



CENTRO DE INVESTIGACIONES BIOLÓGICAS
DEL NOROESTE, S.C.

Programa de Estudios de Posgrado

**PRODUCCIÓN DE LAS TOXINAS RECOMBINANTES PIR A Y
PIR B DE *Vibrio parahaemolyticus* EN *Escherichia coli*
COMO SISTEMA HETERÓLOGO.**

T E S I S

Que para obtener el grado de

Maestro en Ciencias

Uso, Manejo y Preservación de los Recursos Naturales
(Orientación en Biotecnología)

P r e s e n t a

Ismael Mendoza Avilés

La Paz, Baja California Sur, Julio de 2026.

ACTA DE LIBERACIÓN DE TESIS

En la Ciudad de La Paz, B. C. S., siendo las **09:34** horas del día **24** del mes de abril del año **2026**, se procedió por las personas abajo firmantes, integrantes de la Comisión Revisora de Tesis avalada por la Dirección de Estudios de Posgrado y Formación de Recursos Humanos del Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, S. C., a liberar la Tesis de Grado titulada:

"PRODUCCIÓN DE LAS TOXINAS RECOMBINANTES PIR A Y PIR B DE *Vibrio parahaemolyticus* EN *Escherichia coli* COMO SISTEMA HETERÓLOGO"

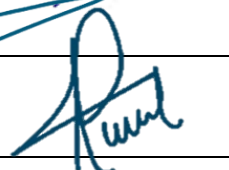
Presentada por el/la alumno/a:

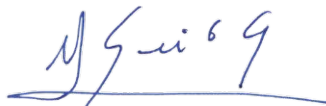
Ismael Mendoza Avilés

Aspirante al Grado de MAESTRO/A EN CIENCIAS EN EL USO, MANEJO Y PRESERVACIÓN DE LOS RECURSOS NATURALES CON ORIENTACIÓN EN **Biotecnología**.

Después de intercambiar opiniones las personas integrantes de la Comisión manifestaron su **APROBACIÓN DE LA TESIS**, en virtud de que satisface los requisitos señalados por las disposiciones reglamentarias vigentes.

LA COMISIÓN REVISORA

Grado y nombre	Estatus	Firma
Dra. Norma Angélica Estrada Muñoz	Co-Directora de Tesis	
Dr. Mario Rojas Arzaluz	Co-Director de Tesis	
Dr. César Salvador Cardona Félix	Co-Tutor	
Dr. Jorge Gustavo Rocha Estrada	Co-Tutor	



Dra. Alejandra Nieto Garibay,
Directora de Estudios de Posgrado y Formación de Recursos Humanos



La Paz, Baja California Sur, a 20 de mayo de 2026.

Los miembros del comité de tesis del (la) estudiante Ismael Mendoza Avilés del Programa de Maestría en Uso, Manejo y Preservación de los Recursos Naturales, revisamos el contenido de la tesis y otorgamos el Vo.Bo. dado que la tesis no representa un plagio de otro documento como lo muestra el reporte de similitud realizado:

- Herramienta antiplagio: iThenticate
- Filtros utilizados: Bibliografía, textos citados y coincidencias pequeñas.
- Porcentajes de similitud: 17%.

Se muestra captura de pantalla

Centro de Investigación en Materiales Avanzados

Detalles del documento

Identificador de la entrega

trnold::3117593785693

Fecha de entrega

22 may 2026, 8:10 a.m. GMT-7

Fecha de descarga

22 may 2026, 8:16 a.m. GMT-7

Nombre del archivo

Tesis Final IMA Abril 2026 Enviar Posgrado 1-correcciones.doc

Tamaño del archivo

2.2 MB

55 páginas

13.090 palabras

75.603 caracteres

iThenticate Página 2 de 62 - Descripción general de integridad

Identificador de la entrega: trnold::3117593785693

17% Similitud general

El total combinado de todas las coincidencias, incluidas las fuentes superpuestas, para el...

Filtrado desde el informe

- Bibliografía
- Texto citado
- Coincidencias menores (menos de 10 palabras)

Fuentes principales

- 17% Fuentes de Internet
- 5% Publicaciones
- 0% Trabajos entregados (trabajos del estudiante)

Marcas de integridad

0% de alertas de integridad para revisión

No se han detectado manipulaciones de texto sospechosas.

Los algoritmos de nuestro sistema analizan un documento en profundidad para buscar inconsistencias que permitan distinguir de una entrega normal. Si advertimos algo extraño, lo marcamos como una alerta para que puedas revisar. Una marca de alerta no es necesariamente un indicador de problemas. Sin embargo, recomendamos que prestes atención y lo revises.

Co-Directores

Dra. Norma Angélica Estrada Muñoz

Dr. Mario Rojas Arzaluz

Estudiante

Ismael Mendoza Avilés

Personal técnico de asesoría en el análisis

Tec. Susana Luna García

Conformación de Comités

Comité Tutorial

Dra. Norma Angélica Estrada Muñoz
Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, S. C.
Co-Directora de Tesis

Dr. Mario Rojas Arzaluz
Universidad Autónoma de Baja California Sur
Co-Director de Tesis

Dr. César Salvador Cardona Félix
Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, S. C.
Co-Tutor de Tesis

Dr. Jorge Gustavo Rocha Estrada
Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, S. C.
Co-Tutor de Tesis

Comité Revisor de Tesis

Dra. Norma Angélica Estrada Muñoz
Dr. Mario Rojas Arzaluz
Dr. César Salvador Cardona Félix
Dr. Jorge Gustavo Rocha Estrada

Jurado de Examen

Dra. Norma Angélica Estrada Muñoz
Dr. Mario Rojas Arzaluz
Dr. César Salvador Cardona Félix

Suplente

Dr. Jorge Gustavo Rocha Estrada

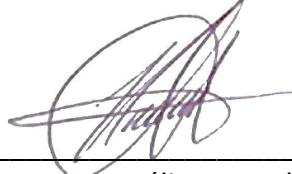
Resumen

La Enfermedad de Necrosis Hepatopancreática Aguda (AHPND por sus siglas en inglés) representa una de las principales problemáticas en la acuicultura del camarón, causando altas mortalidades y pérdidas económicas significativas. Esta enfermedad es provocada por cepas de *Vibrio parahaemolyticus* que portan el plásmido pVA1, el cual codifica las toxinas PirA y PirB, responsables del daño en el hepatopáncreas. Debido a las limitaciones asociadas al manejo de cepas patógenas, la expresión heteróloga en *Escherichia coli* constituye una alternativa segura para su estudio. El objetivo del presente estudio es producir de manera recombinante las toxinas PirA y PirB de *V. parahaemolyticus* utilizando *E. coli* como sistema de expresión heterólogo. En este trabajo se logró la expresión de las toxinas recombinantes Pir A^{VP} y Pir B^{VP} en *E. coli* BL21 mediante los vectores pCOLDI y pET28a. Las construcciones genéticas se confirmaron mediante la purificación del ADN plasmídico y la electroforesis en gel de agarosa. La expresión proteica se indujo con IPTG y se evaluó mediante SDS-PAGE, donde se observó una mayor acumulación en la fracción insoluble, lo que sugiere la formación de cuerpos de inclusión. La identidad de las proteínas se confirmó mediante Western blot con anticuerpos anti-His-Tag. Finalmente, las proteínas se purificaron mediante cromatografía de afinidad con Ni-sefarosa. Los resultados demuestran que el sistema de expresión empleado es adecuado para la producción de las toxinas Pir A^{VP} y Pir B^{VP}, lo que constituye una fuente confiable para estudios posteriores sobre su estructura, función y aplicaciones en el estudio, diagnóstico y control de AHPND.

Palabras clave: AHPND; *Vibrio parahaemolyticus*; toxinas PirA y PirB; expresión heteróloga; *Escherichia coli*.

ORCID: 0000-0002-4313-3511

Vo. Bo. Co-Directores de Tesis



Dra. Norma Angélica Estrada Muñoz



Dr. Mario Rojas Arzuluz

Summary

Acute Hepatopancreatic Necrosis Disease (AHPND) is a major threat to shrimp aquaculture, causing high mortality rates and substantial economic losses worldwide. The disease is associated with strains of *Vibrio parahaemolyticus* carrying the pVA1 plasmid, which encodes the PirA and PirB toxins responsible for the characteristic hepatopancreatic damage. Because working with pathogenic strains is subject to biosafety constraints, heterologous expression in *Escherichia coli* offers a practical, safer approach to studying these toxins. In this study, PirA and PirB toxins from *V. parahaemolyticus* were successfully expressed as recombinant proteins in *E. coli* BL21 using the expression vectors pCOLDI and pET28a. The presence of the constructs was confirmed by plasmid extraction and agarose gel electrophoresis. Protein expression was induced with IPTG and analyzed by SDS-PAGE, which showed greater accumulation in the insoluble fraction, consistent with inclusion body formation. The identity of the recombinant proteins was further confirmed by Western blot using anti-His tag antibodies. Purification was achieved by Ni-sepharose affinity chromatography. Overall, the expression system proved effective in producing Pir A^{VP} and Pir B^{VP}, providing a reliable source of these toxins for future studies on their structure, function, and potential applications in AHPND research, diagnosis, and control.

Keywords: AHPND; *Vibrio parahaemolyticus*; PirA and PirB toxins; heterologous expression; *Escherichia coli*.

ORCID: 0000-0002-4313-3511

Vo. Bo. Co-Directores de Tesis

Dra. Norma Angélica Estrada Muñoz

Dr. Mario Rojas Arzaluz

Dedicatoria

A mi abuelita Teresa de Jesús Avilés Mendoza por ser el pilar de mi vida, por su amor incondicional, sus enseñanzas y su infinito amor. Te amo y te agradezco por ser mi segunda madre. Este logro también es tuyo, porque en cada paso siempre estuvo tu apoyo y tu cariño acompañándome.

Al M. en C. Mario Arce Montoya por impulsarme a ingresar a la Maestría y enseñarme que, aunque la vida se esté yendo siempre hay lugar para amar y apoyar a las personas que estimas.

Agradecimientos

Agradezco profundamente a todas las personas que hicieron posible la realización de esta tesis.

En primer lugar, expreso mi más sincero agradecimiento a mi directora de tesis la Dra. Norma Angélica Estrada Muñoz, por su guía, apoyo constante y valiosas enseñanzas a lo largo de este proceso. Su experiencia y dedicación fueron fundamentales para el desarrollo de este trabajo. Más que directora siempre la he considerado una muy buena amiga, excelente persona y parte fundamental de mi familia.

A los miembros del comité evaluador Dr. Mario Rojas Arzaluz, Dr. César Cardona Félix y al Dr. Jorge Gustavo Rocha Estrada, gracias por su tiempo, observaciones y recomendaciones, que enriquecieron significativamente esta investigación.

A mi institución formadora Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, S.C. y a la Dirección de Estudios de Posgrado y Formación de Recursos Humanos, por brindarme las herramientas, el espacio y las oportunidades necesarias para llevar a cabo este proyecto. A la Secretaría de Ciencia, Humanidades, Tecnología e Innovación en México (SECIHTI) por la beca de posgrado otorgada (No 1320238), la cual hizo posible mi estadía y realización de Posgrado. Asimismo, agradezco a los profesores que contribuyeron a mi formación académica durante la maestría.

A los Laboratorios de Patogénesis Microbiana, al Laboratorio de Genética Molecular y al Módulo de Escalamiento Biotecnológico, además, un fuerte agradecimiento a los técnicos que hicieron posible mi crecimiento profesional y por su ayuda incondicional, entre los cuales quiero agradecer especialmente al Dr. Adrián Esteban Velázquez Lizárraga, a la M. en C. Delia Irene Rojas Posadas, al Dr. Julio Antonio Hernández González y, por último, pero no menos importante, a la Dra. Beatriz Meza.

A mi familia, mi madre María de los Ángeles Avilés Cota, mi padre Andrés Ismael Mendoza Robles y a mis hermanos Paulina Mendoza Avilés y Daniel Mendoza Avilés, por su amor

incondicional, paciencia y comprensión en cada etapa de este proceso. Su apoyo ha sido el pilar más importante para alcanzar esta meta.

A mis compañeros de generación Angie Liceth Suin Miranda, Nayomi Rocio Tapia Ramírez, Kenia Elizabeth Leonardo Cruz, Rodrigo Alejandro Hernández Victoria, Ángel Isidro Campa Molina y Luis Ernesto Villa Díaz de León, gracias por su apoyo, motivación y por compartir conmigo este camino lleno de retos y aprendizajes.

A mis amigos de vida Héctor Gallegos Carrillo, Selma Karen Avalos Morales, Abril Paola Santoyo Murillo, Izamar Martínez Murillo, Fernanda González Ampudia, José Ángel García Trasviña, David Carenzo Castro, Jacqueline Román Inzunza, Yanira Hernández Arias, Said Arturo Robles Pérez, Víctor Hugo Castillo Ceseña, Luis Guillermo Hernández Félix, Tadeo Alejandro Avilés Noguera, Daniela Villalba Aquino, Jessica Zuleima Gúzman Torres, Liliana Alatorre de la Fe, José Eduardo Armendariz Pagola, Eréndira Aragón Sánchez y Francisco Javier Carballo González, por siempre darme amor, ánimos, apoyarme y acompañarme en esta aventura terrenal llamada vida.

Finalmente, agradezco a todas aquellas personas que, de manera directa o indirecta, contribuyeron a la realización de este trabajo.

Este logro también es de Ustedes.

Contenido

Resumen	i
Summary	ii
Dedicatoria	iii
Agradecimientos	iv
Contenido	vi
Lista de figuras	viii
Abreviaturas	ix
1. INTRODUCCIÓN	1
1.1 Acuicultura de camarón y <i>Vibrio spp.</i>	1
1.2 <i>Vibrio parahaemolyticus</i> y la Enfermedad de Necrosis Hepatopáncreática Aguda (AHPND) en camarones	2
1.3 Toxinas de <i>V. parahaemolyticus</i> : proteínas PirA ^{VP} y PirB ^{VP}	2
1.4 Proteínas recombinantes PirA ^{VP} y PirB ^{VP} : Expresión heteróloga en <i>Escherichia coli</i>	3
2. ANTECEDENTES	6
2.1 Origen y diseminación de AHPND	6
2.2 Relación entre el plásmido pVA1 y la virulencia de <i>V. parahaemolyticus</i>	6
2.3 Toxinas PirA ^{VP} y PirB ^{VP}	7
2.4 Producción de proteínas recombinantes	8
3. JUSTIFICACIÓN	9
4. HIPÓTESIS	10
5. OBJETIVOS	11
5.1 Objetivo general	11
5.2 Objetivos particulares	11
6. MATERIAL Y MÉTODOS	12
6.1 Obtención y validación de construcciones recombinantes	12
6.2 Crecimiento rutinario de <i>E. coli</i> con las construcciones genéticas de las endotoxinas Pir A ^{VP} y Pir B ^{VP}	12
6.3 Validación de las construcciones genéticas y purificación de los vectores pCOLDI (Gen <i>Pir A^{VP}</i>) y pET28a (Gen <i>Pir B^{VP}</i>)	14
6.4 Preparación de células químicamente competentes con el protocolo de CaCl ₂	14
6.5 Transformación y verificación de la cepa BL21 químicamente competente con los vectores pCOLDI (Gen <i>PirA^{VP}</i>) y pET28a (Gen <i>PirB^{VP}</i>) purificados.	15
6.6 Extracción de ADNp mediante el método de Birnboim para confirmar transformantes.	16
6.7 Inducción de la expresión heteróloga de las toxinas PirA ^{VP} y PirB ^{VP}	17
6.8 Extracción de proteínas PirA ^{VP} y PirB ^{VP}	18
6.9 Cuantificación de proteínas mediante el método de BCA (ácido bicinconínico)	18
6.10 Visualización de proteínas en gel de poliacrilamida (SDS-PAGE)	19
6.11 Detección de las proteínas PirA ^{VP} y PirB ^{VP} mediante Western blot	20
6.12 Purificación de las proteínas PirA ^{VP} y PirB ^{VP} mediante cromatografía de afinidad en Ni-sefrosa	21
7. RESULTADOS	22
7.1 Validación de las construcciones genéticas y purificación de los vectores pCOLDI (Gen <i>PirA^{VP}</i>) y pET28a (Gen <i>PirB^{VP}</i>)	22

7.2 Purificación de ADNp mediante el método de Birnboim para confirmación de transformantes	23
7.3 Visualización de proteínas en gel de poliacrilamida (SDS-PAGE).....	25
7.4 Western blot para la detección de las proteínas PirA ^{VP} y PirB ^{VP} mediante anticuerpos.	26
8. DISCUSIÓN.....	29
9. CONCLUSIONES.....	33
10. LITERATURA CITADA	34

Lista de figuras

- Figura 1.** Mapas de los vectores de expresión recombinante utilizados en este estudio. (A) Vector pCOLDI que contiene el gen que codifica la toxina PirA^{VP}, bajo el control de un promotor inducible, señalado con una flecha azul. (B) Vector pET28a que contiene el gen que codifica la toxina PirB^{VP}, también bajo un sistema de expresión inducible, indicado con una flecha roja. En ambos vectores se muestran los principales elementos funcionales, incluidos el origen de replicación, el marcador de resistencia a antibióticos y la región de clonación múltiple.13
- Figura 2.** Análisis del ADN plasmídico purificado de las cepas BL21-pCOLDI (Gen PirA^{VP}) y BL21-pET28a (Gen PirB^{VP}) mediante electroforesis en gel de agarosa al 1.2%. Carril 1: marcador de peso molecular (2-Log DNA Ladder, NEB). Carriles 2–4: preparaciones plasmídicas de BL21-pCOLDI (PirA^{VP}). Carriles 5–6: preparaciones plasmídicas de BL21-pET28a (PirB^{VP}).23
- Figura 3.** Visualización del ADNp purificado de cepas transformadas de *E. coli* BL21 mediante el método de Birnboim en gel de agarosa al 1.2%. Carriles 1 y 10: marcador de peso molecular (2-log DNA ladder, NEB). Carriles 2–9: purificaciones plasmídicas de BL21-pCOLDI (Gen PirA^{VP}). Carriles 11–18: purificaciones plasmídicas de BL21-pET28a (Gen PirB^{VP}). Las bandas observadas corresponden a diferentes conformaciones plasmídicas del ADN, evidenciando la presencia e integridad de los vectores en las cepas transformadas.25
- Figura 4.** Visualización de extractos proteicos mediante electroforesis SDS-PAGE al 10% teñido con azul de Coomassie R-250. Las muestras proteicas fueron ajustadas a una concentración de 0.5 mg/mL y se cargaron 30 µL por pocillo. Carril 1: control proteico (cepa de referencia). Carril 2: sobrenadante de BL21 sin plásmido inducida con IPTG (0.1 mM). Carril 3: sobrenadante de BL21-pCOLDI (Gen PirA^{VP}) inducida con IPTG (0.1 mM). Carril 4: sobrenadante de BL21-pET28a (Gen PirB^{VP}) inducida con IPTG (0.1 mM). Carril 5: precipitado de BL21 sin plásmido inducida con IPTG (0.1 mM). Carril 6: precipitado de BL21-pCOLDI (Gen PirA^{VP}) inducida con IPTG (0.1 mM). Carril 7: precipitado de BL21-pET28a (Gen PirB^{VP}) inducida con IPTG (0.1 mM). Carril 8: sobrenadante de BL21-pCOLDI (Gen PirA^{VP}) inducida con IPTG (0.1 mM).26
- Figura 5.** Detección de las proteínas recombinantes PirA^{VP} y PirB^{VP} mediante Western blot en membrana de nitrocelulosa utilizando anticuerpos anti-His-Tag. Las muestras proteicas fueron ajustadas a una concentración de 0.5 mg/mL y separadas previamente por SDS-PAGE. La detección se realizó empleando un anticuerpo primario anti-His-Tag y un anticuerpo secundario anti-ratón, seguida de revelado con diaminobencidina. Carril 1: sobrenadante de BL21 sin plásmido inducido con IPTG (0.1 mM). Carril 2: sobrenadante de BL21-pCOLDI (Gen PirA^{VP}) inducida con IPTG (0.1 mM). Carril 3: sobrenadante de BL21-pET28a (Gen PirB^{VP}) inducida con IPTG (0.1 mM). Carril 4: precipitado de BL21 sin plásmido inducido con IPTG (0.1 mM). Carril 5: precipitado de BL21-pCOLDI (Gen PirA^{VP}) inducido con IPTG (0.1 mM). Carril 6: precipitado de BL21-pET28a (Gen PirB^{VP}) inducido con IPTG (0.1 mM).26

Abreviaturas

AHPND	Acute Hepatopancreatic Necrosis Disease (Enfermedad de necrosis aguda del hepatopáncreas).
ADN	Ácido desoxirribonucleico.
ADNp	ADN plasmídico.
APS	Persulfato de amonio (Ammonium Persulfate).
ARN	Ácido ribonucleico.
BSA	Albúmina sérica bovina (Bovine Serum Albumin).
Bt	<i>Bacillus thuringiensis</i> .
CaCl ₂	Cloruro de calcio.
CHO	Células de ovario de hámster chino (Chinese Hamster Ovary).
Cry	Proteínas cristalinas insecticidas producidas por <i>B. thuringiensis</i> .
DNA ladder	Marcador de peso molecular de ADN.
EDTA	Ácido etilendiaminotetraacético.
EMS	Early Mortality Syndrome (Síndrome de mortalidad temprana).
FAO	Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura.
GST	Glutatión S-transferasa (Glutathione S-transferase).
His-tag	Etiqueta de histidinas utilizada para la purificación y detección de proteínas recombinantes.
HRP	Peroxidasa de rábano picante (Horseradish Peroxidase).
IBs	Cuerpos de inclusión (Inclusion Bodies), agregados insolubles de proteínas recombinantes producidos durante la sobreexpresión en sistemas bacterianos.
IPTG	Isopropil- β -D-1-tiogalactopiranosido.
kb	Kilobases.
KCl	Cloruro de potasio.
LB	Medio de cultivo Luria-Bertani.
MgCl ₂	Cloruro de magnesio.
MgSO ₄	Sulfato de magnesio.
mM	Milimolar.
NaCl	Cloruro de sodio.
NaH ₂ PO ₄	Fosfato monobásico de sodio.
NaOH	Hidróxido de sodio.
NEB	New England Biolabs, empresa fabricante de reactivos para biología molecular.
OD ₆₀₀	Densidad óptica medida a 600 nm.
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa (Polymerase Chain Reaction).
pH	Potencial de hidrógeno.
Pir	<i>Photorhabdus</i> insect-related, familia de toxinas relacionadas con proteínas insecticidas.
PirA	Subunidad A de las toxinas Pir, implicada en el reconocimiento o unión a la célula blanco.
PirB	Subunidad B de las toxinas Pir, asociada con la actividad tóxica mediante la formación de poros en la membrana celular.

PirAVP/ PirBVP	Toxinas binarias de <i>Vibrio parahaemolyticus</i> .
PM	Peso molecular.
pVA1	Plásmido asociado a la virulencia en AHPND.
PMSF	Fluoruro de fenilmetilsulfonilo (Phenylmethylsulfonyl fluoride), inhibidor de proteasas.
RNasa	Ribonucleasa.
rpm	Revoluciones por minuto.
SDS	Dodecil sulfato de sodio (Sodium Dodecyl Sulfate).
SDS-PAGE	Electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecil sulfato de sodio.
SOC	Super Optimal Broth with Catabolite Repression, medio enriquecido para la recuperación bacteriana posterior a la transformación.
SOB	Super Optimal Broth, medio enriquecido para el crecimiento bacteriano.
TAE	Buffer Tris-acetato-EDTA.
TBS	Tris-buffered saline (solución salina amortiguada con Tris).
TBS-Tween	TBS suplementado con Tween-20.
TE	Buffer Tris-EDTA.
TEMED	N,N,N',N'-tetrametiletilendiamina, catalizador de la polimerización de geles de acrilamida.
Tris-HCl	Tris hidrocloruro (tris(hidroximetil)aminometano ajustado con ácido clorhídrico).
T7	Promotor del bacteriófago T7 utilizado para la expresión de proteínas recombinantes.
UV	Ultravioleta.
UVP	Sistema de fotodocumentación ultravioleta utilizado para visualizar geles.
VPAHPND	Cepa de <i>V. parahaemolyticus</i> asociada a la enfermedad de necrosis hepatopancreática aguda (AHPND).
WR	Working Reagent (reactivo de trabajo utilizado en el ensayo BCA).

1. INTRODUCCIÓN

1.1 Acuicultura de camarón y *Vibrio spp.*

Durante 2022, la actividad pesquera y acuícola registró una producción histórica de aproximadamente 223.2 millones de toneladas, generando un valor económico cercano a los 472 000 millones de dólares estadounidenses, aportando en promedio 20.7 kg de productos acuáticos de origen animal destinados al consumo per cápita. Estos productos representaron alrededor del 15% de las proteínas animales consumidas a nivel mundial, en diversos países de Asia y África, el consumo per cápita de productos acuáticos de origen animal superó el 50%. Por otra parte, aunque la pesca extractiva ha permanecido relativamente constante en los últimos años, la acuicultura presentó un incremento de 6.6% desde 2020, llegando a aportar más del 57% de los productos acuáticos destinados al consumo humano (FAO, 2024).

Uno de los cultivos de importancia comercial es el de camarón, principalmente el blanco (*Penaeus vannamei*), registrando 6.8 millones de toneladas, lo que lo consolida como una de las principales actividades productoras de alimentos de origen acuático según datos de 2022 (FAO, 2024). Los sistemas de cultivo intensivos y semiintensivos, aunque incrementan la productividad, generan condiciones ambientales que pueden deteriorarse rápidamente, lo que provoca estrés fisiológico en los camarones. Este estrés conduce a una disminución de las defensas inmunitarias y a un incremento de la susceptibilidad frente a patógenos (Horowitz y Horowitz, 2001; Le Moullac y Haffner, 2000). Diversos microorganismos potencialmente patógenos pueden coexistir de forma latente con los camarones sin causar daño aparente; no obstante, bajo condiciones de estrés, estas infecciones pueden activarse y derivar en brotes agudos que ocasionan pérdidas significativas en la producción (Gómez-Gil *et al.*, 2001).

Las bacterias pertenecientes al género *Vibrio* han sido identificadas recurrentemente como patógenos oportunistas en el cultivo de camarón, tanto durante la etapa larvaria como en los sistemas de engorda. La presencia y predominancia de determinadas especies varía dependiendo de la fase de cultivo. En estanques de engorda se han reportado con mayor frecuencia especies como *Vibrio parahaemolyticus*, *V. alginolyticus*, *V. vulnificus* y *Photobacterium damsela*. en sistemas de cultivo larvario destacan principalmente *V. harveyi* y *V. splendidus* (Gómez-Gil *et al.*, 2001).

La vibriosis representa una de las enfermedades bacterianas más importantes en las etapas iniciales del desarrollo de los camarones, debido a las elevadas tasas de mortalidad que puede ocasionar, generando pérdidas económicas significativas para la industria acuícola (Aguirre-Guzmán *et al.*, 2001).

1.2 *Vibrio parahaemolyticus* y la Enfermedad de Necrosis Hepatopáncreática Aguda (AHPND) en camarones

Actualmente, al menos 20 especies del género *Vibrio* han sido reportadas como patógenas de camarones peneidos (Jayasinghe, 2010; Heenatigala y Fernando, 2016). Entre ellas destaca la especie *Vibrio parahaemolyticus*, una bacteria patógena ampliamente distribuida en ambientes marinos, presente en sedimentos, partículas en suspensión y en forma planctónica, y que actúa como agente infeccioso de diversos organismos marinos. Muestra una marcada afinidad por el camarón blanco (*Litopenaeus vannamei*), al cual se adhiere a la superficie quitinosa y prolifera en condiciones de alta disponibilidad de nutrientes (Broberg *et al.*, 2011).

V. parahaemolyticus destaca como el principal agente causal del síndrome de mortalidad temprana (EMS, por sus siglas en inglés), una enfermedad emergente que afecta gravemente la producción camaronera (Zorriehzahra y Banaederakhshan, 2015), posteriormente denominada AHPND (del inglés Acute Hepatopancreatic Necrosis Disease) (Tran *et al.*, 2013). Esta enfermedad ha sido diagnosticada en camarones peneidos como *Penaeus monodon* Fabricius, 1798 y *Litopenaeus vannamei* (Boone, 1931), y ha sido reportada desde 2009 en países del Pacífico Asiático, con una posterior expansión al Pacífico Mexicano y al resto de América (Hong *et al.*, 2016), afectando principalmente a postlarvas durante los primeros 20–30 días posteriores a la siembra, con tasas de mortalidad que pueden alcanzar el 100% (Lightner *et al.*, 2012 a, 2012b), generando pérdidas económicas cercanas a los mil millones de dólares en Asia, de acuerdo con la Global Aquaculture Alliance.

1.3 Toxinas de *V. parahaemolyticus*: proteínas PirA^{VP} y PirB^{VP}

Los análisis histopatológicos de camarones infectados con EMS/AHPND han demostrado la contracción, pérdida y separación de las células epiteliales presentes en los túbulos del hepatopáncreas hacia la luz tubular, son evidencia de una respuesta inflamatoria significativa, lo

que sugiere una etiología mediada por toxinas (Tran *et al.*, 2013). Tran *et al.* (2013) describieron al agente causal de la AHPND como una cepa virulenta de *Vibrio parahaemolyticus* (VPAHPND) capaz de colonizar el estómago del camarón, producir una potente toxina y provocar daño agudo en el hepatopáncreas. Posteriormente, se demostró que la patogenicidad de estas cepas está asociada a la adquisición de un plásmido específico de aproximadamente 70 Kpb (pVA1), que codifica la toxina binaria Pir (del inglés *Photorhabdus insect-related*), compuesta por las subunidades PirA^{VP} y PirB^{VP}, homólogas a la toxina binaria Pir de las bacterias del género *Photorhabdus*. Este plásmido contiene, además, genes involucrados en mecanismos de transferencia horizontal mediante conjugación, lo que sugiere su potencial de diseminación no solo entre cepas de *V. parahaemolyticus*, sino también hacia otras especies bacterianas (Han *et al.*, 2015a, 2015b).

Estudios estructurales han demostrado que las toxinas PirA^{VP} y PirB^{VP} conforman un sistema binario con actividad formadora de poros, capaz de interactuar con las membranas celulares y de provocar la desestabilización de la integridad tisular (Lin *et al.*, 2019). Adicionalmente, se ha evidenciado que la expresión de los genes *PirA^{VP}* y *PirB^{VP}* está regulada por sistemas de *quorum sensing*, lo que indica que la producción de estas toxinas depende no solo de la presencia del plásmido, sino también de factores ambientales y de la densidad celular bacteriana (Kumar *et al.*, 2020; Lin *et al.*, 2022; Muthukrishnan *et al.*, 2022).

1.4 Proteínas recombinantes PirA^{VP} y PirB^{VP}: Expresión heteróloga en *Escherichia coli*

A pesar de los avances en la comprensión de la genética y la epidemiología de *V. parahaemolyticus*, persisten limitaciones importantes en el estudio funcional de las toxinas PirA^{VP} y PirB^{VP}. El manejo directo de cepas patógenas representa un alto riesgo biológico, requiere infraestructura de bioseguridad especializada y dificulta la obtención de cantidades suficientes de toxinas purificadas para estudios bioquímicos, estructurales y de toxicidad. Además, la elevada variabilidad genética entre aislados clínicos y ambientales complica la estandarización de protocolos experimentales y de ensayos de desafío en camarón (Kongrueng *et al.*, 2015).

La producción de proteínas recombinantes en sistemas bacterianos comenzó a desarrollarse hace aproximadamente cuatro décadas como respuesta a la necesidad de obtener proteínas terapéuticas de manera continua, segura y con calidad homogénea. Desde entonces, los sistemas de expresión heteróloga se han consolidado como herramientas eficientes para la obtención y análisis de proteínas de interés biotecnológico. Entre los organismos utilizados con mayor frecuencia para este propósito destaca *E. coli*, debido a las ventajas que ofrece a nivel experimental y productivo, incluyendo su rápida tasa de crecimiento, bajo costo de mantenimiento y facilidad para realizar manipulaciones genéticas (Demain y Vaishnav, 2009; Rosano y Ceccarelli, 2014). Además, el conocimiento detallado de su genoma, fisiología y metabolismo ha favorecido el desarrollo de múltiples estrategias de ingeniería genética orientadas a optimizar la producción de proteínas recombinantes. Asimismo, se dispone de una amplia variedad de vectores de expresión bien establecidos que facilitan el control de la expresión heteróloga y la obtención de altos niveles de producción en medios de cultivo simples, lo que convierte a *E. coli* en un sistema eficiente y confiable para el estudio y producción de proteínas de interés (Demain y Vaishnav, 2009).

La secuencia genética de la proteína objetivo suele incorporarse en plásmidos de expresión utilizados para la producción recombinante, cuyo tamaño y número de copias están determinados principalmente por el origen de replicación. Los plásmidos caracterizados por presentar un alto número de copias intracelulares (hasta 500 copias por célula o más) son frecuentemente preferidos, ya que se asume que un mayor número de copias del gen de interés favorece una mayor producción de la proteína recombinante. Sin embargo, el número real de copias plasmídicas se encuentra sujeto a variaciones asociadas con las condiciones ambientales del cultivo y la fisiología bacteriana (Sayadi *et al.*, 1989).

El uso de *E. coli* como sistema heterólogo permite una producción eficiente, reproducible y controlada de proteínas de interés, lo cual resulta especialmente relevante para la expresión de proteínas bacterianas, entre ellas las toxinas PirA^{VP} y PirB^{VP} descritas en cepas patógenas de *V. parahaemolyticus*. Este enfoque facilita su estudio funcional en condiciones seguras y estandarizadas, favoreciendo una comprensión más detallada de los mecanismos de patogenidad asociados con la AHPND. Adicionalmente, estas toxinas han sido estudiadas en

otros contextos, particularmente por su similitud estructural y funcional con toxinas bacterianas utilizadas como bioinsecticidas, así como por su potencial de aplicación en diversos desarrollos biotecnológicos y biomédicos. En este contexto, la producción recombinante de proteínas PirA^{VP} y PirB^{VP} representa una estrategia clave para generar herramientas confiables orientadas tanto al análisis de patogenicidad, diagnóstico y control de la enfermedad, como a la exploración de nuevas aplicaciones biotecnológicas, motivo por el cual el presente trabajo se centró en la clonación, expresión y producción de estas toxinas recombinantes en *E. coli* como sistema heterólogo.

2. ANTECEDENTES

2.1 Origen y diseminación de AHPND

La AHPND fue reportada por primera vez en 2009–2010 en regiones meridionales de China y rápidamente se extendió hacia Vietnam, Tailandia, Malasia y, posteriormente, a países de América Latina, incluido México. Esta enfermedad afecta principalmente a camarones peneidos durante las primeras etapas postlarvarias, generando mortalidades que pueden alcanzar el 100% en los primeros 30 días de cultivo (Lightner *et al.*, 2012a, 2012b; FAO, 2014). La rápida diseminación de AHPND ha causado pérdidas económicas millonarias en la industria camaronera mundial, evidenciando su impacto sanitario y productivo.

2.2 Relación entre el plásmido pVA1 y la virulencia de *V. parahaemolyticus*

La identificación del agente causal de la AHPND fue posible mediante estudios comparativos entre cepas de *V. parahaemolyticus* con características patógenas y no patógenas, en los que se secuenciaron por completo sus genomas. Estos análisis permitieron detectar un plásmido de aproximadamente 70 kb, denominado pVA1, cuya presencia se limita a las cepas asociadas a la enfermedad. En dicho plásmido se localizaron los genes *PirA^{vp}* y *PirB^{vp}*, responsables de la producción de las toxinas implicadas en la patogenicidad. La relevancia funcional de este elemento genético se confirmó mediante bioensayos de infección experimental y análisis histopatológicos en camarón, en los que únicamente las cepas portadoras de pVA1 indujeron lesiones características de la AHPND. En contraste, las cepas que carecían del plásmido no provocaron daño, lo que permitió establecer que las toxinas *PirA^{vp}* y *PirB^{vp}* son las responsables directas del daño severo al hepatopáncreas, incluyendo necrosis tisular, desprendimiento del epitelio y destrucción de los túbulos hepatopancreáticos (Tran *et al.*, 2013; Velázquez-Lizárraga *et al.*, 2019).

Investigaciones posteriores confirmaron que la patogenicidad de *V. parahaemolyticus* asociado a AHPND está estrechamente relacionada con la presencia del plásmido pVA1. Este elemento genético móvil contiene no solo los genes *PirA^{vp}* y *PirB^{vp}*, sino también genes asociados a la transferencia horizontal, lo que sugiere un alto potencial de diseminación entre cepas

bacterianas. Se ha propuesto que la adquisición de este plásmido convierte cepas no patógenas en altamente virulentas (Han *et al.*, 2015b; Lee *et al.*, 2015).

2.3 Toxinas PirA^{VP} y PirB^{VP}

Los primeros estudios sobre la toxina binaria Pir fueron realizados por Duchaud *et al.* (2003) en donde secuenciaron el genoma de la bacteria entomopatógena *Photorhabdus luminiscens* y proponen que esta toxina era una hormona que tenía efecto sobre la metamorfosis de los insectos impidiendo que los organismos alcanzaran su estadio adulto, es decir, cumplir su ciclo de vida completo.

Posteriormente Sirikharin *et al.* (2015) y Wang *et al.* (2023) realizan la evaluación de la bioquímica, biología y aplicación de las toxinas binarias y se confirma que PirA^{VP} y PirB^{VP} forman un sistema de toxina binaria, en donde uno de los componentes presenta actividad citotóxica mientras que el otro componente media la unión a un receptor específico de unión.

Existen otros estudios como los de Lee *et al.* (2015), Ahantarig *et al.* (2009), y los de Lin *et al.* (2017), en los cuales se ha realizado la evaluación de los mecanismos citotóxicos y la estructura de las toxinas PirA^{VP} y PirB^{VP}, en donde se ha encontrado y confirmado que las toxinas PirA^{VP} y PirB^{VP} de *V. parahaemolyticus* presentan similitud estructural con las toxinas Cry de *Bacillus thuringiensis*. Estos estudios muestran que las secuencias de aminoácidos de Pir B^{VP}, pero no Pir A^{VP}, muestran similitud con el dominio formador de poros de la toxina Cry de *B. thuringiensis*.

Algunos autores como Yang *et al.* (2014), Lee *et al.* (2015), y Wang *et al.* (2023) realizan estudios sobre la evaluación del genoma y anotación funcional de *V. parahaemolyticus* y determinan que los genes codificantes para las toxinas PirA^{VP} y PirB^{VP} en esta bacteria se encuentran formando parte de un plásmido denominado pVA1 con un tamaño aproximado de 70 kb.

Recientemente Wang *et al.* (2023), realizaron una revisión bibliográfica de las toxinas Pir de *Photorhabdus* y *Vibrio* en insectos y crustáceos como insecticida y determinaron que PirA^{VP} y PirB^{VP} se comporta como una toxina binaria que mata insectos y crustáceos acuáticos, además, concluyen que PirA^{VP} y PirB^{VP} se complementan unas con otras para maximizar su actividad citotóxica.

2.4 Producción de proteínas recombinantes

El proceso de síntesis de proteínas recombinantes constituye uno de los avances más significativos de la biotecnología contemporánea. En 1973, Cohen *et al.* realizaron un experimento histórico al insertar un gen extraño en un plásmido bacteriano y expresarlo en *E. coli*, estableciendo el fundamento de la tecnología de clonación y expresión recombinante. Este avance permitió visualizar por primera vez la posibilidad de utilizar microorganismos como "fábricas" biológicas para la síntesis de proteínas de interés.

Durante los años 80, *E. coli* se consolidó como el sistema principal de expresión debido a su rápido crecimiento, bajo costo y facilidad de manipulación. En 1982 se logró uno de los hitos más importantes en biotecnología: la producción comercial de insulina humana recombinante, la primera proteína terapéutica aprobada basada en ADN recombinante (Goeddel *et al.*, 1979). Este logro transformó la industria farmacéutica y confirmó la viabilidad de la producción de proteínas recombinantes a nivel masivo.

A lo largo de las últimas décadas, se han optimizado múltiples componentes tecnológicos, incluyendo vectores de alta expresión, promotores fuertes como T7, etiquetas de purificación (His-tag, GST) y protocolos de cromatografía, lo que ha contribuido al perfeccionamiento de la solubilidad, la estabilidad y el rendimiento de las proteínas producidas (Rosano y Ceccarelli, 2014). Actualmente, la obtención de proteínas recombinantes representa un proceso fundamental para el desarrollo de vacunas, enzimas, toxinas, terapias biológicas y estudios funcionales, incluyendo las toxinas bacterianas PirA^{VP} y PirB^{VP}.

3. JUSTIFICACIÓN

La necrosis hepatopancreática aguda es una de las principales enfermedades que afectan la industria acuícola del camarón a nivel mundial, lo que ocasiona pérdidas económicas significativas. Esta patología es provocada por cepas de *V. parahaemolyticus* portadoras del plásmido pVA1, responsable de codificar las toxinas PirA^{VP} y PirB^{VP}, responsables del daño severo en el hepatopáncreas. Sin embargo, el estudio estructural y funcional de estas toxinas se ve limitado por los riesgos asociados al manejo de cepas patógenas y por la dificultad para obtener cantidades suficientes de la toxina nativa.

La expresión recombinante en *E. coli* representa una alternativa segura y eficiente para la producción controlada de PirA^{VP} y PirB^{VP}, evitando la manipulación de cepas virulentas y facilitando su purificación y caracterización molecular. Disponer de estas proteínas en forma recombinante permitirá avanzar en su análisis bioquímico y en la evaluación funcional *in vitro*, generando bases experimentales para futuros estudios orientados al diagnóstico, a la comprensión del mecanismo de acción y al manejo sanitario de AHPND en la acuicultura.

4. HIPÓTESIS

Las toxinas PirA^{VP} y PirB^{VP} de *V. parahaemolyticus* pueden expresarse de manera heteróloga en *E. coli* en forma soluble y en cantidades detectables, conservando características estructurales que permitan su purificación, su caracterización molecular y bioquímica.

5. OBJETIVOS

5.1 Objetivo general

Obtener las proteínas recombinantes PirA^{VP} y PirB^{VP} de *V. parahaemolyticus* mediante su expresión heteróloga en *E. coli*, con el fin de disponer de material proteico purificado en cantidad suficiente para su caracterización molecular.

5.2 Objetivos particulares

- Generar y confirmar construcciones genéticas adecuadas para la expresión heteróloga de los genes *PirA*^{VP} y *PirB*^{VP}.
- Establecer condiciones de expresión en *E. coli* que permitan la producción de las proteínas recombinantes PirA^{VP} y PirB^{VP}, detectables.
- Obtener las proteínas recombinantes PirA^{VP} y PirB^{VP} con un grado de pureza adecuado mediante técnicas de purificación por afinidad.
- Confirmar la identidad y el peso molecular de las proteínas recombinantes mediante análisis electroforético e inmunodetección.

6. MATERIAL Y MÉTODOS

6.1 Obtención y validación de construcciones recombinantes

La base experimental para la obtención de las proteínas recombinantes PirA^{VP} y PirB^{VP} utilizadas en el presente estudio se sustenta en desarrollos previos reportados por Almanza (2018), quien llevó a cabo la caracterización molecular de cepas de *V. parahaemolyticus* asociadas a AHPND. En dicho trabajo se realizó el aislamiento de plásmidos, la confirmación por PCR de los genes correspondientes a PirA^{VP} y PirB^{VP}, el análisis comparativo de sus fragmentos y la generación de construcciones recombinantes destinadas a su expresión heteróloga.

Desde el punto de vista metodológico, Almanza (2018) desarrolló la amplificación específica de los genes codificantes de PirA^{VP} y PirB^{VP} mediante Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR), seguida de la verificación de la identidad de los productos mediante secuenciación y su alineamiento con secuencias de referencia. Posteriormente, los fragmentos génicos fueron clonados en vectores intermedios y subclonados en vectores de expresión que incorporan sitios de restricción específicos para asegurar su correcta inserción y orientación. Las construcciones recombinantes obtenidas fueron transformadas en cepas competentes de *E. coli*, y su integridad estructural fue confirmada mediante PCR de colonia, digestiones enzimáticas y secuenciación. En el presente estudio, dichas construcciones recombinantes generadas en trabajos anteriores fueron utilizadas para la expresión y caracterización posterior.

6.2 Crecimiento rutinario de *E. coli* con las construcciones genéticas de las endotoxinas Pir A^{VP} y Pir B^{VP}

Las construcciones genéticas correspondientes a los genes codificantes de las endotoxinas PirA^{VP} y PirB^{VP}, previamente generadas y validadas, se encontraban preservadas a -80 °C en crioviales de 2 mL (medio Luria Bertani (LB) suplementado con glicerol al 30% v/v), para su conservación a largo plazo.

La reactivación bacteriana se realizó mediante inoculación de 50 µL del cultivo criopreservado en tubos que contenían 5 mL de medio LB estéril suplementado con agente antibiótico apropiado como marcador de selección. Se utilizaron 2 vectores de expresión recombinante

(Fig. 1): Los vectores pColdI-PirA^{VP} y pET28a-PirB^{VP} (Almanza, 2018) con resistencia a ampicilina y kanamicina, respectivamente.

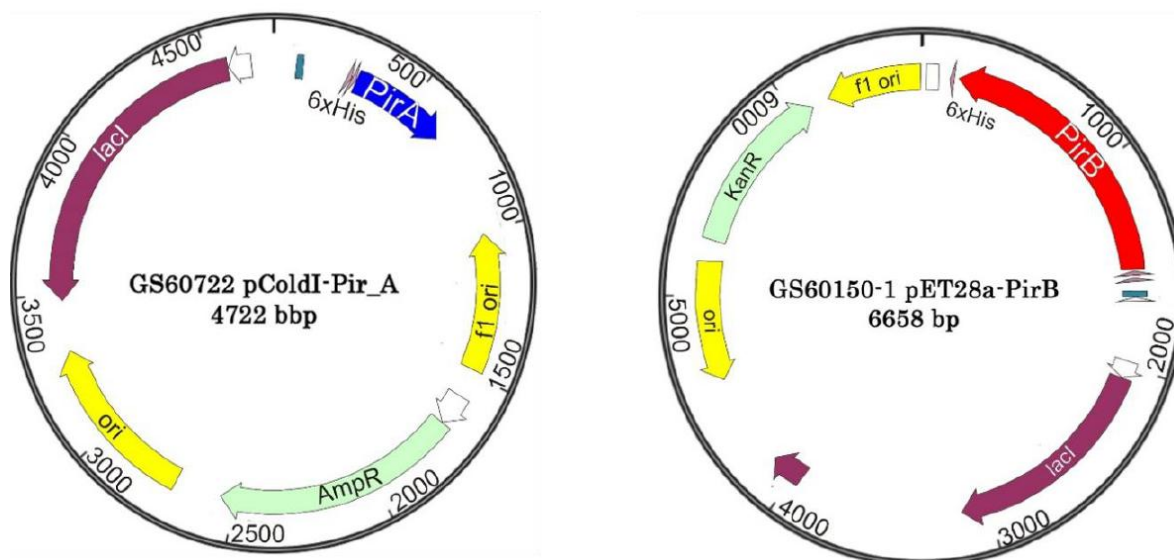


Figura 1. Mapas de los vectores de expresión recombinante utilizados en este estudio. (A) Vector pCOLDI que alberga el gen responsable de codificar la toxina PirA^{VP}, regulado por un promotor inducible, señalado con una flecha azul. (B) Vector pET28a que contiene el gen que codifica la toxina PirB^{VP}, también bajo un sistema de expresión inducible, indicado con una flecha roja. En ambos vectores se muestran los principales elementos funcionales, incorporando elementos como el origen de replicación y el marcador selectivo de resistencia a antibióticos y la región de clonación múltiple. Tomado de Almanza (2021).

En el caso de las células transformadas con el vector pColdI-PirA^{VP}, se adicionó ampicilina (50 µg/mL), mientras que para las células portadoras del vector pET28a-PirB^{VP} se empleó kanamicina (50 µg/mL), según los marcadores de resistencia codificados en cada plásmido.

Los cultivos permanecieron en incubación nocturna a 37 °C y 150 rpm de agitación continua, para favorecer el crecimiento bacteriano. Posteriormente, se sembraron alícuotas de 50 µL en placas de agar LB suplementadas con el antibiótico correspondiente, mediante la técnica de extensión en superficie con material estéril. Las placas fueron incubadas a 37 °C en condiciones estáticas durante 16–18 horas, lo que permitió la formación de colonias aisladas para su posterior uso en ensayos de expresión.

6.3 Validación de las construcciones genéticas y purificación de los vectores pCOLDI (Gen *Pir A^{VP}*) y pET28a (Gen *Pir B^{VP}*).

Una vez obtenidas las placas con crecimiento bacteriano correspondiente a cada construcción recombinante, se seleccionaron colonias aisladas y se inocularon en 5 mL de medio LB suplementado con el antibiótico correspondiente. Los cultivos fueron mantenidos a 37 °C bajo agitación continua de 150 rpm durante aproximadamente 3 horas hasta alcanzar la fase logarítmica de crecimiento. Posteriormente, las células fueron recuperadas por centrifugación a $4,500 \times g$ durante 10 minutos; se eliminó el sobrenadante y el pellet bacteriano fue procesado para el aislamiento de ADN plasmídico (ADNp).

La purificación del ADNp se realizó mediante el kit comercial de minipreparación de plásmidos PureLink™ Quick (Invitrogen K210011), siguiendo las instrucciones del fabricante. Brevemente, la pastilla celular bacteriana se homogenizó en 250 µL de amortiguador de resuspensión (R3) suplementado con RNasa A, seguida de la adición de 250 µL de amortiguador de lisis (L7) y posterior neutralización con 550 µL de amortiguador de precipitación (N4). Tras la centrifugación a $12,000 \times g$ durante 10 minutos, el sobrenadante fue transferido a una columna de afinidad de sílice y sometido a los pasos de lavado correspondientes con amortiguador W9 suplementado con etanol. Finalmente, el ADNp fue eluido con 75 µL de amortiguador TE previamente precalentado y almacenado a -20 °C hasta su uso.

La integridad del ADNp purificado se evaluó mediante electroforesis en gel de agarosa al 1.2% en amortiguador TAE (40 mM Tris-acetato, 1 mM EDTA, pH 8.3), utilizando GelRed (Merck, SCT122) como agente intercalante y un marcador de peso molecular 2-Log DNA Ladder (New England Biolabs). Las imágenes fueron obtenidas con un sistema de fotodocumentación UVP BioDoc-It 2 (Analytik Jena). Adicionalmente, la concentración y pureza del ADNp fueron determinadas por espectrofotometría utilizando un espectrofotómetro (NanoDrop, Thermo Scientific).

6.4 Preparación de células químicamente competentes con el protocolo de CaCl₂.

La cepa utilizada para expresión *E. coli* BL21 fue inoculada en 10 mL de medio LB y cultivada durante la noche a 37 °C con agitación constante a 150 rpm. A partir del cultivo reactivado, se

tomaron 500 μ L y se inocularon en 5 mL de medio SOB (Super Optimal Broth; compuesto por triptona 20 g/L, extracto de levadura 5 g/L, NaCl 0.5 g/L, KCl 0.186 g/L; pH ajustado a 7.0 y suplementado después de la esterilización con $MgCl_2$ o $MgSO_4$ hasta una concentración final de 10 mM), y se incubó bajo las mismas condiciones. Posteriormente, se utilizaron 500 μ L del preinóculo para inocular 50 mL de medio SOB en un matraz de 250 mL, el cual se incubó durante 3 horas a 37 °C con agitación a 200 rpm, hasta alcanzar la fase logarítmica de crecimiento.

El cultivo en fase logarítmica fue transferido a tubos de centrífuga previamente enfriados y se mantuvo en hielo durante 10 minutos. Posteriormente, se centrifugó a $2,700 \times g$ durante 10 minutos a 4 °C y se descartó el sobrenadante. La pastilla celular fue homogenizada en 10 mL de $CaCl_2$ frío 0.1 M y se incubó en hielo durante 20 minutos. A continuación, se realizó una segunda centrifugación bajo las mismas condiciones ($2,700 \times g$, 10 minutos, 4 °C) y se eliminó nuevamente el sobrenadante.

La pastilla resultante fue homogenizada en $CaCl_2$ frío 0.1 M y posteriormente se añadió glicerol estéril hasta alcanzar una concentración final del 30% (v/v). La suspensión celular fue alicuotada en volúmenes de 100 μ L en tubos estériles previamente enfriados y almacenada a -80 °C hasta su uso.

6.5 Transformación y verificación de la cepa BL21 químicamente competente con los vectores pCOLDI (Gen *PirA*^{VP}) y pET28a (Gen *PirB*^{VP}) purificados.

Se utilizaron viales de células químicamente competentes de la cepa *E. coli* BL21, previamente preparados y almacenados a -80 °C. Las células fueron descongeladas y mantenidas en hielo durante 30 minutos. Posteriormente, se mezcló con 8 μ L de ADNp purificado en cada vial (un vial correspondiente al vector pColdI-*PirA*^{VP} y otro al vector pET28a-*PirB*^{VP}) y se mezcló suavemente.

Las células fueron sometidas a un choque térmico a 42 °C durante 50 segundos, seguido de una incubación inmediata en hielo durante 2 minutos. Posteriormente, se añadieron 400 μ L de medio SOC (Super Optimal broth with Catabolite repression; compuesto por triptona 20 g/L, extracto de levadura 5 g/L, NaCl 0.5 g/L, KCl 0.186 g/L, $MgCl_2$ 10 mM, $MgSO_4$ 10 mM y glucosa

20 mM; pH 7.0) y las suspensiones se incubaron a 37 °C con agitación a 150 rpm durante una hora para permitir la recuperación celular.

Para la selección de transformantes, se prepararon placas de agar LB (30 mL por caja) suplementadas con el antibiótico correspondiente: ampicilina (50 µg/mL) para el vector pColdI-PirA^{VP} y kanamicina (50 µg/mL) para el vector pET28a-PirB^{VP}, añadiendo el antibiótico al medio previamente enfriado y antes de su solidificación. Se sembraron 50 µL del cultivo recuperado en cada placa utilizando puntas estériles y extensión en superficie con asas plásticas estériles. Como controles, se realizaron siembras de la cepa BL21 sin plásmido y de las cepas transformadas con ambos vectores, mediante siembra cruzada en medios con los antibióticos correspondientes. Las placas se incubaron a 37 °C durante 16–18 horas.

6.6 Extracción de ADNp mediante el método de Birnboim para confirmar transformantes.

Se seleccionaron colonias transformadas aisladas y libres de colonias satélite, utilizando un palillo estéril para realizar una resiembra en placas réplica de agar LB suplementadas con el antibiótico correspondiente. Con el mismo inóculo se prepararon cultivos líquidos en 10 mL de medio LB con antibiótico, en tubos de 50 mL, empleando ampicilina (50 µg/mL) para las células portadoras del vector pColdI-PirA^{VP} y kanamicina (50 µg/mL) para las células con el vector pET28a-PirB^{VP}. Las placas se incubaron en condiciones estáticas a 37 °C, mientras que los cultivos líquidos se incubaron a 37 °C con agitación constante a 150 rpm, ambos durante la noche (16 h).

Los cultivos líquidos fueron cosechados en tubos de 2 mL mediante centrifugación sucesiva a $4,500 \times g$ durante 2 minutos a 4 °C, descartando el sobrenadante en cada paso y conservando el pellet celular. La extracción de ADNp se realizó mediante el método de lisis alcalina de Birnboim y Doly (1979). El pellet fue homogenizado en 150 µL de solución I (glucosa, Tris-HCl, pH 8.0, EDTA, pH 8.0) suplementada con RNasa A (100 µg/mL) y homogeneizado mediante agitación en un vórtex. Posteriormente, se añadieron 300 µL de la solución II (NaOH 0.2 N, SDS 1%), recién preparada, mezclando suavemente por inversión y manteniendo la suspensión en hielo durante 5 minutos. Se agregaron 150 µL de la solución III de Birnboim (acetato de potasio 3 M, ajustada a pH 5.5 con ácido acético glacial), previamente enfriada a 4 °C, y se mezcló suavemente por

inversión. Posteriormente, los tubos se mantuvieron en hielo durante 30 minutos para favorecer la neutralización y la precipitación de proteínas, de complejos SDS-proteína y de ADN cromosómico. Las muestras se centrifugaron a 13,000 rpm durante 10 minutos a 4 °C y el sobrenadante fue transferido cuidadosamente a microtubos limpios, evitando arrastrar el precipitado.

El ADNp fue precipitado con 600 µL de isopropanol frío (−20 °C), incubado durante 15 minutos a −20 °C y centrifugado nuevamente bajo las mismas condiciones. El pellet obtenido se lavó con 500 µL de etanol al 70% frío (−20 °C), se centrifugó a 13,000 rpm durante cinco minutos a 4 °C, se eliminó el sobrenadante y se dejó secar a temperatura ambiente. Finalmente, el ADNp fue re suspendido en 40 µL de agua destilada estéril y almacenado a 4 °C hasta su análisis.

La integridad del ADNp se evaluó mediante electroforesis en gel de agarosa al 1.2% en amortiguador TAE (40 mM Tris-acetato, 1 mM EDTA, pH 8.3), teñido con GelRed (Merck, SCT122) y visualizado en un sistema de fotodocumentación UVP BioDoc-It 2 (Analytik Jena), utilizando como referencia un marcador de peso molecular 2-Log DNA Ladder (New England Biolabs). La concentración y pureza del ADNp se determinaron por espectrofotometría a 260 nm utilizando un Multiskan FC Microplate Photometer (ThermoScientific).

6.7 Inducción de la expresión heteróloga de las toxinas PirA^{VP} y PirB^{VP}

Se seleccionaron ocho colonias aisladas de las placas réplica y se inocularon individualmente en 10 mL de medio LB suplementado con el antibiótico correspondiente: ampicilina (50 µg/mL) para las células portadoras del vector pColdI-*PirA*^{VP} y kanamicina (50 µg/mL) para las células con el vector pET28a-*PirB*^{VP}. Los cultivos se incubaron a 37 °C, con agitación constante a 150 rpm, hasta alcanzar una densidad óptica (OD₆₀₀) de 0.6.

El crecimiento bacteriano fue monitoreado mediante espectrofotometría a 600 nm utilizando microplacas de 96 pocillos en el Multiskan FC Microplate Photometer (ThermoScientific). Se realizaron mediciones cada 30 minutos a partir de las 2.5 horas de incubación. Una vez alcanzada la fase logarítmica de crecimiento (OD₆₀₀ ≈ 0.6), los cultivos se mantuvieron en hielo durante 30 minutos y posteriormente se indujo la expresión proteica mediante la adición de

isopropil- β -D-1-tiogalactopiranosido (IPTG) en un gradiente de concentraciones finales de 0.1, 0.2, 0.5 y 1 mM.

Tras la inducción, los cultivos fueron incubados a 16.8 °C durante 24 horas con agitación constante a 160 rpm. Finalmente, las células fueron cosechadas por centrifugación a $4,500 \times g$, se descartó el sobrenadante y los pellets celulares se almacenaron a -20 °C hasta su posterior procesamiento.

6.8 Extracción de proteínas PirA^{VP} y PirB^{VP}

Las pastillas celulares previamente cosechadas y almacenadas a -20 °C fueron descongeladas y se mantuvieron en hielo. A cada tubo se le añadió 1 mL de amortiguador de lisis (50 mM NaH₂PO₄, 300 mM NaCl, 10 mM imidazol; pH 8.0 ajustado con NaOH), suplementado con fluoruro de fenilmetilsulfonilo (PMSF) a una concentración final de 5 mM, como inhibidor de proteasas. La suspensión fue homogeneizada mediante pipeteo repetido con puntas estériles y posteriormente transferida a tubos de 15 mL que contenían una perla de vidrio estéril (0.5 cm de diámetro).

Las muestras fueron sometidas a agitación vigorosa en vórtex en seis ciclos de 10 segundos cada uno para favorecer la ruptura celular. Posteriormente, se realizó centrifugación a $4,500 \times g$ durante 15 minutos a 4 °C. El sobrenadante (fracción soluble) fue transferido cuidadosamente a microtubos estériles de 1.5 mL, evitando arrastrar material precipitado. El pellet remanente fue homogenizado en 500 μ L de amortiguador de lisis sin PMSF y conservado en tubos limpios para su posterior análisis a -20° C.

6.9 Cuantificación de proteínas mediante el método de BCA (ácido bicinconínico)

La concentración de proteínas fue determinada utilizando el kit Pierce™ BCA Protein Assay (Thermo Scientific™), siguiendo las instrucciones del fabricante. Se preparó una curva estándar de albúmina sérica bovina (BSA) mediante diluciones seriadas a concentraciones de 2.0, 1.0, 0.5, 0.25, 0.125 y 0.0625 μ g/ μ L.

El volumen total de reactivo de trabajo (Working Reagent, WR) requerido para el ensayo se calculó mediante la fórmula:

$$WR = (\# \text{ estándares} + \# \text{ de muestras}) * (\text{volumen de WR por muestra}) \quad (1)$$

El WR se preparó mezclando 50 partes del reactivo A con una parte del reactivo B.

Se cargaron 20 μL de cada muestra proteica y de los estándares en una microplaca de 96 pocillos, y posteriormente se añadieron 200 μL de WR a cada pocillo. La placa fue incubada a 37 °C durante 30 minutos. Tras la incubación, la absorbancia se midió a 562 nm con un espectrofotómetro Multiskan FC Microplate Photometer (Thermo Scientific™). Las concentraciones de proteína se calcularon a partir de la curva estándar generada.

6.10 Visualización de proteínas en gel de poliacrilamida (SDS-PAGE).

La separación de proteínas se realizó mediante electroforesis en gel de poliacrilamida en condiciones desnaturizantes (SDS-PAGE), siguiendo el sistema de Laemmli (1970) y las recomendaciones del fabricante (Bio-Rad).

Las muestras proteicas fueron previamente ajustadas a una concentración de 0.5 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$. Se preparó un amortiguador de carga compuesto por Tris-HCl 0.5 M (pH 6.8), glicerol 20%, SDS al 10%, 2- β -mercaptoetanol 10% y azul de bromofenol 0.004% como agente de seguimiento. Las muestras se mezclaron con el amortiguador de carga y se desnaturalizaron mediante incubación a 95–100 °C durante cinco minutos.

Para la separación, se preparó un gel de resolución al 10%, utilizando solución de acrilamida/bisacrilamida al 30%, Tris-HCl 1.5 M (pH 8.8), SDS al 10%, persulfato de amonio (APS) al 10% y TEMED 0.05% como catalizador de polimerización. Una vez polimerizado el gel de resolución, se preparó un gel de apilamiento empleando solución de acrilamida/bisacrilamida al 30%, Tris-HCl 1.0 M (pH 6.8), SDS al 10%, APS al 10% y TEMED 0.05%.

Una vez solidificados los geles, se cargaron 30 μL de cada muestra en los pocillos correspondientes y se llevó a cabo la electroforesis en una cámara vertical utilizando amortiguador de corrida 1X (Tris base–glicina–SDS). La corrida se realizó aplicando inicialmente 80 V durante 20 minutos para permitir el apilamiento de las proteínas, seguido de 100 V durante aproximadamente 45 minutos para la separación en el gel de resolución.

Al finalizar la electroforesis, el gel se sumergió en una solución de tinción con azul de Coomassie R-250, compuesta por 0.1% (p/v) de colorante disuelto en una mezcla de metanol al 40% (v/v), ácido acético al 10% (v/v) y agua destilada al 50% (v/v), durante 24 horas. Posteriormente, el gel fue sometido a un proceso de decoloración utilizando una solución compuesta por metanol al 40% (v/v), ácido acético al 10% (v/v) y agua destilada al 50% (v/v), realizando cambios de solución y agitación constante hasta eliminar el exceso de colorante y lograr una adecuada visualización de las bandas proteicas.

6.11 Detección de las proteínas PirA^{VP} y PirB^{VP} mediante Western blot

La separación inicial de las proteínas se realizó mediante SDS-PAGE según el sistema de Laemmli, siguiendo las recomendaciones del fabricante (Bio-Rad). Las muestras proteicas fueron previamente ajustadas a 0.5 µg/µL, mezcladas con amortiguador de carga (Tris-HCl 0.5 M pH 6.8, glicerol 20%, SDS al 10%, 2-β-mercaptoetanol 10% y azul de bromofenol 0.004%) y desnaturalizadas a 95–100 °C durante 5 minutos. Se emplearon un gel de resolución al 10% y un gel de apilamiento estándar. Las muestras (30 µL) fueron cargadas en los pocillos y la electroforesis se realizó con amortiguador de corrida 1X (Tris base–glicina–SDS), aplicando 80 V durante el apilamiento y, posteriormente, 150 V hasta completar la migración.

Una vez finalizada la electroforesis, las proteínas fueron transferidas a una membrana de nitrocelulosa mediante electrotransferencia en sistema húmedo a 100 V durante 65 minutos, utilizando un amortiguador de transferencia (Tris base 25 mM, glicina 192 mM y metanol al 20%).

Posteriormente, la membrana fue bloqueada con leche descremada al 5% disuelta en TBS (Tris 20 mM, NaCl 150 mM, pH 7.4) durante 30 minutos a temperatura ambiente (22 °C) con agitación constante (120 rpm). Tras el bloqueo, se realizaron dos lavados de 10 minutos con TBS-Tween-20 al 0.1% en agitación.

La membrana fue incubada con el anticuerpo primario anti-His tag (Santa Cruz sc-8036 HRP, 1:1000), diluido en solución bloqueadora, durante dos horas a temperatura ambiente con agitación. Posteriormente, se realizaron tres lavados de 10 minutos con TBS-Tween al 0.1%,

seguidos de la incubación con el anticuerpo secundario (anti-ratón, HRP, 1:5000), también diluido en solución bloqueadora, durante dos horas en las mismas condiciones.

Finalizada la incubación con el anticuerpo secundario, se realizaron tres lavados adicionales de 10 minutos con TBS-Tween al 0.1%. La membrana fue equilibrada en acetato de sodio 0.1 M (pH 5.4) durante cinco minutos y posteriormente revelada con una solución de diaminobencidina (2.5 mg en 10 mL de acetato de sodio) activada con 5 μ L de peróxido de hidrógeno al 33%, hasta la visualización de las bandas inmunorreactivas.

6.12 Purificación de las proteínas PirA^{VP} y PirB^{VP} mediante cromatografía de afinidad en Ni-sefarosa

La fracción que contenía la proteína recombinante (sección 6.8) fue centrifugada a $15,000 \times g$ durante 20 minutos a 4 °C para eliminar material insoluble. El sobrenadante fue posteriormente filtrado a través de una membrana de 0.22 μ m con el fin de evitar obstrucciones durante el proceso cromatográfico. La purificación se realizó mediante cromatografía de afinidad utilizando una columna pre-empacada con resina Ni-sefarosa (Ni-NTA). La columna fue previamente equilibrada con 5–10 volúmenes de amortiguador de equilibrio (50 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, pH 7.4) a un flujo constante de aproximadamente 1 mL/min.

La muestra proteica se aplicó a la columna a un flujo de 0.5–1 mL/min, lo que permitió la unión de la proteína marcada con histidina a los iones de níquel inmovilizados en la matriz. Posteriormente, la columna fue lavada con 5–10 volúmenes del mismo amortiguador de equilibrio para eliminar proteínas unidas de forma no específica. La elución de la proteína de interés se llevó a cabo con un amortiguador que contenía 250 mM de imidazol. Las fracciones obtenidas fueron recolectadas en volúmenes de 0.5 – 1 mL para su análisis posterior.

Una vez concluida la elución, la columna fue regenerada mediante lavado con 0.1 M de EDTA, seguida de un reequilibrio con el amortiguador inicial y almacenamiento en solución conservadora con etanol al 20%. Las fracciones obtenidas se analizaron mediante SDS-PAGE para evaluar la presencia y la pureza de la proteína recombinante (Ausubel *et al.*, 1995). Por otra parte, las fracciones obtenidas durante la elución fueron analizadas por SDS-PAGE y western blot, para evaluar la presencia y pureza de las proteínas recombinantes.

7. RESULTADOS

7.1 Validación de las construcciones genéticas y purificación de los vectores pCOLDI (Gen *PirA^{VP}*) y pET28a (Gen *PirB^{VP}*).

La integridad del ADNp purificado de las cepas BL21-pCOLDI (*PirA^{VP}*) y BL21-pET28a (*PirB^{VP}*) fue evaluada mediante electroforesis en gel de agarosa al 1.2% (Fig. 2). Las muestras correspondientes a BL21-pCOLDI mostraron la presencia de múltiples conformaciones plasmídicas, observándose bandas compatibles con las formas superenrollada, circulares abiertas y, en menor proporción, formas lineales del ADNp. Estas distintas migraciones son características del ADNp purificado y reflejan las variaciones estructurales que puede presentar la molécula durante el proceso de aislamiento.

De manera similar, las preparaciones plasmídicas de BL21-pET28a presentaron bandas definidas correspondientes a conformaciones típicas del ADNp. Aunque la intensidad de algunas bandas fue menor que en otras muestras, la presencia de bandas bien definidas en las posiciones esperadas indica que el ADNp se mantuvo estructuralmente íntegro durante el proceso de purificación.

En conjunto, los resultados obtenidos confirman la presencia y la integridad del ADNp de ambos vectores de expresión, lo que permitió su uso en ensayos posteriores de transformación en células químicamente competentes y en experimentos subsecuentes de expresión de las proteínas recombinantes.

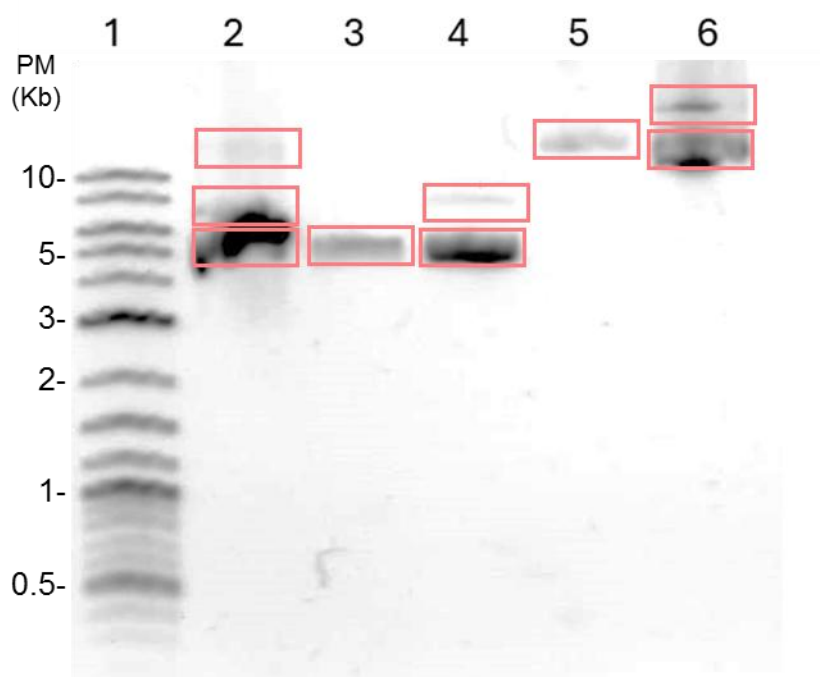


Figura 2. Análisis del ADNp purificado de las cepas BL21-pCOLDI (Gen *PirA^{VP}*) y BL21-pET28a (Gen *PirB^{VP}*) mediante electroforesis en gel de agarosa al 1.2%. Carril 1: marcador de peso molecular (2-Log DNA Ladder, NEB). Carriles 2–4: preparaciones plasmídicas de BL21-pCOLDI (*PirA^{VP}*). Carriles 5–6: preparaciones plasmídicas de BL21-pET28a (*PirB^{VP}*). Los recuadros rojos indican las diferentes conformaciones plasmídicas observadas, incluyendo las formas superenrolladas, circular abierta (laxa) y lineal. PM, peso molecular; kb, kilobases.

7.2 Purificación de ADNp mediante el método de Birnboim para confirmación de transformantes

La Fig. 3 muestra la integridad del ADNp purificado a partir de la cepa *E. coli* BL21 transformada con los vectores pCOLDI (Gen *PirA^{VP}*) y pET28a (Gen *PirB^{VP}*), obtenido mediante el método de extracción alcalina descrito por Birnboim. Este análisis se realizó con el propósito de confirmar la presencia de los vectores en las colonias obtenidas tras el proceso de transformación mediante choque térmico en células químicamente competentes.

Para este análisis, se seleccionaron colonias bien aisladas, sin presencia de colonias satélite, que mostraban morfología típica y crecimiento en medio selectivo de agar LB suplementado con el antibiótico correspondiente a cada vector (ampicilina para pCOLDI y kanamicina para pET28a), lo que indica la presencia y mantenimiento del plásmido. A partir de estas colonias se establecieron cultivos líquidos individuales, de los cuales se extrajo el ADNp para su posterior análisis.

En los carriles 1 y 10 se observa el marcador de peso molecular, cuyas bandas permiten estimar el tamaño aproximado de las moléculas de ADN presentes en las muestras analizadas. Las migraciones observadas son consistentes con los tamaños esperados de los vectores empleados en este estudio.

Los carriles del 2 al 9 corresponden a las purificaciones plasmídicas de las cepas BL21-pCOLDI (Gen *PirA^{VP}*). En estas muestras se aprecian claramente distintas conformaciones plasmídicas características del ADNp, incluyendo las formas superenrolladas, circular abierta y lineal. Las bandas presentan una migración definida y una adecuada integridad, lo que indica que el ADNp se recuperó satisfactoriamente mediante el procedimiento de extracción.

Por otra parte, los carriles del 11 al 18 corresponden a las purificaciones plasmídicas de las cepas BL21-pET28a (Gen *PirB^{VP}*). En estas muestras se observa al menos una conformación plasmídica bien definida y, en la mayoría de los casos, dos formas del ADNp. Las bandas muestran una intensidad y definición adecuadas, lo que sugiere que el ADNp obtenido presenta buena calidad e integridad estructural.

En conjunto, los resultados observados confirman la presencia de los vectores plasmídicos en las colonias seleccionadas, así como la integridad del ADNp purificado, lo que valida el éxito del proceso de transformación y permite continuar con los experimentos posteriores de expresión de las proteínas recombinantes.

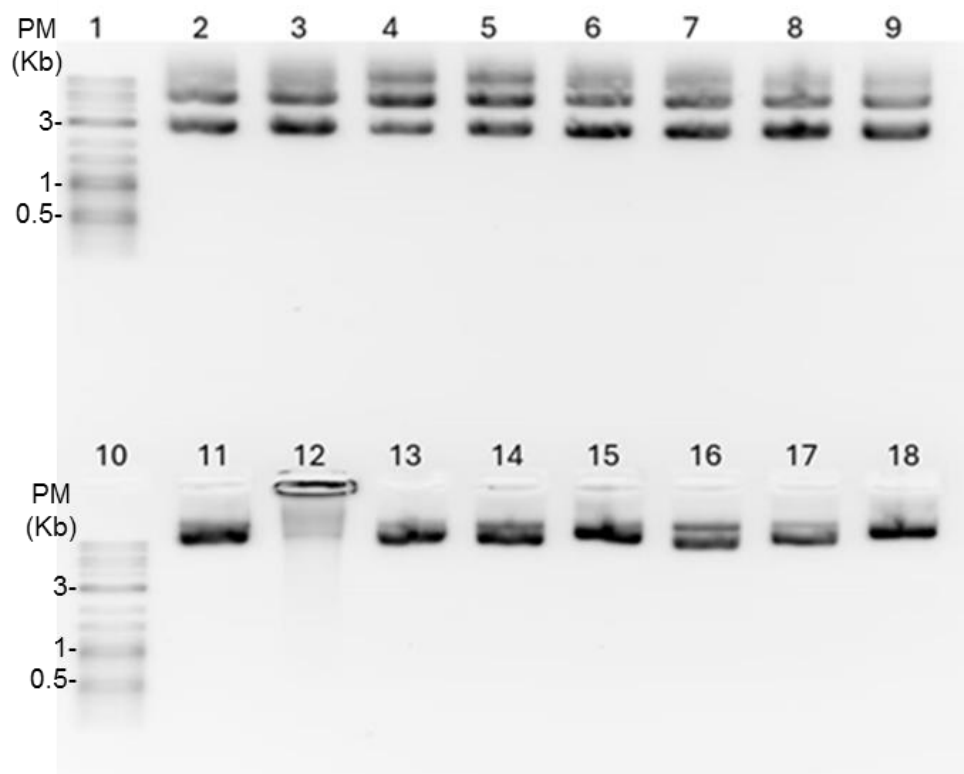


Figura 2. Visualización del ADNp purificado de cepas transformadas de *E. coli* BL21 mediante el método de Birnboim en gel de agarosa al 1.2%. Carriles 1 y 10: marcador de peso molecular (2-log DNA ladder, NEB). Carriles 2–9: purificaciones plasmídicas de BL21-pCOLDI (Gen *PirA^{VP}*). Carriles 11–18: purificaciones plasmídicas de BL21-pET28a (Gen *PirB^{VP}*). PM, peso molecular; b, kilobases.

7.3 Visualización de proteínas en gel de poliacrilamida (SDS-PAGE).

La Fig. 4 muestra el perfil proteico obtenido tras la inducción de la expresión recombinante en *E. coli* BL21 y posterior extracción celular. Después de la inducción con IPTG, las células fueron sometidas a lisis mecánica para separar las fracciones soluble (sobrenadante) e insoluble (precipitado), con el objetivo de evaluar la distribución de las proteínas expresadas.

El análisis mediante SDS-PAGE al 10% teñido con azul de Coomassie R-250 permitió comparar ambas fracciones. Se observa que la cantidad de proteínas en la fracción soluble (carriles 2, 3 y 4) es menor en comparación con la fracción insoluble (carriles 5, 6 y 7). Este patrón sugiere que una proporción importante de las proteínas recombinantes se encuentra en la fracción insoluble, lo cual es consistente con la formación de cuerpos de inclusión (Ibs del inglés *inclusion bodies*), fenómeno común en sistemas de sobreexpresión en *E. coli*.

En particular, la cepa BL21-pET28a (Gen *PirB^{VP}*) muestra una mayor intensidad de bandas en la fracción precipitada, lo que indica una acumulación más marcada de proteínas en esta fracción, en comparación con las demás condiciones evaluadas.

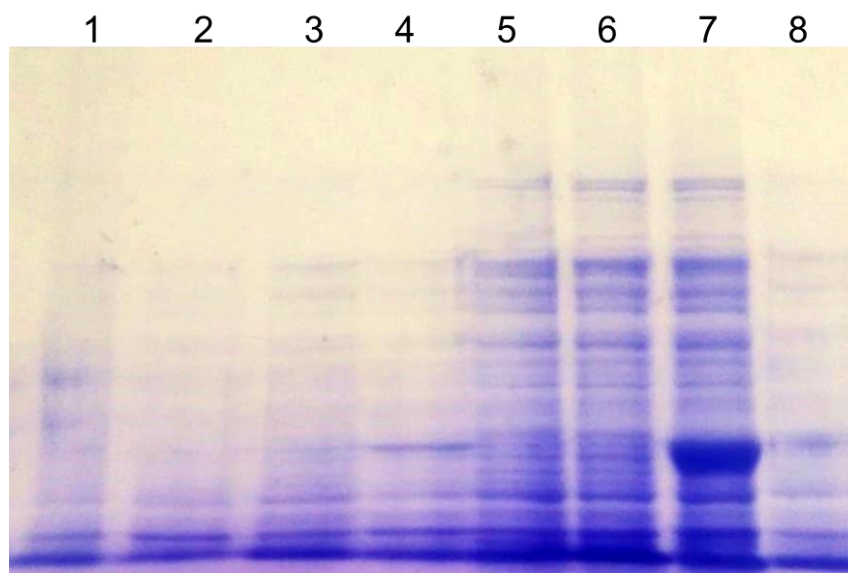


Figura 3. Visualización de extractos proteicos mediante electroforesis en SDS-PAGE al 10%, teñidos con azul de Coomassie R-250. Las muestras proteicas se ajustaron a una concentración de 0.5 mg/mL y se cargaron 30 μ L por pocillo. Carril 1: control proteico (cepa de referencia). Carril 2: sobrenadante de BL21 sin plásmido inducido con IPTG (0.1 mM). Carril 3: sobrenadante de BL21-pCOLDI (Gen *PirA^{VP}*) inducida con IPTG (0.1 mM). Carril 4: sobrenadante de BL21-pET28a (Gen *PirB^{VP}*) inducida con IPTG (0.1 mM). Carril 5: precipitado de BL21 sin plásmido inducido con IPTG (0.1 mM). Carril 6: precipitado de BL21-pCOLDI (Gen *PirA^{VP}*) inducido con IPTG (0.1 mM). Carril 7: precipitado de BL21-pET28a (Gen *PirB^{VP}*) inducido con IPTG (0.1 mM). Carril 8: sobrenadante de BL21-pCOLDI (Gen *PirA^{VP}*) inducida con IPTG (0.1 mM).

7.4 Western blot para la detección de las proteínas *PirA^{VP}* y *PirB^{VP}* mediante anticuerpos.

La Fig. 5 muestra la detección específica de las proteínas recombinantes mediante Western blot, como paso confirmatorio posterior al análisis por SDS-PAGE. Hasta este punto, se había evidenciado la sobreexpresión de proteínas en las fracciones soluble e insoluble; sin embargo, debido a la complejidad del perfil proteico, fue necesario confirmar la identidad de las proteínas de interés mediante un método más específico. Con este propósito, las proteínas separadas por SDS-PAGE fueron transferidas a una membrana de nitrocelulosa y detectadas utilizando anticuerpos dirigidos contra la etiqueta de histidina (His-tag) presente en las construcciones recombinantes.

En el carril 1 se observa el marcador de peso molecular. En el carril 2 (sobrenadante de BL21 sin plásmido) no se detecta señal, lo cual confirma la especificidad del anticuerpo, ya que no hay proteínas marcadas con His-tag en esta muestra. De manera similar, en el carril 5 (precipitado de BL21 sin plásmido) tampoco se observan bandas detectables.

Los carriles 3 y 6 corresponden a BL21-pCOLDI (Gen *PirA^{VP}*) en las fracciones soluble y precipitada, respectivamente. En ambos casos se detecta una banda específica compatible con el tamaño esperado de la toxina *PirA^{VP}*, observándose mayor intensidad en el carril 6, lo que indica una mayor acumulación en la fracción insoluble.

Los carriles 4 y 7 corresponden a BL21-pET28a (Gen *PirB^{VP}*) en sobrenadante y precipitado, respectivamente. En estas muestras se detecta una banda de mayor peso molecular, consistente con la toxina *PirB^{VP}*. Al igual que en el caso de *PirA^{VP}*, la mayor intensidad observada en el carril 7 sugiere que esta proteína se encuentra predominantemente en la fracción insoluble.

En conjunto, estos resultados confirman de manera específica la expresión de las proteínas recombinantes *PirA^{VP}* y *PirB^{VP}* en *E. coli* BL21. Asimismo, la mayor intensidad de las bandas en las fracciones precipitadas respalda la formación de IBs, en concordancia con lo observado previamente en el análisis por SDS-PAGE.

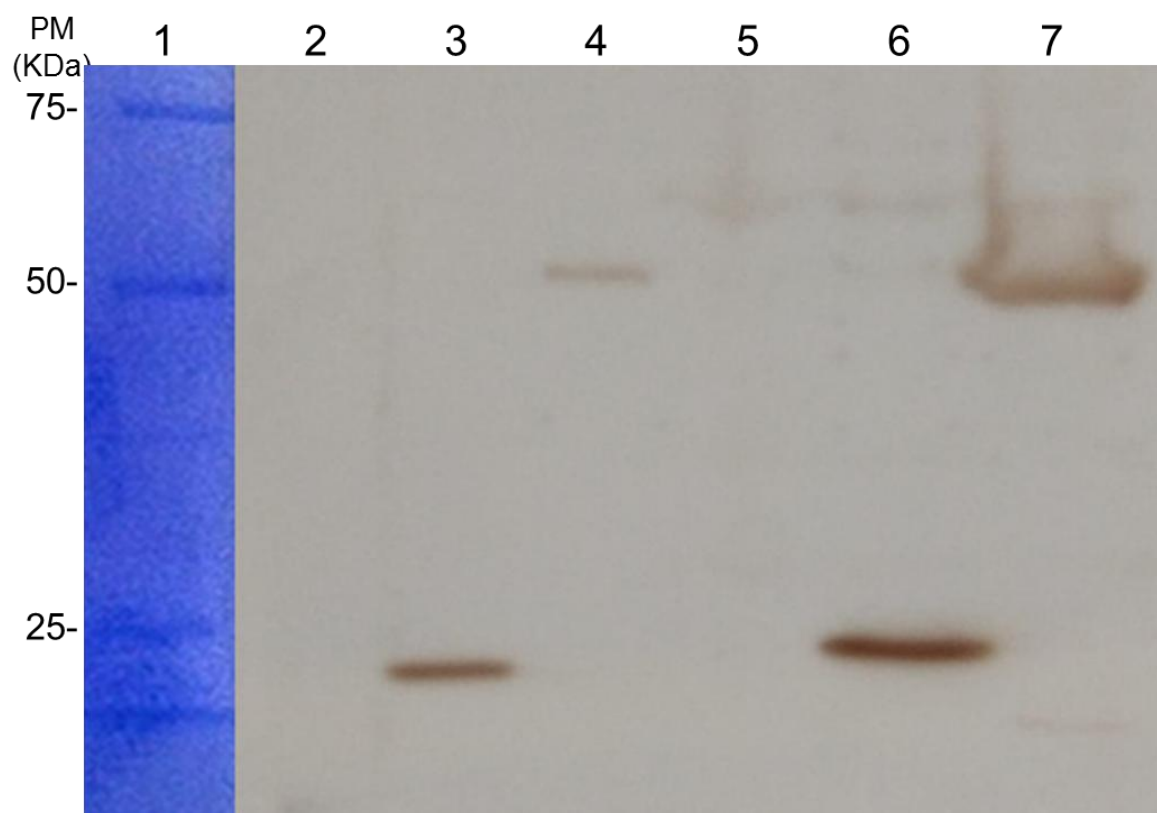


Figura 4. Detección de las proteínas recombinantes PirA^{VP} y PirB^{VP} mediante Western blot en membrana de nitrocelulosa utilizando anticuerpos anti-His-Tag. Las muestras proteicas fueron ajustadas a una concentración de 0.5 mg/mL y separadas previamente por SDS-PAGE. La detección se realizó empleando un anticuerpo primario anti-His-Tag y un anticuerpo secundario anti-ratón, seguida de revelado con diaminobencidina. Carril uno marcador de peso molecular. Carril dos: sobrenadante de BL21 sin plásmido inducido con IPTG (0.1 mM). Carril tres: sobrenadante de BL21-pCOLDI (Gen *PirA*^{VP}) inducida con IPTG (0.1 mM). Carril cuatro sobrenadante de BL21-pET28a (Gen *PirB*^{VP}) inducida con IPTG (0.1 mM). Carril cinco: precipitado de BL21 sin plásmido inducido con IPTG (0.1 mM). Carril seis: precipitado de BL21-pCOLDI (Gen *PirA*^{VP}) inducido con IPTG (0.1 mM). Carril siete: precipitado de BL21-pET28a (Gen *PirB*^{VP}) inducido con IPTG (0.1 mM). PM, peso molecular; kDa, kilodaltons.

8. DISCUSIÓN

La expresión heteróloga de proteínas recombinantes en *E. coli* continúa siendo una de las estrategias más utilizadas para la producción de proteínas de interés biotecnológico, debido a su facilidad de manipulación genética, su rápida tasa de crecimiento y su capacidad para producir altos niveles de proteína (Rosano y Ceccarelli, 2014). En el presente trabajo se logró la obtención y expresión de las endotoxinas PirA^{VP} y PirB^{VP} mediante los vectores de expresión pCOLDI y pET28a en la cepa *E. coli* BL21, lo que permitió evaluar la producción de estas proteínas bajo condiciones de inducción con IPTG.

La confirmación de la presencia de los vectores recombinantes en las cepas transformadas se realizó mediante la purificación de ADNp y su análisis por electroforesis en gel de agarosa. Los resultados mostraron las diferentes conformaciones plasmídicas características del ADN circular, incluyendo las formas superenrolladas, circular abierta y lineal, lo cual es consistente con preparaciones obtenidas mediante métodos de extracción alcalina como el descrito por Birnboim y Doly (1979). La presencia de estas conformaciones, junto con la integridad de las bandas observadas, confirma la estabilidad estructural del ADNp recuperado y el éxito del proceso de transformación mediante choque térmico en células químicamente competentes.

Posteriormente, la expresión de las proteínas recombinantes se evaluó mediante inducción con IPTG, utilizando los sistemas de expresión presentes en los vectores pCOLDI y pET28a. El análisis por SDS-PAGE evidenció diferencias claras en la distribución de las proteínas entre las fracciones solubles e insolubles. En particular, se observó una mayor acumulación proteica en las fracciones correspondientes al precipitado celular, lo que sugiere la formación de IBs. Este fenómeno se reporta ampliamente durante la sobreexpresión de proteínas heterólogas en *E. coli*, especialmente en aquellas que requieren estructuras específicas o se producen a niveles elevados (Baneyx, 1999; Baneyx y Mujacic, 2004).

La presencia de las proteínas recombinantes se confirmó mediante Western blot utilizando anticuerpos dirigidos contra la etiqueta de histidina. En este análisis se detectaron bandas específicas correspondientes a PirA^{VP} y PirB^{VP} en las cepas transformadas, mientras que en la cepa BL21 sin plásmido no se observó señal detectable, lo que confirma la especificidad del

sistema de detección. Adicionalmente, la mayor intensidad de las bandas en las fracciones insolubles, en comparación con las fracciones solubles, respalda la acumulación preferencial de ambas proteínas en IBs.

La formación de IBs, aunque tradicionalmente considerada una limitación, no necesariamente supone una desventaja en la producción de proteínas recombinantes. Estas estructuras pueden actuar como reservorios de proteínas relativamente puras, facilitando procesos posteriores de purificación, solubilización y replegamiento para recuperar su actividad biológica (Rosano y Ceccarelli, 2014). No obstante, la proporción entre proteínas solubles e insolubles puede ser modulada mediante la optimización de parámetros de cultivo como la temperatura, la concentración del inductor y el tiempo de expresión, factores que influyen directamente en la capacidad de plegamiento de la célula hospedera (Sørensen y Mortensen, 2005).

En este contexto, es importante señalar que, aunque en este trabajo se observó una acumulación predominante en la fracción insoluble, también se detectaron proteínas en la fracción soluble, lo que sugiere que las condiciones de expresión empleadas permitieron, al menos parcialmente, el plegamiento adecuado de las toxinas. Este comportamiento puede estar relacionado tanto con las condiciones de inducción como con la compatibilidad del sistema bacteriano con los genes expresados, incluido el uso de codones adecuados para *E. coli*, lo que favorece una traducción eficiente y reduce los errores durante la síntesis proteica (Rosano y Ceccarelli, 2014).

Desde el punto de vista funcional, las toxinas PirA^{VP} y PirB^{VP} constituyen un sistema binario en el que ambas proteínas actúan de manera complementaria. Se ha propuesto que PirA^{VP} participa en el reconocimiento o en la unión a la célula blanco, mientras que PirB^{VP} ejerce el efecto tóxico, posiblemente mediante la formación de poros en la membrana celular (Lee *et al.*, 2015). Este mecanismo presenta similitudes con el de las toxinas Cry de *Bacillus thuringiensis*, lo que sugiere la existencia de estrategias de acción conservadas entre distintos sistemas toxigénicos (Palma *et al.*, 2014).

La relevancia de estas toxinas radica en su papel como principales factores de virulencia asociados al síndrome de la AHPND, una enfermedad que ha generado pérdidas significativas en

la industria acuícola a nivel mundial (Han *et al.*, 2015c; Lee *et al.*, 2015). En este sentido, la obtención de PirA^{VP} y PirB^{VP} en sistemas recombinantes constituye una herramienta fundamental para el estudio de su mecanismo de acción, así como para el desarrollo de estrategias de diagnóstico, control y prevención de esta patología.

Adicionalmente, la disponibilidad de estas proteínas recombinantes en cantidades suficientes permite realizar estudios estructurales, ensayos de interacción molecular y evaluaciones funcionales en distintos modelos experimentales. En particular, su posible relación estructural y funcional con las toxinas Cry sugiere que podrían explorarse en modelos alternativos, como *Spodoptera frugiperda*, ampliamente utilizados en estudios de toxicidad bacteriana (Palma *et al.*, 2014).

A pesar de los resultados obtenidos, es importante considerar algunas limitaciones del presente estudio. Si bien se logró la expresión y detección de las proteínas recombinantes, no se realizaron análisis directos de actividad biológica ni estudios estructurales que permitan confirmar plenamente su funcionalidad. Asimismo, el uso de *E. coli* como sistema de expresión implica limitaciones inherentes, particularmente la ausencia de modificaciones postraduccionales complejas como la glicosilación, la formación de enlaces disulfuro en condiciones no oxidantes y ciertos mecanismos de plegamiento asistido presentes en otros sistemas celulares. En el caso de las toxinas PirA^{VP} y PirB^{VP}, aunque se trata de proteínas de origen bacteriano que no requieren glicosilación, su correcta actividad biológica podría depender de un adecuado plegamiento conformacional y de la formación de complejos funcionales entre ambas subunidades, procesos que pueden verse afectados durante la sobreexpresión heteróloga en *E. coli*, favoreciendo la formación de IBs y posibles estados parcialmente plegados (Rosano y Ceccarelli, 2014).

En conjunto, los resultados obtenidos demuestran que las construcciones genéticas empleadas permiten la expresión de las toxinas PirA^{VP} y PirB^{VP} en *E. coli* BL21, lo que confirma la funcionalidad del sistema de expresión empleado. Estos hallazgos establecen una base sólida para estudios posteriores enfocados en la purificación, la caracterización estructural y la evaluación funcional de estas endotoxinas, contribuyendo al entendimiento de sus mecanismos

de acción y a su posible aplicación en el estudio de la patogénesis asociada a *V. parahaemolyticus*.

La obtención de las toxinas PirA^{VP} y PirB^{VP} en sistemas recombinantes abre la posibilidad de explorar su aplicación en diversos ámbitos biotecnológicos. Debido a su naturaleza como toxinas formadoras de poros y a su similitud funcional con las toxinas Cry de *B. thuringiensis*, estas proteínas podrían evaluarse como candidatas para el desarrollo de bioinsecticidas o agentes de control biológico, particularmente en sistemas que requieren alta especificidad hacia organismos blanco (Palma *et al.*, 2014). Asimismo, considerando su papel clave en la virulencia asociada al síndrome de la AHPND (Han *et al.*, 2015c; Lee *et al.*, 2015), estas toxinas representan una herramienta potencial para el desarrollo de métodos diagnósticos, incluyendo ensayos moleculares e inmunológicos, así como para el diseño de estrategias orientadas a la vacunación o a la inhibición de la interacción toxina-hospedero en sistemas acuícolas.

Por otra parte, el estudio detallado de su mecanismo de acción a nivel molecular podría contribuir al entendimiento general de las toxinas formadoras de poro, lo cual tiene implicaciones en áreas como la biomedicina, particularmente en el diseño de moléculas con actividad citotóxica selectiva o como herramientas para estudiar procesos de permeabilización de membranas celulares (Dal Peraro y van der Goot, 2016).

En conjunto, estas perspectivas resaltan el potencial de las toxinas Pir no solo como factores de virulencia, sino también como herramientas versátiles en biotecnología, acuicultura y desarrollo de nuevas estrategias de control biológico.

9. CONCLUSIONES

En el presente estudio se confirmaron y validaron las construcciones genéticas pCOLDI (*PirA^{VP}*) y pET28a (*PirB^{VP}*) mediante análisis de ADNp. Las proteínas recombinantes PirA^{VP} y PirB^{VP} fueron expresadas exitosamente en *E. coli* BL21 tras la inducción con IPTG y su presencia fue corroborada mediante SDS-PAGE y Western blot. Se observó una mayor acumulación de ambas proteínas en la fracción insoluble, lo que sugiere la formación de cuerpos de IBs, aunque también se detectó expresión en la fracción soluble. La purificación mediante cromatografía de afinidad con Ni-NTA permitió recuperar las proteínas recombinantes. En conjunto, estos resultados demuestran que el sistema de expresión empleado es funcional y adecuado para la producción de las toxinas PirA^{VP} y PirB^{VP}, lo que establece una base sólida para su caracterización y aplicación en estudios posteriores.

10. LITERATURA CITADA

- Aguirre-Guzmán, G., Vázquez-Juárez, R. and Ascencio, F. (2001) 'Differences in the susceptibility of American white shrimp larval substages (*Litopenaeus vannamei*) to four *Vibrio* species', *Journal of Invertebrate Pathology*, 78(4), pp. 215–219. doi:10.1006/jipa.2001.5073.
- Ahantarig, A., Chantawat, N., Waterfield, N.R., French-Constant, R. y Kittayapong, P. (2009). 'PirAB toxin from *Photobacterium damsela* as a larvicide against dengue vectors'. *Applied and Environmental Microbiology*, 75(13), pp. 4627–4629. <https://doi.org/10.1128/AEM.00221-09>
- Ausubel, F.M., Brent, R., Kingston, R.E., Moore, D.D., Seidman, J.G., Smith, J.A. y Struhl, K. (1995) *Short protocols in molecular biology: a compendium of methods from Current protocols in molecular biology*. 3rd ed. New York: John Wiley & Sons.
- Baneyx, F. (1999) 'Recombinant protein expression in *Escherichia coli*', *Current Opinion in Biotechnology*, 10(5), pp. 411–421. [https://doi.org/10.1016/S0958-1669\(99\)00003-8](https://doi.org/10.1016/S0958-1669(99)00003-8)
- Baneyx, F. y Mujacic, M. (2004) 'Recombinant protein folding and misfolding in *Escherichia coli*', *Nature Biotechnology*, 22(11), pp. 1399–1408. <https://doi.org/10.1038/nbt1029>
- Birnboim, H. C., y Doly, J. (1979). A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Research*, 7(6), 1513–1523. <https://doi.org/10.1093/nar/7.6.1513>
- Broberg, C. A., Calder, T. J., y Orth, K. (2011). *Vibrio parahaemolyticus* cell biology and pathogenicity determinants. *Microbes and Infection*, 13(12–13), 992–1001. <https://doi.org/10.1016/j.micinf.2011.06.013>
- Cohen, S. N., Chang, A. C. Y., Boyer, H. W., y Helling, R. B. (1973). Construction of biologically functional bacterial plasmids *in vitro*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 70(11), 3240–3244. <https://doi.org/10.1073/pnas.70.11.3240>
- Dal Peraro, M., y van der Goot, F. G. (2016). Pore-forming toxins: Ancient, but never really out of fashion. *Nature Reviews Microbiology*, 14(2), 77–92. <https://doi.org/10.1038/nrmicro.2015.3>
- Demain, A. L., y Vaishnav, P. (2009). Production of recombinant proteins by microbes and higher organisms. *Biotechnology Advances*, 27(3), 297–306. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2009.01.008>
- Duchaud, E., Rusniok, C., Frangeul, L., Buchrieser, C., Givaudan, A., Taourit, S., Bocs, S., Boursaux-Eude, C., Chandler, M., Charles, J. F., Dassa, E., Deroose, R., Derzelle, S., Freyssinet, G., Gaudriault, S., Médigue, C., Lanois, A., Powell, K., Siguier, P., Vincent, R., Wingate, V., Zouine, M., Glaser, P., Boemare, N., Danchin, A., y Kunst, F. (2003). The genome sequence of the entomopathogenic bacterium *Photobacterium luminescens*. *Nature Biotechnology*, 21(11), 1307–1313. <https://doi.org/10.1038/nbt886>
- FAO. (2024). El estado mundial de la pesca y la acuicultura 2024. La transformación azul en acción. *Organización de la Naciones Unidas Para la Alimentación y la Agricultura*, Roma. 278 pp. <https://doi.org/10.4060/cd0683es>
- FAO (2014) *Report of the FAO/MARD Technical Workshop on Early Mortality Syndrome (EMS) or Acute Hepatopancreatic Necrosis Syndrome (AHPNS)*. FAO Fisheries and Aquaculture Report. Rome: Food and Agriculture Organization of the United Nations.
- Goeddel, D. V., Kleid, D. G., Bolivar, F., Heyneker, H. L., Yansura, D. G., Crea, R., Hirose, T., Kraszewski, A., Itakura, K., y Riggs, A. D. (1979). Expression in *Escherichia coli* of chemically

- synthesized genes for human insulin. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 76(1), 106–110. <https://doi.org/10.1073/pnas.76.1.106>
- Gómez, G.B., Roque, A. y Guerra-Flores, A.L. (2001) 'Enfermedades infecciosas más comunes en la camaronicultura en México y el impacto del uso de antimicrobianos', en Páez-Osuna, F. (ed.) *Camaronicultura y medio ambiente*. México: UNAM, pp. 315–343.
- Han, J. E., Tang, K. F. J., y Lightner, D. V. (2015a). Genotyping of virulence plasmid from *Vibrio parahaemolyticus* isolates causing acute hepatopancreatic necrosis disease in shrimp. *Diseases of Aquatic Organisms*, 115(3), 245–251. <https://doi.org/10.3354/dao02906>
- Han, J. E., Tang, K. F. J., Tran, L. H., y Lightner, D. V. (2015b). *Phototransducin* insect-related (Pir) toxin-like genes in a plasmid of *Vibrio parahaemolyticus*, the causative agent of acute hepatopancreatic necrosis disease (AHPND) of shrimp. *Diseases of Aquatic Organisms*, 113(1), 33–40. <https://doi.org/10.3354/dao02830>
- Han, J. E., Tang, K. F. J., y Lightner, D. V. (2015c). Pir toxin-like genes in a plasmid of *Vibrio parahaemolyticus*, the causative agent of AHPND. *Diseases of Aquatic Organisms*, 113(1), 33–40. <https://doi.org/10.3354/dao02830>
- Heenatigala M, Fernando M. (2016). Occurrence of bacteria species responsible for vibriosis in shrimp pond culture systems in Sri Lanka and assessment of the suitable control measures. *Sri Lanka Journal of Aquatic Sciences* 21: 1-17.
- Hong, X., Lu, L., y Xu, D. (2016). Progress in research on acute hepatopancreas necrosis disease (AHPND). *Aquaculture International*, 24(2), 577–593. <https://doi.org/10.1007/s10499-015-9948-x>
- Horowitz, A. y Horowitz, S. (2001) 'Disease control in shrimp aquaculture from a microbial ecology perspective', en Browdy, C.L. y Jory, D.E. (eds.) *The New Wave: Proceedings of the Special Session on Sustainable Shrimp Culture, Aquaculture 2001*. Baton Rouge, LA: World Aquaculture Society, pp. 199–218.
- Jayasinghe, C. V. L., Ahmed, S. B. N., y Kariyawasam, M. G. I. U. (2010). The isolation and identification of *Vibrio* species in marine shrimps of Sri Lanka. *Journal of Food and Agriculture*, 1(1). <https://doi.org/10.4038/jfa.v1i1.1838>
- Kongrueng, J., Yingkajorn, M., Bunpa, S., Sermwittayawong, N., Singkhamanan, K., y Vuddhakul, V. (2015). Characterization of *Vibrio parahaemolyticus* causing acute hepatopancreatic necrosis disease in southern Thailand. *Journal of Fish Diseases*, 38(11), 957–966. <https://doi.org/10.1111/jfd.12308>
- Kumar, V., Roy, S., Baruah, K., Van Haver, D., Impens, F., y Bossier, P. (2020). Environmental conditions steer phenotypic switching in acute hepatopancreatic necrosis disease-causing *Vibrio parahaemolyticus*, affecting PirA^{VP}/PirB^{VP} toxins production. *Environmental Microbiology*, 22(10), 4212–4230. <https://doi.org/10.1111/1462-2920.14903>
- Laemmli, U. K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 227(5259), 680–685. <https://doi.org/10.1038/227680a0>
- Le Moullac, G., Haffner, P., (2000). Environmental factors affecting immune responses in Crustacea. *Aquaculture* 191, 121–131.
- Lee, C. T., Chen, I. T., Yang, Y. T., Ko, T. P., Huang, Y. T., Huang, J. Y., Huang, M. F., Lin, S. J., Chen, C. Y., Lin, S. S., Lightner, D. V., Wang, H. C., Wang, A. H. J., y Lo, C. F. (2015). The opportunistic marine pathogen *Vibrio parahaemolyticus* becomes virulent by acquiring a plasmid that expresses a deadly toxin. *Proceedings of the National Academy of Sciences of*

- the United States of America, 112(34), 10798–10803.
<https://doi.org/10.1073/pnas.1503129112>
- Lightner, D. V., Redman, R. M., Pantoja, C. R., Noble, B. L., y Tran, L. (2012a). Early mortality syndrome affects shrimp in Asia. *Global Aquaculture Advocate*, 15(3), 40–43.
- Lightner, D. V., Redman, R. M., Pantoja, C. R., Tang, K. F. J., Noble, B. L., Schofield, P., Mohny, L. L., Nunan, L. M., y Navarro, S. A. (2012b). Historic emergence, impact and current status of shrimp pathogens in the Americas. *Journal of Invertebrate Pathology*, 110(2), 174–183.
<https://doi.org/10.1016/j.jip.2012.03.006>
- Lin, S. J., Hsu, K. C., y Wang, H. C. (2017). Structural insights into the cytotoxic mechanism of *Vibrio parahaemolyticus* PirA^{VP} and PirB^{VP} toxins. *Marine Drugs*, 15(12), 373.
<https://doi.org/10.3390/md15120373>
- Lin, S. J., Chen, Y. F., Hsu, K. C., Chen, Y. L., Ko, T. P., Lo, C. F., Wang, H. C., y Wang, H. C. (2019). Structural insights to the heterotetrameric interaction between the *Vibrio parahaemolyticus* PirA^{VP} and PirB^{VP} toxins and activation of the Cry-like pore-forming domain. *Toxins*, 11, 233.
<https://doi.org/10.3390/toxins11040233>
- Lin, S. J., Huang, J. Y., Le, P. T., Lee, C. T., Chang, C. C., Yang, Y. Y., Su, E. C. Y., Lo, C. F., y Wang, H. C. (2022). Expression of the AHPND toxins PirA^{VP} and PirB^{VP} is regulated by components of the *Vibrio parahaemolyticus* quorum sensing (QS) system. *International Journal of Molecular Sciences*, 23(5), 2889. <https://doi.org/10.3390/ijms23052889>
- Muthukrishnan, S., Shariff, M., Ina-Salwany, M. Y., Md Yusoff, F., y Natrah, I. (2022). Expression of AHPND toxin genes (pirAB), quorum sensing master regulator gene (luxR) and transmembrane transcriptional regulator gene (toxR) in *Vibrio parahaemolyticus* and *Vibrio harveyi* during infection of *Penaeus vannamei* (Boone, 1931). *Aquaculture*, 551, 737895.
<https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2022.737895>
- Palma, L., Muñoz, D., Berry, C., Murillo, J., y Caballero, P. (2014). *Bacillus thuringiensis* toxins: an overview of their biocidal activity. *Toxins*, 6(12), 3296–3325.
<https://doi.org/10.3390/toxins6123296>
- Rosano, G. L., y Ceccarelli, E. A. (2014). Recombinant protein expression in *Escherichia coli*: Advances and challenges. *Frontiers in Microbiology*, 5, 172.
<https://doi.org/10.3389/fmicb.2014.00172>
- Sayadi, S., Nasri, M., Barbotin, J. N., y Thomas, D. (1989). Effect of environmental growth conditions on plasmid stability, plasmid copy number, and catechol 2,3-dioxygenase activity in free and immobilized *Escherichia coli* cells. *Biotechnology and Bioengineering*, 33(7), 801–808. <https://doi.org/10.1002/bit.260330702>
- Sirikharin, R., Taengchaiyaphum, S., Sanguanrut, P., Chi, T. D., Mavichak, R., Proespraiwong, P., Nuangsaeng, B., Thitamadee, S., Flegel, T. W., y Sritunyalucksana, K. (2015). Characterization and PCR detection of binary, Pir-like toxins from *Vibrio parahaemolyticus* isolates that cause acute hepatopancreatic necrosis disease (AHPND) in shrimp. *PLOS ONE*, 10(5), e0126987. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0126987>
- Sørensen, H. P., y Mortensen, K. K. (2005). Advanced genetic strategies for recombinant protein expression in *Escherichia coli*. *Journal of Biotechnology*, 115(2), 113–128.
<https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2004.08.004>
- Tran, L., Nunan, L., Redman, R. M., Mohny, L. L., Pantoja, C. R., Fitzsimmons, K., y Lightner, D. V. (2013). Determination of the infectious nature of the agent of acute hepatopancreatic

necrosis syndrome affecting penaeid shrimp. *Diseases of Aquatic Organisms*, 105(1), 45–55.
<https://doi.org/10.3354/dao02621>

- Velázquez-Lizárraga, A. E., Juárez-Morales, J. L., Racotta, I. S., Villarreal-Colmenares, H., Valdes-Lopez, O., Luna-González, A., Rodríguez-Jaramillo, C., Estrada, N., y Ascencio, F. (2019). Transcriptomic analysis of Pacific white shrimp (*Litopenaeus vannamei*, Boone 1931) in response to acute hepatopancreatic necrosis disease caused by *Vibrio parahaemolyticus*. *Public Library of Science ONE*, 14(8), e0220993.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0220993>
- Wang, H.C., Lin, S.J., Wang, H.C., Kumar, R., Le, P. T., y Leu, J.H. (2023). A bacterial binary toxin system that kills both insects and aquatic crustaceans: *Photorhabdus* insect-related toxins A and B. *Public Library of Science Pathogens*, 19(5), e1011330.
<https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1011330>
- Yang, Y.T., Chen, I.T., Lee, C.T., Chen, C.Y., Lin, S.S., Hor, L.I., Tseng, T.C., Huang, Y.T., Sritunyalucksana, K., Thitamadee, S., Wang, H.C., y Lo, C.F. (2014). Draft genome sequences of four strains of *Vibrio parahaemolyticus*, three of which cause early mortality syndrome/acute hepatopancreatic necrosis disease in shrimp in China and Thailand. *Genome Announcements*, 2(5), e00816-14. <https://doi.org/10.1128/genomea.00816-14>
- Zorriehzahra, M.J. y Banaederakhshan, R. (2015) 'Early mortality syndrome (EMS) as new emerging threat in shrimp industry', en *Proceedings of the 17th EAFP International Conference on Diseases of Fish and Shellfish*, Las Palmas de Gran Canaria, España.
<https://doi.org/10.13140/RG.2.1.3325.7449>