

Facultad de Farmacia  
Universidad de La Laguna

Departamento de Bioquímica, Microbiología,  
Biología Celular y Genética  
(Área de Microbiología)

***FACTORES DE VIRULENCIA EN  
VIBRIO SP. AND4***

---

**TRABAJO FIN DE GRADO**

Elisa Rodríguez Acosta  
Grado en Farmacia  
La Laguna, septiembre de 2017

# ÍNDICE

1	ABSTRACT.....	3
2	RESUMEN.....	4
3	INTRODUCCIÓN .....	5
4	OBJETIVOS.....	8
5	METODOLOGÍA .....	9
6	RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	10
	6.1 <i>Isla de patogenicidad</i> .....	18
7	CONCLUSIÓN .....	23
8	BIBLIOGRAFÍA.....	25

# 1 ABSTRACT

The microorganisms that inhabit the human body can often cause damages in the human being, causing remarkable and devastating diseases. This is the reason why microbiology it's a continuous field of study which helps to eradicate these pathogenic microorganisms or try that their presence diminishes.

Vibrios are the main pathogens who affect humans and they are responsible for remarkable gastrointestinal diseases. Our scope is focused on a kind of vibrio denominated *Vibrio sp. AND4*, and we aim to know in depth the virulence mechanisms and the structure that trigger the infection by the pathogens bacteria.

In order these pathogens bacteria are able to cause infection in men they must develop certain virulence factors, which are located in a set of genes named pathogenicity islands, present in the pathogens bacteria's genome and apparently they have been acquired by horizontal genetic transfer.

We will focus on the type III secretion system as the main virulence factor present in the *vibrio sp. AND4*, which is destined to the toxic proteins secretion inside the host cell in order to cause infection on it.

This secretory system consists of approximately twenty proteins conserved in pathogens as distant as *Yersinia* and *Erwinia*, where only the secreted proteins are completely different among the different secretory machines. Depending on the toxic proteins secreted we will get different diseases.

Therefore, we analyze the bacterial pathogenesis as the main focus of microbiological research, which imply the study of the components involved in the pathogen-host interaction, and the production of new antibiotics.

Finally, we will cite some preventive measurements that must get underway in order to offset the diseases produced by vibrios. Measurements, which must be worked from education and public health areas with the support of microbiology research.

## 2 RESUMEN

Los microorganismos que habitan en el cuerpo humano pueden causar a menudo daños en el ser humano, provocando grandes enfermedades devastadoras, por ello es motivo para la microbiología su continuo estudio con el fin de erradicar estos microorganismos patógenos o para que su presencia disminuya.

Los vibrios son los principales patógenos que afectan a los seres humanos siendo responsables de importantes enfermedades gastrointestinales. Nuestro estudio se centra en una especie de vibrio denominada *Vibrio sp. AND4*, pretendemos conocer en profundidad los mecanismos de virulencia y la estructura que tienen las bacterias patógenas para provocar la infección.

Para que estas bacterias patógenas puedan causar infección en el hombre deben desarrollar determinados factores de virulencia, que se encuentran en un conjunto de genes denominados *islas de patogenicidad*, presentes en el genoma de las bacterias patógenas y aparentemente adquiridas mediante transferencia genética horizontal.

Nos centraremos en el sistema de secreción tipo III, como principal factor de virulencia presente en el *vibro sp. AND4*, destinado a la secreción de proteínas tóxicas en el interior de la célula huésped para causar infección en ella.

Dicho sistema de secreción consta aproximadamente de veinte proteínas conservadas en patógenos tan distantes como *Yersinia* y *Erwinia*, donde solo son las proteínas secretadas las que difieren por completo entre las diferentes maquinarias de secreción. Dependiendo de las proteínas tóxicas secretadas obtendremos diferentes enfermedades.

Por lo tanto, analizamos la patogénesis bacteriana como foco principal de investigación microbiológica, ello implica el estudio de los componentes involucrados en la interacción patógeno- huésped, y la producción de nuevos antibióticos.

Finalmente, citaremos algunas medidas de prevención que deben ponerse en marcha para subsanar las enfermedades producidas por vibrios, medidas que han de trabajarse desde las áreas de salud pública y de educación, con el apoyo de las investigaciones de la microbiología.

### 3 INTRODUCCIÓN

Uno de los principales problemas que afecta a todos los sectores de la población y que la microbiología con sus investigaciones intenta erradicar, es el relacionado con las enfermedades causadas por microorganismos, donde los *vibrios* representan uno de los principales patógenos de importancia clínica en el humano, ya que son los responsables de grandes brotes de intoxicaciones alimentarias.

La mayor parte de los microorganismos que habitan en el cuerpo humano lo hacen porque se benefician de los nutrientes que les proporciona el hombre. Esta relación puede ser beneficiosa, neutral o perjudicial. Toda relación entre el agente patógeno y la célula huésped comienza con el contacto del agente infeccioso con la célula hospedadora, dando lugar a la infección. Cuando los efectos acumulativos de la infección dañan los tejidos se produce una enfermedad infecciosa. Los mecanismos para el desarrollo de una enfermedad también son patógenos.

Al iniciar una infección los microorganismos penetran en los tejidos del cuerpo por una ruta característica, donde la piel, tracto alimentario, tracto respiratorio y tracto genitourinario son las principales puertas de entrada para estos microorganismos, atravesando las barreras anatómicas.<sup>[1]</sup>

Una vez que el patógeno contacta con el huésped a través de las vías de entrada, el siguiente paso en la infección requiere que el patógeno se una al huésped, atravesando el epitelio y se establezca entonces en los tejidos. Esta capacidad de adhesión a las células de la mucosa o producir proteínas tóxicas, son ciertas características de los patógenos que tienen una conexión clara y directa con el proceso de infección.<sup>[2]</sup>

Las bacterias patógenas han elevado su agresividad frente a las barreras de defensa de los organismos hospedadores, desarrollando así los factores de patogenicidad o virulencia y con ello la capacidad de iniciar una enfermedad en el organismo, invadiendo al huésped y evadiendo las defensas de este. Cabe mencionar la importancia de reconocer los factores de virulencia de las cepas bacterianas, ya que muchas son la primera causa de infección hospitalaria, y provocan un gran impacto en la morbilidad y mortalidad.

Para abordar el tema de factores de virulencia se debe partir de la premisa de que en el organismo humano y animal hay miles de millones de bacterias que pueden ser patógenas o no. Los factores de virulencia nos proporcionan además, información acerca de la variabilidad genética y la evolución de un organismo.

Mediante el análisis de los genomas se ha demostrado que los patógenos se distinguen de los que no lo son, por la presencia de genes que codifican proteínas asociadas al proceso de patogénesis, organizados en conjuntos de genes denominados islas de patogenicidad. Estas islas de patogenicidad son elementos genéticos que contribuyen a la modificación y diseminación entre poblaciones bacterianas de distintas especies, y como consecuencia la de muchos factores de virulencia.<sup>[3]</sup>

En estas especies patógenas se detectaron dos cromosomas circulares de diferente tamaño, uno más grande que el otro, el cromosoma más pequeño tiene una estructura de mosaico con islas de patogenicidad y genes similares a fagos, lo que indica numerosos eventos horizontales de transferencia génica. Las variantes no patógenas no presentan islas de patogenicidad. Se cree que estas grandes regiones del cromosoma fueron adquiridas mediante procesos de conjugación o transducción.<sup>[3, 4, 5]</sup>

Las islas de patogenicidad se encuentran en bacterias como *E.coli*, *Shigella*, *Salmonella*, *Pseudomonas*, *Vibrio cholerae* y *S.pneumoniae*, entre otras especies.<sup>[6]</sup>

A pesar de una gran variedad de síntomas y enfermedades en humanos, animales y plantas provocadas por bacterias patógenas invasivas o no invasivas, los patógenos filogenéticamente distantes contienen genes estrechamente relacionados. Este aspecto es evidente para un grupo de aproximadamente 20-26 genes que en conjunto codifican para uno de los más recientes mecanismos de secreción (Sistema de Secreción tipo III). Los genes que codifican para el SSTIII<sup>1</sup> están conservados en los diferentes patógenos de animales y plantas, mientras que son las proteínas secretadas por el SSTIII las que difieren.<sup>[7]</sup>

Muchos microorganismos patógenos secretan toxinas como forma de infección en la célula hospedadora. Una toxina es un producto químico venenoso específico de microorganismos, plantas y animales. Algunas bacterias gramnegativas y grampositivas producen exotoxinas (toxinas secretadas por una célula bacteriana viva en el tejido infectado) y otras mientras producen endotoxinas (componente de la pared celular que

---

<sup>1</sup> Abreviatura: Sistema de Secreción tipo III.

solamente se liberan después de que la célula ha sido dañada o lisada, nunca se secretan). Son unas de las sustancias más tóxicas que se conocen, las más importantes son la toxina colérica, la toxina botulínica y la toxina diftérica. [6]

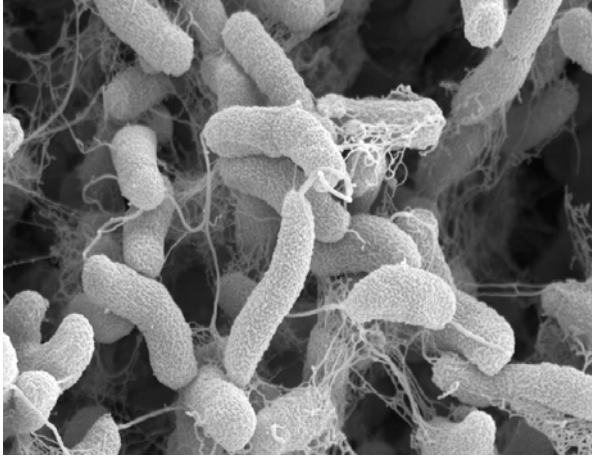
Algunas exotoxinas se transfieren directamente de la bacteria a la célula humana adyacente gracias al sistema de secreción tipo III, sistema en el que nos centraremos en este trabajo. [6, 7]

Conociendo entonces la relación patógeno-hospedador, los factores de virulencia, las islas de patogenicidad y el mecanismo de transmisión de los patógenos, nos adentramos ahora en una especie de microorganismos patógenos responsables de causar infección en los humanos, asociados a grandes epidemias devastadoras.

La conocida especie del género *Vibrio sp.* pertenece a la familia *Vibrionaceae*, es uno de los principales patógenos transmitidos por los alimentos que provoca grandes pérdidas en la industria causando así grandes brotes y contaminación de los alimentos, encontrándose en todos los ambientes estuarinos y marinos. Por ello, plantean un serio peligro para los seres humanos y animales, desde la infección clínica hasta afectar a la agricultura y acuicultura a través de la infección del ganado, por lo que es de gran interés en la salud pública y la economía. Las enfermedades transmitidas por los alimentos son un problema omnipresente, costoso pero reversible. La presentación clínica más frecuente de la infección por *Vibrio* es la gastroenteritis auto limitada. [4]

La supervivencia de los vibriones en el medio acuático se relaciona con las características de *V.cholerae*. Es por ello que el cólera y las infecciones similares al cólera continúan siendo una importante carga para la salud en los países en vía de desarrollo, especialmente en África y en Asia, comprometiendo la salud en miembros vulnerables de la sociedad.

Especialmente existen tres genotipos de vibrio: *V. parahaemolyticus*, *V.cholerae* y *V.vulnificus*, son tres especies que albergan genotipos potencialmente patógenos para los seres humanos. El *vibrio cholerae* es el agente causal del cólera, mientras que *vibrio vulnificus* y *vibrio parahaemolyticus* son los patógenos asociados al consumo de marisco, pescado crudo, siendo *V. vulnificus* el patógeno más mortal transmitido por mariscos. La distinción entre los vibrios patógenos y no patógenos se realiza mediante el antígeno somático O, antígeno V, entre otros, presente en los vibrios patógenos. [1, 8, 9]



**Figura 1.** *Vibrio cholerae*. Microscopía electrónica de barrido. Escala = 1  $\mu$ m. Fuente: Muhsin Özel, Gudrun Holland. [10]



**Figura 2.** *Vibrio cholerae*. Microscopía electrónica de transmisión, contraste negativo. Fuente: Hans R. Gelderblom. [10]

Tradicionalmente, las investigaciones de Microbiología se han realizado siempre en laboratorios experimentales, pero con los nuevos avances se ha encontrado la necesidad de almacenar todos los datos generados de los últimos años de investigación en una base de datos y así informatizarlos. La Bioinformática es la disciplina que se ocupa de recoger toda esta información y crear una base de datos biológica. Reúne secuencias de nucleótidos, genomas, proteomas, estructuras de proteínas, etc.

Se buscará información en una base de datos reconocida como NCBI, sobre el denominado *Vibrio sp. AND4*, caracterizado por el factor de secreción tipo III, que es un factor de virulencia.

## 4 OBJETIVOS

El objetivo principal de este estudio es detectar y analizar los posibles factores de virulencia presentes en la especie *vibrio sp. AND4* estudiada, a partir de secuencias genómicas en GenBank localizadas en el National Center for Biotechnology Information (NCBI).

El objetivo secundario de esta revisión es ofrecer una descripción actualizada de las distintas interacciones que ocurren a nivel celular en el proceso de invasión a la



célula huésped. Por ello, describimos la interacción de los determinantes de virulencia (proteínas efectoras, SSTIII, genes codificantes en el plásmido de invasión).

Se comparará por tanto, la presencia de estos factores de virulencia también en otros vibrios.

## 5 METODOLOGÍA

Se realizó un estudio a partir de un genoma secuenciado en GenBank y también búsquedas de publicaciones como PubMed que contienen artículos de investigaciones biomédicas. Se utilizaron publicaciones relacionadas con la patogénesis molecular de *Yersinia* y estudios sobre la caracterización y función del sistema de secreción tipo III.

Para realizar el análisis de esas secuencias de ADN genómico tendremos muchas herramientas proporcionadas por el NCBI siendo BLAST una de las más usadas.

BLAST es un programa informático de alineamiento de secuencias de tipo local, en el que compara la secuencia problema con otras secuencias encontradas en la base de datos. Es una herramienta de búsqueda de alineación local básica. También se hizo uso de otras bases de datos como Pfam, que consiste en la alineación con el péptido, así como el uso de HMMER.

Una vez reconocida la secuencia genómica, se comprobó la presencia de distintos factores de virulencia, pero sin lugar a duda, se encontró un factor patogénico predominante a lo largo de la secuencia de ADN, codificando para distintos locus, éste es el **factor de secreción tipo III**.

## 6 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Para conocer la región en la que se encuentra el factor de virulencia, primero se localizó el “*contig*”, que es un conjunto de clones ordenados y solapados que constituyen una región cromosómica de un genoma. La importancia de estos mapas cromosómicos radica en que permiten analizar un segmento largo del genoma a través del estudio de clones solapados.

Los factores de virulencia se localizan en elementos genéticos transmisibles denominados plásmidos. Además, dichos genes pueden ser parte de regiones particulares de cromosomas bacterianos denominados “islas de patogenicidad”. Son grandes regiones de ADN y a menudo llevan más de un gen de virulencia y cuyo contenido en G + C difiere del resto del genoma.<sup>[3]</sup>

Es importante mencionar que las bacterias patógenas utilizan diferentes vías de secreción (sistemas de secreción tipo I, II, III, IV y V), pero el más conocido y encontrado en nuestro *vibrio* es el sistema de secreción tipo III.<sup>[6]</sup>

Este sistema de secreción tipo III ha sido identificado en una gran variedad de patógenos humanos como pueden ser: *Bordetella*, *Chlamydia*, *Erwinia*, *E.coli*, *Pseudomonas*, *Salmonella*, *Yersinia*, *Shigella*, *Xanthomonas*, *Rhizobia*, entre otros.<sup>[11]</sup>

Como se describe en el presente trabajo, un sistema de secreción de proteínas es lo único que precisa la bacteria para constituirse como un buen patógeno. Cada una de las maquinarias de secreción tiene sus propias ventajas y limitaciones en cuanto al destino de las proteínas secretadas. Todos estos sistemas están caracterizados por su alta especificidad, el ensamblaje de esta maquinaria en la membrana de la célula, así como el movimiento de los sustratos excretados a través de ella.<sup>[6]</sup>

Se expone el mecanismo de secreción que utilizan algunas bacterias, presente en nuestro *vibrio* objeto de análisis. Esta maquinaria de translocación de proteínas es la responsable de causar virulencia en la célula y, el principal factor de patogenicidad. Estos sistemas de secreción inyectan o translocan proteínas al citosol de células eucariotas, donde las proteínas translocadas facilitan la patogénesis bacteriana interfiriendo con procesos celulares de la célula huésped.<sup>[6, 7]</sup>

Analizamos la estructura del sistema de secreción partiendo de la base de que es un sistema de secreción independiente, conformado por veinte proteínas, donde los genes que componen este aparato se encuentran agrupados. Asumimos que se trata de una maquinaria formada por constituyentes altamente conservados en los diferentes patógenos, sin embargo son las proteínas excretadas las que difieren entre ellos y, por lo tanto, las enfermedades que causan. Dichas proteínas translocadas tienen que atravesar la membrana externa de la célula hospedadora, siendo la mayor parte de estas proteínas homólogas al componente de biosíntesis flagelar. La localización de este sistema de secreción se encuentra en la membrana interna de la célula hospedadora y requiere de ATPasa para su función. <sup>[6, 7]</sup>

Un ejemplo importante de factor de virulencia conocido presente en *Yersinia pestis* y que también pudimos encontrar en el *vibrio* estudiado, que veremos a continuación, son las proteínas *Yops* (del inglés *Yersinia outer-membrane proteins*), proteínas de membrana externa de *Yersinia*. Estos factores de virulencia actúan después de la invasión de las células por los microorganismos. <sup>[6, 12, 13, 11]</sup>

Se debe tener en cuenta las distintas proteínas que participan el sistema de secreción de patógenos y las que conforman el flagelo bacteriano:

1. Proteínas con función de chaperonas específicas.
2. Proteínas que permiten la translocación y se ven involucradas en el proceso de transporte al interior de la célula eucariota y forman un poro o translocón.
3. Proteínas que regulan la expresión de los genes estructurales y la secreción de las proteínas que median la virulencia del patógeno.
4. Proteínas que forman la estructura del sistema de secreción, que constituyen el núcleo del mismo y el flagelo bacteriano, siendo proteínas muy conservadas.
5. Proteínas efectoras.

El ejemplo prototipo de SSTIII de translocación de factores de virulencia está constituido por la familia *Yersinia*, representado por las proteínas *Yops* como principal factor de virulencia conocido en la especie *Yersinia pestis*. <sup>[6, 7, 12, 13]</sup>

A continuación se exponen las proteínas del vibrio de la familia *Yersinia* que comparten similitud con nuestro *Vibrio sp. ADN4*, el cual contiene la función de muchas de las mismas:

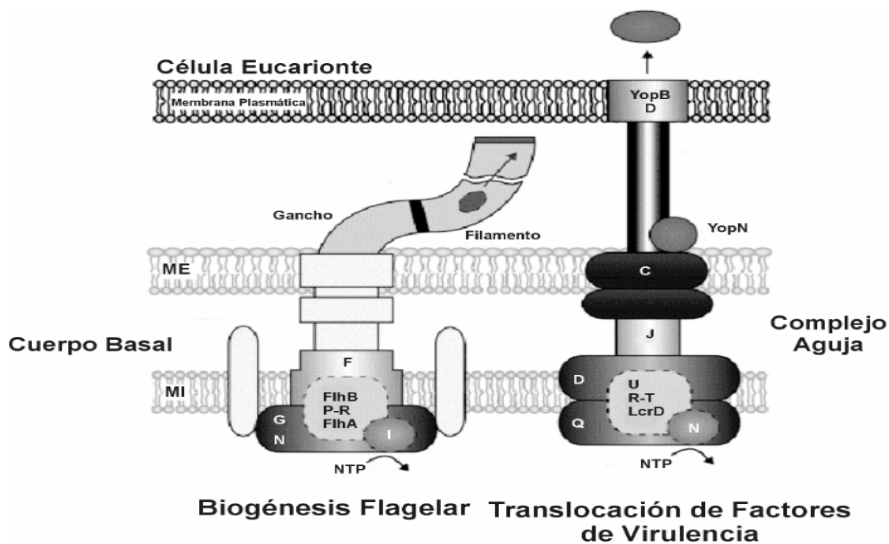
PROTEÍNAS O COMPONENTES DEL SISTEMA DE SECRECIÓN TIPO III	NOTAS
<i>YscC, YscD, YscJ, YscL, YscN, YscQ, YscR, YscS, YscT, YscU, YscV</i>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Conservadas en todos los sistemas de secreción.</li> <li>- Comparten similitud con el aparato flagelar.</li> </ul>
<i>Ysc</i>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Es el aparato de secreción</li> <li>- Formado por 25 proteínas incluyendo la secretina</li> </ul>
<i>Yops</i>	Proteínas efectoras secretadas por el SSTIII.
<i>YopE, YopH, YopO, YopP, YpKA, YopJ, YopM, YopT</i>	Proteínas efectoras
<i>YopB, YopD, LvrV</i>	Proteínas que forman el translocón
<i>YscN, YscQ e YscL</i>	Proteínas citosólicas.
<i>YscN</i>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Altamente conservada en los SSTIII.</li> <li>- Pertenece a la familia de ATPasas</li> <li>- Importante en la secreción</li> </ul>
<i>YscJ</i>	Lipoproteína con secuencia señal.
<i>YscC</i>	Familia de las secretinas que forman un canal en la membrana externa.
<i>YscU e YscP</i>	Regulan la secreción de Yop.
<i>Lcr</i>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Característica y exclusiva de <i>Yersinia</i>.</li> <li>- Se expresa solamente a 37° y en ausencia de Ca<sup>2+</sup></li> </ul>
<b>Región 5' del ARNm</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Codifica proteínas secretadas.</li> <li>- Es la señal de secreción de proteínas.</li> </ul>
<b>Proteínas secretadas</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Requieren proteínas citoplásmicas con función de chaperonas para proteger los factores secretados.</li> <li>- Secreción regulada por contacto con la superficie de las células efectoras.</li> </ul>
<b>Syc</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Con función de chaperona para el correcto funcionamiento del sistema.</li> <li>- Localizadas en el citosol bacteriano.</li> </ul>

**Tabla. 1.** Clasificación de proteínas que forman parte del sistema de secreción del SSTIII en *Yersinia*. Referencias: [6][7][11][13]

En cuanto al flagelo, componente que da movilidad a la célula, consiste en tres estructuras principales: filamento, gancho y cuerpo basal, siendo éste el responsable de reconocer las proteínas que van a ser exportadas. [6][7] Respecto a las proteínas que componen esta estructura, se destaca:

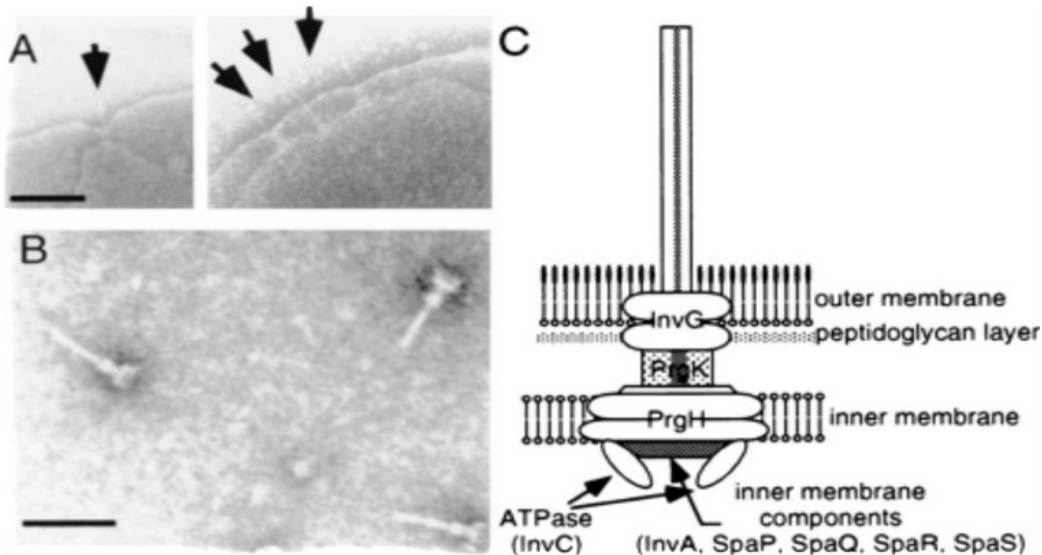
COMPONENTES DEL FLAGELO	NOTAS:
<i>FlhA, FlhB, FlhO, FlhP y FlhQ, FlhR</i>	Proteínas membranales
<b>Anillo MS</b>	Insertado en la membrana interna y forma un núcleo sobre el que se acoplan los demás componentes
<b>Anillo C</b>	Localizado en el citoplasma
<i>FlhG, FlhM y FlhN</i>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Proteínas que componen el anillo C.</li> <li>- Participan en el cambio de dirección de rotación flagelar.</li> </ul>
<i>Mxi y spa</i>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Proteínas de secreción</li> <li>- Homólogas en otras proteínas putativas de SSTIII de <i>Yersinia</i>, <i>Salmonella</i>, <i>E.coli</i>, <i>Pseudomonas</i>, <i>Chlamydia</i></li> </ul>

**Tabla. 2.** Clasificación de proteínas que conforman la maquinaria flagelar del SSTIII en *Yersinia*. [6][7][13]



**Figura 3.** Modelos de secreción tipo III ejemplificados por la biogénesis flagelar y la translocación de factores de virulencia en *Yersinia*. Se muestran los componentes del flagelo que son homólogos a los del complejo aguja del sistema de translocación de factores de virulencia. [6]

Cabe destacar que existe una similitud entre los componentes estructurales de la maquinaria del flagelo de *Salmonella*, *Shigella flexneri* y *E.coli* enteropatógena, con el *vibrio AND4* propuesto, confirmando así la existencia de un mecanismo común. [14]



**Figura 4.** Complejo de aguja del sistema de secreción III. (A) Complejos en la envoltura bacteriana. (B) Microfotografía Electrónica del SSTIII. (C) Representación esquematizada. [15]

A continuación, se mostrará los diferentes genes encontrados en nuestro *vibrio sp. AND4*, que coinciden con los genes de *Salmonella*:

GEN	“Locus_tag”	FUNCIÓN
spaS	AND4_03304	- Vía de secreción tipo III, componente <i>EscU</i> .
spaR	AND4_03299	- Sistema de secreción tipo III de la familia <i>EscT/YscT/HrcT</i> . Las subunidades de este sistema provoca patogenicidad estando muy próximos unos de otros.
spaP	AND4_03289	- Componentes del sistema de secreción tipo III. - Translocación de proteínas. - TGRFARM → se comprueba el sistema de secreción tipo III de la familia <i>YscR/HrcR</i> . - 100% de identidad.
inuc	AND4_15410	- Familia <i>FliI</i> que conforman el flagelo - ATP sintetasa específica. Esta entrada incluye la ATP sintasa $\alpha$ y $\beta$ subunidades asociadas con flagelos y la terminación del factor <i>Rho</i> . - Dominio ensamblaje de nucleótidos.
inu b	AND4_17184	- Acetil coAcetiltransferasa. - 50% de identidad.
inu a	AND4_03239	- Baja proteína de respuesta al calcio. - Sistema de secreción tipo III familia <i>EsCU/YscU/HrcV</i> - TGRFARM → SSTIII en familia <i>HrcV</i> .
inu g	AND4_03364	- SSTIII de la familia <i>EscC/YscC/HrcC</i> , Anillo proteico sobre la membrana.

		- TGRFARM→ SSTIII. Poro sobre la membrana, familia <i>YscC/HrcC</i> .
<b>inu f</b>	<b>AND4_04685</b>	- Regulador transcripcional, familia <i>ARaC/XylS</i> . - Dominio hélice-giro-hélice.
<b>sic a</b>	<b>AND4_03219</b>	- Baja proteína de respuesta al calcio. Proteína H. - SSTIII de la familia de chaperonas <i>CesD/SyCD/LcrH</i> .
<b>sip a</b>	<b>AND4_02963</b>	- Histidinol-phosphato aminotransferasas. - Aminotransferasas clase I y II
<b>iac p</b>	<b>AND4_18922</b>	- Sensor histidina quinasa <i>FexB</i> . - Histidina quinasa, DNA girasa B, HSP90 como ATPasas. (Representa los dominios de ATPasas estructuralmente relacionados e histidina quinasa, DNA girasa B y HSP90)
<b>sic p</b>	<b>AND4_01263</b>	- Carboxil terminal proteasa. - NA- glutamato deshidrogenasa bacteriana. Proteínas relacionadas con la NAD-glutamato deshidrogenasa (GDH).
<b>spt p</b>	<b>AND4_16529</b>	- Fosfatasa. Inhibidor de la quinasa dependiente de ciclina 3 (CDKN3). Esta familia consta de quinasa dependiente de ciclina o quinasa asociada a fosfatasa.
<b>iag b</b>	<b>AND4_11419</b>	- Proteínasa de cisteína como transglutaminasa bacteriana <i>BTLCP</i> .
<b>hil a</b>	<b>AND4_07134</b>	- Proteína reguladora transcripcional. C terminal.
<b>prg h</b>	<b>AND4_19407</b>	- Proteína exportadora <i>SecD</i> (Familia de proteína <i>SecD</i> ). - N-terminal de la proteína de exportación.

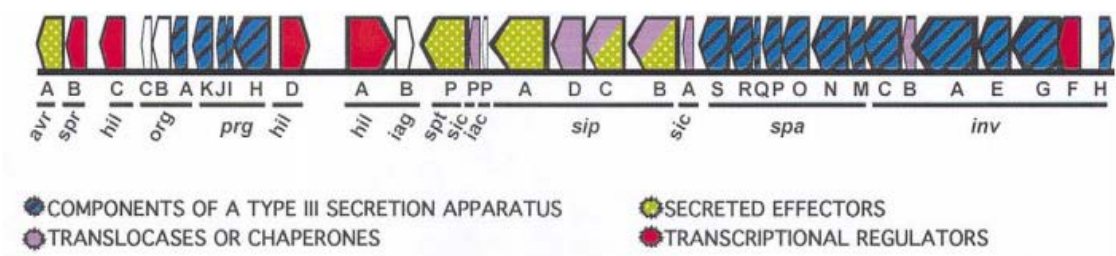


<b>prg k</b>	AND4_	<ul style="list-style-type: none"> <li>- SSTIII de lipoproteína. Familia de proteínas secretoras de <i>YsCJ/FliF</i></li> <li>- Proteínas relacionadas con la lipoproteína <i>YscJ</i> y el término amino de <i>FliF</i> y la proteína M-anillo flagelar. Los miembros de esta familia se piensa que están implicados en la secreción de varias proteínas.</li> <li>- El anillo <i>FliF</i> es parte del aparato de exportación.</li> </ul>
<b>org a</b>	AND4_12899	<ul style="list-style-type: none"> <li>- 5,10-metilenterahidrofolato reductasa.</li> </ul>
<b>hil c</b>	AND4_07134	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Respuesta reguladora de unión al AND.</li> </ul>
	AND4_17744	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Proteína reguladora transcripcional.</li> </ul>

**Tabla 3.** Genes correspondientes a la isla de patogenicidad de *Vibrio sp. AND4* coincidentes con *Salmonella*. [16]

En *vibrio sp. AND4* encontramos una serie de genes *inv*, *spa*, *prg* y *org* que se encargan de formar las proteínas constituyentes del sistema de secreción, mientras que los genes *sptP*, que codifica para una tirosinofosfatasa junto con *SipA* y *SipE*, son encargados del re-arreglo de los filamentos de actina.<sup>[14]</sup>

Obtenemos entonces la estructura de la isla de patogenicidad:



**Figura 5.** Los componentes codificados en la isla de patogenicidad incluyen las subunidades de una secreción de tipo III. Aparatos, efectores secretados por el aparato, factores requeridos para su translocación eficiente y reguladores transcripcionales. Mapas a la izquierda de avrA, SipB y sipC. [16]

### 6.1. Isla de patogenicidad

Tras el análisis del ADN genómico del *Vibrio sp. AND4* se observó una isla de patogenicidad cuyo factor de virulencia era el sistema de secreción tipo III. Detectamos así el inicio y el final de esta isla de patogenicidad, comenzando desde el locus AND4\_03209 y finalizando por tanto en el locus AND4\_03464.

*Vibrio sp. AND4* es una especie que tiene un factor de secreción tipo III codificado por una isla de patogenicidad.

LOCUS	FUNCIÓN
AND4_03209 → Proteínas YopD bacterianas	La especie virulenta de <i>Yersinia</i> alberga un plásmido que codifica los determinantes de virulencia (las proteínas <i>Yop</i> ), reguladas por estímulos extracelulares de Ca <sup>2+</sup> y temperatura.
AND4_03214 → Sistema de secreción efector C (SseC)	Complejo de proteínas formado por el factor de secreción tipo III. Muchos patógenos usan este sistema para la inyección de células efectoras en células diana.  Este complejo forma un poro en la membrana.
AND4_03219 → Secreción tipo III secreción baja de calcio chaperona LcrH / SycD	Los genes de esta familia se encuentran en operones de secreción de tipo III. LcrH, de <i>Yersinia</i> , tiene una función reguladora en la respuesta de bajo contenido de calcio del sistema de secreción.
AND4_03224 → Antígeno V (LcrV)	<i>Yersinia pestis</i> segrega un conjunto de proteínas de virulencia denominadas <i>Yops</i> y antígeno V (LcrV) mediante el mecanismo de secreción de tipo III. LcrV es una proteína que actúa en el nivel de control de la secreción, es necesaria para la inducción de la transcripción del gen de virulencia del estímulo de la respuesta de bajo contenido de calcio (LCR).
AND4_03229 → Proteína LcrG. Proteína de secreción tipo III.	LcrG es un componente de ese aparato (denominado virulón) implicado en la regulación de la secreción del <i>Yops</i> .
AND4_03234 → Regulador del sistema de secreción tipo III (LCRR)	Esta familia de proteínas está formada por operones de secreción de tipo III y se han caracterizado en <i>Yersinia</i> como un regulador de la respuesta de bajo calcio (LCR).
AND4_03239 → Proteína de secreción tipo III, familia HrcV	Los miembros de esta familia son homólogos a la proteína de biosíntesis flagelar <i>FlhA</i> y participan en sistemas de secreción tipo III, pueden trasladar péptidos a través de la membrana. Familia <i>FHIPEP</i> .
AND4_03249 → Sistema de secreción tipo III YscX	El miembro de esta familia en <i>Yersinia</i> se demostró por mutación que se requiere para la secreción de tipo III de proteínas efectoras de <i>Yops</i> .
AND4_03254 → Tipo III secreción chaperón SycN	Los miembros de esta familia de proteínas son parte de la maquinaria de la secreción bacteriana de tipo III. Un complejo de esta proteína ( <i>SycN</i> ) y <i>YscB</i> actúa como una chaperona para la exportación de <i>YopN</i> .  <i>YopN</i> actúa entonces para controlar la secreción de proteínas efectoras, en respuesta a los niveles de calcio.
AND4_03259 → sistema de secreción tipo III.	Los miembros de esta familia interactúan con la proteína bacteriana <i>YopN</i> . Se forma una estructura que sirve entonces como un impedimento para la secreción tipo III de <i>YopN</i> .

AND4_03264 → HrpJ-como el dominio	<i>HrpJ</i> forma parte del sistema de secreción tipo III. Esta familia incluye las proteínas bacterianas <i>SepL</i> y <i>SsaL</i> . <i>SepL</i> importantes en el proceso de infección de <i>E. coli</i> enterohemorrágica y responsable de la secreción de <i>EspA</i> , <i>EspD</i> y <i>EspB</i> . <i>SsaL</i> de <i>Salmonella typhimurium</i> es un componente del sistema de secreción tipo III.
AND4_03269 → ATP sintasa alfa / beta, dominio de unión a nucleótidos	Esta entrada incluye la ATP sintasa alfa y beta subunidades, la ATP sintasa asociada con flagelos y la terminación factor <i>Rho</i> .
AND4_03274 → Proteína de secreción tipo III YscO	Esta familia contiene la proteína de secreción <i>YscO</i> . <i>YscO</i> es necesario para la expresión y secreción de alto nivel del antígeno V de las proteínas anti-huésped y <i>Yops</i> en <i>Yersinia pestis</i> .
AND4_03279 → Sistema de secreción del tipo III determinante de la longitud de la aguja.	Los miembros de esta familia incluyen <i>YscP</i> del sistema de secreción <i>Yersinia</i> tipo III y proteínas equivalentes en otros sistemas de secreción bacteriana de tipo III de tipo patógeno animal. El modelo describe la región C-terminal conservada.
AND4_03284 → Tipo III flagelar interruptor regulador (C-ring) FliN C-term.	Proteínas que forman el anillo C del flagelo del sistema de secreción tipo III.
AND4_03289 → Familia FliP	Proteínas <i>FliP</i> forman parte de la formación del flagelo.
AND4_03294 → Proteína de translocación en la secreción de tipo III	Esta familia incluye los siguientes miembros; <i>FliQ</i> , <i>MopD</i> , <i>HrcS</i> , <i>Hrp</i> , <i>YopS</i> y <i>SpaQ</i> . Todos estos miembros exportan proteínas.
AND4_03299 → Sistema de secreción tipo III.	Esta familia incluye los siguientes miembros; <i>FliR</i> , <i>MopE</i> , <i>SsaT</i> , <i>YopT</i> , <i>Hrp</i> , <i>HrcT</i> y <i>SpaR</i> Todos estos miembros exportan proteínas.
AND4_03304 → Familia Flh B HrpN YscU SpaS	Esta familia incluye los siguientes miembros: <i>FlhB</i> , <i>HrpN</i> , <i>YscU</i> , <i>SpaS</i> , <i>HrcUSsaU</i> y <i>YopU</i> . Todas estas proteínas exportan péptidos usando el sistema de secreción tipo III.
AND4_03314 → Proteína de secreción tipo III.	Esta familia consiste en una serie de secuencias bacterianas que son muy similares a la proteína <i>Tir chaperone</i> en <i>E. Coli</i> . Muchas de las proteínas secretadas a partir de tales sistemas requieren pequeñas chaperonas.

AND4_03319 → Proteína de secreción tipo III.	Proteína flagelar de montaje <i>FliH</i> .
AND4_03324 → YOP proteína de translocación proteínas K (YscK)	Esta familia consta de varias proteínas <i>YscK</i> . Pertenece a un operón implicado en la secreción de proteínas <i>Yop</i> a través de las membranas bacterianas.
AND4_03334 → Proteína del cuerpo basal de secreción tipo III, YscI, HrpB, PscI.	Es la proteína de la barra interna de la aguja secretada, permitiendo así el paso del sustrato a través de la membrana interna de la aguja de <i>YscF</i> a través de ella.
AND4_03339 → YopR, regulador de polimerización de aguja de tipo III.	<i>YopR</i> es un componente regulador móvil. <i>YopR</i> controla directamente la secreción de <i>YscF</i> , la proteína de la aguja polimerizada, impactando así el montaje de las máquinas del tipo III.
AND4_03344 → Sistema de secreción tipo III.	<i>YscG</i> es una chaperona molecular para <i>YscE</i> , que forman parte del sistema de secreción tipo III de <i>Yersinia</i> .
AND4_03349 → Sistema de secreción tipo III. Proteína de exportación tipo III YscF.	<i>MxiH</i> es una aguja alfa helicoidal extracelular que se requiere para la translocación de las proteínas efectoras en las células huésped. Una vez dentro, las proteínas efectoras subvertirán la función celular normal para ayudar a la infección. La proteína de la aguja F, polimeriza para formar un eje.
AND4_03354 → Sistema de secreción tipo III.	Familia de proteínas del operón que construye y controla la aguja del sistema de inyección de secreción tipo III.
AND4_03359 → Sistema de secreción tipo III.	<i>Yop-YscD-ppl</i> es el dominio periplásmico de proteínas <i>Yop</i> como <i>YscD</i> de Proteobacteria. <i>YscD</i> forma parte del componente de membrana interna del aparato de inyección de bacterias de secreción de tipo III.
AND4_03364 → Sistema de secreción tipo III y tipo II.	
AND4_03369 → Familia de proteína tir chaperonas.	Esta familia consiste en una serie de secuencias bacterianas que son muy similares a la proteína <i>Tir chaperone</i> en <i>E. Coli</i> . Es un indicador clave del potencial patógeno que se utiliza para administrar proteínas efectoras de virulencia directamente en el citosol de la célula huésped.
AND4_03374	La proteína antiactivadora <i>ExsD</i> reprime el activador transcripcional <i>ExsA</i> que activa la expresión de los genes del sistema de

	secreción tipo III.
<b>AND4_03384 → Sistema de secreción tipo III.</b>	Es una chaperona para el componente de poro de membrana exterior <i>YscC</i> . <i>YscW</i> es una lipoproteína que está localizada en la membrana externa. Facilita la oligomerización y localización de <i>YscC</i>
<b>AND4_03389 → Familia de proteínas TIF chaperonas.</b>	Familia de proteínas similares a la proteína <i>Tir chaperone</i> en <i>E. Coli</i> . Es un indicador clave del potencial patógeno que se utiliza para administrar proteínas efectoras de virulencia directamente en el citosol de la célula huésped.
<b>AND4_03424 → está marcado como factor de secreción tipo III</b>	Esta familia incluye los dos canales iónicos de la membrana encontrados en bacterias.
<b>AND4_03449 → Proteína de translocación TolB precursor</b>	Proteína de translocación.
<b>AND4_03454 → Proteína TolA</b>	Su familia se compone de varias proteínas bacterianas <i>TolA</i> . Las proteínas <i>Tol</i> están implicadas en la translocación de colicinas. Las colicinas son toxinas proteicas bacterianas, que son activas contra <i>E. coli</i> . <i>TolA</i> , anclado a la membrana citoplásmica.
<b>AND4_03459 → Biopolímero de transporte de proteínas ExbD / TolR</b>	Son proteínas de transporte unidas a membranas esenciales para la absorción de iones férricos en bacterias.
<b>AND4_03464 → Proteína TolQ</b>	Proteínas integrales de la membrana implicadas en la translocación de proteínas a través de una membrana. Estas proteínas son probablemente canales de protones. <i>MotA</i> es un componente esencial del motor flagelar que utiliza un gradiente de protones para generar movimiento rotacional en el flagelo.

**Tabla 4.** Isla de patogenicidad extraída del genoma de *Vibrio sp. AND4*. El cuadro expuesto está realizado a partir de la base de datos NCBI utilizada en este estudio.

Según estudios elaborados recientemente, existe una estrecha similitud entre el *vibrio sp. AND4* y el *vibrio harveyi*, sin embargo no se pudo asignar a ninguna especie de la familia *Vibrionaceae*, según describen Urbanczyk, Ogura y Hayashi, por lo tanto, la caracterización taxonómica de esta cepa requerirá el aislamiento y el análisis de cepas adicionales. Esta publicación ha dado lugar a una variedad de cuestiones que intenta resolver actualmente la microbiología.

## 7 CONCLUSIÓN

En la actualidad sigue siendo elevado el número de personas que acude a un servicio de urgencias aquejados de síntomas de gastroenteritis, muchas de ellas por contaminación a causa de algún alimento.

En este estudio se ha intentado aclarar la estructura supramolecular de la maquinaria de secreción tipo III, como forma de infección de la bacteria, incluyendo sus principales componentes estructurales.

En nuestro estudio se puede concluir:

1. Cada vez parece más probable que en un futuro se identifiquen muchos más sistemas de secreción tipo III. Esto ha dado lugar a un salto evolutivo en la patogénesis bacteriana, donde la identificación de un nuevo sistema de secreción tipo III conducirá a nuevos conocimientos sobre los mecanismos de patogenicidad.
2. La identificación de este sistema de secreción ha abierto un amplio campo de investigación sobre otros posibles mecanismos patógenos subyacentes. El análisis de la bioquímica de los factores de virulencia secretados por el sistema tipo III ha dado lugar a fascinantes conocimientos sobre la sofisticada interacción entre la célula huésped y el patógeno.
3. Este sistema facilita la comprensión de los mecanismos moleculares y la evolución de la patogenicidad bacteriana y puede dar importantes aplicaciones prácticas. Según la Organización Mundial de la Salud (OMS), las enfermedades diarreicas son la segunda mayor causa de mortalidad en

niños y niñas menores de cinco años (alrededor de 525 mil mueren cada año) y morbilidad que afecta a todos los grupos de personas, de diferentes edades.

4. Es fundamental el papel de la educación en la prevención de la enfermedad diarreica, especialmente en los países desarrollados en los que esta enfermedad no es tan virulenta como en los países en desarrollo. Las campañas de información y formación a la población deben hacerse desde la interdisciplinariedad de los recursos técnicos de los que dispone la sociedad, esto es, los agentes de salud y de educación para concienciar de la importancia de la higiene personal y del tratamiento y manipulación de los alimentos, así como el uso correcto de los antibióticos.
5. Mejorar las condiciones de la población de los países en desarrollo debe ser prioridad en agenda de los diferentes gobiernos, esto se contempla en los Objetivos de Desarrollo Sostenible (ODS), en concreto el objetivo 6: *Garantizar la disponibilidad de agua y su gestión sostenible y el saneamiento para todos.*

6. La aparición de cepas multirresistentes de *vibrio sp.* mediante el mecanismo de transmisión horizontal demuestra cierta resistencia a antibióticos debido al indiscriminado de estos. Esto ha motivado el estudio de nuevos antibióticos que reemplacen a los de primera línea con el fin de evitar que las infecciones comunes y las lesiones que en la actualidad son menores vuelvan a ser potencialmente virulentas.



## 8 BIBLIOGRAFÍA

- [1] Vincent T. Lee, Olaf Schneewind. “Protein secretion and the pathogenesis of bacterial infections”. *Genes & Dev.* [Internet]. 2001 [citado 15 abril 2017]; 15: 1725-1752.
- [2] Rocha Gracia, R.C, Lozano Zarain, P, Martínez Laguna, Y. “Mecanismos de Patogenicidad e Interacción parásito-hospedero”. [Internet]. 1º ed. Benemérita Universidad Autónoma de Puebla; 2004 [citado 25 abril 2017].
- [3] Hacker J, Blum-Oehler G, Mühldorfer I, Tschäpe H. “Pathogenicity islands of virulent bacteria: structure, function and impact on microbial evolution.” *Mol Microbiol Rev* [Internet]. 1997 [citado 28 marzo 2017]; 23(1089-1094): 1365-2958.
- [4] Payne S.M, Mey Ar, Wyckoff EE. “Vibrio iron transport: evolutionary adaptation to life in multiple environments.” *Microbiol Mol Biol.* [Internet]. 2015 [citado 20 Abr 2017]; 80: 69-84.
- [5] Pierce BA. “Genética: Un enfoque conceptual.” [Internet]. 3º ed. Editorial Médica Panamericana; 2009 [citado 10 abril 2015].
- [6] González-Pedrajo B, Dreyfus G. “Sistemas de secreción de proteínas en las bacterias Gram negativas: Biogénesis flagelar y translocación de factores de virulencia.” [Internet]. 2003 [citado 15 abril 2017]; 1-19.
- [7] Hueck CJ. “Type III Protein Secretion Systems in Bacterial Pathogens of Animals and Plants.” *Microbiol Mol Biol* [Internet]. 1998 [15 junio]; 2; 381-398.
- [8] Murray RP, Rosenthal SK, Pfaller MA. *Microbiología Médica.* [Internet]. 8 ed. Elsevier: 2016 [consultado 16 junio 2017].
- [9] Borbolla-Sala ME, Vidal-Pérez MR, Piña-Gutiérrez OE, Ramírez-Messner I, Vidal-Vidal JJ. “Contaminación de los alimentos por *Vibrio cholerae*, coliformes fecales, Salmonella, hongos, levaduras y Sthaphylococcus aureus en Tabasco durante 2003.” *Salud en Tabasco* [Internet]. 2004 [consultado 20 junio 2017]; 10: 1-13.
- [10] Özel M, Holland G, Gelderbrom HR. “Vibrio cholerae, Microscopía electrónica de barrido. Microscopía electrónica de transmisión, contraste negativo.” *Robert Koch Institut* [Internet]. 2014.

- [11] Hueck CJ. "Type III Protein Secretion Systems in Bacterial Pathogens of animals and plants." *Microbiol Mol Biol Rev* [Internet]. 1998 [consultado 25 junio 2017]; 62 (381-423).
- [12] Michiels T, Cornelis GR. "Secretion of Hybrid Proteins by the *Yersinia* Yop Export System." *Journal of Bacteriology* [Internet]. 1991 [consultado 28 junio 2017]; 173 (1677-1685). Disponible en:
- [13] Cornelis GR, Boland A, Boyd AP, Geuijen C, Iriarte M, Neyt C et al. "The Virulence Plasmid of *Yersinia*, an Antihost Genome." *Microbiol Mol Biol Rev* [Internet]. 1998 [consultado 29 junio 2017]; 62 (1315-1352).
- [14] Minamino T, Macnab RM. "Components of the *Salmonella* Flagellar Export Apparatus and Classification of Export Substrates." *Journal of Bacteriology* [Internet]. 1999 [consultado 1 julio 2017]; 181 (1388-1394).
- [15] Castillo MC. "Asociaciones simbióticas, patogenicidad y virulencia." *SlideServe* [Internet]. 2014 [consultado 15 julio 2017]; (34) (1-50).
- [16] Lostroh CP, Lee CA. "The *Salmonella* pathogenicity island-1 type III secretion system." *Microbes and Infection* [Internet]. 2001 (1281-1291).