



UNIVERSIDAD DE SONORA

DIVISIÓN DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y DE LA SALUD
DEPARTAMENTO DE INVESTIGACIONES CIENTÍFICAS Y
TECNOLÓGICAS

POSGRADO EN BIOCENCIAS

**IDENTIFICACIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE LAS
PROTEÍNAS INTEGRALES DE MEMBRANA DE LA
BACTERIA DE LA NECROSIS
HEPATOPANCREÁTICA Y DE LA CEPA ATCC17802
Y CEPA 22 DE *Vibrio parahaemolyticus*.**

TESIS

que para obtener el grado de:

DOCTOR EN BIOCENCIAS

presenta:

JESÚS ALBERTO PÉREZ ACOSTA

Hermosillo, Sonora, México

12 de enero de 2018

Universidad de Sonora

Repositorio Institucional UNISON



"El saber de mis hijos
hará mi grandeza"



Excepto si se señala otra cosa, la licencia del ítem se describe como openAccess

DERECHOS DE AUTOR

El presente trabajo de tesis se presenta como uno de los requisitos parciales para la obtención del grado de **Doctor en Biociencias** de la Universidad de Sonora.

Se deposita en la biblioteca de Ciencias Biológicas y de la Salud para ponerla a disposición de los interesados. Se permiten citas breves del material contenido en la tesis sin permiso del autor, siempre y cuando se otorgue el crédito correspondiente. Para reproducir, o en su caso referirse a este documento en forma parcial o total, se deberá solicitar la autorización al Coordinador del Programa del Posgrado.

Bajo cualquier otra circunstancia se debe solicitar permiso directamente al autor.

Atentamente

Jesús Alberto Pérez Acosta

Autor

Dra. Nohemí Gámez Meza

Coordinadora del Programa de Doctorado en Biociencias

IDENTIFICACIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE LAS PROTEÍNAS INTEGRALES DE
MEMBRANA DE LA BACTERIA DE LA NECROSIS HEPATOPANCREÁTICA Y
DE LA CEPA ATCC17802 Y CEPA 22 DE *Vibrio parahaemolyticus*.

TESIS

que para obtener el grado de:
DOCTOR EN BIOCENCIAS

presenta:

JESÚS ALBERTO PÉREZ ACOSTA

Hermosillo, Sonora, México.

Enero de 2018

APROBACIÓN

Los miembros del Comité designado para revisar la tesis intitulada "Identificación y caracterización de las proteínas integrales de membrana de la bacteria de la necrosis hepatopancreática y de la cepa ATCC17802 y cepa 22 de *Vibrio parahaemolyticus*" presentada por Jesús Alberto Pérez Acosta la han encontrado satisfactoria y recomiendan que sea aceptada como requisito parcial para obtener el grado de Doctor en Biociencias.



Dr. Luis Rafael Martínez Córdova
Director y Presidente



Dr. Marcel Martínez Porchas
Co-Director



Dr. Luis Enrique Gutiérrez Millán
Sinodal interno y Secretario



Dr. Marco Antonio López Torres
Sinodal interno



Dra. Teresa Gollas Galván
Sinodal externo

DEDICATORIA

A MI FAMILIA

AGRADECIMIENTOS

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología ((Conacyt), a la Universidad de Sonora y al Posgrado en Biociencias (DICTUS), por su apoyo en la realización de este trabajo.

A el **Dr. José Ángel Huerta Ocampo**, por apoyarme y ayudarme a crecer como persona y como profesionista.

A la **M.C. Dolores Alicia Vásquez Del Castillo**, por su amabilidad y disponibilidad en cada paso de mi acreditación de Doctorado.

Agradezco a los miembros de mi comité. **Dr. Luis Rafael Martínez Córdova, Dr. Marcel Martínez Porchas, Dr. Luis Enrique Gutiérrez Millán, Dr. Marco Antonio López Torres y Dra. Teresa Gollas Galván** por sus acertados comentarios, consejos y valiosa contribución en este trabajo.

RESUMEN

Candidatus hepatobacter penaei y *Vibrio parahaemolyticus* están clasificadas como proteobacterias, Gram negativas, intracitoplasmáticas y tolerantes a la sal. Causan enfermedades en los camarones de cultivo representando una importante amenaza para la actividad camaronícola. El objetivo del presente trabajo es identificar proteínas transmembranales de una cepa de *Candidatus* Hepatobacter penaei y de las cepas ATCC 17802 y 22 de *Vibrio parahaemolyticus*, homólogas de los factores de patogenicidad de organismos filogenéticamente cercanos. Debido a la baja concentración de muestra obtenida para *Candidatus* Hepatobacter penaei se realizó la identificación de genes y deducción de proteínas utilizando el servidor público GeneMark. En el caso de *Vibrio parahaemolyticus*, se empleó un método para la extracción secuencial de proteínas integrales de membrana de ambas cepas y se procedió al análisis de cuantificación relativa mediante LC-MS/MS por el método de iTRAQ. (isobaric tags for relative and absolute quantification). La identificación de proteínas se realizó contra las proteínas de ambas bacterias reportadas en el NCBI y con la ayuda del software MASCOT. Las proteínas únicas se agruparon con base en su localización celular, función molecular y proceso biológico en el que participan mediante la herramienta Blast2GO. La identificación de proteínas de membrana reconocidas como factores de patogenicidad en *Candidatus* Hepatobacter penaei y *Vibrio parahaemolyticus* permitió generar un posible modelo de infección para las cepas analizadas.

ABSTRACT

Candidatus hepatobacter penaei and *Vibrio parahaemolyticus* are classified as proteobacteria, Gram negative, intracytoplasmic and salt tolerant. They cause disease in shrimp farming, posing a major threat to shrimp farming. The objective of the present work is to identify transmembrane proteins of a strain of *Candidatus* Hepatobacter penaei and strains ATCC 17802 and 22 of *Vibrio parahaemolyticus*, homologous to the pathogenicity factors of phylogenetically close organisms. Due to the low sample concentration obtained for *Candidatus* Hepatobacter penaei we performed the gene identification and protein deduction using the GeneMark public server. In the case of *Vibrio parahaemolyticus*, a method was used for the sequential extraction of integral membrane proteins from both strains and the relative quantification analysis was performed by LC-MS / MS by the iTRAQ method. (Isobaric tags for relative and absolute quantification). Protein identification was performed against the proteins of both bacteria reported in NCBI and with the help of MASCOT software. The unique proteins were grouped based on their cellular location, molecular function and biological process in which they participate through the Blast2GO tool. The identification of membrane proteins recognized as pathogenicity factors in *Candidatus* Hepatobacter penaei and *Vibrio parahaemolyticus* allowed to generate a possible model of infection for the strains analyzed.

INDICE GENERAL

	Página
APROBACIÓN	i
DEDICATORIA	ii
AGRADECIMIENTOS	iii
RESUMEN	iv
ABSTRACT	v
ÍNDICE DE FIGURAS	viii
ÍNDICE DE TABLAS	ix
INTRODUCCIÓN	1
I. ANTECEDENTES	4
II. HIPOTESIS	6
III. OBJETIVOS	7
3.1 Objetivo general	7
3.2 Objetivos específicos	7
IV. MATERIALES Y MÉTODOS	8
4.1. Aislamiento y cultivo de cepas de <i>V. parahaemolyticus</i>	8
4.2. Aislamiento de <i>Candidatus</i> <i>Hepatobacter penaei</i> por el método de centrifugación en gradiente de densidad con percoll	8
4.3. Extracción y cuantificación completas de proteínas integrales de membrana de <i>Candidatus</i> <i>Hepatobacter penaei</i> y <i>Vibrio parahaemolyticus</i>	9
4.4. Digestión de las proteínas de la membrana y etiquetado ITRAQ en muestras de <i>Vibrio parahaemolyticus</i>	9
4.5. Cromatografía líquida-Análisis de espectrometría de masa en tándem (LC-MS/MS) en muestras de <i>Vibrio parahaemolyticus</i>	11
4.6. Identificación de proteínas y cuantificación relativa por selección de precursor sincrónico (SPS) -MS3, en muestras de <i>Vibrio parahaemolyticus</i>	11
4.7. Análisis de ontología genética, en muestras de <i>Vibrio parahaemolyticus</i> ...	12
4.8. Predicción de genes codificantes de proteínas en muestras de <i>Candidatus</i> <i>Hepatobacter penaei</i>	13
4.9. Análisis de identidad de las secuencias de aminoácidos deducidas en muestras de <i>Candidatus</i> <i>Hepatobacter penaei</i>	13
4.10. Análisis de dominios conservados en muestras de <i>Candidatus</i> <i>Hepatobacter penaei</i>	13
4.11. Alineamiento múltiple de las secuencias de aminoácidos en muestras de <i>Candidatus</i> <i>Hepatobacter penaei</i>	14

	Página
V. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	15
5.1. Extracción secuencial de proteínas de <i>Vibrio parahaemolyticus</i>	15
5.2. Identificación de proteínas de <i>Vibrio parahaemolyticus</i> y cuantificación relativa por ITRAQ	17
5.3. Proteínas de <i>Vibrio parahaemolyticus</i> relacionadas con la adherencia	21
5.4. Sistemas de secreción de <i>Vibrio parahaemolyticus</i>	22
5.5. División celular de <i>Vibrio parahaemolyticus</i>	23
5.6. Proteínas de transporte de <i>Vibrio parahaemolyticus</i>	23
5.7. Proteínas de <i>Vibrio parahaemolyticus</i> implicadas en el proceso de lisogenización	24
5.8. Proteínas de <i>Vibrio parahaemolyticus</i> implicadas en el movimiento y producción de ATP	25
5.9. Factores de virulencia de <i>Vibrio parahaemolyticus</i>	25
5.10. Resistencia a la fagocitosis de <i>Vibrio parahaemolyticus</i>	26
5.11. Identificación de los ORFs obtenidos a partir de la secuenciación del genoma de la cepa de <i>Candidatus</i> Hepatobacter penaei	27
5.12. Identidad y notación funcional para las 96 proteínas integrales de membrana reconocidas como factores de patogenicidad en la cepa de <i>Candidatus</i> Hepatobacter penaei aislada en México	28
5.13. Proteínas de <i>Candidatus</i> Hepatobacter penaei relacionadas con la adherencia	33
5.14. Sistemas de secreción de <i>Candidatus</i> Hepatobacter penaei	33
5.15. División celular de <i>Candidatus</i> Hepatobacter penaei	35
5.16. Proteínas de transporte de <i>Candidatus</i> Hepatobacter penaei	36
5.17. Proteínas de <i>Candidatus</i> Hepatobacter penaei implicadas en el movimiento y producción de ATP	39
5.18. Factores de virulencia de <i>Candidatus</i> Hepatobacter penaei	40
VI. CONCLUSIONES	44
VIII. RECOMENDACIONES	46
IX. LITERATURA CITADA	47

INDICE DE FIGURAS

Figura		Página
1	Extracción de proteínas citoplasmáticas solubles y débilmente unidas de las cepas ATCC17802 y 22 de <i>Vibrio parahaemolyticus</i> .	15
2	Extracción de proteínas integrales de membrana de las cepas ATCC17802 y 22 de <i>Vibrio parahaemolyticus</i> .	16
3	Clasificación funcional de proteínas de membrana de <i>Vibrio parahaemolyticus</i> identificadas por LC-MS/MS y cuantificadas relativamente por ITRAQ.	18
4	Posible modelo de invasión para la cepa 22 de <i>Vibrio parahaemolyticus</i> inferido con base en las proteínas integrales de membrana encontradas.	27
5	Clasificación funcional de proteínas integrales de membrana de <i>Candidatus</i> <i>Hepatobacter penaei</i> .	32
6	Funciones ejercidas por proteínas transmembranales inferidas a través del análisis bioinformático de secuencia genómica y consideradas como factores de virulencia de la bacteria causante de necrosis hepatopancreática <i>Candidatus</i> <i>Hepatobacter penaei</i> .	42
7	Posible modelo de invasión para <i>Candidatus</i> <i>Hepatobacter penaei</i> y otros OTR que se puede inferir gracias a las proteínas integrales de membrana encontradas a través del análisis bioinformático de secuencia genómica.	43

INDICE DE TABLAS

Tabla		Página
1	Proteínas integrales de membrana identificadas como factores de patogenicidad en <i>Vibrio parahaemolyticus</i>	20
2	Proteínas de membrana integral deducidas del genoma de <i>Candidatus</i> <i>Hepatobacter penaei</i> e identificadas como factores de patogenicidad.	28
3	Identificación mediante análisis bioinformático de proteínas integrales de membrana reconocidas como factores de patogenicidad en la cepa de <i>Candidatus</i> <i>Hepatobacter penaei</i> aislada en México.	29

INTRODUCCIÓN

La camaronicultura, particularmente la del camarón blanco del Pacífico (*Litopenaeus vannamei*) es una de las actividades más rentables a nivel mundial; sin embargo, estos cultivos son continuamente afectados por enfermedades causadas por diversos factores, entre los que destacan los alimenticios, medioambientales y propios del sistema de cultivo como mala calidad del agua, presencia de patógenos, etcétera, con las consecuentes pérdidas económicas (FAO, 2014; COSAES, 2014). Se ha establecido que existe una gran variedad de agentes del tipo biológico que pueden ser causantes de estas enfermedades, entre los que se encuentran hongos, protozoos, metazoos, virus y bacterias (Morales *et al.*, 2011). Dentro de las bacterias más importantes causantes de enfermedades en camarón se encuentra la bacteria causante de necrosis hepatopancreática *Candidatus* Hepatobacter penaei y la causante del síndrome de la muerte temprana *Vibrio parahaemolyticus* (Morales *et al.*, 2011; Nunan *et al.*, 2013; Soto *et al.*, 2015; Zorriehzahra y Banaederakhshan, 2015).

Candidatus Hepatobacter penaei es una α -proteobacteria intracelular pleomórfica Gram negativa. Su forma predominante es de cocobacilo, es móvil, con un tamaño alrededor de 0.32 μm de diámetro, exhibiendo una membrana trilaminar, sin flagelos; con una sección transversal constricta en la parte central, indicando replicación por fisión binaria (Krol *et al.*, 1991, Frelief *et al.*, 1992). Otro fenotipo observado es el de una bacteria helicoidal, que oscila entre los 0.59-1.18 μm de longitud y 0.36 μm de ancho (Loy *et al.*, 1996), posee una membrana trilaminar con ocho flagelos en el vértice basal y 1 o 2 en la cresta. También se ha descrito un tercer fenotipo, el cual presenta la morfología de las dos variantes antes descritas, lo que sugiere diferentes estadios de desarrollo bacteriano desde la forma replicativa de cocobacilo a la forma elíptica (Lightner *et al.*, 1992).

Por su cercanía filogenética se puede catalogar a *Candidatus* Hepatobacter penaei como un organismo tipo tickettsia (OTR) debido a que presenta características endosimbióticas al desarrollarse y multiplicarse dentro de las células hepatopancreáticas E, R, F y B de camarón. Es patógena para *Plesionika edwardsii*, *Cherax quadricarinatus*, *Penaeus marginatus*, *Penaeus monodon*, *Penaeus stylirostris* y *L. vannamei* (Morado *et al.*, 1988; Krol *et al.*, 1991; Lightner *et al.*, 1992; Nunan *et al.*, 2013; Zewen *et al.*, 2012; Gollas *et al.*, 2013).

Los síntomas observables de *Candidatus* Hepatobacter penaei en camarón aparecen regularmente en la fase aguda de la enfermedad, incluyen anorexia, letargia, atrofia muscular abdominal, exoesqueleto blando, disminución de la tasa de crecimiento e intestinos vacíos (Briñez *et al.*, 2003). Otros signos indirectos incluyen oscurecimiento de branquias, lesiones cutáneas, melanización, erosión de apéndices y cromatóforos expandidos (Bradley *et al.*, 2004). En la fase aguda es cuando se observa la mayor mortalidad, seguida de la fase crónica en la que se observa el hepatopáncreas de color más oscuro y visiblemente atrofiado (Morales y Cuellar, 2014).

Vibrio parahaemolyticus es una γ -proteobacteria Gram-negativa en forma de bastón, oxidasa positiva, facultativamente aeróbica, no forma esporas, es móvil, con un solo flagelo polar, se encuentra en ambientes estuarinos, marinos y costeros; es patógeno para almejas, calamares, cangrejos y ostras, pero predominantemente para camarón blanco (*Litopenaeus vannamei*), ya que posee el plásmido VPA3-1 que codifica para una toxina binaria (PirA y PirB), siendo reconocido como el agente causal del síndrome de mortalidad temprana (EMS) (Han *et al.*, 2015).

EMS es transferido por vía oral por los detritos que se encuentran en la columna de agua y el fondo del estanque, colonizando el tracto digestivo, produciendo una toxina binaria (PirA y PirB) y causando en la fase aguda una disfunción de las células del hepatopáncreas, en donde se destruyen las células E, R, F y B, y además producen el desprendimiento de las células epiteliales tubulares, inflamación hemocítica y necrosis muy marcada del hepatopáncreas. En la fase terminal, adicional al desprendimiento de las células epiteliales, se presenta una infección secundaria bacteriana masiva (Phiwsaiya *et al.*, 2017).

Como ya se mencionó anteriormente *Vibrio parahaemolyticus* y *Candidatus* Hepatobacter penaei son bacterias gam-negativas, es decir, posee doble membrana; estructuralmente integrada por una membrana plasmática, espacio periplásmico, peptidoglicanos y una membrana externa que contiene proteínas integrales y periféricas (Cournia *et al.*, 2015). Las proteínas integrales de membrana juegan un rol medular en los procesos de invasión e infección sobre la célula hospedera, al funcionar como receptores, canales, transportadores y enzimas, responsables de la transducción de señales, los procesos

reguladores, así como la adhesión celular y las interacciones célula-ambiente (Vit y Petrak, 2017). Es por ello que el objetivo del presente trabajo fue identificar proteínas transmembranales de una cepa de *Candidatus Hepatobacter penaei* y de las cepas ATCC 17802 y 22 de *Vibrio parahaemolyticus*, que son homólogas de los factores de patogenicidad de organismos filogenéticamente cercanos. La identificación de proteínas de membrana reconocidas como factores de patogenicidad en *Candidatus Hepatobacter penaei* y *Vibrio parahaemolyticus* permitió generar posibles modelos de infección para las cepas analizadas.

I. ANTECEDENTES

Candidatus Hepatobacter penaei se ha detectado en múltiples crustáceos marinos y desde entonces, se ha catalogado de diferentes maneras. En principio fue conocida como bacteria de la necrosis hepatopancreática (BNHP) (Ibarra *et al.*, 2007), mientras que en años recientes fue registrada como *Candidatus* Hepatobacter penaei (Nunan *et al.*, 2013, Leyva *et al.*, 2017).

Se han descrito diferentes proteínas integrales de membrana implicadas en los mecanismos de patogenicidad de *Candidatus* Hepatobacter penaei, incluyendo adhesión, invasión e infección de células hospederas. Esto permite inferir posibles modelos de invasión sobre células hepatopancreáticas de camarón y otras funciones (O'Boyle y Boyd, 2014; Pérez *et al.*, 2017). Las proteínas transmembranales encontradas intervienen desde la adhesión inicial mediada por Sca5 con Ku70 de la célula hospedera (Chan *et al.*, 2009), seguida por la activación de Sca0, Sca1, Sca2 y Sca4 que interactúan con receptores de adhesión y receptores de invasión de la célula hospedera provocando la fagocitosis. Esto ocurre a pesar de que la célula hospedera no es una célula fagocítica; sin embargo, esto da acceso a la bacteria dentro del citosol en un fagosoma o endosoma, que es posteriormente lisado por hemolisina C y fosfolipasa D (Kleba *et al.*, 2010; Noriega *et al.*, 2015; Yang *et al.*, 2016). Una vez ocurrido este proceso, la bacteria está lista para su replicación por fisión binaria ya sea en el mismo citosol o puede emigrar al núcleo de la célula afectada ya que RickA y ARP 2/3 le confieren movilidad debido a la polimerización de la actina. El mecanismo anteriormente descrito, es posible gracias a la intervención de la familia de las translocasas (Tlc), las cuales ayudan a obtener diversos tipos de nucleótidos como ATP, CTP, UTP y GTP, convirtiendo a *Candidatus* Hepatobacter penaei en un parásito intracelular obligado, ayudado por el sistema de secreción tipo 4 (T4SS), que inyecta proteínas efectoras, las cuales se apoderan de la maquinaria de la célula hospedera para sus propios fines (Pérez *et al.*, 2017).

En el caso de *V. parahaemolyticus*, la cepa causante de síndrome de muerte temprana en camarón se caracteriza por poseer el plásmido VPA3-1 que codifica para una toxina binaria (PirA y PirB), siendo la toxina PirB la responsable de producir el síndrome de la muerte temprana. Sin embargo, se desconoce si la presencia de este plásmido tiene algún efecto regulador en otras funciones de la célula (Han *et al.*, 2015).

La extracción de proteínas integrales de membrana de *V. parahaemolyticus* es menos complicada, ya que esta bacteria puede cultivarse con relativa facilidad en medio selectivo, confirmando por medio de marcadores moleculares si se trata de una cepa patógena para camarón o no. Se han descrito algunas proteínas de membrana integrales implicadas en el mecanismo de patogenicidad. Estos incluyen adhesinas tales como la hemaglutinina sensible a la manosa (MSHA) y la multivalente molécula de adhesión 7 (MAM7) que son esenciales para la unión de *V. parahaemolyticus* a la célula hospedera (Krachler *et al.*, 2011). Durante este contacto inicial, MSHA y MAM7 interaccionan con fibronectinas, ácido fosfatídico y glicanos de la membrana de la célula hospedera (Gode *et al.*, 2011). Inmediatamente después de la adhesión de *V. parahaemolyticus* a la célula hospedera, se construyen el sistema de secreción tipo 3 y el sistemas de secreción tipo 6 (T3SS y T6SS por sus siglas en ingles). Los T3SS y T6SS son canales que conectan a *V. parahaemolyticus* con la célula diana, éstos están constituidos por una estructura llamada aguja de punción celular, cuyo propósito es inyectar diferentes efectores y toxinas al citoplasma de la célula huésped. A través de este mecanismo, el patógeno se apodera de la señalización y los mecanismos de acción, causando citotoxicidad celular y la patogenicidad en los organismos afectados, incluyendo el camarón blanco (Gode *et al.*, 2011, Coulthurst, 2013). Cada sistema de secreción proporciona un conjunto exclusivo de efectores y produce efectos únicos en la célula huésped (O'Boyle y Boyd, 2014).

II. HIPÓTESIS

Las cepas patógenas de camarón blanco, *Candidatus* *Hepatobacter penaei* y *Vibrio parahaemolyticus*, contienen proteínas transmembranales con características similares a las reportadas como factores de patogenicidad en bacterias filogenéticamente cercanas.

III. OBJETIVOS

3.1. Objetivo general

Identificar y caracterizar proteínas integrales de membrana de *Candidatus* Hepatobacter penaei y de cepas ATCC 17802 y 22 de *Vibrio parahaemolyticus* que son homólogos a los factores de patogenicidad de organismos tipo rickettsia y cepas de *Vibrio parahaemolyticus* patógenas, respectivamente.

3.2. Objetivos particulares

- Identificar entre las proteínas integrales de membrana de *Candidatus* Hepatobacter penaei y *Vibrio parahaemolyticus*, los homólogos de los factores de patogenicidad reportados en organismos tipo rickettsia y en diferentes cepas patógenas de *Vibrio parahaemolyticus*.
- Caracterizar mediante análisis de secuencias genómicas, los homólogos de los factores de patogenicidad presentes en *Candidatus* Hepatobacter penaei y en dos cepas de *Vibrio parahaemolyticus*.
- Evaluar la acumulación diferencial de proteínas integrales de membrana, en dos cepas de *Vibrio parahaemolyticus*: ATCC 17802 patógena para humano y cepa 22 patógena para camarón.

IV. MATERIALES Y MÉTODOS

4.1. Aislamiento y cultivo de cepas de *V. parahaemolyticus*

La cepa 22 de *V. parahaemolyticus* se aisló de hepatopáncreas de camarón blanco infectado (*L. vannamei*). El proceso de aislamiento se realizó obteniendo los hepatopáncreas de camarones infectados con *V. parahaemolyticus*, previamente identificados por medio del examen visual y el análisis de la secuencia del gen 16S rRNA. Una vez obtenidos los hepatopáncreas se maceraron manualmente y se les adicionó agua milli-Q proporción 1:1. La cepa control de *V. parahaemolyticus* se obtuvo de la colección ATCC17802 la cual es patógena para humano y su identidad fue confirmada por análisis de la secuencia del gen 16S rRNA. Las dos cepas se cultivaron durante 24h a 36°C bajo agitación constante en medio de cultivo Luria Broth con sal al 3%. Cada cepa se cultivó tres veces por duplicado. Después de la incubación, las células se recuperaron por centrifugación a 14.000xg durante 30min a 25°C. El sobrenadante se retiró y las células se suspendieron en 5ml de solución salina tamponada con fosfato y se centrifugaron de nuevo bajo las mismas condiciones. El sobrenadante se descartó y se agregó 2mL de agua estéril al pellet, se colocó la muestra en viales de 1.5mL a 8°C hasta los análisis posteriores.

4.2. Aislamiento de *Candidatus Hepatobacter penaei* por el método de centrifugación en gradiente de densidad con percoll

La muestra de *Candidatus Hepatobacter penaei* fue obtenida utilizando el método de centrifugación en gradiente de densidad con percoll con algunas modificaciones, de acuerdo a lo establecido por Frelier *et al.* (1992).

El proceso inicia adicionando a la muestra buffer Tris-Sacarosa con pH 7.54 en proporción 1:1. Se homogeniza para posteriormente ser centrifugada a 270xg por 20min a 4°C, con lo que se descarta gran parte de material indeseable, como tejidos y lípidos. Se vertió el sobrenadante en un microtubo nuevo y se adicionó percoll al 40% en proporción 1:1. Se centrifugó a 25,000xg durante 70min a 4°C. Se extrajo la banda formada en la interfase del percoll y se almacenó una alícuota con glicerol estéril a -20°C y el resto fue centrifugado por

segunda vez con percoll. Se recuperaron las bandas obtenidas (BA1, BA2 y BA3) y se almacenó una alícuota de cada una a -20°C.

De la alícuotas con glicerol se tomó un volumen de 100mL para la detección de *Candidatus Hepatobacter penaei* y como control, se utilizó el homogenizado HHpS. Las bandas BA, BA1, BA2 y BA3 fueron descongeladas a temperatura ambiente y centrifugadas a 25,000xg por 70 min a 4°C. Al formarse nuevamente la banda entre la interfase del percoll y glicerol, esta fue recuperada por pipeteo. De cada una de las muestras recuperadas, se tomaron dos alícuotas de 300mL, de las cuales se eliminaron los restos de glicerol y percoll.

4.3. Extracción y cuantificación completas de proteínas integrales de membrana de *Candidatus Hepatobacter penaei* y *Vibrio parahaemolyticus*

Para la extracción secuencial de proteínas, se utilizó un kit de extracción de proteínas integrales de membranas de acuerdo con las especificaciones del fabricante (ProteoPrep® Membrane Extraction Kit, Sigma-Aldrich, St. Louis MO), donde se extrajeron primero las proteínas citoplasmáticas solubles, seguido de las proteínas de membrana débilmente unidas y finalmente, las proteínas integrales de membrana, las cuales se solubilizaron en reactivo de extracción de proteínas tipo 4 (C 0356).

La concentración de proteína se determinó en cada paso de la extracción secuencial mediante el método colorimétrico de Bradford (Bio-Rad, Hercules, CA). Los extractos de proteínas con diferente solubilidad se resolvieron en SDS-PAGE al 10% según Laemmli (1970), en un equipo Mini-Protean III (Bio-Rad) en condiciones reductoras.

4.4. Digestión de las proteínas de la membrana y etiquetado ITRAQ en muestras de *Vibrio parahaemolyticus*

Para la digestión y etiquetado de proteínas integrales de membrana de *Vibrio parahaemolyticus* se prepararon dos tubos con muestras de 100µg para cada replica biológica y para cada una de las cepas. Se precipitó la proteína añadiendo 20 volúmenes de acetona fría a cada muestra, incubando durante 12h a 20°C y centrifugando a 14,000xg durante 30min a

4°C. Las proteínas precipitadas se lavaron tres veces con 1mL de acetona fría y se secaron en una centrifuga de concentración de vacío (Vacufuge Plus, Eppendorf). Con el fin de verificar la calidad de la proteína y la concentración, se suspendieron en 40 mM de Tris un conjunto de pellets de proteínas secas para analizarlas. Las proteínas integrales de membrana se cuantificaron mediante el método de Bradford y se analizaron en SDS-PAGE al 10% como se ha detallado anteriormente. Las proteínas secas se solubilizaron y se sometieron a reducción, alquilación y digestión con tripsina.

Las muestras fueron digeridas con tripsina en paralelo. Se redujo un extracto de proteína de 100µg con Tris (2-carboxietil) fosfina 10mM (TCEP) durante 45 min a 60 °C, se alquiló con yodoacetamida 30 mM durante 1 h a 25 °C bajo condiciones de oscuridad y se inactivó el remanente de yodoacetamida con DTT 30mM durante 10min. A continuación, las proteínas se precipitaron con cuatro volúmenes de acetona fría durante 15h a -20 °C. Posteriormente, las muestras se centrifugaron a 3000xg durante 30min a 4°C. El sobrenadante se descartó y el sedimento de proteína se suspendió en 100µL de bicarbonato de trietilamonio 50mM (TEAB). Las proteínas se digirieron con tripsina (cat. N° V528A, Trypsin Gold, Promega, Madison WI) a una relación de proteína tripsina de 1:30 (p/p), durante 16 h a 37 °C.

Después de la digestión, se marcaron los péptidos con reactivos ITRAQ® de 4plex de acuerdo con las especificaciones del fabricante (n° de catálogo 4352135, AB SCIEX™). El estudio incluyó tres replicas biológicas distribuidas en dos series de 4plex, donde se usaron las etiquetas 114 y 115 para la cepa ATCC17802, mientras que las etiquetas 116 y 117 se usaron para la cepa 22. Los péptidos marcados se combinaron en un tubo para cada corrida; se mezcló una cantidad conocida de péptidos de cada etiqueta y se fraccionó utilizando cartuchos de intercambio catiónico fuerte (SCX) (n° de catálogo 60108-421, Thermo-Scientific, Bellefonte, PA, EE.UU.), obteniéndose tres fracciones basadas en elución secuencial con 150, 250 y 500 mM de KCl (tampón de elución). A continuación, cada fracción se desaló con cartuchos C18 y se secó en una centrifuga de concentración de vacío (Labconco Corp., Kansas City, MO, EE.UU.).

4.5. Cromatografía líquida-Análisis de espectrometría de masa en tándem (LC-MS/MS) en muestras de *Vibrio parahaemolyticus*

Las muestras se analizaron mediante el método de nanoLC-MS/MS usando un espectrómetro de masas Orbitrap Fusion™ Tribrid™ conectado con un sistema Ultimate 3000 RSLC (Dionex, Sunnyvale, CA) y fijado con una fuente de iones nano de EASY Spray (Thermo-Fisher Scientific, San Jose, CA). Cada muestra reconstituida (5 µL) se introdujo en una columna de trampa C18 de nanoviper (3 µm, 75 µm X 2 cm, Dionex) a 3 µL de caudal min⁻¹ y se separó en una columna EASY spray C18 RSLC (2 µm, 75 µm) Mm x 25 cm, usando un gradiente de 100 min con un caudal de 300 nL·min⁻¹ y utilizando ácido fórmico al 0.1 % en agua de grado LC-MS (disolvente A) y ácido fórmico al 0.1 % en acetonitrilo al 90 % (disolvente B). El gradiente se ajustó de la siguiente manera: 10 min de disolvente A, 7-20 % de disolvente B en 25 min, 20 % de disolvente B durante 15 min, 20-25 % de disolvente B durante 15 min, 25-95 % de disolvente B durante 20 min, y 8 min de disolvente A. El espectrómetro de masas se operó en ion positivo.

4.6. Identificación de proteínas y cuantificación relativa por selección de precursor sincrónico (SPS) -MS3, en muestras de *Vibrio parahaemolyticus*.

Las exploraciones completas de MS en el analizador Orbitrap se llevaron a cabo con 120,000 (FWHM) de resolución, rango de exploración 350-1500m/z, control automático de ganancia (AGC) de 2.0e5, tiempo máximo de inyección de 50ms, umbral de intensidad de 5.0e3, exclusión dinámica 1 a 70s y 10ppm de tolerancia de masa. Para el análisis de MS2, se aislaron los 20 MS1 más abundantes con estados de carga establecidos en 2-7. Los parámetros de fragmentación CID incluyen: 35% de energía de colisión, activación Q de 0.25, AGC de 1.0e4 y tiempo máximo de inyección de 50ms?, rango de selección de precursor de 400-1200m/z, rango de ancho de exclusión de ión precursor 18m/z a 5m/z, y la pérdida de la etiqueta isobárica ITRAQ. La detección se realizó en la trampa de iones. Posteriormente, los espectros de MS3 se adquirieron usando SPS con 10 muescas de aislamiento (McAlister *et al.*, 2012). Los precursores de MS3 se fragmentaron mediante HCD con 65% de energía de colisión y se analizaron con Orbitrap con una resolución de 60,000 a 120-500m/z, 2m/z de

ventana de aislamiento, $1.0e5$ AGC y un tiempo máximo de inyección de 120ms con 1 microscan.

Los datos se procesaron con Proteome Discoverer 2.1 (PD, Thermo-Fisher Scientific Inc.). La búsqueda posterior se llevó a cabo con el motor de búsqueda Mascot (www.matrixscience.com) contra el subconjunto *V. parahaemolyticus* de la base de datos de proteínas NCBIInr. Los parámetros en la búsqueda incluyeron la especificidad de la proteasa trípica completa y dos rupturas perdidas permitidas. Además, las modificaciones estáticas cubrieron carbamidometilación de residuos de cisteína (+57.021Da) y residuos de ITRAQ 4-plex N-terminal / lisina. Además, las modificaciones dinámicas comprenden la oxidación de metionina (+15.995Da) y la desamidación deaminación en asparagina / glutamina (+0.984Da). El método de cuantificación ITRAQ 4-plex se llevó a cabo con el software PD. Se utilizó una tolerancia de masa de ± 10 ppm, un centroide de mayor confianza y un filtro de coaislamiento precursor del 45%. Para el método SPS-MS3, la cuantificación se realizó en el nivel MS3. Para el informe de nivel de proteínas, se habilitó la agrupación de proteínas y los valores se calcularon a partir de la mediana de todas las coincidencias cuantificables de péptido a espectro (PSM) para cada grupo (proteínas maestras).

4.7. Análisis de ontología genética, en muestras de *Vibrio parahaemolyticus*.

Las identificaciones de proteínas únicas se enviaron al análisis de Gene Ontology (GO) usando Blast2GO v3.0.10 (disponible en www.blast2go.org), (Conesa *et al.*, 2005). El análisis se realizó buscando (BLAST-P) las secuencias proteicas de las cepas ortólogas más probables de *V. parahaemolyticus* (obtenidas previamente después de la identificación de proteínas basada en datos MS/MS) contra el subconjunto *V. parahaemolyticus* de la base de datos de proteínas NCBIInr. Los parámetros de entrada utilizados se establecieron de la siguiente manera: número de BLAST-hits solicitados para cada consulta, 20; valor esperado de BLAST, $1e-25$. Después se realizó un mapeo GO para obtener GOs para hits recuperados por el paso BLAST-P, obteniendo las respectivas anotaciones (los parámetros de las anotaciones fueron los siguientes: filtro de impacto de valor e; $1e-25$; límite de anotación, 55; y peso de GO 5), se obtuvieron gráficos combinados de procesos biológicos, funciones moleculares y componentes

celulares de las proteínas con la herramienta Make Combined Graph Toolciones moleculares y componentes celulares de las proteínas con la herramienta Make Combined Graph Tool.

4.8. Predicción de genes codificantes de proteínas en muestras de *Candidatus Hepatobacter penaei*

Los análisis se realizaron usando la secuencia del genoma de la bacteria previamente obtenido mediante un proceso de secuenciación por síntesis con un valor de Q igual a 38 y un posterior ensamblaje *de novo*. Para la identificación de genes y proteínas deducidas se utilizó el servidor público GeneMark (<http://opal.biology.gatech.edu/genemark/gmhmp.cgi>). La secuencia genómica se cargó en formato fasta, siguiendo los lineamientos del servidor. Se utilizaron los parámetros de traducción para bacterias y arqueas, con la opción de salida de genes coordinados con proteínas traducidas.

4.9. Análisis de identidad de las secuencias de aminoácidos deducidas en muestras de *Candidatus Hepatobacter penaei*

Para la identificación de las proteínas integrales de membrana consideradas como factores de patogenicidad en *Candidatus Hepatobacter penaei*, se realizó un alineamiento de secuencias en el software Blast2GO, el cual consiste en la búsqueda de proteínas homólogas. Para realizar el alineamiento de secuencias de proteínas, se utilizó la base de datos del NCBI mediante el programa BLASTP (Basic Local Alignment Search Tool). Las comparaciones de secuencias problemas (o query), se realizaron solamente contra las proteínas reportadas en el BLASTP con un valor E menor de $1e-10$ y 10 hits. De los datos obtenidos en el alineamiento se seleccionaron los 30 resultados con mayor identidad.

4.10. Análisis de dominios conservados en muestras de *Candidatus Hepatobacter penaei*

Se realizó un análisis de dominios conservados de las secuencias de aminoácidos deducidas a partir de la predicción de genes de *Candidatus Hepatobacter penaei*. El algoritmo utilizado consistió en un alineamiento de secuencias de tipo local específico en posición invertida (RPS BLAST). Se tomó un valor E con significancia de 0.01 basado en un ajuste de composición.

Se utilizó la base de datos con dominios conservados del Centro Nacional para la Información Biotecnológica (NCBI's CDD) (Marchler *et al.*, 2015).

4.11. Alineamiento múltiple de las secuencias de aminoácidos en muestras de *Candidatus Hepatobacter penaei*

Las secuencias con similitud adecuada fueron alineadas usando CLUSTAL Omega, mediante la base de datos de UniProtKB para bacterias en el servidor público de UniProt (<http://www.uniprot.org>). Este programa usa un algoritmo heurístico progresivo para calcular alineamientos múltiples (Sievers *et al.*, 2011). CLUSTAL Omega utiliza árboles de guía sin semillas del modelo de Hidden Markov y técnicas perfil-perfil para generar alineaciones entre 3 o más secuencias (Söding, 2005). De los resultados obtenidos con BLASTP, se realizó el alineamiento múltiple de secuencias de aminoácidos que resultaron con mayor identidad.

V. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

5.1. Extracción secuencial de proteínas de *Vibrio parahaemolyticus*

Los resultados revelaron una exitosa extracción de proteínas integrales de membrana. En la Figura 1 se muestra la extracción y separación de las proteínas de membrana citoplasmáticas solubles y las proteínas débilmente unidas a la membrana; mientras que en la Figura 2 se muestran las proteínas integrales de membrana de *V. parahaemolyticus*.

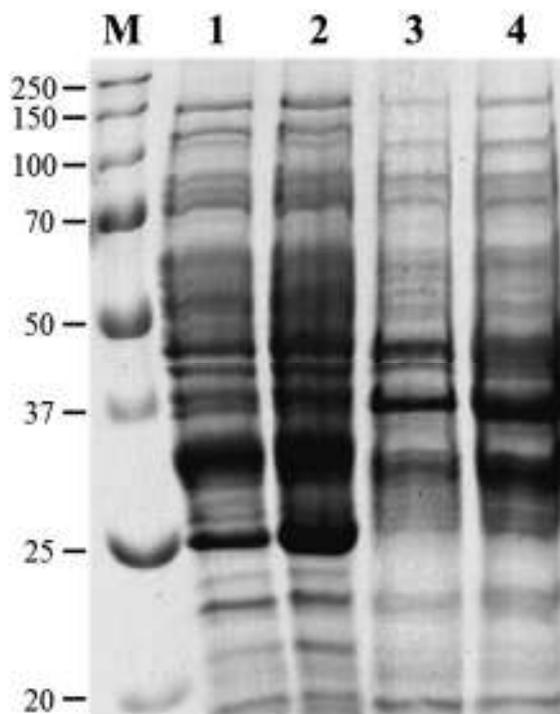


Figura 1. Extracción de proteínas citoplasmáticas solubles y débilmente unidas de las cepas ATCC17802 y 22 de *Vibrio parahaemolyticus*. SDS-PAGE que muestra proteínas de membrana citoplasmáticas solubles (Carriles 1 y 2) y proteínas débilmente unidas (Carriles 3 y 4) de *V. parahaemolyticus*. Cepa ATCC17802 patógena para humanos (Carril 1 y 3). Cepa 22, patógenos para camarón blanco (Carriles 2 y 4). M = marcador de peso molecular (kDa).

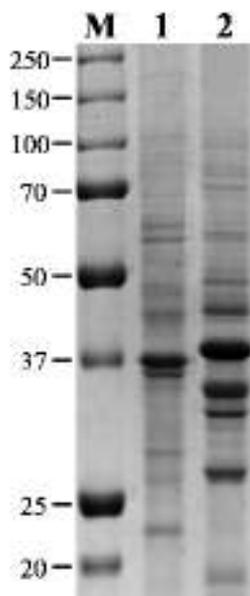


Figura 2. Extracción de proteínas integrales de membrana de las cepas ATCC17802 y 22 de *Vibrio parahaemolyticus*. SDS-PAGE que muestra proteínas integrales de membrana de *Vibrio parahaemolyticus* cepa ATCC 17802 (Carril 1) y cepa 22 (Carril 2). M = marcador de peso molecular (kDa).

Los patrones de banda de las proteínas obtenidas para ambas cepas son muy parecidas en el caso de las proteínas citoplasmáticas solubles y las proteínas débilmente unidas, como se muestra en la Figura 1; mientras que los patrones de bandas de las proteínas integrales de membrana son diferentes entre las cepas ATCC17802 patógena para mamíferos y la cepa 22 aislada de hepatopáncreas de camarón blanco infectado (Figura 2).

Debido a que la electroforesis bidimensional convencional es inadecuada para el análisis de proteínas hidrófobas en mezclas complejas para la identificación y cuantificación relativa de proteínas integrales de membrana entre ambas cepas de *V. parahaemolyticus*, se optó por no abordar esta tarea a través de la electroforesis bidimensional convencional. Esta incompatibilidad tiene varias razones, pero la más relevante es la baja solubilidad de las proteínas integrales de membrana durante el isoelectroenfoque (Vit y Petrak, 2017).

5.2. Identificación de proteínas de *Vibrio parahaemolyticus* y cuantificación relativa por ITRAQ

Un total de 324 proteínas fueron identificadas y funcionalmente anotadas entre las dos cepas utilizando Blast2GO según la localización celular, la función molecular y los procesos biológicos en los que están involucrados (Figura 3). Cuando se clasificó por componente celular (Figura 3A), el componente integral de la membrana fue el grupo más representado, como se esperaba entre las proteínas de membrana. Sin embargo, la purificación de proteínas integrales de membrana no es absoluta, ya que una pequeña proporción de proteínas ribosómicas también estaban presentes en la muestra. Las principales funciones de las proteínas integrales de membrana identificadas en este trabajo fueron la actividad catalítica, unión y transporte (Figura 3B), siendo las dos últimas funciones las relacionadas con los mecanismos de patogenicidad en *V. parahaemolyticus*. La mayoría de las proteínas identificadas resultaron estar asociadas principalmente a procesos celulares y metabólicos, tal como se muestra en la Figura 3C.

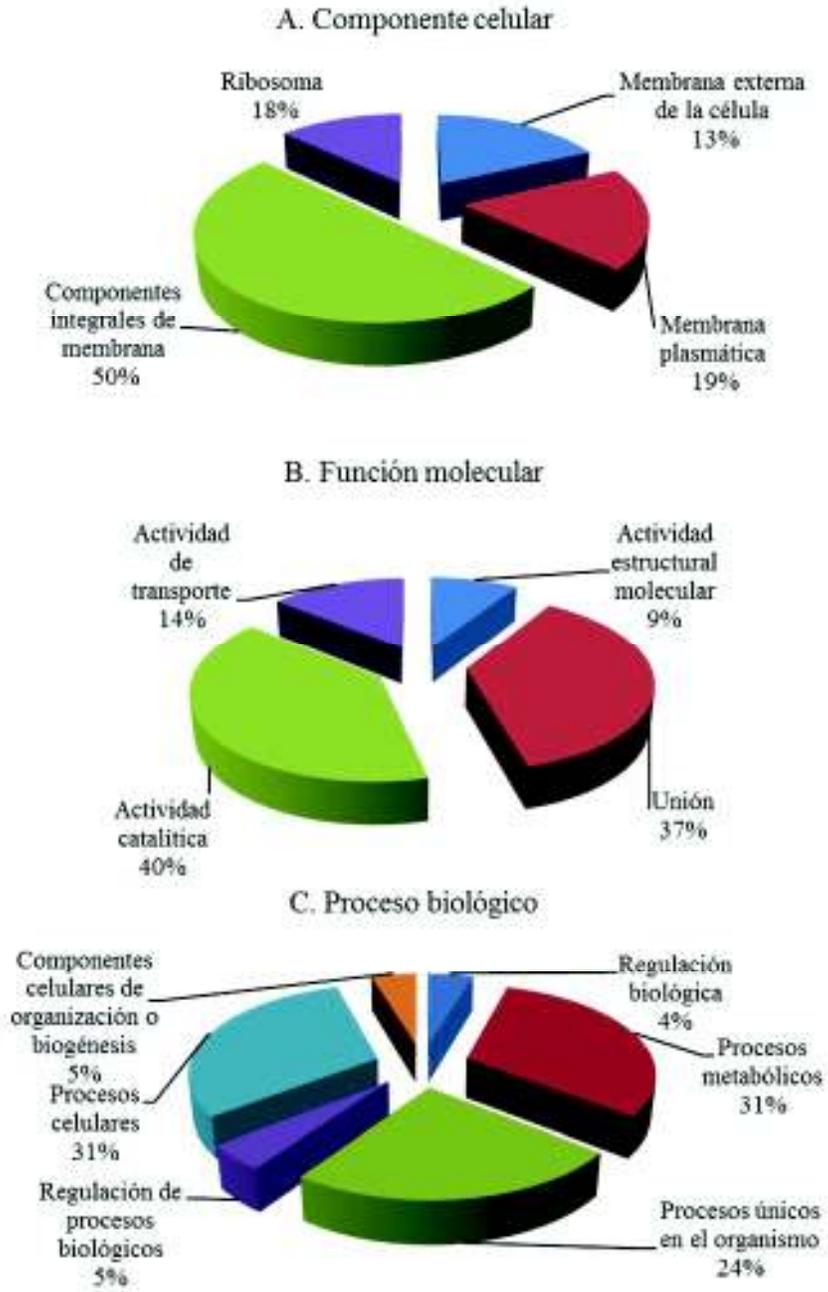


Figura 3. Clasificación funcional de proteínas de membrana de *Vibrio parahaemolyticus* identificadas por LC-MS/MS y cuantificadas relativamente por ITRAQ. Las proteínas se clasificaron con base en el análisis de ontología de genes con Blast2GO, basado en su componente celular (A), función molecular (B) y proceso biológico (C).

Entre las proteínas integrales de membrana identificadas por LC-MS/MS, varias se relacionaron con diferentes procesos biológicos implicados en los sistemas de patogenicidad de *V. parahaemolyticus*, que van desde la adhesión y la invasión a la célula hospedera, sistemas de secreción que inyectan efectores de virulencia, mediadores de resistencia bacteriana, proteínas involucradas en la división celular, movimiento bacteriano dentro y fuera de la célula hospedera, proteínas implicadas en el proceso de lisogenización, así como proteínas que transportan azúcares, aminoácidos, iones metálicos, péptidos, componentes hidrofóbicos y metabolitos a través de la membrana extracelular.

Particularmente, las 30 proteínas integrales de membrana identificadas y reconocidas como factores de patogenicidad mostraron mayor abundancia en la cepa 22 cuando se compararon con la cepa ATCC17802 patógena para humanos (Tabla 1).

Tabla 1. Proteínas integrales de membrana identificadas como factores de patogenicidad en *Vibrio parahaemolyticus*

Proteínas	Número de Acceso ^a	Theor. PM/ <i>pI</i> ^b	Pm/Sc ^c	Puntuación ^d	ITRAQ Radio 22/17802 ^e
<i>Adherencia</i>					
MSHA	gi 658992907	17.7/5.01	11/67%	705	5.9
Outer membrane protein OmpA	gi 28901041	35.9/4.44	18/68%	4466	4.9
<i>Sistemas de secreción</i>					
Type II secretion system protein GspD	gi 1048095298	73.3/5.20	7/15%	273	5.0
Type IV system coupling protein TraD	gi 646369270	78.9/6.20	4/7.4%	74.1	5.7
Type VI secretion protein	gi 757492843	55.6/5.43	9/36%	688	5.4
<i>División celular</i>					
Cell division protein FtsH	gi 28899237	72.9/5.19	17/36%	760	5.6
Cell division protein FtsZ	gi 1015923174	42.5/4.79	3/13%	136	5.3
Cell division protein ZipA	gi 922027294	35.6/4.53	8/37%	240	4.4
<i>Transporte</i>					
ABC transporter ATPbinding protein	gi 758878821	64.4/7.17	8/15%	251	4.3
MFS transporter	gi 1015879832	50.9/7.12	6/16%	221	5.6
OMF	gi 758854380	61.6/5.00	2/5%	78.1	4.4
Outer membrane channel protein TolC	gi 686144399	49.3/4.93	19/58%	1173	4.9
Porin_4	gi 545125313	36.8/4.49	12/48%	4054	6.1
Maltose/transporter ATP-binding protein	gi 1015874944	41.2/5.82	8/40%	370	5.1
Aminobenzoylglutamate transporter	gi 1015874008	54.9/5.99	2/6%	56	5.9
<i>Lisogenización</i>					
Protease modulator HflC	gi 922039803	37.4/6.70	11/37%	799.8	4.7
Protease modulator HflK	gi 927332993	44.5/5.26	9/29%	891	4.8
Lysogenization regulator HflD	gi 1015931884	22.6/9.42	2/9%	70.5	4.4
<i>Movimiento</i>					
Flagellar motor protein PomA	gi 28897463	27.1/4.93	3/19%	61	6
Flagellar M-ring protein FliF	gi 1015879046	63.9/4.77	3/9%	72	4.6
Flagellin	gi 28899032	39.8/4.98	7/34%	287	5.4
Chemotaxis protein	gi 1048092791	60.5/4.92	5/16%	321	6
<i>Producción de ATP</i>					
ATP synthase subunit alpha	gi 491599739	55.5/5.21	20/45%	1149	3.6
ATP synthase subunit beta	gi 686235341	50.9/4.79	14/46%	963	3.7
<i>Factores de Virulencia</i>					
ToxS protein	gi 28897593	19.2/5.63	3/20%	47.4	5.1
OmpK	gi 1048194483	30.3/5.34	12/64%	3851	5.7
Hemolysin D	gi 647462788	40.1/5.31	6/29%	285	4.3
Hypothetical protein OmpV	gi 1024865977	28.1/5.26	5/40%	533	7.7

OmpA family lipoprotein	gi 1048094755	23.7/9.11	4/13%	115.7	4.4
<i>Resistencia a la fagocitosis</i>					
Outer membrane protein OmpW	gi 922316605	23.2/5.20	7/37%	1475	4.6

^a Número de acceso acordado por NCBI, ^b Masa molecular teórica y punto isoeléctrico, ^c Péptidos que coincidieron/coertura de secuencia, ^d Puntuación obtenida tras la búsqueda de *Vibrio parahaemolyticus* subconjunto de la base de datos de proteínas NCBI. Puntuación >30 indica identidad o gran homología con p< (0.01). ^e El cambio de doblado se expresa como una relación de la abundancia entre las proteínas de la cepa 22 / la misma proteína en la cepa 17802, El valor representa el valor medio de tres extracciones independientes para cada cepa.

5.3. Proteínas de *Vibrio parahaemolyticus* relacionadas con la adherencia

Las proteínas de adhesión median el mecanismo de adherencia del patógeno a las respectivas células hospederas, con el subsiguiente proceso de infección (Liu y Chen, 2015). En *V. parahaemolyticus*, este proceso es realizado por varias proteínas de membrana (Mikula *et al.*, 2012); algunas de ellas han sido descritas en informes previos incluyendo la proteína hemaglutinina sensible a manosa (MSHA) y la molécula de adhesión 7 multivalente (MAM7) (Krachler *et al.*, 2011, O'Boyle *et al.*, 2013, Jiang *et al.*, 2014), el factor de adhesión de Vibrio (VpadF) (Liu y Chen, 2015), la enolasa (Jiang *et al.*, 2014) y el polisacárido capsular (Hsieh *et al.*, 2003). MSHA y la proteína de membrana externa A (OmpA) se detectaron en este estudio para *V. parahaemolyticus*; OmpA no ha sido previamente descrita como factor de adhesión para esta especie, pero ha sido bien reconocida como mediadora de adhesión en varios patógenos como *Waddlia chondrophila* (Kebbi *et al.*, 2015) y *Anaplasma marginale* (Hebert *et al.*, 2016).

Estos resultados sugieren que el inicio de la infección por *V. parahaemolyticus* está mediado por un grupo de adhesinas que interactúan con la célula hospedera. Se pueden detectar diferentes adhesinas específicas para cada célula diana dependiendo de la cepa; además, estas cepas pueden adquirir frecuentemente factores de virulencia, por mutaciones constantes en sus proteínas integrales de membrana, que producen patogenicidad en células y organismos que previamente eran inmunes a estas bacterias (Mikula *et al.*, 2012). Esto explica por qué repentinamente las bacterias no patógenas pueden causar epizootias en la acuicultura, lo que aunado a la presencia del plásmido AP3 en la cepa patógena, resulta mortal para el camarón blanco.

Por otro lado, la detección de MSHA, sin la detección de proteínas involucradas en los sistemas de secreción tipo 3-1 y 3-2 (T3SS1 y T3SS2), los cuales están fuertemente relacionados con el proceso de infección, sugiere que algunos de estos tipos de proteínas no se extrajeron con éxito por este método. Otra posible explicación puede ser que estas adhesinas experimentaron modificaciones estructurales y funcionales dando lugar a una nueva integración entre adhesinas y sistemas de secreción (O'Boyle *et al.*, 2013).

5.4. Sistemas de secreción de *Vibrio parahaemolyticus*

La función de los sistemas de secreción es inyectar efectores en el citosol de la célula diana, con el fin de aprovechar su maquinaria celular (Krachler *et al.*, 2011) y se construyen inmediatamente después de que se produce la interacción entre las adhesinas de *V. parahaemolyticus* y los receptores de las células hospederas. En trabajos anteriores, se han detectado los sistemas de secreción de tipo 3-1 (T3SS1), tipo 3-2 (T3SS2), tipo 6-1 y tipo 6-2 en *V. parahaemolyticus* (O'Boyle *et al.*, 2013).

La evidencia del sistema de secreción tipo 2 (T2SS) fue elucidada en este experimento; este sistema no se ha descrito completamente para la especie, pero teniendo en cuenta que se trata de una característica conservada en el género *Vibrio*, su participación en la secreción de toxinas y enzimas degradadoras como proteasas y lipasas, puede ser inferida; estas últimas proteínas están generalmente asociadas con la lisis celular (Korotkov *et al.*, 2012).

También se encontró evidencia del sistema de secreción tipo 6 (T6SS). Este sistema puede estar implicado en la inyección de efectores de virulencia como VP1388 y VPA1263, asociados con citotoxicidad y lisis de la célula hospedera (Salomon *et al.*, 2015); sin embargo, no se detectó la adhesina MAM7 asociada usualmente con el T6SS. De nuevo, es posible que no todas las proteínas de membrana se extraigan de manera eficiente por el método utilizado o se extraigan a concentraciones indetectables.

5.5. División celular de *Vibrio parahaemolyticus*

Se identificaron tres proteínas implicadas en procesos de división celular (FtsH, FtsZ y ZipA). Estas proteínas no han sido registradas previamente para *V. parahaemolyticus*, pero si en otras especies de *Vibrio*. Por ejemplo, FtsH se ha detectado en *V. furnissii* y se conoce que participa en la división celular, los procesos de unión a ATP, además de tener actividad metaloendopeptidasa (Lux *et al.*, 2011). FtsZ es una proteína esencial en la división celular en el género *Vibrio*; su función es formar una estructura de anillo contráctil (anillo Z) en el futuro sitio de división celular. La regulación del conjunto de anillos controla la sincronización y la ubicación de la división celular. Una de las funciones del anillo FtsZ es reclutar otras proteínas de división celular para producir una nueva pared celular entre las células en división; también están implicados en la actividad GTPasa y en la unión a GTP (Kumari *et al.*, 2014). ZipA es una proteína esencial de la división celular identificada en *Vibrio* sp.; esta proteína estabiliza los protofilamentos FtsZ mediante reticulación y sirve como un anclaje de membrana citoplásmica para el anillo Z. También es necesaria para el reclutamiento al anillo septal de las proteínas de división celular (Roh *et al.*, 2012). Gracias a los aspectos filogenéticos de conservación en *V. parahaemolyticus* de las proteínas integrales de membrana, su función se puede presuponer.

5.6. Proteínas de transporte de *Vibrio parahaemolyticus*

Las proteínas de transporte bacterianas median el transporte pasivo y activo de pequeños solutos a través de membranas para el suministro de nutrientes externos y la eliminación de compuestos indeseables. La comparación de las secuencias de aminoácidos muestra una fuerte conservación entre los transportadores bacterianos (Wilkens *et al.*, 2015). Algunas proteínas de transporte se identificaron en este experimento; unas ya documentadas para diferentes cepas de *V. parahaemolyticus* y otras notificadas en otras bacterias Gram negativas. Entre las proteínas de transporte identificadas y reportadas en diversas cepas de *V. parahaemolyticus*, están la proteína de unión a ATP ABC que tiene actividad de unión a ATP y ATPasa (Makino *et al.*, 2003) y la proteína de transporte MFS que facilita el movimiento de pequeños solutos a través de las membranas (Quistgaard *et al.*, 2016). Algunas otras proteínas de transporte,

incluyen la proteína TolC, implicada en la exportación de antibióticos y otros compuestos tóxicos de la célula (Rajagopala *et al.*, 2014); “Porin 4” que permite procesos de difusión pasiva (Tateda *et al.*, 2012) y Maltosa responsable del acoplamiento de energía al sistema de transporte (Chen *et al.*, 2013), las cuales se han identificado en algunas bacterias Gram negativas; sin embargo, estos resultados representan la primera detección de estas proteínas en *V. parahaemolyticus*.

Esta información puede ser útil para crear un modelo que explique cómo se agregan o descartan varios componentes a través de las membranas de esta especie y para comprender las estructuras proteínicas que hacen posible tal acción, lo que es necesario para lograr la invasión en la célula hospedera; adquiriendo, una mejor comprensión de este tipo de mecanismos.

5.7. Proteínas de *Vibrio parahaemolyticus* implicadas en el proceso de lisogenización

El proceso de lisogenización proporciona a la célula huésped una serie de nuevos caracteres que incluyen cambios en la morfología colonial, inhibición o mejora de las actividades enzimáticas, resistencia a los antibióticos, inmunidad a la infección y cambios en las propiedades patógenas tales como la producción de toxinas (De Maayer *et al.*, 2012).

Se identificaron tres proteínas en contraste con proteínas homólogas reportadas en otras bacterias que participan en los procesos de lisogenización. Por ejemplo, las proteínas HflD, HflC y HflK son conjuntamente responsables de la regulación de la actividad peptidasa (Chu *et al.*, 2016). Esta evidencia permite entender los cambios causados en la célula hospedera, incluyendo la transformación a una célula fagocítica, así como la modificación de los mecanismos de acción que permiten la transferencia y garantizan la supervivencia de *V. parahaemolyticus*.

Se ha comprobado experimentalmente la capacidad de algunas cepas de *V. parahaemolyticus* para incorporar lisógenos que contienen genes para proteínas específicas e integrarlos exitosamente a su catálogo de funciones; por lo que se estima que esta bacteria tiene una alta capacidad de adaptación a distintos escenarios (Zabala *et al.*, 2009).

5.8. Proteínas de *Vibrio parahaemolyticus* implicadas en el movimiento y producción de ATP

La movilidad, así como la producción de ATP comprenden procesos vitales para la patogenicidad de *V. parahaemolyticus*. En este caso, se identificaron proteínas que componen el sistema flagelar, incluyendo la proteína PomA que forma el complejo estator del motor flagelar (Takekawa *et al.*, 2012), la proteína FliF (Tae *et al.*, 2011) y flagelinas (Ivicak *et al.*, 2013), que junto con las proteínas quimiotácticas permiten el movimiento bacteriano (Bitbol y Wingreen, 2015).

También se detectaron las proteínas de la subunidad alfa de ATP sintasa y las proteínas de la subunidad beta de ATP sintasa; las cuales producen ATP a partir de ADP en presencia de un gradiente de protones a través de la membrana. La cadena alfa es una subunidad reguladora y los sitios catalíticos se encuentran principalmente en las subunidades beta (Giubergia *et al.*, 2015; Morales *et al.*, 2015). Aunque se cuenta con alguna información en relación al mecanismo de movilidad de la especie, la identificación de las proteínas productoras de ATP y de las proteínas implicadas en este proceso, permite conocer más sobre la bioenergética y la movilidad de la especie.

5.9. Factores de virulencia de *Vibrio parahaemolyticus*

Los factores de virulencia permiten a *V. parahaemolyticus* invadir a células diana, provocando patogenicidad (Cárdenas *et al.*, 2014). Los resultados en este trabajo mostraron la presencia de factores de virulencia tales como adhesinas, proteínas flagelares, proteínas de quimiotaxis y sistemas de secreción, los cuales se discutieron en secciones anteriores. Sin embargo, se detectaron factores de virulencia adicionales. Por ejemplo, se detectó la proteína ToxS que interactúa con ToxR para regular la expresión de otros factores de virulencia (Guardiola *et al.*, 2016). Otros factores detectados fueron la proteína de membrana externa K (OmpK), que actúa como receptor para un vibriófago de amplio espectro (Ronholm *et al.*, 2015) y la hemolisina D causante de lisis de glóbulos rojos y que, junto con la hemolisina B, regulan la secreción de hemolisina A (Kim *et al.*, 2016).

La identificación de varios componentes de virulencia de *V. parahaemolyticus* representa información relevante para entender en profundidad su mecanismo de infección, pero también representa información útil para el sector acuícola, para desarrollar estrategias de inhibición de estos factores de virulencia. Además, los resultados sugieren que ambas cepas cuentan con factores de virulencia similares, por lo que la diferencia parece radicar únicamente en que la cepa patógena produce una toxina binaria (PirA y PirB) que el sistema inmune del camarón es incapaz de procesar o eliminar, dejando a la célula hospedera sin defensa alguna.

5.10. Resistencia a la fagocitosis de *Vibrio parahaemolyticus*

La resistencia a la fagocitosis es un punto clave en el proceso de invasión. En este trabajo se detectó una proteína integral de membrana relacionada con la resistencia a la fagocitosis, la proteína de membrana externa W (OmpW). La regulación positiva de OmpW se correlaciona con el aumento de la supervivencia bacteriana durante la fagocitosis. Los mutantes bacterianos que no cuentan con OmpW exhiben una tasa significativamente aumentada de fagocitosis. Esta evidencia sugiere que OmpW protege a las bacterias contra el sistema de fagocitosis de la célula hospedera (Wu *et al.*, 2013). La regulación diferencial positiva, en el caso de la cepa patógena, sugiere que ésta podría ser más resistente que la no patógena; no obstante, esto podría deberse a la respuesta de las cepas ante las condiciones de cultivo.

Finalmente, estos resultados demostraron la presencia de proteínas de membrana comúnmente asociadas a diversas funciones biológicas de *V. parahemolyticus*; además, se generó información novedosa, incluyendo la primera detección de proteínas involucradas en el proceso de adhesión (OmpA), sistemas de secreción (T2SS), división celular (FtsH, FtsZ y ZipA), transporte (TolC, Porin4, Maltose), lisogenización (HflD, HflC y HflK), factores de virulencia y resistencia a patógenos, con lo que se puede inferir un posible modelo de invasión (Figura 4), contribuyendo a una mejor comprensión de la biología de los especímenes.

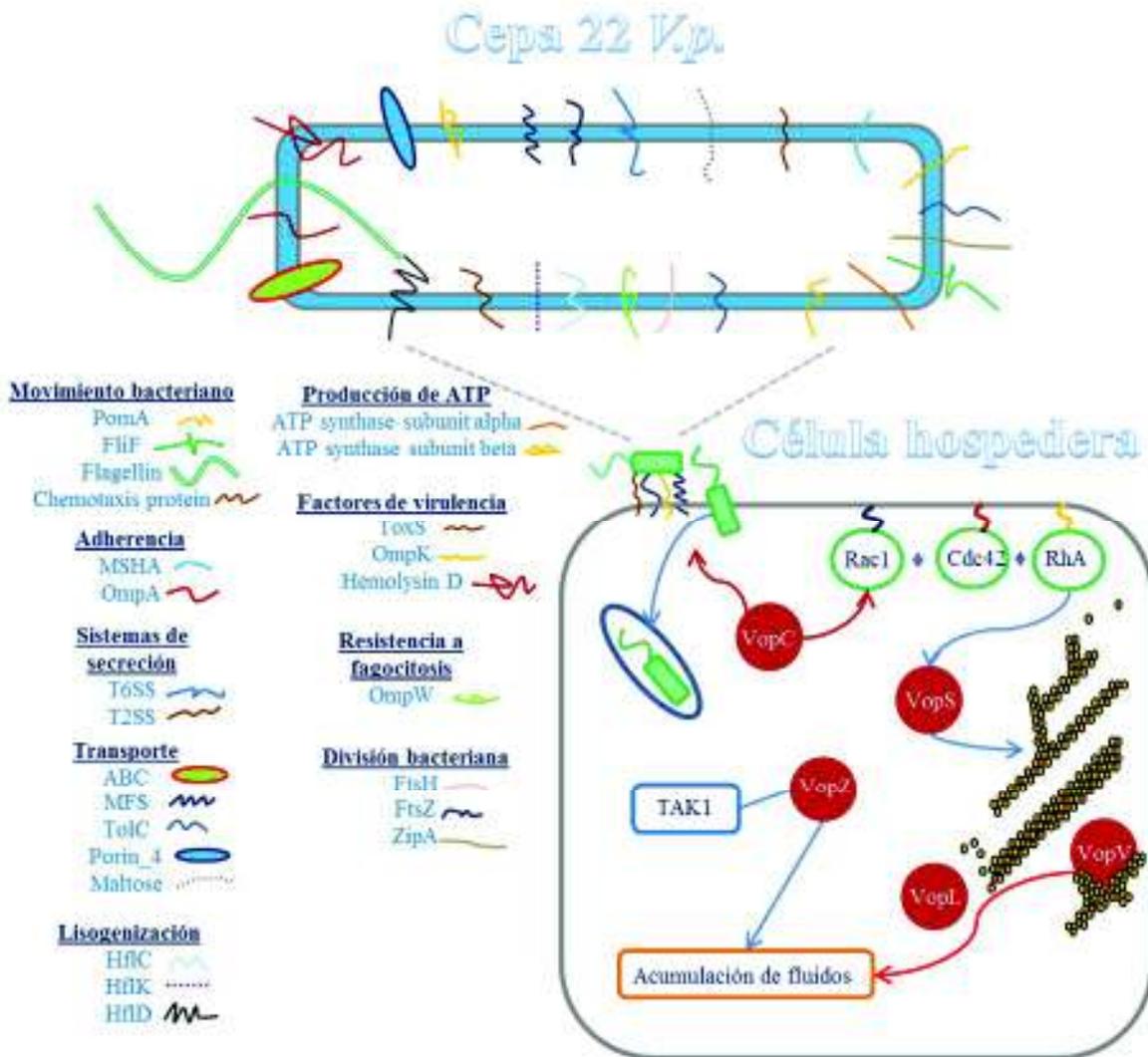


Figura 4. Posible modelo de invasión para la cepa 22 de *Vibrio parahaemolyticus* inferido con base en las proteínas integrales de membrana encontradas.

5.11. Identificación de los ORFs obtenidos a partir de la secuenciación del genoma de la cepa de *Candidatus Hepatobacter penaei*

En el caso de *Candidatus Hepatobacter penaei*, no se logró obtener una concentración adecuada de muestra debido a la baja cantidad de células aisladas mediante gradiente de Percoll, por lo que se optó por la predicción de proteínas deducidas de genes codificantes de

las secuencias genómicas de la especie, las cuales fueron previamente obtenidas en el grupo de trabajo del Laboratorio de Biología Experimental de CIAD.

La identificación de los ORFs obtenidos a partir de la secuenciación del genoma de la cepa de *Candidatus* Hepatobacter penaei aislada y el alineamiento mediante la herramienta blastp con la ayuda del programa Blast2GO de las proteínas deducidas a partir de estos ORFs, arrojó 96 proteínas integrales de membrana reconocidas como factores de patogenicidad cuyos datos del alineamiento se resumen en la Tabla 2.

Tabla 2. Proteínas de membrana integral deducidas del genoma de *Candidatus* Hepatobacter penaei e identificadas como factores de patogenicidad.

Factores de patogenicidad	Porcentaje de identidad *	Longitud de secuencia*	Desajustes *	E-valor*	Puntuación de bits *	Cobertura *
96	99.19	377	2.86	4E-41	759	99.30

* = Los valores representan el promedio obtenido de las 96 proteínas identificadas como factores de patogenicidad.

5.12. Identidad y notación funcional para las 96 proteínas integrales de membrana reconocidas como factores de patogenicidad en la cepa de *Candidatus* Hepatobacter penaei aislada en México

En la Tabla 3 se muestran la identidad y la notación funcional obtenida con el software Blast2GO para las 96 proteínas integrales de membrana reconocidas en la literatura como factores de patogenicidad bacterianos y principalmente en Organismos Tipo Rickettsia (OTR). Mientras que en la Figura 5A, se muestra que tres cuartas partes de los factores de patogenicidad identificados participan en funciones de transporte, así como movimiento y producción de ATP. En la Figura 5B se muestra que un poco más de la mitad de los factores de patogenicidad relacionados con el transporte transmembranal corresponden a transportadores ABC y transportadores de lípidos, mientras que entre las proteínas cuya función está relacionada con el movimiento y la producción de ATP (Figura 5C), aquellas relacionadas con el cuerpo y el motor flagelar constituyen casi tres cuartas partes de las proteínas identificadas.

Tabla 3. Identificación mediante análisis bioinformático de proteínas integrales de membrana reconocidas como factores de patogenicidad en la cepa de *Candidatus Hepatobacter penaei* aislada en México.

No	Gen ^a	Proteína ^b	No. Acceso ^c	Identidad ^d	Cobertura ^e	Función ^f
1	1004	ABC transporter ATP-binding ABCD_peroxisomal_ALDP	WP_031933696.1	98.25	99	Transportadores ABC
2	24	ABC transporter ATP-binding MlaF	WP_052545706.1	100	100	Transportadores ABC
3	1101	ABC transporter ATP-binding protein YejF	WP_031934595.1	97.96	99	Transportadores ABC
4	574	ABC transporter ATP-binding protein LptB	WP_052545548.1	100	100	Transportadores ABC
5	534	ABC transporter ATP-binding protein LolD	WP_052545693.1	99.58	99	Transportadores ABC
6	601	ABC transporter ATP-binding protein MdlB 1	WP_052545555.1	99.16	100	Transportadores ABC
7	1075	ABC transporter ATP-binding protein Superfamily AAA 1	WP_031934580.1	100	100	Transportadores ABC
8	1162	ABC transporter ATP-binding protein Superfamily SunT 1	WP_031934525.1	99.31	100	Transportadores ABC
9	1201	ABC transporter permease YejE	WP_031933736.1	100	100	Transportadores ABC
10	25	ABC transporter permease MlaE	WP_031934350.1	99.61	99	Transportadores ABC
11	314	ABC transporter permease MdlB 2	WP_031934196.1	99.48	99	Transportadores ABC
12	1018	ABC transporter permease Superfamily SunT 2	WP_052545520.1	99.83	100	Transportadores ABC
13	629	ABC transporter substrate-binding protein	WP_082191986.1	99.84	100	Transportadores ABC
14	1203	ABC transporter Superfamily AAA 2	WP_052545530.1	98.77	100	Transportadores ABC
15	795	LPS export ABC transporter permease	WP_031934250.1	99.73	100	Transportadores ABC
16	385	Outer Membrane lipid asymmetry maintenance protein	WP_082191968.1	100	100	Transportadores ABC
17	361	ABC transporter ATP-binding protein/permease	WP_052545643.1	99.16	100	Transportadores ABC
18	151	Outer membrane protein OmpA	WP_031934458.1	100	100	Adhesión
19	510	Amino acid permease	WP_031934043.1	99.53	100	Transportadores de Amino ácidos
20	293	Pyridoxal phosphate-dependent aminotransferase	WP_031934215.1	99.75	100	Transportadores de Amino ácidos
21	987	EamA/RhaT family transporter	WP_031933955.1	98.05	99	Transportadores de Amino ácidos
22	147	Cell division ATP-binding protein FtsE	WP_031934456.1	99.16	100	División celular
23	1323	Cell division protein FtsA	WP_031934614.1	97.51	100	División celular
24	34	Cell division protein FtsH	WP_082192097.1	99.68	98	División celular
25	1297	Cell division protein FtsW	WP_031934673.1	99.73	100	División celular
26	1324	Cell division septal protein FtsQ	WP_082192099.1	100	100	División celular
27	961	Cell filamentation Fic	WP_052545591.1	99.03	99	División celular
28	659	Flagellar basal body P-ring protein	WP_052545541.1	100	100	Cuerpo flagelar
29	262	Flagellar basal body rod	WP_082192064.1	100	100	Cuerpo flagelar
30	505	Flagellar basal body rod protein FlgC	WP_052545614.1	98.6	100	Cuerpo flagelar
31	263	Flagellar basal body rod protein FlgG	WP_031934324.1	100	100	Cuerpo flagelar
32	265	Flagellar basal body-associated protein FliL	WP_052545700.1	100	96	Cuerpo flagelar
33	976	Flagellar hook	WP_031933945.1	97.39	100	Cuerpo flagelar
34	858	Flagellar hook-associated protein FlgK	WP_031934106.1	97.78	100	Cuerpo flagelar
35	974	Flagellar hook-length control protein FliK	WP_031933943.1	98.73	100	Cuerpo flagelar
36	260	Flagellar L-ring protein	WP_031934321.1	100	100	Cuerpo flagelar
37	1275	Flagellar M-ring protein FliF	WP_040333182.1	99.62	100	Cuerpo flagelar
38	257	Flagellar motor MotA_ ExbB	WP_031934318.1	99.64	100	Motor flagelar
39	446	Flagellar motor protein MotB	WP_031934707.1	100	100	Motor flagelar

40	782	Flagellar motor rotation OmpA_C-like	WP_052545680.1	98.98	100	Motor flagelar
41	445	Flagellar motor stator protein MotA	WP_031934708.1	100	100	Motor flagelar
42	1274	Flagellar motor switch protein FliG	WP_031934702.1	99.71	100	Motor flagelar
43	266	Flagellar motor switch protein FliM	WP_031934326.1	99.71	100	Motor flagelar
44	1272	Flagellar motor switch protein FliN	WP_052545790.1	100	100	Motor flagelar
45	1270	Flagellar biosynthesis protein FliA	WP_082192111.1	99.57	100	Biosíntesis del flagelo
46	77	Flagellar biosynthesis protein FliQ	WP_031934395.1	100	100	Biosíntesis del flagelo
47	501	Flagellar biosynthetic protein FliP	WP_031934035.1	97.59	100	Biosíntesis del flagelo
48	802	Flagellum-specific ATP synthase FliI	WP_031934243.1	100	99	Biosíntesis del flagelo
49	31	Apolipoprotein N-acyltransferase	WP_082192069.1	99.81	100	Transportador de lípidos
50	457	Lipocalin	WP_031934001.1	100	97	Transportador de lípidos
51	1207	Lipoprotein-releasing system transmembrane subunit LolC	WP_031933741.1	100	100	Transportador de lípidos
52	388	Lipoyl(octanoyl) transferase	WP_031933680.1	99.52	95	Transportador de lípidos
53	551	Outer membrane lipoprotein carrier protein LolA	WP_031934074.1	99.21	100	Transportador de lípidos
54	443	Magnesium transporter	WP_082192112.1	100	100	Transportador de metales
55	1202	Metal ABC transporter substrate-binding ZnuB	WP_052545529.1	99.83	99	Transportador de metales
56	973	Mg2/Co2 transporter CorB	WP_052545594.1	99.76	100	Transportador de metales
57	1038	Metal ABC transporter permease	WP_031934549.1	94.57	100	Transportador de metales
58	105	Potassium transporter	WP_082192078.1	99.57	100	Transportador de metales
59	810	ZnuC family protein	WP_052545668.1	96.52	100	Transportador de metales
60	751	MFS transporter 2	WP_082192091.1	99.63	100	Transportador MFS
61	1179	MFS Family permease	WP_082192091.1	100	100	Transportador MFS
62	259	MFS transporter pfam07690 1	WP_031934320.1	100	100	Transportador MFS
63	792	MFS transporter pfam07690 2	WP_031934253.1	99.09	100	Transportador MFS
64	172	MFS transporter 1	WP_082192086.1	100	100	Transportador MFS
65	364	MFS transporter pfam07690 3	WP_031934154.1	99.75	100	Transportador MFS
66	724	MFS transporter 3	WP_031934649.1	99.5	100	Transportador MFS
67	144	Preprotein translocase subunit SecA	WP_052545729.1	99.32	100	Transportador Sec
68	561	Preprotein translocase subunit SecE	WP_031934082.1	100	100	Transportador Sec
69	340	Preprotein translocase subunit SecG	WP_031934175.1	100	100	Transportador Sec
70	198	Preprotein translocase subunit SecY	WP_031934502.1	100	100	Transportador Sec
71	1037	Protein translocase subunit SecF	WP_052545743.1	100	100	Transportador Sec
72	805	T1SS	WP_031934240.1	99.79	100	Sistema de secreción
73	614	DotU family type IV/VI secretion system protein	WP_052545560.1	99.65	99	Sistema de secreción
74	873	T6SS_VipA and VipB domain-containing protein	WP_082191990.1	99.71	100	Sistema de secreción
75	87	Type II secretion protein	WP_082192076.1	95.34	100	Sistema de secreción
76	139	Type II secretion system D	WP_082192082.1	99.24	100	Sistema de secreción
77	86	Type II/IV secretion system protein	WP_082192075.1	97.17	70	Sistema de secreción

78	14	Type IV pilus biogenesis and competence	WP_031934340.1	99.05	98	Sistema de secreción
79	955	Type VI secretion protein_VasE	WP_031933928.1	100	97	Sistema de secreción
80	977	LicD family protein	WP_031933946.1	96.52	100	Transporte
81	794	YjgP/YjgQ family permease	WP_031934251.1	99.73	100	Transporte
82	378	Lipid-A-disaccharide synthase	WP_082191969.1	97.08	100	Factor de virulencia
83	865	Outer membrane lipoprotein SlyB	WP_031934100.1	98.03	100	Factor de virulencia
84	109	ATP synthase subunit C	WP_031934423.1	98.65	99	Factor de virulencia
85	1010	ATP synthase subunit alpha	WP_031933701.1	100	100	Factor de virulencia
86	1008	F0F1 ATP synthase subunit beta	WP_082191972.1	99.82	100	Factor de virulencia
87	374	F0F1 ATP synthase subunit I	WP_082191970.1	100	100	Factor de virulencia
88	376	Pathogen resistance antiapoptotic effect	WP_031933691.1	98.29	100	Factor de virulencia
89	1087	AcrB/AcrD/AcrF family protein	WP_052545750.1	99.52	100	Factor de virulencia
90	676	Outer membrane protein assembly factor BamD	WP_082191979.1	99.21	100	Factor de virulencia
91	36	Outer membrane protein assembly factor BamA	WP_052545712.1	98.94	100	Factor de virulencia
92	392	Hemolysin LPLAT	WP_052545503.1	99.26	100	Factor de virulencia
93	1086	Hemolysin D HlyD_3	WP_031934587.1	96.77	100	Factor de virulencia
94	132	Major capsid protein	WP_052545726.1	98.68	100	Factor de virulencia
95	1065	Insertion efficiency factor Superfamily Haemolytic	WP_082192096.1	95.65	93	Factor de virulencia
96	893	Membrane protein insertase YidC	WP_031933875.1	99.82	100	Factor de virulencia

^aNúmero de genes según el análisis genómico de la cepa aislada en México de *Candidatus* Hepatobacter penaei; ^bLas anotaciones de proteínas se obtuvieron después del análisis blastp de los ORF deducidos; ^cNúmeros de acceso según la base de datos de proteínas NCBIInr; ^dIdentidad proteica entre la proteína consultada y el mejor sujeto después del recocido blastp; ^eCobertura de la proteína consultada. ^fLa función molecular fue asignada por el análisis de Ontología de Genes.

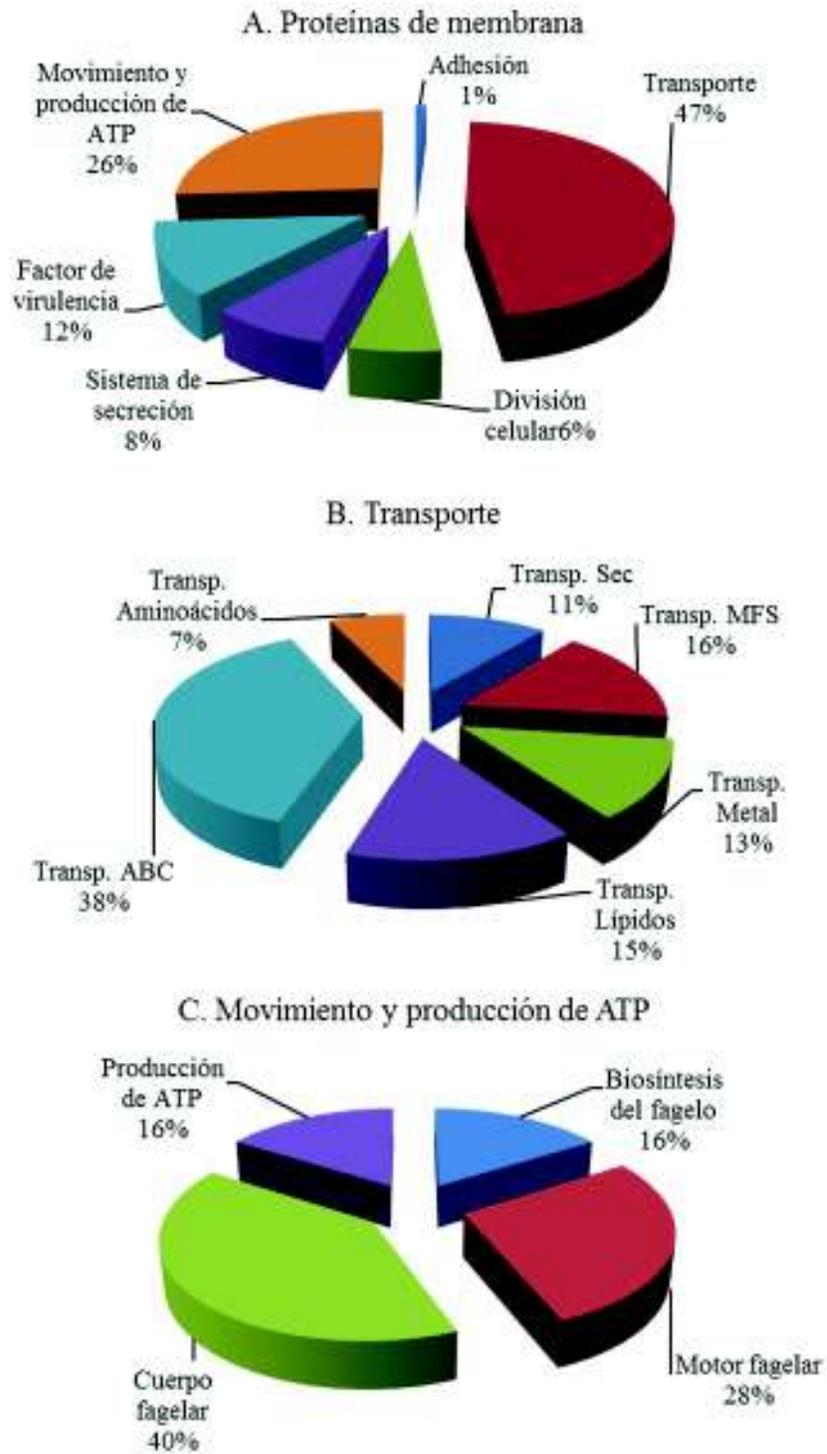


Figura 5. Clasificación funcional de proteínas integrales de membrana de *Candidatus Hepatobacter penaei*. Las proteínas se clasificaron en base al análisis de ontología de genes con Blast2GO, basado en sus proteínas de membrana (A), transporte (B) y movimiento y producción de ATP (C).

5.13. Proteínas de *Candidatus Hepatobacter penaei* relacionadas con la adherencia

Las proteínas de adhesión median la unión inicial de bacterias patógenas a sus respectivas células hospederas, con el subsiguiente proceso de infección (Liu y Chen, 2015). En OTR este proceso lo realizan varias proteínas de membrana (Pérez *et al.*, 2017); algunas de ellas han sido descritas en informes previos incluyendo a la proteína de membrana externa A (OmpA), también conocida como antígeno de superficie celular 0 (Sca0), el antígeno de superficie celular 1 (Sca1), el antígeno de superficie celular 2 (Sca2) y el antígeno de superficie celular 5 (Sca5) anteriormente conocido como OmpB, SpaP, SPA o p120 (Noriea *et al.*, 2015, Yang *et al.*, 2016). En el presente estudio se detectó una proteína de membrana idéntica a la reportada en *Candidatus Hepatobacter penaei* en la base de datos del NCBI, implicada en los sistemas de adhesión, llamada antígeno de superficie celular 0 (Sca0).

Los resultados obtenidos indican que el inicio de la infección de *Candidatus Hepatobacter penaei* es llevado a cabo por la proteína de membrana Sca0, que interactúa con receptores de la célula hospedera. El encontrar únicamente una proteína de adherencia y no las diversas adhesinas reportadas para OTR, sugiere que las adhesinas presentes en la membrana de *Candidatus Hepatobacter penaei* son específicas de la cepa, es decir, que experimentaron modificaciones estructurales y funcionales dando lugar a una nueva integración entre adhesinas y células hospederas, las cuales aún no se han reportado (Clark y Vignjevic 2015).

Las bacterias pueden adquirir con frecuencia factores de virulencia a través de varios mecanismos; éstos producen patogenicidad en células y organismos que previamente eran inmunes (Mikula *et al.*, 2012).

5.14. Sistemas de secreción de *Candidatus Hepatobacter penaei*

Los sistemas de secreción se construyen inmediatamente después de producirse la interacción entre las adhesinas y los receptores de células hospederas. La función de los sistemas secretores es inyectar proteínas efectoras en el citosol de la célula hospedera, con el fin de apoderarse de su maquinaria celular (Krachler *et al.*, 2011). En OTR se ha detectado el sistema

de secreción tipo 4 el cual inyecta efectores como Sec7, LepA, LepB y patatinas en la célula diana, apoderándose de diversos mecanismos celulares (Wallden *et al.*, 2010).

En este trabajo se obtuvo evidencia de la presencia de proteínas relacionadas con los sistemas de secreción, de los cuales el tipo 1 (T1SS) participa en la secreción de proteínas del tipo I, un sistema transportador ABC para la secreción de proteínas sin escisión de una secuencia señal, aunque pueden, al igual que TolC, participar también en el flujo de salida de moléculas más pequeñas (Thomas *et al.*, 2014). La “DotU family type IV/VI secretion system protein”, es en realidad una asociación de dos proteínas a menudo codificadas por genes adyacentes; éstas muestran similitud de secuencia debido a la homología entre los sistemas de secreción de tipo IV y los sistemas de secreción de tipo VI, los cuales se unen firmemente a IcmF, permaneciendo anclados a la membrana interna en un extremo y la capa de peptidoglicano en el otro (Marchler *et al.*, 2017).

La “T6SS_VipA and VipB domain-containing protein”, es una proteína con los dominios VipA y VipB, que forman parte del sistema de secreción patogénica tipo VI. VipB y VipA interactúan muy estrechamente con el eje del sistema de agujas penetrantes patógenas (Kapitein *et al.*, 2013). “Type II protein secretion” transporta proteínas generalmente hidrolasas asociadas a la virulencia a través de la membrana externa de la célula bacteriana. El transporte a través de la membrana interna es a menudo, pero no exclusivamente, manejado por el sistema Sec (Desvaux *et al.*, 2009). “Type II secretion system D” se encuentra en la membrana externa, está asociada con el suministro de proteínas desde el periplasma al exterior de la célula (Yan *et al.*, 2017). “Type II/IV secretion system protein” sólo se conoce que contiene proteínas de secreción de vía de tipo II y tipo IV de bacterias (Peabody *et al.*, 2003). “Type IV pilus biogenesis and competence”, se requiere tanto para la estabilidad pilus, como para su función de adherencia a las células humanas. Los miembros de esta familia contienen copias del dominio TPR (Hospenthal *et al.*, 2017). “Type VI secretion protein_VasE” es una familia de proteínas bacterianas que son esenciales para el sistema de secreción patogénica tipo VI, aunque todavía no se conoce la función exacta de este componente particular del sistema (Basler *et al.*, 2012).

La información sobre los sistemas de secreción para *Candidatus* *Hepatobacter penaei* es escasa, aunque estos resultados ofrecen punto de partida para conocer sobre los sistemas de secreción implicados en la patogenicidad de la bacteria y más adelante, sobre los efectores de virulencia que le confieren control sobre la célula diana, provocando citotoxicidad y lisis celular.

5.15. División celular de *Candidatus* *Hepatobacter penaei*

La división celular bacteriana es un proceso complicado, que se basa en un complejo multi-proteínico compuesto de un núcleo de proteínas ampliamente conservadas y generalmente esenciales y de proteínas accesorias que varían en número e identidad en diferentes bacterias. El montaje de este complejo y en particular, la iniciación de la constricción, es un proceso regulado que ha estado bajo intenso estudio (Osorio *et al.*, 2017).

Se identificaron seis proteínas implicadas en procesos de división celular (FtsA, FtsE, FtsH, FtsQ, FtsW y Fic). La proteína FtsA es esencial para la división celular bacteriana, y co-localiza al anillo septal con FtsZ; se ha sugerido que la interacción de FtsA-FtsZ ha surgido a través de la co-evolución en diferentes cepas bacterianas (Mura *et al.*, 2017). FtsE se localiza junto con FtsX en el sitio de división celular, que en algunas especies este par de genes se encuentran junto a FtsY, que es la señal de reconocimiento de partículas de acoplamiento de proteínas (Marchler *et al.*, 2017). FtsH también conocida como HflB, es una proteína pleiotrópica necesaria para la correcta división celular en bacterias y tiene actividad metaloproteasa de zinc dependiente de ATP (Marchler *et al.*, 2017). FtsQ junto con DivIB contienen un dominio POTRA N-terminal para el dominio asociado al polipéptido-transporte; estas proteínas además de participar en el proceso de división bacteriana también pueden tener un papel similar a las chaperonas (Sánchez *et al.*, 2003). FtsW es una proteína con diez segmentos transmembrana, esencial para la división celular y es parálogo en la biosíntesis del peptidoglicano junto con RodA (Pastoret *et al.*, 2004). La proteína Fic conocida como la filamentación inducida por cAMP, está implicada en la división celular y se sugiere que está implicada en la síntesis de PAB o folato, lo que indica que la proteína Fic y cAMP están

involucrados en un mecanismo regulador de la división celular a través del metabolismo del folato (Kokaska *et al.*, 2015).

5.16. Proteínas de transporte de *Candidatus Hepatobacter penaei*

Las proteínas de transporte bacterianas median el transporte pasivo y activo de pequeños solutos a través de membranas, para el suministro de nutrientes externos y la eliminación de compuestos indeseables. Las secuencias de aminoácidos están altamente conservadas entre los transportadores bacterianos. Los sustratos que pueden ser transportados incluyen iones, aminoácidos, péptidos, azúcares y otras moléculas que son en su mayoría hidrofílicas (Goffeau *et al.*, 2013, Wilkens *et al.*, 2015).

Los transportadores ABC, son uno de los grupos de proteínas más grandes y omnipresentes, (Tian *et al.*, 2017), a menudo consisten en múltiples subunidades, una o dos de las cuales son proteínas transmembrana y ATPasas asociadas a la membrana (ter Beek *et al.*, 2014), utilizando la energía de ATP vinculante y la hidrólisis para el transporte de diversos sustratos a través de las membranas celulares (Wilkens *et al.*, 2015).

En este trabajo se demostró la presencia de diecisiete transportadores ABC, entre los que se encuentran transportadores ABC de unión a ATP (“ABC transporter ATP-binding ABCD_peroxisomal_ALDP, ABC transporter ATP-binding MlaF, ABC transporter ATP-binding protein YejF, ABC transporter ATP-binding protein LptB, ABC transporter ATP-binding protein LolD, ABC transporter ATP-binding protein MdlB 1, ABC transporter ATP-binding protein Superfamily AAA 1, ABC transporter ATP-binding protein Superfamily SunT 1, ABC transporter ATP-binding protein/permease”), los transportadores ABC permeasa (“ABC transporter permease YejE, ABC transporter permease MlaE, ABC transporter permease MdlB 2, ABC transporter permease Superfamily SunT 2, LPS export ABC transporter permease”) y otros (“ABC transporter substrate-binding protein, ABC transporter Superfamily AAA 2, Outer membrane lipid asymmetry maintenance protein MlaD”).

Los transportadores de aminoácidos son proteínas de transporte de membrana que trasladan aminoácidos, mediando la homeostasis, la activación y la diferenciación celular (Ren

et al., 2017). En este trabajo se detectaron tres proteínas de transporte: “Amino acid permease” involucrada en el transporte de aminoácidos la cual contiene doce segmentos transmembranales (Chen *et al.*, 2017) y la “pyridoxal phosphate-dependent aminotransferase” que al combinarse con un alfa-aminoácido forma un compuesto llamado base de Schiff o aldimina intermedia lo cual provoca la transaminación (movimiento de grupos amino) (Marchler *et al.*, 2017). Además, la proteína “EamA/RhaT family transporter” que se localiza en la membrana interna, implicada en el transporte de una variedad de sustratos tales como aminoácidos, fármacos, metabolitos y fosfatos de azúcar, entre otros (Västermark *et al.*, 2011).

Los transportadores de lípidos son proteínas encargadas de transportar lípidos, proteínas lipídicas, lipopolisacáridos, hormonas esteroides, bilinas, retinoides, entre otras, a través de las membranas biológicas. En este estudio se encontraron siete proteínas de transporte, descritas a continuación. “LicD family protein” transfiere la fosforilcolina (ChoP) de la colina-difosfonucleósido al lipopolisacárido (LPS) (Harper *et al.*, 2013). “YjgP/YjgQ family permease” es una proteína similar al sistema de exportación de lipopolisacáridos de *Escherichia coli* proteína permeasa LptF, parte del complejo transportador ABC LptBFG implicado en la translocación de LPS desde la membrana interna a la membrana externa (Marchler *et al.*, 2017). “Apolipoprotein N-acyltransferase” transfiere el grupo acilo a las lipoproteínas y participa en la biosíntesis de las lipoproteínas en bacterias Gram negativas (da Silva *et al.*, 2016). “Lipocalin” es una proteína transportadora de pequeñas moléculas hidrófobas, tales como lípidos, hormonas esteroides, bilinas y retinoides, con una estructura de beta barril de ocho cadenas (Kang *et al.*, 2017). “Lipoprotein-releasing system transmembrane subunit LolC” ha demostrado transportar lípidos dirigidos a la membrana externa a través de la membrana interna (Konovalova *et al.*, 2015). “Lipoyl(octanoyl) transferase” transfiere ácido octanoico endógeno unido a través de un enlace tioéster a la proteína portadora de acilo (ACP) sobre dominios de lipoilo, que se convierte posteriormente en lipoato sintasa LipA en derivados lipoilados (Hermes *et al.*, 2009).

Los transportadores de metales son las proteínas encargadas de trasladar los diversos componentes metálicos dentro y fuera de la célula. En el presente trabajo se localizaron seis transportadores de metales, descritos a continuación. “Magnesium transporter”, los miembros de esta familia transportan magnesio u otros cationes divalentes dentro de la célula

(Subramani *et al.*, 2016). “Metal ABC transporter substrate-binding ZnuB” que, además de participar como receptor inicial en el transporte de manganeso, también participa como adhesina superficial en algunas especies eubacterianas (Gabbianelli *et al.*, 2011). “Mg²⁺/Co²⁺ transporter CorB” (que contiene dominios “DUF21, CBS pair, and CorC-HlyC”), la cual está involucrada en el eflujo de magnesio y cobalto, su función es incierta, pero podría estar implicada en la modulación del transporte de sustratos iónicos (Hirata *et al.*, 2014). “Metal ABC transporter permease” es específica para iones metálicos tales como manganeso, zinc o hierro (Marchler *et al.*, 2017). “Potassium transporter” es una proteína de transporte de cationes (Trk) que forma el sistema de captación de potasio (Gierth *et al.*, 2017). “ZnuC family protein” se encuentra implicada en la captación de diversos cationes metálicos tales como hierro, manganeso y zinc (Gabbianelli *et al.*, 2011).

Las proteínas pertenecientes a la familia “Major Facilitator Superfamily” (MFS), facilitan el transporte a través de membranas citoplasmáticas o internas de una variedad de sustratos incluyendo iones, fosfatos de azúcar, fármacos, neurotransmisores, nucleósidos, aminoácidos y péptidos. Lo hacen utilizando el potencial electroquímico de los sustratos transportados (Quistgaard *et al.*, 2016). En este trabajo se predijeron siete proteínas MFS: “MFS Family permease, MFS transporter pfam07690 1, MFS transporter pfam07690 2, MFS transporter pfam07690 3, MFS transporter 1, MFS transporter 2 y MFS transporter 3”.

La vía de secreción general (Sec) comprende una maquinaria de exportación esencial, omnipresente y universal para la mayoría de las proteínas que se integran o se trasladan a través de la membrana plasmática. En este trabajo se encontraron cinco proteínas relacionadas con Sec, las cuales son descritas a continuación. SecA se une a la membrana plasmática donde interactúa con proOmpA para soportar la translocación de proOmpA a través de la membrana. La proteína SecA consigue esta translocación en asociación con la proteína SecY, de una manera dependiente de ATP. SecDF utiliza la fuerza motriz del protón para completar la translocación de proteínas después de la ATP-función dependiente de SecA. SecE. Esta familia de proteínas forma un complejo con SecY y SecE. SecA luego recluta el complejo SecYEG para formar un canal activo de translocación de proteínas. SecE es parte del núcleo heterotrímico, SecYEG, del sistema “Sec preprotein translocase”. Otros componentes son

ATPase SecA, un chaperon citosólico SecB y un complejo accesorio de SecDF y YajC (Tsirigotaki *et al.*, 2016).

La información recabada sobre las proteínas de transporte es útil para crear un modelo de transporte de proteínas, obteniendo una noción más clara de cómo se lleva a cabo el transporte de proteínas a través de las membranas de la bacteria *Candidatus* Hepatobacter penaei, necesario para lograr la invasión a la célula hospedera.

5.17. Proteínas de *Candidatus* Hepatobacter penaei implicadas en el movimiento y producción de ATP

El flagelo es un organelo locomotor para la propulsión bacteriana. La motilidad, así como la producción de ATP comprenden procesos vitales para la patogenicidad de *Candidatus* Hepatobacter penaei, involucrando una alta diversidad de proteínas. En este sentido, se detectó una amplia gama de proteínas que componen el sistema flagelar. Entre las proteínas detectadas que forman parte del sistema flagelar se encontraron siete proteínas que conforman el cuerpo basal, que actúa como un motor rotativo reversible (Flagellar basal body P-ring protein, Flagellar basal body rod, Flagellar basal body rod protein FlgC, Flagellar basal body rod protein FlgG, Flagellar basal body-associated protein FliL, Flagellar L-ring protein y Flagellar M-ring protein FliF), tres proteínas que conforman el gancho (hook), que funciona como una articulación universal (Flagellar hook, Flagellar hook-associated protein FlgK, Flagellar hook-length control protein FliK), siete que integran el motor flagelar (Flagellar motor MotA_ExbB, Flagellar motor protein MotB, Flagellar motor rotation OmpA_C-like, Flagellar motor stator protein MotA, Flagellar motor switch protein FliG, Flagellar motor switch protein FliM, Flagellar motor switch protein FliN) y cuatro implicadas en la biosíntesis flagelar (Flagellar biosynthesis protein FlhA, Flagellar biosynthesis protein FliQ, Flagellar biosynthesis protein FliP, Flagellum-specific ATP synthase FliI) (Terashima *et al.*, 2010).

La identificación de las proteínas productoras de ATP, implicadas en el movimiento bacteriano de *Candidatus* Hepatobacter penaei permiten conocer a detalle sobre la producción de energía y motilidad de la especie. En este trabajo se detectaron cuatro proteínas implicadas

en la producción de energía: ATP synthase subunit C, ATP synthase subunit alpha, F0F1 ATP synthase subunit beta y F0F1 ATP synthase subunit I. Estas enzimas forman parte del núcleo catalítico de ATPasa, utilizan un gradiente de protones para impulsar la síntesis e hidrólisis de ATP (Junge *et al.*, 2015).

5.18. Factores de virulencia de *Candidatus Hepatobacter penaei*

Los factores de virulencia permiten a *Candidatus Hepatobacter penaei* invadir a las células diana provocando patogenicidad (Nunan *et al.*, 2013). Los resultados mostraron la presencia de factores de virulencia tales como adhesinas, proteínas flagelares, sistemas de secreción, proteínas de división celular y de transporte, los cuales fueron discutidos en secciones anteriores. Sin embargo, se detectaron quince factores de virulencia adicionales en la bacteria *Candidatus Hepatobacter penaei* de los cuales no se encontró evidencia en reportes previos.

Dentro de las proteínas lipídicas se detectó Lipid-A-disaccharide synthase, una enzima que cataliza el primer paso de disacárido en la síntesis del lípido-A-disacárido, que participa en la biosíntesis de lipopolisacáridos (Metzger *et al.*, 2009) y Outer membrane lipoprotein SlyB que junto con SlyA, forma un complejo homo-oligomérico, requerido para la activación de genes de virulencia (Ludwig *et al.*, 1995).

Outer membrane protein assembly factor BamA junto con Outer membrane protein assembly factor BamD también llamada YfiO, son parte del complejo de montaje de proteína de membrana externa, que es esencial en el montaje e inserción de proteínas de beta barril en la membrana externa (Marchler *et al.*, 2017).

Hemolysin LPLAT es una proteína de membrana, localizada en la superficie celular de la cual no se conoce aún su función específica (Sakiyama *et al.*, 2011). Hemolysin D HlyD_3 se encuentra anclada a la membrana citoplasmática por un único dominio transmembrana y forma parte del componente del sistema prototípico de secreción bacteriana de tipo alfa-hemolisina (HlyA), que sirve para formar un canal trans-membrana o poro a través del cual se puede transferir HlyA directamente al medio extracelular (Su *et al.*, 2012). Membrane

insertion efficiency factor Superfamily Haemolytic es una pequeña proteína no esencial que mejoran la inserción de proteínas de membrana interna dependiente de YidC (Yu *et al.*, 2011).

La proteína de efecto antiapoptótico de resistencia al patógeno tiene un efecto antiapoptótico ya sea estimulando la función antiapoptótica de Bcl-2 o inhibiendo el efecto proapoptótico de Bax (Chang *et al.*, 2014). AcrB/AcrD/AcrF family protein es una proteína de motilidad que se requiere para la autoresistencia a la surfactina, que es un surfactante lipopeptídico antimicrobiano (Murakami *et al.*, 2002). Major capsid protein representa el componente principal de la cápside bacteriana del bacteriófago HK97, phi-105, P27 y fagos relacionados (Krupovic *et al.*, 2017). Membrane protein insertase YidC funciona como una proteína de membrana chaperona y como una insertasa independiente para proteínas de membrana (Kuhn *et al.*, 2017).

La identificación de los componentes de virulencia de *Candidatus* Hepatobacter penaei que se presenta en la Tabla 3 y se esquematiza en la Figura 6, representa información relevante para entender en profundidad su mecanismo de infección, para poder crear un posible modelo de infección para *Candidatus* Hepatobacter penaei y otros OTR (Figura 7). También representa información útil para el sector acuícola y, por lo tanto, para desarrollar estrategias basadas en mecanismos moleculares que inhiban algunos de estos factores de virulencia.

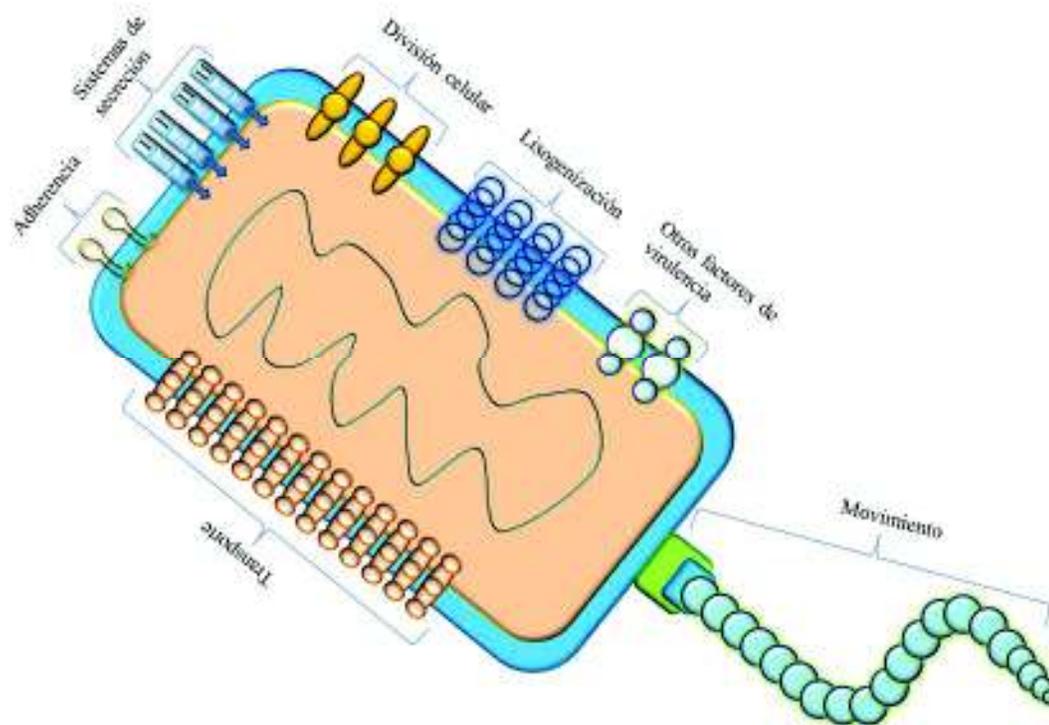


Figura 6. Funciones ejercidas por proteínas transmembranales inferidas a través del análisis bioinformático de secuencia genómica y consideradas como factores de virulencia de la bacteria causante de necrosis hepatopancreática *Candidatus* Hepatobacter penaei.

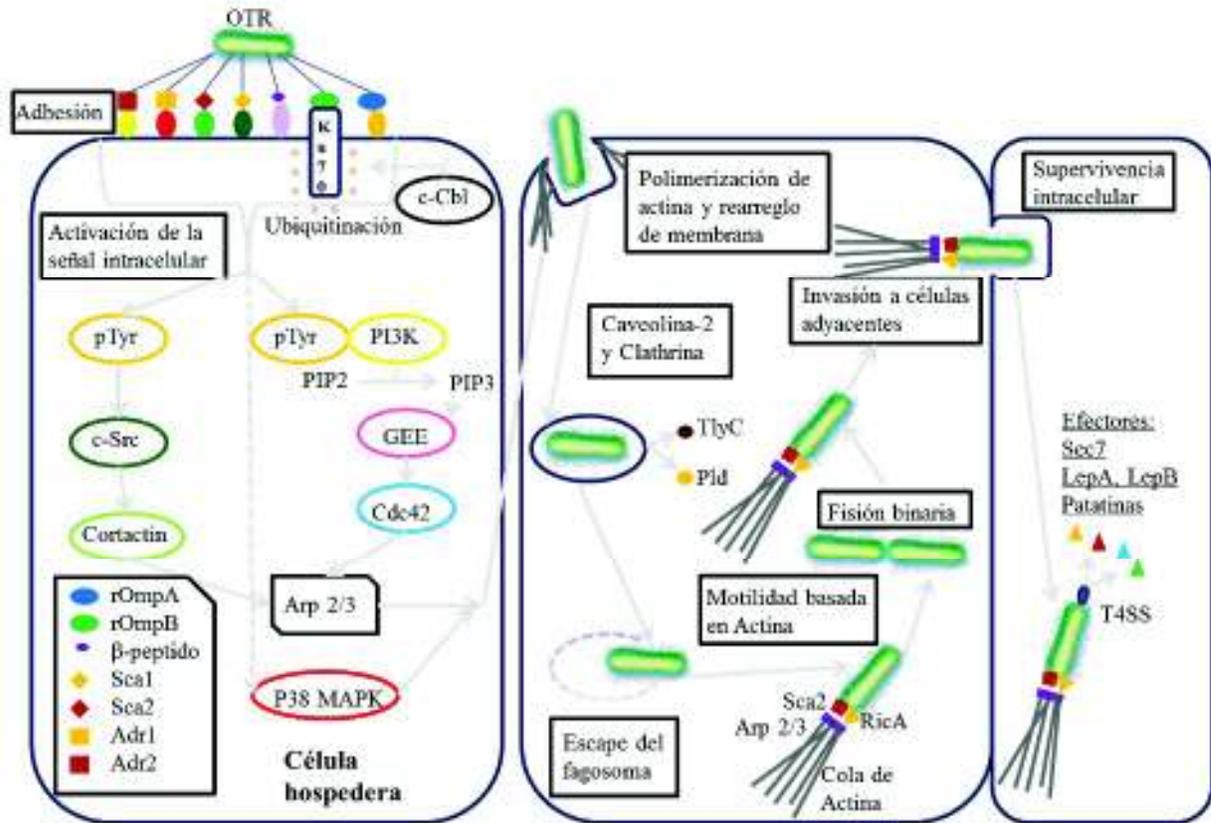


Figura 7. Posible modelo de invasión para *Candidatus Hepatobacter penaei* y otros OTR que se puede inferir gracias a las proteínas integrales de membrana encontradas a través del análisis bioinformático de secuencia genómica.

VI. CONCLUSIONES

Los resultados obtenidos sugieren que el inicio de la infección por *V. parahaemolyticus* está mediado por un grupo de adhesinas que interactúan con la célula hospedera. Se pueden detectar diferentes adhesinas específicas para cada célula diana dependiendo de la cepa; además, estas cepas pueden adquirir frecuentemente factores de virulencia que producen patogenicidad en células y organismos que previamente eran inmunes a estas bacterias. Esto explica por qué repentinamente las bacterias no patógenas pueden causar epizootias en la acuicultura, lo que aunado a la presencia del plásmido AP3 en la cepa patógena, resulta mortal para el camarón blanco.

Por otro lado, la detección de MSHA en *V. parahaemolyticus*, sin la detección de proteínas involucradas en los sistemas de secreción tipo 3-1 y 3-2 (T3SS1 y T3SS2), los cuales están fuertemente relacionados con el proceso de infección, sugiere que algunos de estos tipos de proteínas no se extrajeron con éxito por este método.

La identificación de varios componentes de virulencia de *V. parahaemolyticus* representa información relevante para entender en profundidad su mecanismo de infección, lo cual es útil para desarrollar estrategias de inhibición de estos factores de virulencia.

Los resultados sugieren que ambas cepas cuentan con factores de virulencia similares, por lo que la diferencia parece radicar únicamente en que la cepa patógena produce una toxina binaria (PirA y PirB) que el sistema inmune del camarón es incapaz de procesar o eliminar, dejando a la célula hospedera sin defensa alguna.

Finalmente, estos resultados demostraron la presencia de proteínas de membrana comúnmente asociadas a diversas funciones biológicas de *V. parahemolyticus*; generándose la primera detección de proteínas involucradas en el proceso de adhesión (OmpA), sistemas de secreción (T2SS), división celular (FtsH, FtsZ y ZipA), transporte (TolC, Porin4, Maltose), lisogenización (HflD, HflC y HflK), factores de virulencia y resistencia a patógenos, con lo que se puede inferir un posible modelo de invasión contribuyendo a una mejor comprensión de la biología de los especímenes.

En el caso de *Candidatus* Hepatobacter penaei los resultados obtenidos nos indican que el inicio de la infección podría ser llevado a cabo por la proteína de membrana Sca0 que interactúa con receptores de la célula hospedera. La identificación de los componentes de virulencia de *Candidatus* Hepatobacter penaei representa información relevante para entender en profundidad su mecanismo de infección, para poder crear un posible modelo de infección. También representa información útil para el sector acuícola para desarrollar estrategias de control basadas en mecanismos moleculares que inhiban algunos de estos factores de virulencia.

VII. RECOMENDACIONES

Para lograr una concentración adecuada de proteínas integrales de membrana de *Candidatus* Hepatobacter penaei, que permita llevar a cabo los análisis necesarios, se requiere contar con una mayor cantidad de bacteria aislada, para que, después de realizarse las diferentes etapas de purificación, la concentración de proteínas integrales de membrana sea mayor a la detectada por el equipo de cromatografía líquida acoplada a la espectrometría masas/masas (LC-MS/MS) por el método de ITRAQ, ya que esta tecnología detecta concentraciones mínimas, en el rango de los picomoles.

VIII. LITERATURA CITADA

- Basler M., Pilhofer M., Henderson G.P., Jensen G.J. y Mekalanos J.J. 2012. Type VI secretion requires a dynamic contractile phage tail-like structure. *Nature*. 483(7388):182-6. doi: 10.1038/nature10846.
- Bitbol F. y Wingreen S. 2015. Fundamental constraints on the abundances of chemotaxis proteins. *Biophysical Journal*. Lewis-Sigler Institute for Integrative Genomics, Department of Physics, and Department of Molecular Biology, Princeton University, Princeton, NJ 08544, USA.
- Bradford M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72:248-254.
- Bradley D. J., Pantoja C. y Lightner D. V. 2004. Development of monoclonal antibodies for detection of necrotizing hepatopancreatitis in penaeid shrimp. *Diseases of Aquatic Organisms* 60, 233-240.
- Briñez B., Aranguren F. y Salazar M. 2003. Fecal samples as DNA source for the diagnosis of necrotizing hepatopancreatitis (NHP) in *Penaeus vannamei* broodstock. *Diseases of Aquatic Organisms* 55, 69-72.
- Cárdenas P., Cruz L., Gándara R. y Pérez H. 2014. Factores de virulencia bacteriana: la “inteligencia” de las bacterias. *Elementos*. 94, 35-43.
- Chan Y.G., Cardwell M.M., Hermanas T.M., Uchiyama T. y Martinez J. J. 2009. Rickettsial outer-membrane protein B (rOmpB) mediates bacterial invasion through Ku70 in an actin, c-Cbl, clathrin and caveolin 2-dependent manner. *Cell Microbiology* 11: 629-644.
- Chang Y., Bruni R., Kloss B., Assur Z., Kloppmann E., Rost B., Hendrickson W. A. y Liu Q. 2014. Structural basis for a pH-sensitive calcium leak across membranes. *Science*. 344(6188):1131-5. doi: 10.1126/science.1252043.
- Chen F.J., Lauderdale T.L., Wang L.S. y Huang I.W. 2013. Complete Genome Sequence of *Staphylococcus aureus* Z172, a Vancomycin-Intermediate and Daptomycin-Nonsusceptible Methicillin-Resistant Strain Isolated in Taiwan. *Genome Announc.* 1:e01011-13.
- Chen X., Wang Z., Guo X., Liu S. y He X. 2017. Regulation of general amino acid permeases Gap1p, GATA transcription factors Gln3p and Gat1p on 2-phenylethanol biosynthesis via Ehrlich pathway. *Journal of Biotechnology*. Pages 83–91. Volume 242.
- Chu C. Y., Stewart P. E., Bestor A., Hansen B., Lin T., Gao L., Norris S. J., y Rosa P. A. 2016. Function of the *Borrelia burgdorferi* FtsH Homolog Is Essential for Viability both *In Vitro* and *In Vivo* and Independent of HflK/C. *mBio*. doi: 10.1128/mBio.00404-16.

- Clark A. G. y Vignjevic D. M. 2015. Modes of cancer cell invasion and the role of the microenvironment. *Current Opinion in Cell Biology*. 36:13–22. <https://doi.org/10.1016/j.ceb.2015.06.004>.
- Conesa A., Götz S., García G., Terol J., Talón M. y Robles M. 2005. Blast2GO: a universal tool for annotation, visualization and analysis in functional genomics research. *Bioinformatics*, 21(18), 3674-3676.
- Coulthurst S. J. 2013. The Type VI secretion system – a widespread and versatile cell targeting system. *Res. Microbiol.* 164, 640–654. doi: 10.1016/j.resmic.2013.03.017.
- Cournia Z., Allen T. W., Andricioaei I., Antonny B., Baum D., Brannigan G., Buchete N. V., Deckman J. T., Delemotte L., Val C., Friedman R., Gkeka P., Hege H. C., Hénin J., Kasimova M. A., Kolocouris A., Klein M. L., Khalid S., Lemieux M. J., Lindow N., Roy M., Selent J., Tarek M., Tofoleanu F., Vanni S., Urban S., Wales D. J., Smith J. C. y Bondar A. N. 2015. Membrane Protein Structure, Function and Dynamics: A Perspective from Experiments and Theory. *J Membr Biol.* 2015 Aug; 248(4): 611–640. doi: 10.1007/s00232-015-9802-0.
- COSAES. 2014. Informe final ciclo 2014. Seguimiento a los cultivos de camarón del estado de sonora. Comité de Sanidad Acuícola del Estado de Sonora, A.C. Sitio: <http://www.cosaes.com/Informe%20Final%20COSAES%202014%20Camaron.pdf>.
- Desvaux M., Hébraud M., Talon R. y Henderson I. R. 2009. Secretion and subcellular localizations of bacterial proteins: a semantic awareness issue. *Trends Microbiol.* 139-45. doi: 10.1016/j.tim.2009.01.004.
- FAO. 2014 (Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura).El estado mundial de la pesca y la acuicultura. Sitio: <http://www.fao.org/3/a-i3720s.pdf>.
- Frelier P. F., Sis R. F., Bell T.A. y Lewis D. H. 1992. Microscopic and ultrastructural studies of necrotizing hepatopancreatitis in Pacific white shrimp (*Penaeus vannamei*) cultured in Texas. *Veterinary Pathology* 4: 269-277.
- De Maayer P., Chan W. Y., Rezzonico F., Bühlmann A., Venter S. N., Blom J., Goesmann A., Frey J. E., Smits T. H. M., Duffy B., y Coutinho T. A. 2012. Complete Genome Sequence of Clinical Isolate *Pantoea ananatis* LMG 5342. *J. Bacteriol.* doi: 10.1128/JB.06715-11.
- Gierth M. y Mäser P. 2017. Potassium transporters in plants – Involvement in K⁺ acquisition, redistribution and homeostasis. Volume 581, Issue 12, Pages 2348-2356. *FEBS Letters*.
- Giubergia S., Machado H., Mateiu R.V. y Gram L. 2015. *Vibrio galathea* sp. nov., a novel member of the Vibrionaceae family isolated from the Solomon Islands.
- Gode P., Kustus R. J., Breheny P. J., Weiss D. S. y McCarter L. L. 2011. Surface sensing in *Vibrio parahaemolyticus* triggers a programme of gene expression that promotes

- colonization and virulence. *Mol. Microbiol.* 79 240–263 10.1111/j.1365-2958.2010.07445.
- Goffeau A., de Hertogh B. y Baret P. V. 2013. ABC Transporters. In Lane W. J, Lennarz M. D. *Encyclopedia of Biological Chemistry* (Second ed.). London: Academic Press. ISBN 978-0-12-378631-9. doi:10.1016/B978-0-12-378630-2.00224-3.
- Gollas G., Avila V., Martínez P. y Hernandez L. 2013. Rickettsia-like organisms from cultured aquatic organisms, with emphasis on necrotizing hepatopancreatitis bacterium affecting penaeid shrimp: an overview on an emergent concern. *Reviews in Aquaculture* 5: 1-14.
- Guardiola A., Acedo F., Sifuentes R., Yepiz P., Gomez G. y Noriega O. 2016. Molecular and Genomic Characterization of *Vibrio mimicus* Isolated from a Frozen Shrimp Processing Facility in Mexico. *PLoS ONE* 11(1): e0144885. doi:10.1371/journal.pone.0144885.
- Han J. E., Tang K. F., Tran L. H. y Lightner D. V. 2015. 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.
- Harper M., St Michael F., Vinogradov E., John M., Steen J., van Dorsten L., Boyce J., Adler B. y Cox A. 2013. Structure and biosynthetic locus of the lipopolysaccharide outer core produced by *Pasteurella multocida* serovars 8 and 13 and the identification of a novel phospho-glycero moiety. *Glycobiology* vol. 23 no. 3 pp. 286–294. doi: 10.1093/glycob/cws154.
- Hebert K. S., Seidman D., Oki A. T., Izac J., Emani S., Oliver L. D., Miller D. P., Tegels B. K., Kannagi R., Marconi R. T. y Carlyon J. A. 2016. *Anaplasma marginale* outer membrane protein A is an adhesin that recognizes sialylated and fucosylated glycans and functionally depends on an essential binding domain.
- Hospenthal M. K., Costa T. R. D. y Waksman G. 2017. A comprehensive guide to pilus biogenesis in Gram-negative bacteria. *Nature reviews microbiology*. 15, 365–379. doi:10.1038/nrmicro.2017.40.
- Hsieh Y. C., Liang S. M., Tsai W. L., Chen Y. H., Liu T. Y. y Liang. C. M. 2003. Study of capsular polysaccharide from *Vibrio parahaemolyticus*. *Infection and immunity* 71, 3329–3336. vol. 71 no. 6 3329-3336. doi: 10.1128/IAI.71.6.3329-3336.2003.
- Ibarra G., Galavíz S., Molina G. 2007. Distribución de la bacteria causante de la necrosis hepatopancreática (NHPB) en cultivos de camarón blanco, *Litopenaeus vannamei*, en México. *Ciencias Marinas*. Universidad Autónoma de Baja California México.
- Ivicak K. K., Panter G., Bencina M. y Jerala R. 2013. Determination of the physiological 2:2 TLR5:flagellin activation stoichiometry revealed by the activity of a fusion receptor. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 435:40-45.

- Jiang W., Han X., Wang Q., Li X., Yi L., Liu Y. y Ding C. 2014. *Vibrio parahaemolyticus* enolase is an adhesion-related factor that binds plasminogen and functions as a protective antigen. *Appl Microbiol Biotechnol* 98, 4937–48.
- Junge W. y Nelson N. 2015. ATP synthase. *Annual Review of Biochemistry*. 84: 631–57. doi:10.1146/annurev-biochem-060614-034124.
- Kang S. S., Ren Y., Liu C. C., Kurti A., Baker K. E, Bul G., Asmann Y. y Fryer J. D. 2017. Lipocalin-2 protects the brain during inflammatory conditions. *Molecular Psychiatry*. doi: 10.1038/mp.2016.243.
- Kebbi B. C., Domröse A., Becker E., Cisse O. H., Hegemann J. H. y Greub G. 2015. OmpA family proteins and Pmp-like autotransporter: new adhesins of *Waddlia chondrophila*. *Pathog Dis*. doi: 10.1093/femspd/ftv035.
- Kim J.S., Song S., Lee M., Lee S., Lee K. y Ha N.C. 2016. Crystal Structure of a Soluble Fragment of the Membrane Fusion Protein HlyD in a Type I Secretion System of Gram-Negative Bacteria. *Structure* 24:477-485(2016).
- Kleba B., Clark T., Lutter E., Ellison D. y Hackstadt T. 2010. Disruption of the *Rickettsia rickettsii* Sca2 autotransporter inhibits actin-based motility. *Infection and Immunology* 78: 2240-2247.
- Krachler A. M., Ham H. y Orth K. 2011. Outer membrane adhesion factor multivalent adhesion molecule 7 initiates host cell binding during infection by gram-negative pathogens. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 108, 11614–11619. doi: 10.1073/pnas.1102360108.
- Krol M, Hawkins E. y Overstreet M. 1991. Rickettsial and mollicute infections in hepatopancreatic cells of cultured Pacific white shrimp (*Penaeus vannamei*). *Journal of the Invertebrate Pathology* 57: 362-370.
- Krupovic M. y Koonin E. V. 2017. Multiple origins of viral capsid proteins from cellular ancestors. *PNAS*. E2401–E2410.
- Kokaska y Ashlynn M. 2015. Assessing the Role of Fic (Filamentation Induced by cAMP) Proteins in *E. coli*. *The Journal of Purdue Undergraduate Research: Vol. 5, Article 24*. DOI: 10.5703/1288284315667.
- Konovalova A. y Silhavy T. J. 2015. Outer membrane lipoprotein biogenesis: Lol is not the end. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*. 370(1679): 20150030. doi: 10.1098/rstb.2015.0030.
- Korotkov K.V., Sandkvist M. y Hol W. G. 2012. "The type II secretion system: biogenesis, molecular architecture and mechanism". *Nature Reviews Microbiology*. 10: 336–351. doi:10.1038/nrmicro2762.
- Kuhn A. y Kiefer D. 2017. Membrane protein insertase YidC in bacteria and archaea. *MicroReview*. DOI: 10.1111/mmi.13586.

- Kumari P., Poddar A. y Das S.K. 2014. FtsZ gene sequences of *Vibrio* strains. Nucleotide sequence.
- Laemmli A. 1970. Cleavage of structural protein during assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*. 277(5259):680-685.
- Lightner D. V., Redman R. M., Pantoja C. R., Noble B. L. y Tran L. 2012. Early mortality syndrome affects shrimp in Asia. *Global Aquaculture Advocate*;15:40.
- Liu M., y Chen S. 2015. A novel adhesive factor contributing to the virulence of *Vibrio parahaemolyticus*. *Scientific Reports*, 5, 14449. <http://doi.org/10.1038/srep14449>.
- Ludwig A., Tengel C., Bauer S., Bubert A., Benz R., Mollenkopf H. J. y Goebel W. 1995. SlyA, a regulatory protein from *Salmonella typhimurium*, induces a haemolytic and pore-forming protein in *Escherichia coli*. *Mol. Gen. Genet.*
- Lux T. M., Lee R. y Love J. 2011. Complete genome sequence of a free-living *Vibrio furnissii* sp. nov. strain (NCTC 11218). *J. Bacteriol.* 193:1487-1488(2011).
- McAlister G. C., Huttlin E. L., Haas W., Ting L., Jedrychowski M. P., Rogers J. C., Kuhn K., Pike I., Grothe R. A. y Blethrow J. D. 2012. Increasing the multiplexing capacity of TMTs using reporter ion isotopologues with isobaric masses. *Anal Chem* 84, 7469–7478.
- Makino K., Oshima K., Kurokawa K., Yokoyama K., Uda T., Tagomori K., Iijima Y., Najima M., Nakano M., Yamashita A., Kubota Y., Kimura S., Yasunaga T., Honda T., Shinagawa H., Hattori M. y Iida T. 2003. Genome sequence of *Vibrio parahaemolyticus*: a pathogenic mechanism distinct from that of *V. cholerae*. *Lancet* 361:743-749.
- Marchler B. A., Derbyshire M. K., Gonzales N. R., Lu S., Chitzas F., Geer L. Y., Geer R. C., He J., Gwadz M., Hurwitz D. I., Lanczycki C. J., Lu F., Marchler G. H., Song J. S., Thanki N., Wang Z., Yamashita R. A., Zhang D., Zheng C. y Bryant S. H. 2015. CDD: NCBI's conserved domain database. *Nucleic Acids Research* 43: 222-226. doi: 10.1093/nar/gku1221.
- Marchler B. A. Bo Y., Han L., He J., Lanczycki C. J., Lu S., Chitsaz F., Derbyshire M. K., Geer R. C., Gonzales N. R., Gwadz M., Hurwitz D. I., Lu F., Marchler G. H., Song J. S., Thanki N., Wang Z., Yamashita R. A., Zhang D., Zheng C., Geer L. Y. y Bryant S. H. 2017. CDD/SPARCLE: functional classification of proteins via subfamily domain architectures. *Nucleic Acids Res.* 45(D1):D200-D203. doi: 10.1093/nar/gkw1129.
- Metzger L.E. y Raetz C. R. 2009. Purification and characterization of the lipid A disaccharide synthase (LpxB) from *Escherichia coli*, a peripheral membrane protein. *Biochemistry*. 48(48): 11559–11571. pmid:19883124.
- Mikula K. M., Kolodziejczyk R. y Goldman A. 2012. Yersinia infection tools-characterization of structure and function of adhesins. *Frontiers in cellular and infection microbiology* 2, 169.

- Morado J., Sparks A. y O'Clair C. 1988. A preliminary study of idiopathic lesions in the Dungeness crab, *Cancer magister*, from Rowan Bay, Alaska. *Marine Environmental Research* 26: 311-318.
- Morales C., Lemus P., Solís M., Ruíz L. y Conroy G. 2011. Prevalence of diseases in cultured white shrimp (*penaeus vannamei*) in eight regions of Latin America. *Rev. Científica, FCV-LUZ*, 2 (5), 434–446.
- Morales R., Montgomery G., Leslie W., y Walkera E. 2015. Structure of ATP synthase from *Paracoccus denitrificans* determined by X-ray crystallography at 4.0 Å resolution. *PNAS*, vol. 112. no. 43. 13231–13236.
- Morales V. y Cuellar J. 2014. Guía técnica-patología e inmunología de camarones peneidos, 382 pp. OIRSA, Panamá.
- Mura A., Fadda D., Perez A. J., Danforth M. L., Musu D., Rico A. I., Krupka M., Denapaite D., Tsui H.-C.T., Winkler M. E., Branny P., Vicente M., Margolin W. y Massidda O. 2017. Roles of the essential protein FtsA in cell growth and division in *Streptococcus pneumoniae*. *J Bacteriol* 199:e00608-16. <https://doi.org/10.1128/JB.00608-16>.
- Murakami S., Nakashima R., Yamashita E. y Yamaguchi A. 2002. Crystal structure of bacterial multidrug efflux transporter AcrB. *Nature*. 419(6907):587-93. DOI: 10.1038/nature01050.
- Noriea N., Clark T. y Hackstadt T. 2015. Targeted knockout of the *Rickettsia rickettsii* OmpA surface antigen does not diminish virulence in a mammalian model system. *MBio* 6: e00323-15.
- Nunan M., Pantoja R., Gomez J. y Lightner V. 2013. “*Candidatus* Hepatobacter penaei,” an Intracellular Pathogenic Enteric Bacterium in the Hepatopancreas of the Marine Shrimp *Penaeus vannamei* (Crustacea: Decapoda). *AEM* p. 1407–1409. Volume 79 Number 4. doi: 10.1128/AEM.02425-12.
- Quistgaard E. M., Löw C., Guettou F. y Nordlund P. 2016. Understanding transport by the major facilitator superfamily (MFS): structures pave the way. *Nature reviews molecular cell biology*.
- Rajagopala S. V., Sikorski P., Kumar A., Mosca R., Vlasblom J., Arnold R., Franca-Koh J., Pakala S.B., Phanse S., Ceol A., Hauser R., Siszler G., Wuchty S., Emili A., Babu M., Aloy P., Pieper R. y Uetz P. 2014. The binary protein-protein interaction landscape of *Escherichia coli*. *Nat. Biotechnol.* 32:285-290.
- Ren W., Liu G., Yin J., Tan B., Wu G., Bazer F. W., Peng Y. y Yin Y. 2017. Amino-acid transporters in T-cell activation and differentiation. *Cell Death and Disease*. 8, e2655; doi:10.1038/cddis.2016.222.
- Roh H., Yun E. J., Lee S., Ko H. J., Kim S., Kim B. Y., Song H., Lim K. I., Kim K. H. y Choi I. G. 2012. Genome sequence of *Vibrio* sp. strain EJY3, an agarolytic marine bacterium

- metabolizing 3,6-anhydro-L-galactose as a sole carbon source. *J. Bacteriol.* 194:2773-2774.
- Ronholm J., Petronella N., Kenwell R. y Banerjee S. 2015. Foodborne *Vibrio parahaemolyticus* Isolates. Nucleotide sequence (large scale genomic DNA).
- Sánchez P., Devos D., Genevrois S., Vicente M. y Valencia A. 2003. POTRA: a conserved domain in the FtsQ family and a class of beta-barrel outer membrane proteins. *Trends Biochem Sci.* PMID: 14559180.
- Salomon D., Klimko J. A., Trudgian D. C., Kinch L. N., Grishin N. V., Mirzaei H. y Orth K. 2015. Type VI Secretion System Toxins Horizontally Shared between Marine Bacteria. Sitio: <http://dx.doi.org/10.1371/journal.ppat.1005128>.
- Sakiyama T., Araie H., Suzuki I. y Shiraiwa Y. 2011. Functions of a hemolysin-like protein in the cyanobacterium *Synechocystis sp.* PCC 6803. *Arch Microbiol.* 193(8):565-71. doi: 10.1007/s00203-011-0700-2.
- Sievers F., Wilm A., Dineen D., Gibson T. J., Karplus K., Li W., Lopez R., McWilliam H., Remmert M., Söding J., Thompson J. D. y Higgins D. G. 2011. Fast, scalable generation of high-quality protein multiple sequence alignments using Clustal Omega. *Mol. Syst. Biol.*, 7, 539. doi: 10.1038/msb.2011.75.
- Söding J. 2005. Protein homology detection by HMM-HMM comparison. 21,7:951-60. doi: 10.1093/bioinformatics/bti125.
- Subramani S., Perdreau D. y Preben M. 2016. The magnesium transporter A is activated by cardiolipin and is highly sensitive to free magnesium *in vitro*. <https://doi.org/10.7554/eLife.11407.001>.
- O'Boyle N., Houeix B., Kilcoyne M., Joshi L. y Boyd A. 2013. The MSHA pilus of *Vibrio parahaemolyticus* has lectin functionality and enables TTSS-mediated pathogenicity. *Int. J. Med. Microbiol.* 303, 563–573. doi: 10.1016/j.ijmm.2013.07.010.
- O'Boyle N. y Boyd A. 2014. Manipulation of intestinal epithelial cell function by the cell contact-dependent type III secretion systems of *Vibrio parahaemolyticus*. *Front Cell Infect Microbiol.* 3: 114. doi: 10.3389/fcimb.2013.00114.
- Osorio A., Camarena L., Cevallos M. A. y Poggio S. 2017. A new essential cell division protein in *Caulobacter crescentus*. *Journal of bacteriology.* doi: 10.1128/JB.00811-16.
- Pastoret S., Fraipont C., den Blaauwen T., Wolf B., Aarsman M. E., Piette A., Thomas A., Brasseur R. y Nguyen-Distèche M. 2004. Functional analysis of the cell division protein FtsW of *Escherichia coli*. *J Bacteriol.* PMID: 15576787 PMCID: PMC532424 DOI: 10.1128/JB.186.24.8370-8379.2004.
- Pérez A., Martínez P., Gollas G., Martínez C., Gutiérrez M. y López T. 2017. Proteínas transmembranales de organismos tipo rickettsia (OTR) en animales acuáticos: Factores

- de adherencia, invasión e infección. *Revista de Biología Marina y Oceanografía* Vol. 52, N°1: 19-32. DOI 10.4067/S0718-19572017000100002.
- Phiwsaiya K., Charoensapsri W., Taengphu S., Dong T., Sangsuriya P., Nguyen T., Pham Q., Amparyup P., Sritunyalucksana K., Taengchaiyaphum S., Chaivisuthangkura P., Longyant S., Sithigorngul P. y Senapina S. 2017. A Natural *Vibrio parahaemolyticus* Δ pirAVp pirBVp⁺ Mutant Kills Shrimp but Produces neither PirVp Toxins nor Acute Hepatopancreatic Necrosis Disease Lesions. *Appl. Environ. Microbiol.* vol. 83 no. 16. doi: 10.1128/AEM.00680-17.
- Leyva J. M., Martínez-Porchas M., Vargas-Albores F., Hernández-López J., Gollas-Galván T. 2017. Análisis bioinformático del sistema flagelar de la alphaproteobacteria tipo rickettsia *Candidatus* *Hepatobacter penaei*. *Revista de Biología Marina y Oceanografía* Vol. 52, N°1: 121-130.
- Lightner D. V., Redman R. M. y Bonami J. R. 1992. Morphologic evidence for a single bacterial etiology in Texas necrotizing hepatopancreatitis in *Penaeus vannamei* (Crustacea: Decapoda). *Diseases of Aquatic Organism* 13: 235-239.
- Loy J. K., Dewhirst F. E., Weber W., Frelter P. F., Garbar T. L., Tasca S. I. y Templeton J. W. 1996. Molecular phylogeny and *in situ* detection of the etiologic agent of necrotizing hepatopancreatitis in shrimp. *Applied and Environmental Microbiology* 62: 3439-3445.
- Soto R., Gómez G., Lozano O., Betancourt L. y Morales C. 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. *Appl Environ Microbiol* 81:1689–1699. doi:10.1128/AEM.03610-14.
- Su L., Chen S., Yi L., Woodard R. W., Chen J. y Wu J. 2012. Extracellular overexpression of recombinant *Thermobifida fusca* cutinase by alpha-hemolysin secretion system in *E. coli* BL21(DE3). *Microb Cell Fact.* 11:8. doi: 10.1186/1475-2859-11-8.
- Tae H., Shallom S., Settlege R., Preston D., Adams L.G. y Garner H.R. 2011. Revised genome sequence of *Brucella suis* 1330. *J. Bacteriol.* 193:6410-6410.
- Tateda C., Kusano T. y Takahashi Y. 2012. The Arabidopsis voltage-dependent anion channel 2 is required for plant growth. *Plant Signal Behav* 7:31-33.
- Takekawa N., Li N., Kojima S. y Homma M. 2012. Characterization of PomA mutants defective in the functional assembly of the Na⁺-driven flagellar motor in *Vibrio alginolyticus*. *J. Bacteriol.* 194:1934-1939.
- ter Beek J., Guskov A. y Slotboom D. J. 2014. Structural diversity of ABC transporters. *The Journal of General Physiology.* 143 (4): 419–35. PMC 3971661. PMID 24638992. doi:10.1085/jgp.201411164.
- Terashima H., Koike M., Kojima S. y Homma M. 2010. The Flagellar Basal Body-Associated Protein FlgT Is Essential for a Novel Ring Structure in the Sodium-Driven *Vibrio* Motor. *Journal of bacteriology.* vol. 192 no. 21 5609-5615. doi: 10.1128/JB.00720-10.

- Thomas S., Holland I. B. y Schmitt L. 2014. The Type 1 secretion pathway - the hemolysin system and beyond. *Biochim Biophys Acta*.1843(8):1629–41. PMID: 24129268 DOI: 10.1016/j.bbamcr.2013.09.017.
- Tian L., Song T., He R., Zeng Y., Xie W., Wu Q., Wang S., Zhou X. y Zhang Y. 2017. Genome-wide analysis of ATP-binding cassette (ABC) transporters in the sweetpotato whitefly, *Bemisia tabaci*. *BMC Genomics*. DOI: 10.1186/s12864-017-3706-6.
- Tsirigotaki A., De Geyter J., Šoštarić N., Economou A. y Karamanou S. 2016. Protein export through the bacterial Sec pathway. *Nature reviews microbiology*. 15, 21–36 doi:10.1038/nrmicro.2016.161.
- Västermark A., Almén M. A., Simmen M. W., Fredriksson R. y Schiöth H. B. 2011. Functional specialization in nucleotide sugar transporters occurred through differentiation of the gene cluster EamA (DUF6) before the radiation of Viridiplantae. *BMC Evolutionary Biology*. DOI: 10.1186/1471-2148-11-123.
- Vit O. y Petrak J. 2017. Integral membrane proteins in proteomics. How to break open the black box?. *J Proteomics*. 153:8-20. doi: 10.1016/j.jprot.2016.08.006.
- Wallden K., Rivera-Calzada A., y Waksman G. 2010. Type IV secretion systems: versatility and diversity in function. *Cell Microbiol*. 12(9): 1203–1212. doi: 10.1111/j.1462-5822.2010.01499.x.
- Wilkens S. 2015. Structure and mechanism of ABC transporters. *F1000Prime Rep*. doi: 10.12703/P7-14.
- Wu X. B., Tian L. H., Zou H. J., Wang C. Y., Yu Z. Q., Tang C. H., Zhao F. K. y Pan J. Y. 2013. Outer membrane protein OmpW of *Escherichia coli* is required for resistance to phagocytosis. *Res Microbiol*. PMID: 23811183 DOI: 10.1016/j.resmic.2013.06.008.
- Yan Z., Yin M., Xu D., Zhu Y. y Li X. 2017. Structural insights into the secretin translocation channel in the type II secretion system. *Nature Structural & Molecular Biology* 24, 177–183. doi:10.1038/nsmb.3350.
- Yang A., Narechania A. y Kim E. 2016. Rickettsial endosymbiont in the ‘earlydiverging’ streptophyte green alga *Mesostigma viride*. *Journal of Phycology* 52(2): 219-229.
- Yu Z., Lavèn M., Klepsch M., de Gier J. W., Bitter W., van Ulsen P. y Luirink J. 2011. Role for *Escherichia coli* YidD in membrane protein insertion. *J Bacteriol*. 193(19):5242-51. doi: 10.1128/JB.05429-11.
- Zabala B., García K., y Espejo R. T. 2009. Enhancement of UV light sensitivity of a *Vibrio parahaemolyticus* O3: K6 pandemic strain due to natural lysogenization by a telomeric phage. *Applied and environmental microbiology*, 75(6), 1697-1702.
- Zewen Z., Ting X., Zhongyang H., Xinzhong W., Liuji W., Qingguo M & Jiaqing H. 2012. Rickettsia-like organism infection associated with mass mortalities of blood clam,

Tegillarca granosa, in the Yueqing Bay in China. Acta Oceanológica Sinica 31: 106-115.

Zorriehzahra, M. J., y Banaederakhshan, R. 2015. Early mortality syndrome (EMS) as new emerging threat in shrimp industry. Adv. Anim. Vet. Sci, 3(2s), 64-72.