.monodon cultured in the

Philippines. Diseases of Aquatic Organisms, 116(3), 251–254.

Derbyshire, K. M., Hwang, L., & Grindley, N. D. (1987). Genetic analysis of the interaction of the insertion sequence IS903 transposase with its terminal inverted repeats. Proceedings of the National Academy of Sciences, 84(22), 8049-8053.

Derveaux, S., Vandesompele, J., & Hellemans, J. (2010). How to do successful gene expression analysis using real-time PCR. Methods, 50(4), 227-230.

Dong, X., Song, J., Chen, J., Bi, D., Wang, W., Ren, Y., Wang, H., Wang, G., Tang, K., Wang, X. & Huang, J. (2019). Conjugative transfer of the pVA1-type plasmid carrying the pirABvp genes results in the formation of new AHPND-causing Vibrio. Frontiers in cellular and infection microbiology, 9, 195.

Duong-Ly, K. C., & Gabelli, S. B. (2014). Salting out of proteins using ammonium sulfate precipitation. In Methods in enzymology (Vol. 541, pp. 85-94). Academic Press.

Durán-Avelar, M. D. J., Vázquez-Reyes, A., González-Mercado, A. L., Zambrano-Zaragoza, J. F., Ayón-Pérez, M. F., Agraz-Cibrián, J. M., Gutierrez-Franco, J. & Vibanco-Pérez, N. (2018). pirA-and pirB-like gene identification in Micrococcus luteus strains in Mexico. Journal of fish diseases, 41(11), 1667-1673.

Eisenstein, E., Gilliland, G. L., Herzberg, O., Moult, J., Orban, J., Poljak, R. J., Banerjei, L., Richardson, D. & Howard, A. J. (2000). Biological function made crystal clear—annotation of hypothetical proteins via structural genomics. Current Opinion in Biotechnology, 11(1), 25-30.

Engvall, E., & Perlmann, P. (1972). Enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA: III. Quantitation of specific antibodies by enzyme-labeled anti-immunoglobulin in antigen-coated tubes. The Journal of Immunology, 109(1), 129-135.

Feng, B., Liu, H., Wang, M., Sun, X., Pan, Y., & Zhao, Y. (2017). Diversity analysis of acute hepatopancreatic necrosis disease-positive Vibrio parahaemolyticus strains. Aquaculture and Fisheries, 2(6), 278-285.

Finn, R. D., Mistry, J., Tate, J., Coggill, P., Heger, A., Pollington, J. E., … & Holm, L. (2009). The Pfam protein families database. Nucleic acids research, 38(suppl_1), D211-D222.

Flegel, T. W. (2012). Historic emergence, impact and current status of shrimp pathogens in Asia. Journal of invertebrate pathology, 110(2), 166-173.

Foo, S. M., Han Eng, W. W., Lee, Y. P., Gui, K., & Gan, H. M. (2017). New Sequence Types of Vibrio parahaemolyticus Isolated from Malaysian Aquaculture Pond, as Revealed by Whole-Genome Sequencing. Genome Announcement, 5(19), 17–19.

Galitsky, N., Cody, V., Wojtczak, A., Ghosh, D., Luft, J. R., Pangborn, W., & English, L. (2001). Structure of the insecticidal bacterial δ-endotoxin Cry3Bb1 of Bacillus thuringiensis. Acta Crystallographica Section D: Biological Crystallography, 57(8), 1101-1109.

Galperin, M. Y. (2001). Conserved 'hypothetical'proteins: new hints and new puzzles. International Journal of Genomics, 2(1), 14-18.

Galperin, M. Y., & Koonin, E. V. (2004). 'Conserved hypothetical'proteins: prioritization of targets for experimental study. Nucleic acids research, 32(18), 5452-5463.

Gentry, D. R., Hernandez, V. J., Nguyen, L. H., Jensen, D. B., & Cashel, M. (1993). Synthesis of the stationary-phase sigma factor sigma s is positively regulated by ppGpp. Journal of bacteriology, 175(24), 7982-7989.

Gomez-Gil, B., Soto-Rodríguez, S., Lozano, R., & Betancourt-Lozano, M. (2014). Draft genome sequence of Vibrio parahaemolyticus strain M0605, which causes severe mortalities of shrimps in Mexico. Genome announcements, 2(2), e00055-14.

Grochulski, P., Masson, L., Borisova, S., Pusztai-Carey, M., Schwartz, J. L., Brousseau, R., & Cygler, M. (1995). Bacillus thuringiensisCrylA (a) Insecticidal Toxin: Crystal Structure and Channel Formation. Journal of molecular biology, 254(3), 447-464.

Guruprasad, K., Reddy, B. B., & Pandit, M. W. (1990). Correlation between stability of a protein and its dipeptide composition: a novel approach for predicting in vivo stability of a protein from its primary sequence. Protein Engineering, Design and Selection, 4(2), 155-161.

Han, J. E., Tang, K. F., & Lightner, D. V. (2015a). Genotyping of virulence plasmid from Vibrio parahaemolyticus isolates causing acute hepatopancreatic necrosis disease in shrimp. Diseases of aquatic organisms, 115(3), 245-251.

Han, J. E., Tang, K. F., Tran, L. H., & Lightner, D. V. (2015b). Photorhabdus insect-related (Pir) toxin-like genes in a plasmid of Vibrio parahaemolyticus, the causative agent of acute hepatopancreatic necrosis disease (AHPND) of shrimp. Diseases of aquatic organisms, 113(1), 33-40.

Hulo, N., Bairoch, A., Bulliard, V., Cerutti, L., De Castro, E., Langendijk-Genevaux, P. S., Pagni, M. & Sigrist, C. J. (2006). The PROSITE database. Nucleic acids research, 34(suppl_1), D227-D230.

Ijaq, J., Malik, G., Kumar, A., Das, P. S., Meena, N., Bethi, N., Sundararajan, V. S. & Suravajhala, P. (2019). A model to predict the function of hypothetical proteins through a nine-point classification scoring schema. BMC bioinformatics, 20(1), 14.

Ikai, A. (1980). Thermostability and aliphatic index of globular proteins. The Journal of Biochemistry, 88(6), 1895-1898.

Jones, G. W. (2006). Novel Bacillus sphaericus binary toxin active against bin-resistant culex mosquito larvae. Cardiff University.

Joshi, J., Srisala, J., Truong, V. H., Chen, I. T., Nuangsaeng, B., Suthienkul, O., Lo, C. F., Flegel, T. W., Sritunyalucksana, K. & Thitamadee, S. (2014). Variation in Vibrio parahaemolyticus isolates from a single Thai shrimp farm experiencing an outbreak of

Kelley, L. A., Mezulis, S., Yates, C. M., Wass, M. N., & Sternberg, M. J. (2015). The Phyre2 web portal for protein modeling, prediction and analysis. Nature protocols, 10(6), 845.

Kondo, H., Van, P. T., Dang, L. T., & Hirono, I. (2015). Draft genome sequence of non-Vibrio parahaemolyticus acute hepatopancreatic necrosis disease strain KC13. 17.5, isolated from diseased shrimp in Vietnam. Genome announcements, 3(5), e00978-15.

Koonin, E. V., Mushegian, A. R., Galperin, M. Y., & Walker, D. R. (1997). Comparison of archaeal and bacterial genomes: computer analysis of protein sequences predicts novel functions and suggests a chimeric origin for the archaea. Molecular microbiology, 25(4), 619-637.

Kovacs-Simon, A., Titball, R. W., & Michell, S. L. (2011). Lipoproteins of bacterial pathogens.

Infection and immunity, 79(2), 548-561.

Krogh, A., Larsson, B., Von Heijne, G., & Sonnhammer, E. L. (2001). Predicting transmembrane protein topology with a hidden Markov model: application to complete genomes. *Journal of molecular biology*, *305*(3), 567-580.

Kyte, J., & Doolittle, R. F. (1982). A simple method for displaying the hydropathic character of a protein. Journal of molecular biology, 157(1), 105-132.

Kuroda, A. K. I. O., & Sekiguchi, J. U. N. I. C. H. I. (1993). High-level transcription of the major Bacillus subtilis autolysin operon depends on expression of the sigma D gene and is affected by a sin (flaD) mutation. Journal of bacteriology, 175(3), 795-801.

Ladant, D., Alouf, J. E., & Popoff, M. R. (2005). The comprehensive sourcebook of bacterial protein toxins. Elsevier.

Lai, H. C., Ng, T. H., Ando, M., Lee, C. T., Chen, I. T., Chuang, J. C., Mavichak, R. Chang, S. H., Yeh, M. D., Chiang, Y. A., Takeyama, H., Hamaguchi, H., Lo, C. F., Aoki, T. & Wang, H. C. (2015). Pathogenesis of acute hepatopancreatic necrosis disease (AHPND) in shrimp. Fish & shellfish immunology, 47(2), 1006-1014.

Leaño, E. M., & Mohan, C. V. (2012). Early mortality syndrome threatens Asia's shrimp farms. Global Aquaculture Advocate, 2012(7/8), 38-39.

Lee, C. T., Chen, I. T., Yang, Y. T., Ko, T. P., Huang, Y. T., Huang, J. Y., Huang, M. F., Lin, S. J., Chen, C. Y., Lin, S. S. & Lightner, D. V. (2015). The opportunistic marine pathogen Vibrio parahaemolyticus becomes virulent by acquiring a plasmid that expresses a deadly toxin. Proceedings of the National Academy of Sciences, 112(34), 10798-10803.

Lee, S. J., & Park, K. (1994). Protein interaction with surfaces: Separation distance-dependent interaction energies. Journal of Vacuum Science & Technology A: Vacuum, Surfaces, and Films, 12(5), 2949-2955.

Li, K., Liu, L., Zhan, J., Scippo, M. L., & Dalsgaard, A. (2019). Evaluation of antimicrobial products used in tilapia (Oreochromis spp.) and whiteleg shrimp (Litopenaeus vannamei) aquaculture. Aquaculture Research.

Lightner, D. V., Redman, R. M., Pantoja, C. R., Noble, B. L., & Tran, L. (2012). Early mortality syndrome affects shrimp in Asia. Global Aquaculture Advocate, 15(1), 40.

Liu, L., Xiao, J., Xia, X., Pan, Y., Yan, S., & Wang, Y. (2015). Draft genome sequence of Vibrio owensii strain SH-14, which causes shrimp acute hepatopancreatic necrosis disease. Genome announcements, 3(6), e01395-15.

Livak, K. J., & Schmittgen, T. D. (2001). Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta CT}$ method. Methods, 25(4), 402-408.

Lory, S. T. E. P. H. E. N. (1992). Determinants of extracellular protein secretion in gram-negative bacteria. Journal of bacteriology, 174(11), 3423.

Masuyer, G., Conrad, J., & Stenmark, P. (2017). h estructure of the tetanus toxin reveals Ph-mediated domain dynamics. EMBO reports, 18(8), 1306-1317.

Morse, R. J., Yamamoto, T., & Stroud, R. M. (2001). Structure of Cry2Aa Suggests an Unexpected Receptor Binding Epitope. Structure, 9, 409-417.

Natale, D. A., Galperin, M. Y., Tatusov, R. L., & Koonin, E. V. (2000). Using the COG database to improve gene recognition in complete genomes. Genetica, 108(1), 9-17.

Newbury, S. F., Smith, N. H., & Higgins, C. F. (1987). Differential mRNA stability controls relative gene expression within a polycistronic operon. Cell, 51(6), 1131-1143.

Nielsen, H. (2017). Predicting secretory proteins with SignalP. In *Protein function prediction* (pp. 59-73). Humana Press, New York, NY.

Nielsen, H., & Krogh, A. (1998, July). Prediction of signal peptides and signal anchors by a hidden Markov model. In *Ismb* (Vol. 6, pp. 122-130).

Nunan, L., Lightner, D., Pantoja, C., & Gomez-Jimenez, S. (2014). Detection of acute hepatopancreatic necrosis disease (AHPND) in Mexico. Diseases of aquatic organisms, 111(1), 81-86.

Okinaka, R. T., Cloud, K., Hampton, O., Hoffmaster, A. R., Hill, K. K., Keim, P., Koehler, T. M., Lamke, G., Kumano, S., Mahillon, J. & Manter, D. (1999). Sequence and organization of Pxo1, the large Bacillus anthracis plasmid harboring the anthrax toxin genes. Journal of bacteriology, 181(20), 6509-6515.

Pellegrini, M., Marcotte, E. M., Thompson, M. J., Eisenberg, D., & Yeates, T. O. (1999). Assigning protein functions by comparative genome analysis: protein phylogenetic profiles. Proceedings of the National Academy of Sciences, 96(8), 4285-4288.

Prava, J., Pranavathiyani, G., & Pan, A. (2018). Functional assignment for essential hypothetical proteins of Staphylococcus aureus N315. International journal of biological macromolecules, 108, 765-774.

ProtParam, E. (2017). ExPASy-ProtParam tool.

Quevillon, E., Silventoinen, V., Pillai, S., Harte, N., Mulder, N., Apweiler, R., & Lopez, R. (2005). InterProScan: protein domains identifier. Nucleic acids research, 33(suppl_2), W116-W120.

Raffestin, S., Dupuy, B., Marvaud, J. C., & Popoff, M. R. (2005). BotR/A and TetR are alternative RNA polymerase sigma factors controlling the expression of the neurotoxin and associated protein genes in Clostridium botulinum type A and Clostridium tetani. Molecular microbiology, 55(1), 235-249.

Raj, U., Sharma, A. K., Aier, I., & Varadwaj, P. K. (2017). In silico characterization of hypothetical proteins obtained from Mycobacterium tuberculosis H37Rv. Network Modeling Analysis in Health Informatics and Bioinformatics, 6(1), 5.

Rao, X., Huang, X., Zhou, Z., & Lin, X. (2013). An improvement of the 2ˆ (–delta delta CT) method for quantitative real-time polymerase chain reaction data analysis. Biostatistics, bioinformatics and biomathematics, 3(3), 71.

Restrepo, L., Bayot, B., Betancourt, I., & Pinzón, A. (2016). Draft genome sequence of pathogenic bacteria Vibrio parahaemolyticus strain Ba94C2, associated with acute hepatopancreatic necrosis disease isolate from South America. Genomics data, 9, 143-144.

Riojas, M. A., Kiss, K., McKee, M. L., & Hazbón, M. H. (2015). Multiplex PCR for Species-Level Identification of Bacillus anthracis and Detection of Pxo1, Pxo2, and Related Plasmids.

Schnepf, E., Crickmore, N. V., Van Rie, J., Lereclus, D., Baum, J., Feitelson, J., Zeigler, D. R. &

Dean, D. H. (1998). Bacillus thuringiensis and its pesticidal crystal proteins. Microbiology and molecular biology reviews, 62(3), 775-806.

Shahbaaz, M., ImtaiyazHassan, M., & Ahmad, F. (2013). Functional annotation of conserved hypothetical proteins from Haemophilus influenzae Rd KW20. PloS one, 8(12), e84263.

Sirikharin, R., Taengchaiyaphum, S., Sanguanrut, P., Chi, T. D., Mavichak, R., Proespraiwong, P., Nuangsaeng, B., Thitanadee, S., Flegel, T. W. & Sritunyalucksana, K. (2015). Characterization and PCR detection of binary, Pir-like toxins from Vibrio parahaemolyticus isolates that cause acute hepatopancreatic necrosis disease (AHPND) in shrimp. PloS one, 10(5), e0126987.

Sivashankari, S., & Shanmughavel, P. (2006). Functional annotation of hypothetical proteins–A review. Bioinformation, 1(8), 335.

Smith, T. J., Hill, K. K., Foley, B. T., Detter, J. C., Munk, A. C., Bruce, D. C., & Brettin, T. S. (2007). Analysis of the neurotoxin complex genes in Clostridium botulinum A1-A4 and B1 strains: BoNT/A3,/Ba4 and/B1 clusters are located within plasmids. PloS one, 2(12), e1271.

SOFIA. (2018). El estado mundial de la pesca y la acuicultura 2018. Cumplir los objetivos del desarrollo sustentable. FAO, 17-24. https://www.fao.org/documents/card/en/c/I9540ES

Soto-Rodriguez, S. A., Gomez-Gil, B., Lozano-Olvera, R., Betancourt-Lozano, M., & Morales-Covarrubias, M. S. (2015). Field and experimental evidence of Vibrio parahaemolyticus as the causative agent of acute hepatopancreatic necrosis disease of cultured shrimp (Litopenaeus vannamei) in Northwestern Mexico. Applied and environmental microbiology, 81(5), 1689-1699.

Tan, J. S., & Martic, P. A. (1990). Protein adsorption and conformational change on small polymer particles. Journal of Colloid and Interface science, 136(2), 415-431.

Theethakaew, C., Nakamura, S., Motooka, D., Matsuda, S., Kodama, T., Chonsin, K., Suthienkul, O. & Iida, T. (2019). Plasmid dynamics in Vibrio parahaemolyticus strains related to shrimp Acute Hepatopancreatic Necrosis Syndrome (AHPNS). Infection, Genetics and Evolution, 51, 211-218.

Tran, L., Nunan, L., Redman, R. M., Mohney, L. L., Pantoja, C. R., Fitzsimmons, K., & Lightner, D. V. (2013). Determination of the infectious nature of the agent of acute hepatopancreatic necrosis syndrome affecting penaeid shrimp. Diseases of aquatic organisms, 105(1), 45-55.

Tinwongger, S., Nochiri, Y., Thawonsuwan, J., Nozaki, R., Kondo, H., Awasthi, S. P., Hinenoya, A., Yamasaki, S. & Hirono, I. (2016). Virulence of acute hepatopancreatic necrosis disease Pir AB-like relies on secreted proteins not on gene copy number. Journal of applied microbiology, 121(6), 1755-1765.

Tusnady, G. E., & Simon, I. (2001). The HMMTOP transmembrane topology prediction server. Bioinformatics, 17(9), 849-850.

Udvardi, M. K., Czechowski, T., & Scheible, W. R. (2008). Eleven golden rules of quantitative RT-PCR. The Plant Cell, 20(7), 1736-1737.

Untergasser, A., Cutcutache, I., Koressaar, T., Ye, J., Faircloth, B. C., Remm, M., & Rozen, S. G. (2012). Primer3—new capabilities and interfaces. Nucleic acids research, 40(15), e115-e115.

Vargas Aguilar, A. (2015). Factores de virulencia de Vibrio parahaemolyticus asociado a la

Enfermedad Necrosis Aguda del Hepatopáncreas del Camarón (tesis de maestría). Centro de investigación en alimentación y desarrollo, Culiacan, México.

Xiao, J., Liu, L., Ke, Y., Li, X., Liu, Y., Pan, Y., Yan, S. & Wang, Y. (2017). Shrimp AHPND-causing plasmids encoding the PirAB toxins as mediated by pirAB-Tn903 are prevalent in various Vibrio species. Scientific reports, 7, 42177.

Yang, Y. T., Chen, I. T., Lee, C. T., Chen, C. Y., Lin, S. S., Hor, L. I., Tseng, T. C., Sritunyalucksana, K., Thitamadee, S. & Wang, H. C. (2014). Draft genome sequences of four strains of Vibrio parahaemolyticus, three of which cause early mortality syndrome/acute hepatopancreatic necrosis disease in shrimp in China and Thailand. Genome announcements, 2(5), e00816-14.

11. ANEXOS

11.1. Material de Apoyo para Analisis Bioinformáticos y Experimentación

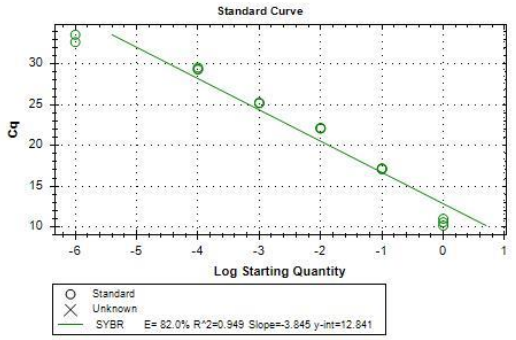
A) Secuencias de Nucleótidos Utilizada como Entrada para las Herramientas Bioinformáticas

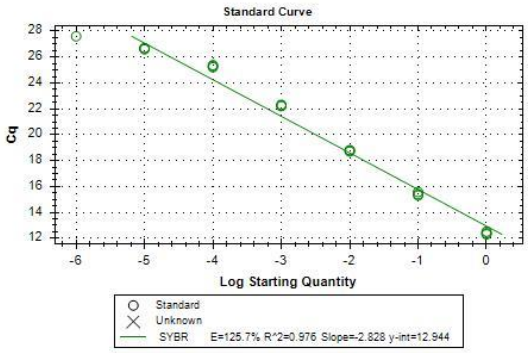
```
>M0904_hp1
ATGAACGTATTAAAGGTTATAGATAAACATATTAAAAACGATTCAACGGAGCATGATAATTTAGTGACTTTTATTGATGTAAATAGAGAGGTGATACCAAACGCAGATAAGATAATTGATCTTTTGTGTCGCCATGAAACAGAAA
CAAAACGCTATCATGCAATGTTACGAACTGAAATTGTTGAACTACTAAAAAGAGGAAAATAA
>M0904_hp2
ATGAAATGGTTAATGCTTATTTTTATTGGTGGTTGCACCGTAAATTTTCAGGTTGAAACTACTTCTACAGCACAAAGTGGAAATGGTGAACTTGCGGAAGTCATTGAAACAAAAGAAACAAGCGAAACGGATGCCCAAGTCTTTC
CTGTAAAATGA
>M0904_hp3
TTATGCTTCAATATCGAACATGACATTAAGACCGTTAATTCTATGTCTTAGATTGCAACGCCTTGCTTTGAACTTATAACTTAGCGTATCACCGCCTCCAATATTTTTAGCTGTAACCACTAATTTAAATGCAGCGCCATTAAAG
AAATTTCCTTGCAGCATGATGTTTTGCTTCTTTCTAGACGCCATATATTTTTGTAAATGTTGATTGTTCATATTCAATTTATAACCGCGTACGTTTGGAAGAAAGATTTCCTCTGTAGCGACTGTGAACGGCATTTCATCATCAA
AATTACAATCATTCATATGACCATATCTTGATGAGTGCAAACGACCGAACTCAGTACCGAAATGAGTAGTGAACAAAGCGGGGAACTCAATATTTAAATTTTCCCCTCTTGCGCAAGCTTGGACCGCCGTTAAGATATATGTTGA
ATCAGCAAAAGCTTTACCACCTGATTCGACAAAATGAGCAATCAAATTTAGAATCGCAATTCTTGATTGGCTACTTGTAGATGAGTTGTAAGGTTCCCATACACAGGGATCAAATCCATCATTTACTAGTAGGACAACTTTTTTA
ACAAACTCTTTATCGTATGATTTCTTTGTTGCTTTTGGACTATTTGTATGGCTTTGTTGCGTAAT
>M0904_cwsp
ATGAAATTTATAATTTTAATATTAGCATTTTTATTGTCCGCTTGTTCCACTCAGCCAGTGCTTCAAGCGTCCCATTCGAAAGATTTTTATCCGGCAATGGGACACTCTTTTGTTCCTTTGGATACCACAGATTTTGCATACGGCA
TTACTAATAATCATGGGGCAATCGTTGTTTCTGAGGACGGCGTTTATATGATAGTAGCAGCCCCGCAAGTCGGCTGTATGATGTGTGACGGCGAGTTTAGGTTATGGTTAAGCGTTAACGGAAAGTACGTTGAAAACTCAAATGT
ACTGCTTAACGTTGACGACTCAATTAAGGATGTAATCATTTCACAAGGCGCAATCCCTCTAAAAGCTGGCGATGTTGTGCAAGTAATGATGTATGGAGACAACGGAATTGGGCTTGAGGCAATCAACCGTGCAAACGAACCCTTA
GTGCCAGCGATCATTTTTACCATGTATAAGGTAAGTAACTAA
```

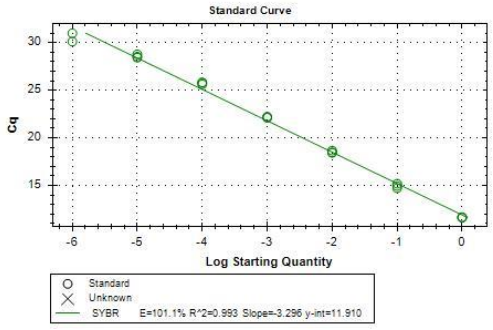
B) Secuencia de Aminoácidos Utilizada comoEentrada para las Herramientas Bioinformáticas

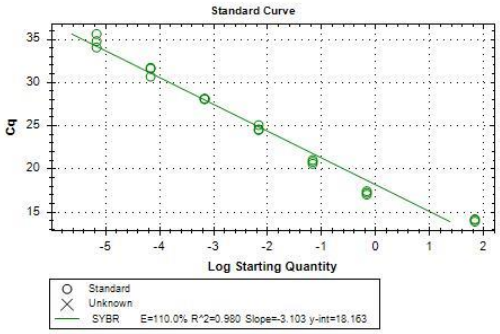
```
>M0904_hp1_traduccion
MNVLKVIDKHIKNDSTEHDNLVTFIDVNREVIPNADKIIDLLCRHETETKRYHAMLRTEIVELLKRGK
>M0904_hp2_traduccion
MKWLMLIFIGGCTVNFQVETTSTAQSGNGELAEVIETKETSETDAQVFPVK
>M0904_hp3_traducion
LCFNIEHDIKTVNSMS*IATPCFELIT*RITASNIFSCNH*FKCSAIKEISLQHDVLLLSRRHIFL*MLIVHIQFITAYVWKKDFLCSDCERHFIIKITIIHMTIS**VQTTELSTEMSSEQSGELNI*IFPSCASLDRR*DIC*
ISKSFTT*FDKMSNQI*NRNS*LATCR*VVRFPYTGIKSIIY**DNFFNKLFIV*FLCCFWTICMALLRN
>M0904_cwsp_traduccion
MKFIILILAFLLSACSTQPVLQASHSKDFYPAMGHSFVPLDTTDFAYGITNNHGAIVVSEDGVYMIVAAPQVGCMMCDGEFRLWLSVNGKYVENSNVLLNVDDSIKDVIISQGAIPLKAGDVVQVMMYGDNGIGLEAINRANEPL
VPAIIFTMYKVSN
```

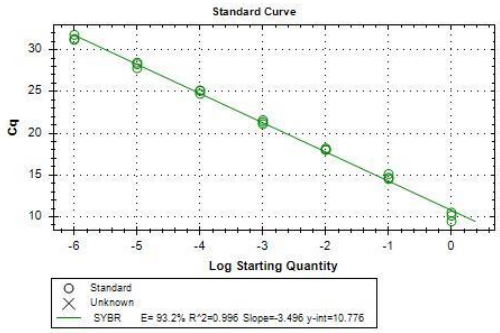
C) Curvas Estándar de amplificación de los genes.

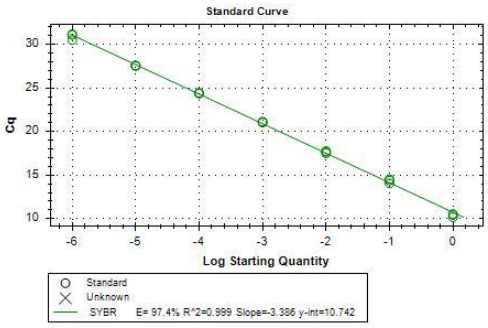


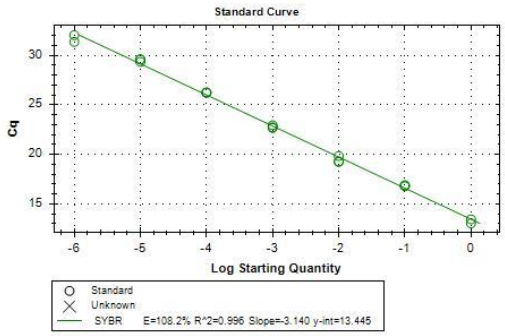


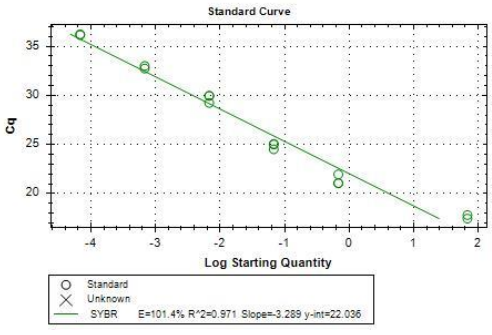




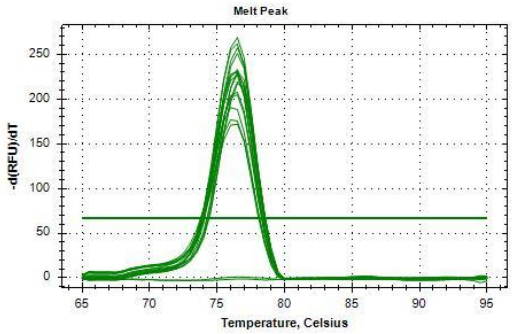


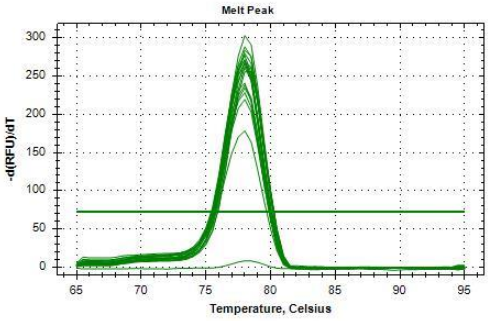


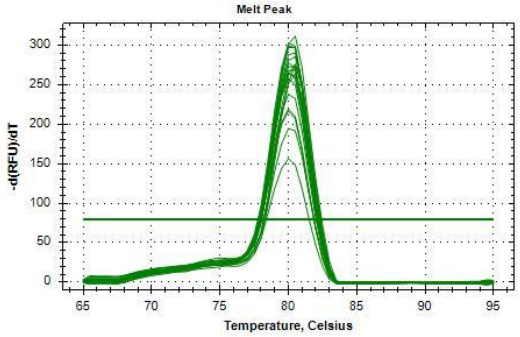


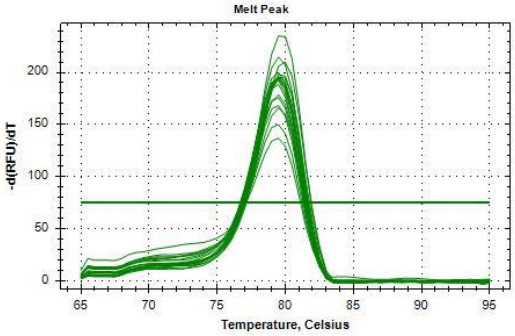


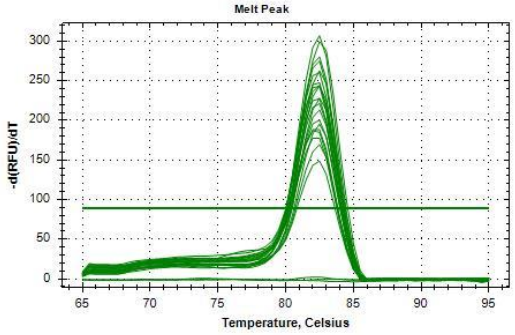
D) Picos de disociación de la reacción de amplificación.

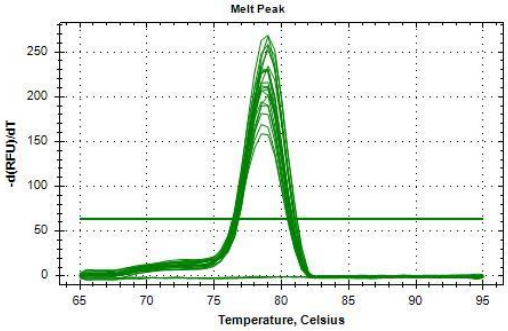

Melt Peak
-d(RFU)/dT
Temperature, Celsius

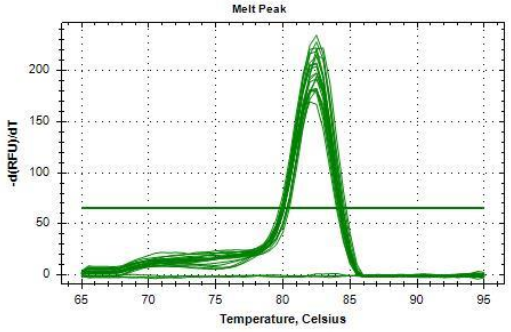

Melt Peak
-d(RFU)/dT
Temperature, Celsius

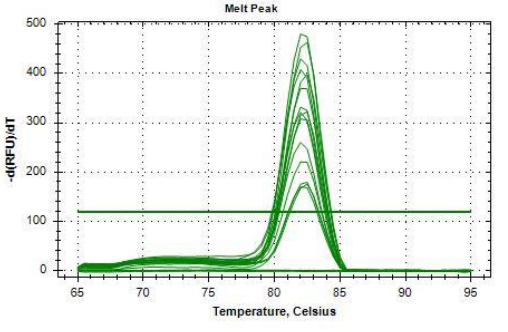

Melt Peak
-d(RFU)/dT
Temperature, Celsius


Melt Peak
-d(RFU)/dT
Temperature, Celsius


Melt Peak
-d(RFU)/dT
Temperature, Celsius


Melt Peak
-d(RFU)/dT
Temperature, Celsius

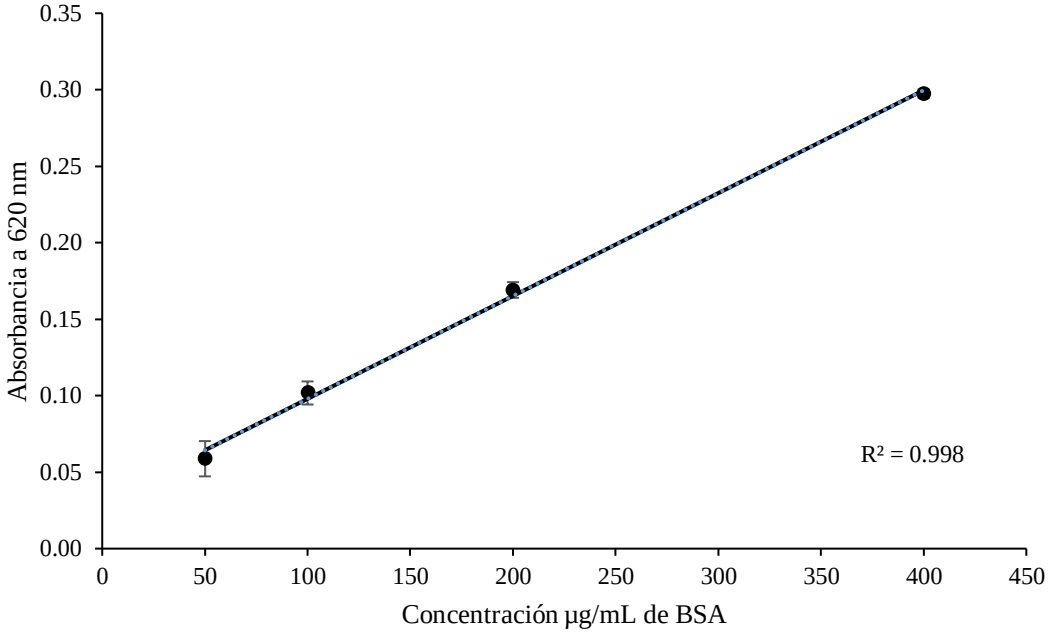

Melt Peak
-d(RFU)/dT
Temperature, Celsius


Melt Peak
-d(RFU)/dT
Temperature, Celsius

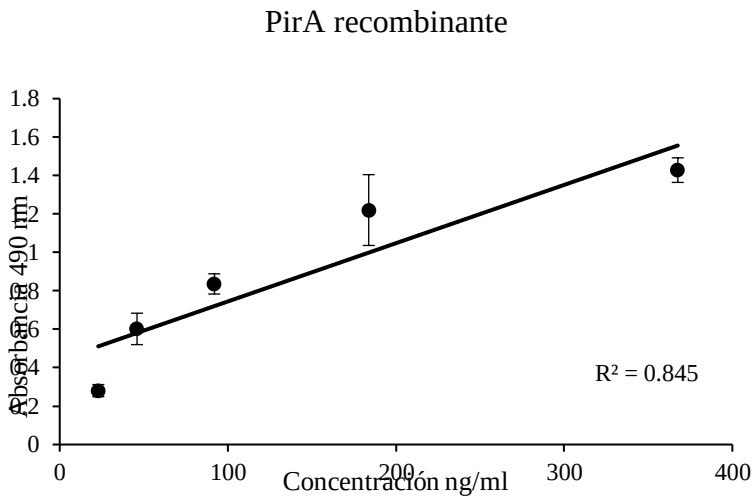
Melt Peak
-d(RFU)/dT
Temperature, Celsius

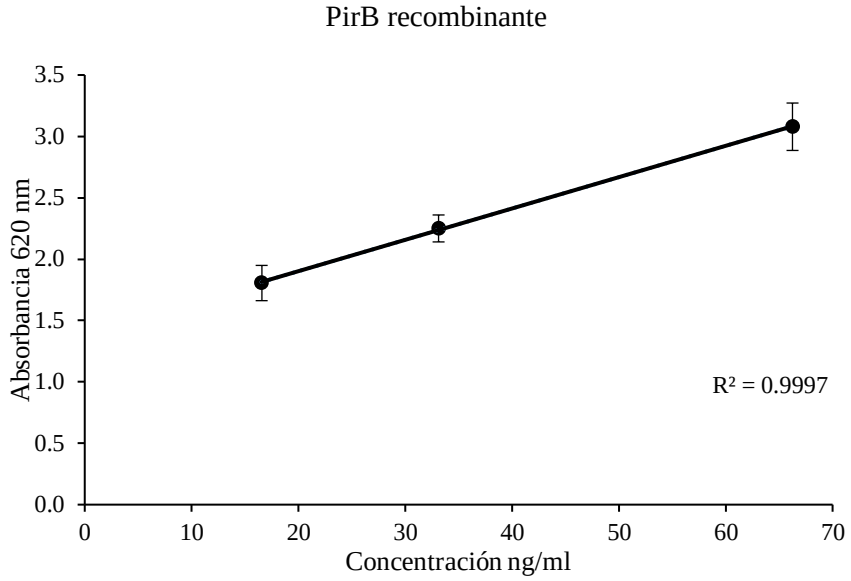
Melt Peak
-d(RFU)/dT
Temperature, Celsius

E) Curva patrón de concentración de BSA esta curva va antes de la recombinantes.

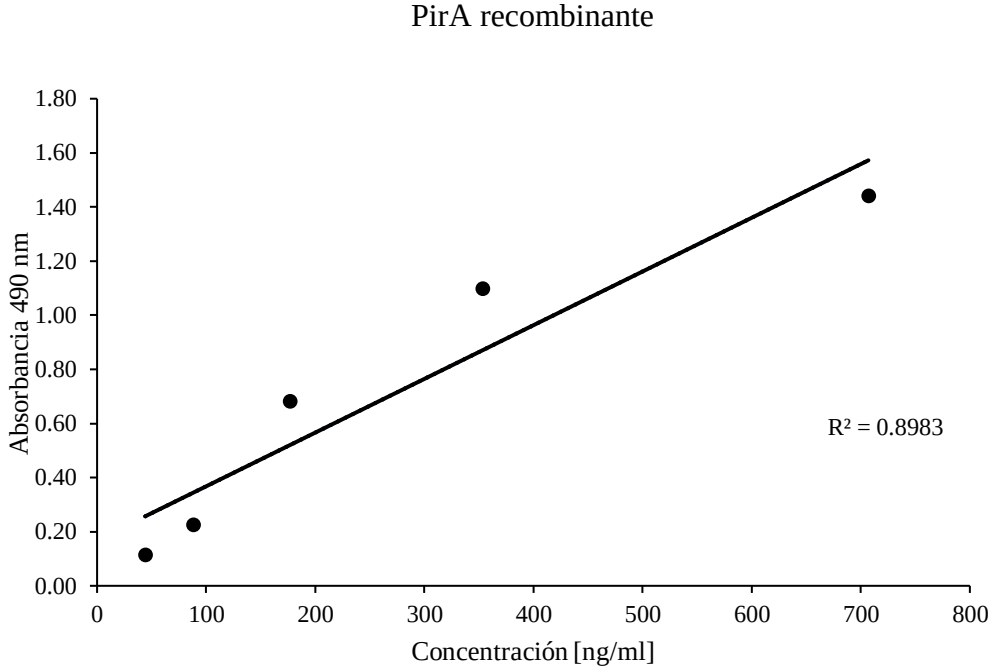


F) Curvas patrón de concentración de toxina PirA y PirB recombinante para cuantificación de toxinas en cultivo *in vitro*.

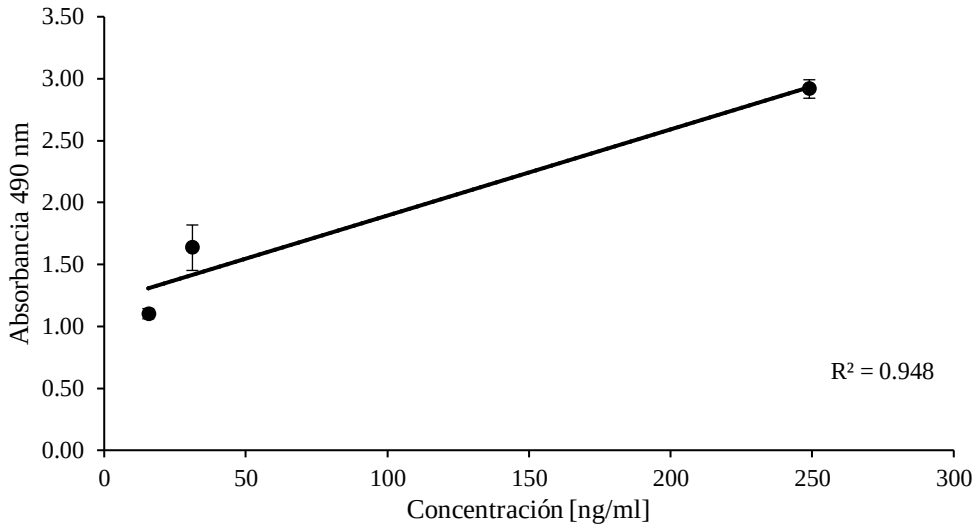




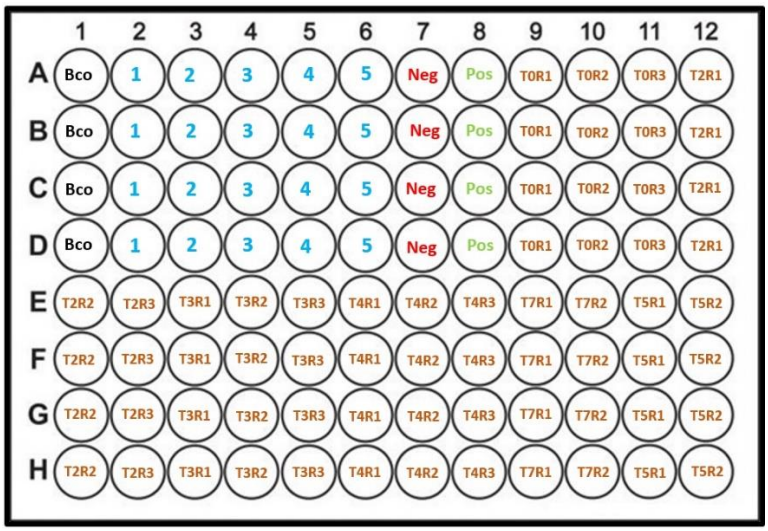
G) Curvas patrón de concentración de toxina PirA y PirB recombinante para cuantificación de toxinas en condiciones de desafío Vp M0904 con *Penaeus vannamei*.



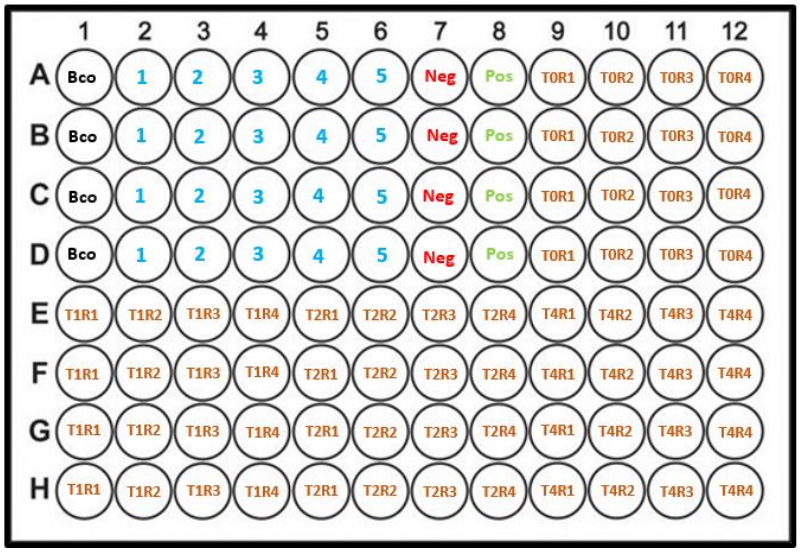
PirB recombinante



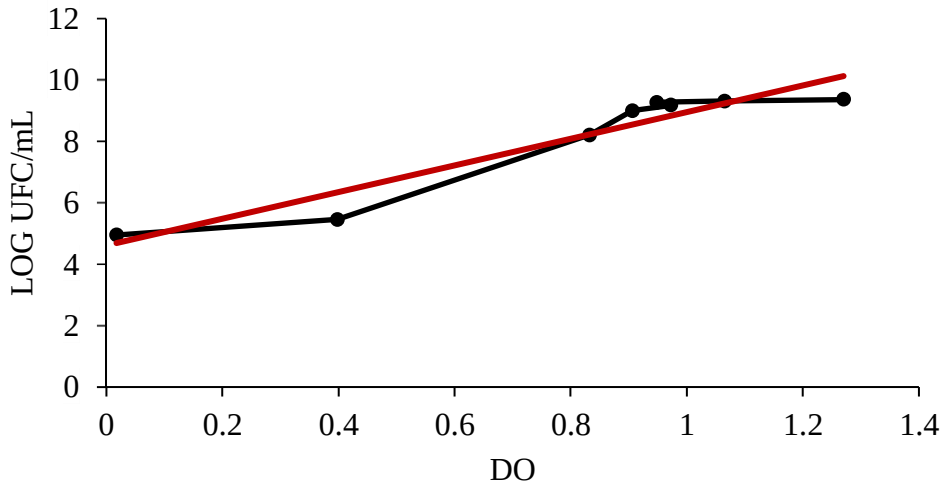
H) Figura 3. Esquema de cargado de muestras en microplaca para cuantificación de toxinas PirA^{vp} y PirB^{vp} por ELISA indirecta. En los primeros cuatro pocillos de la columna 1 se cuantifico el blanco, las columnas 2, 3, 4, 5 y 6 se utilizaron para la construcción de la curva patrón de concentración, columnas 7 y 8 son controles negativo y positivo respectivamente. Las muestras problema se cargaron en todos los pocillos restantes, iniciando en la columna 9.



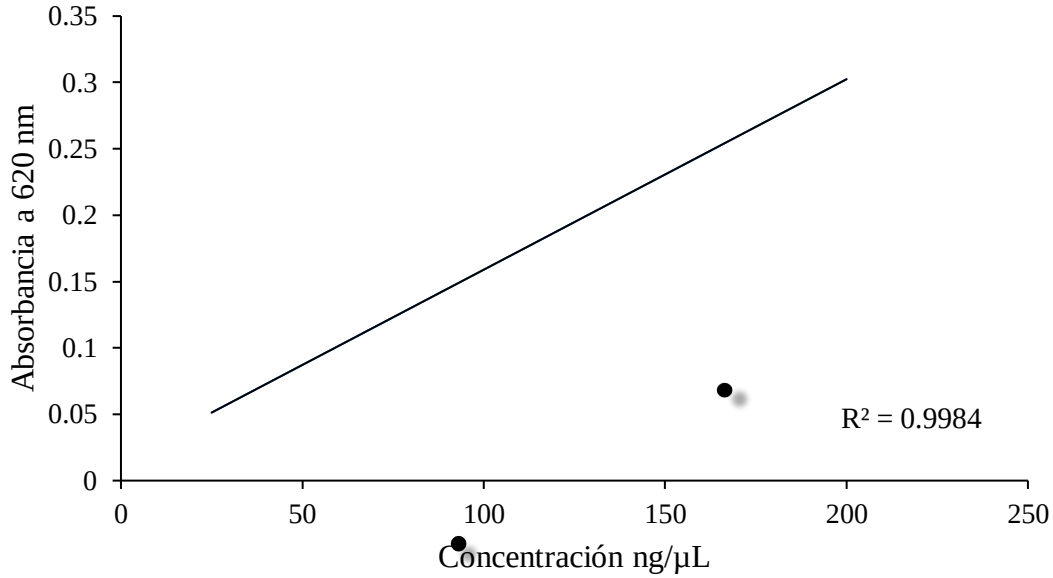
I) Esquema de cargado de muestras en micro placa para cuantificación de toxinas PirA^{vp} y PirB^{vp} por ELISA indirecta en desafio de *Vibrio parahaemolyticus* M0904 con *Penaeus vannamei*. En los primeros cuatro pocillos de la columna 1 se cuantifico el blanco, las columnas 2, 3, 4, 5 y 6 se utilizaron para la construcción de la curva patrón de concentración, columnas 7 y 8 son controles negativo y positivo respectivamente. Las muestras problema se cargaron en todos los pocillos restantes, iniciando en la columna 9.



J) Figura 6. Gráfico de correlación entre DO y UFC/Ml.



K)



11.2. Protocolos de Experimentación

A. Extracción de RNA Total c/Trisue

1. Homogenizar la muestra con pistilo en 500 µl de Trisure.
2. Incubar 5 minutos a temperatura ambiente.
3. Añadir 100 µl de cloroformo y agitar vigorosamente.
4. Incubar 3 minutos a temperatura ambiente.
5. Centrifugar a 12,000 g por 15 minutos a 4 ºC.
6. Transferir el sobrenadante a un tubo limpio.
7. Añadir 250 µl de isopropanol al tubo con sobrenadante y agitar un poco.
8. Incubar a temperatura ambiente por 15 minutos.
9. Centrifugar a 12,000 g por 10 min a 4 ºC.
10. Retirar el sobrenadante.
11. Añadir 500 µl de etanol 70% (al pellet).
12. Centrifugar a 12,000 g por 5 minutos a 4 µC.
13. Retirar sobrenadante.
14. Añadir 50 µl de agua DEPC y resuspender el pelet.

B. Digestión con TURBO DNA-Free Kit (Invitrogen)

1. Agregas 0.1 volumen de 10x TURBO DNAsa buffer y 1 µl de TURBO DNAsa al RNA y mezclar cuidadosamente.
2. Tratamiento de rutina: (<200µg Ac. Nucleicos/ml) Agregar 1 µl de TURBO DNAsa por 10 µg de RNA en 50 µl.
3. Tratamiento riguroso: (<200 µg de Ac. Nucleicos/ml) Diluir la muestra en 10 µg en 50 µl antes de añadir la TURBO DNAsa.
4. Incubar a 37°C por 30 minutos.

Nota: El tratamiento riguroso se recomienda añadir la mitad de la enzima e incubar por 30 minitos y después agregar la otra mitad e incubar por 30 minutos más.

5. Añadir el reactivo inactivador de DNAsa (resuspender por vortex).
   Nota: si se usa el tratamiento riguroso se agregan 0.2 volúmenes del reactivo inactivador de la

DNAsa.

6. Incubar 5 minutos a temperatura ambiente y mezclar ocasionalmente con el dedo.
7. Centrifugar a 12,000 g por 1.5 minutos a temperatura ambiente y transferir el sobrenadante a un tubo nuevo.

L) Síntesis de cDNA

1. Mezclar 5 µl de RNA con 1 µl de Random
2. Incubar a 70 °C por 10 mininutos.
3. Poner muestras en hielo por 1 minuto y centrifugar 1 minuto.
4. Preparar mezcla:

Reactivos	1x
Agua DEPC	7.7
Buffer 5x M-MLV	4
dNTP's	1
RNA sin*	0.5
M.MLV	0.8
Total:	14

5. Añadir 14 µl de la mezcla a cada tubo
6. Incubar a t° ambiente por 10 minutos.
7. Incubar a 45 °C por 1 h.
8. Incubar de 90-95 °C por 5 minutos.
9. Poner muestras en hielo 1 minuto y centrifugar 1 minuto.
10. Almacenar a –20 °C.