



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

ESCUELA NACIONAL DE ESTUDIOS SUPERIORES
UNIDAD LEÓN

TEMA:

"Diseño y desarrollo de una vacuna recombinante multiepitópica basada en las toxinas TDH, TRH y TLH de *Vibrio parahaemolyticus* para su expresión en plantas y microalgas"

MODALIDAD DE TITULACIÓN:

Tesis y examen profesional

PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

Licenciado en Ciencias Agrogenómicas

P R E S E N T A:

Arturo Ricardo Villegas Zagal

TUTORA EXTERNA:

Dra. Elizabeth Monreal Escalante

TUTORA INTERNA:

Dra. Harumi Shimada Beltrán

León, Guanajuato

2023



ENES UNAM
UNIDAD LEÓN



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

ESCUELA NACIONAL DE ESTUDIOS SUPERIORES
UNIDAD LEÓN

TEMA:

"Diseño y desarrollo de una vacuna
recombinante multiepitópica basada
en las toxinas TDH, TRH y TLH de
Vibrio parahaemolyticus para su
expresión en plantas y microalgas"

MODALIDAD DE TITULACIÓN:

Tesis y examen profesional

PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

Licenciado en Ciencias Agrogenómicas

P R E S E N T A:

Arturo Ricardo Villegas Zagal

TUTORA EXTERNA:

Dra. Elizabeth Monreal Escalante

TUTORA INTERNA:

Dra. Harumi Shimada Beltrán



ENES UNAM
UNIDAD LEÓN

León, Guanajuato

2023

AGRADECIMIENTOS INSTITUCIONALES

De primera mano quiero agradecer a la UNAM, mi *alma mater* desde la noción de mi consciencia, desde la preparatoria me acogió en sus brazos y me formó un sentido de unidad.

A la ENES León, por mi gran exposición y acercamiento al mundo fuera del que vivía.

A todo Ciencias Agrogenómicas, porque gracias a todos los profesores comprendí un poco más del mundo de la biología, la genética y las plantas.

Al Centro de Investigación CIBNOR, por la enorme oportunidad de conocer y trabajar en un proyecto de mi interés gracias a las facilidades otorgadas y en las mejores instalaciones.

Al Grupo de Investigación GIV, por el gran acogimiento de cada persona que me acompañó, por la pasión por la ciencia y las grandes instalaciones. Me alegra bastante coincidir con cada persona.

A la Dra. Elizabeth Monreal Escalante, por mi aceptación en el proyecto, por la guía en cada parte que se me dificultaba, por el acompañamiento en los experimentos, por las pequeñas pláticas y consejos brindados, por el profesionalismo en laboratorio que me enseñó en todo este viaje.

A la Dra. Harumi Shimada Beltrán, por la mentoría en mi camino educativo y profesional.

Al Dr. Manojkumar Arthikala, que me mostró el tema de mi interés al cual me quiero dedicar y por la gran calidez y los grandes consejos de vida que sigo practicando hoy en día.

Al Mtro. Paul Castro Cosio, que fue mi acompañante de laboratorio y me orientó con gran confianza en cada experimento.

Al Dr. Carlos Eliud Angulo Valadez, por mostrarme el gran liderazgo y temple encabezando el GIV siempre con humanidad.

A mis amistades del GIV: Eduardo, Amy, Alejandra, Isaac, Fernanda, Marcio y la Dra. Miriam que, con ustedes, mi estancia en La Paz fue una etapa tan excepcional.

AGRADECIMIENTOS PERSONALES

Quiero tomarme el espacio para agradecer todo el tiempo que involucró mi vida universitaria, porque los momentos y personas comparten este logro personal y profesional.

Primero que nada, agradezco a mi familia, desde mi tía Graciela dándome la mano y herramientas para estudiar una carrera científica, mi tío Benjamín que descanse en paz y donde me vi reflejado en él al salir de mi núcleo familiar a buscar mejores oportunidades. A mis tíxs y primxs, con quienes compartí tiempo y apoyo.

A mi mamá Minerva y a mi papá Víctor, que me han mostrado la relatividad de la vida, que la actitud ante las situaciones define el rumbo, que se aprende de lo que tenemos, de lo que nos falta y que no todo es absoluto.

A mi hermana Ana, que inconscientemente es mi principal pilar familiar y de referencia profesional.

Sin conocer nada de la vida me aventé al mundo científico y aunque he tenido dudas, es humano cuestionarse. Porque el dominio de un tema lo hace la práctica, la constancia y todas las dudas que me inspiran a querer conocer más. A pesar de los obstáculos que he enfrentado, sean psicológicos, de mi tipo de aprendizaje o de cualquier tipo, he seguido avanzando y tratando de dar lo mejor que puedo.

Agradezco cada año desde el 2018, las experiencias foráneas, las fiestas y convivencias, los experimentos realizados, los temas aprendidos, los momentos de concentración y aprendizaje, a mis compañerxs de carrera con quienes compartí tiempo en un momento cercano y a todas mis amistades dentro y fuera de la universidad que se han ido, que han venido o se han quedado.

Me agradezco a mí mismo, al yo de unos cuantos años, al yo de León, al yo de CDMX o al yo de La Paz porque a veces no acepto reconocerme un logro por tomarlo como un *es lo que tenía que hacer*.

Agradezco nuevamente a la Dra. Elizabeth, por tener fe en mí cuando yo mismo me tambaleaba, por la libertad y paciencia en todo el proyecto con valores propios de una gran investigadora.

Todas esas personas tienen nombres y mientras yo los recuerde, viven en mí. A Mafer porque somos tan iguales, a Ceci por lo que vivimos y cómo nos entendemos, a Paola por la amistad remota y por el apoyo donde más lo necesitaba, a Alice por la alegría, apoyo y amor de siempre, a Bernardo por el largo tiempo que nos conocemos, a Aarón por el gran *openmind* que tuve gracias a ti y por los momentos en pandemia, a Blanca que nunca nos hemos soltado desde primero de prepa, a Mildred porque fuimos señoras foráneas, a Emiliano por los momentos que más necesitaba despejarme, a Fernanda, Diana y Mireya que recuerdo con tanto cariño siendo familia foránea, a Diego bestia por la gran conexión, a Eduardo y a Amy por la amistad que aprecio, a Mauricio que aunque tomaste otro rumbo la amistad se conserva, a Mauro con quien he ido formando una gran amistad, a Rubén por la otra visión y por las pláticas, a Yamileth que quiero mucho y a mi ex por el corazón roto. A todxs y a quienes no mencioné. Y quiero agradecer a los perritxs Crispr, Darla, Akia descanse en paz, Tachi y Yiyis que, en algún momento me acompañaron escribiendo un trabajo, me despejaban la mente y me alegraban el corazón.

DEDICATORIA

*A la vida y al tiempo,
que me ayudan a comprender más...*

ABREVIATURAS

APC	Células Presentadoras de Antígenos
DNA	Ácido Desoxirribonucleico
HLA	Sistema de Antígenos Leucocitarios Humanos
Ig	Inmunoglobulinas
LB	Linfocitos B
LT	Linfocitos T
MHC	Complejo Mayor de Histocompatibilidad
PCR	Reacción en Cadena de la Polimerasa
TDH	Hemolisina Termoestable Directa
TLH	Hemolisina Termolábil
TRH	Hemolisina Relacionada a TDH
GRAS	Generalmente Reconocidas Como Seguras

RESUMEN

El desarrollo de vacunas durante los últimos años ha tenido grandes avances gracias al progreso de nuevas plataformas de expresión y al uso de herramientas inmunoinformáticas que a través del análisis *in silico* de vacunas de subunidades o multiepitópicas ha permitido mejorar su producción y generar una mejor respuesta inmune. Por otro lado, *Vibrio parahaemolyticus* es una bacteria zoonótica que se transmite principalmente por el consumo de alimentos marinos contaminados, y ha ocasionado serios problemas de salud por lo que el objetivo del presente trabajo fue diseñar una vacuna *in silico* contra *V. parahaemolyticus* que pueda expresarse en plataformas de expresión como en plantas o microalgas.

En este trabajo se realizó un análisis *in silico* de las secuencias de las proteínas Hemolisina Termoestable Directa, Hemolisina Relacionada a TDH y Hemolisina Termolábil (TDH, TRH y TLH, por sus siglas en inglés) consideradas los principales factores de patogenicidad de *V. parahaemolyticus*; resultando en 2 epítomos de cada proteína reconocidos por linfocitos B y linfocitos T respectivamente. Los 6 epítomos obtenidos fueron analizados mediante programas de afinidad, antigenicidad y promiscuidad, además de la evaluación de las propiedades fisicoquímicas *in silico* de la vacuna generada.

Posteriormente se generó la construcción denominada *VP_ridx* con accesorios indispensables para su adecuada expresión en los vectores *pBI121* y *pALGEVIR*, se diseñaron primers específicos para la identificación del gen a nivel experimental. Finalmente, se logró generar las construcciones *pBI121 + VP_ridx* y *pALGEVIR + VP_ridx* en células de *Agrobacterium tumefaciens* que permitirán la transformación y expresión de la vacuna en plantas y microalgas, respectivamente.

Palabras clave: biopharming, diseño de vacunas, multiepitópica, *in silico*, *Vibrio parahaemolyticus*.

ÍNDICE

INTRODUCCIÓN.....	11
PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....	14
JUSTIFICACIÓN.....	15
HIPÓTESIS	15
OBJETIVOS.....	16
OBJETIVO GENERAL	16
OBJETIVOS ESPECÍFICOS	16
MARCO TEÓRICO	17
BIOLOGÍA DEL GÉNERO <i>Vibrio spp.</i>	17
VIBRIOSIS POR <i>Vibrio parahaemolyticus</i>	18
DISTRIBUCIÓN E IMPORTANCIA EN HUMANOS.....	18
ENFERMEDAD	20
FACTORES DE VIRULENCIA	21
RUMBO AL DESARROLLO DE UNA VACUNA CONTRA <i>Vibrio parahaemolyticus</i>	23
CANDIDATOS VACUNALES	23
NUEVAS PLATAFORMAS PARA LA PRODUCCIÓN DE VACUNAS	26
METODOLOGÍA	28
ANÁLISIS BIOINFORMÁTICO DE LAS SECUENCIAS DE INTERÉS	28
SELECCIÓN DE EPITOPOS PARA LINFOCITOS B	28
SELECCIÓN DE EPITOPOS PARA LINFOCITOS T	28
SELECCIÓN DE LINKER.....	29
DISEÑO DE LA QUIMERA <i>VP_ridx</i>	29
CARACTERIZACIÓN DEL GEN SINTÉTICO <i>VP_ridx</i>	29
CONSTRUCCIÓN GENÉTICA	30
CLONACIÓN DEL GEN <i>VP_ridx</i> en los vectores <i>pBI121</i> y <i>pALGEVIR</i>	30
PURIFICACIÓN DE DNA EN GELES DE AGAROSA.....	30
REACCIÓN DE LIGACIÓN CON T ₄ DNA LIGASA.....	30
TRANSFORMACIÓN DE <i>E. coli</i> TOP10 POR CHOQUE TÉRMICO	30
EXTRACCIÓN DE DNA PLASMÍDICO MEDIANTE MÉTODO DE LISIS ALCALINA.....	31
TRANSFORMACIÓN DE <i>A. tumefaciens</i> GV3101 MEDIANTE MÉTODO DE ELECTROPORACIÓN	31

REACCIÓN EN CADENA DE POLIMERASA (PCR) POR PUNTO FINAL	32
DISEÑO DE PRIMERS	32
PCR PUNTO FINAL	32
RESULTADOS.....	34
SELECCIÓN DE EPÍTOPOS	34
CARACTERIZACIÓN DE LA QUIMERA <i>VP_ridx</i>	37
PERFILES DE DIGESTIÓN ENZIMÁTICA	39
DETECCIÓN DEL GEN <i>VP_ridx</i> A TRAVÉS DE PCR	41
DISCUSIÓN.....	43
PREDICCIÓN <i>in silico</i> DE EPÍTOPOS A LINFOCITOS B Y LINFOCITOS T.....	43
DISEÑO Y CARACTERIZACIÓN <i>in silico</i> DE LA QUIMERA <i>VP_ridx</i>	45
OBTENCIÓN DE LAS CONSTRUCCIONES GENÉTICAS	46
CONCLUSIONES.....	48
BIBLIOGRAFÍA.....	49

ÍNDICE DE TABLAS

TABLA 1. Antígenos candidatos como vacunas contra <i>V. parahaemolyticus</i>	25
TABLA 2. Características de los primers diseñados para la amplificación por PCR punto final del gen <i>VP_ridx</i>	33
TABLA 3. Condiciones de PCR punto final para la detección del gen <i>VP_ridx</i>	33
TABLA 4. Epítomos dirigidos a linfocitos B.	34
TABLA 5. Epítomos de TDH dirigidos a linfocitos T.	35
TABLA 6. Epítomos de TRH dirigidos a linfocitos T.	36
TABLA 7. Epítomos de TLH dirigidos a linfocitos T.	36

ÍNDICE DE FIGURAS

FIGURA 1. Distribución geográfica de los distintos serotipos de <i>Vibrio parahaemolyticus</i> en México.	20
FIGURA 2. Caracterización <i>in silico</i> de la quimera <i>VP_ridx</i>	37
FIGURA 3. Validación de estructura antes (A) y después (B) del refinamiento de la estructura terciaria.	38
FIGURA 4. Diseño final de la secuencia <i>VP_ridx</i>	38
FIGURA 5. Perfil de restricción del vector <i>pBI121</i>	40
FIGURA 6. Perfil de restricción del vector <i>pALGEVIR</i>	40
FIGURA 7. Perfil de restricción del gen <i>VP_ridx</i> en <i>pUC57</i>	40
FIGURA 8. Producto de PCR de punto final en clonas de <i>E. coli</i> TOP10.	41
FIGURA 9. Producto de PCR de punto final en clonas de <i>A. tumefaciens</i> GV3101.	41
FIGURA 10. Confirmación mediante secuenciación del producto de PCR de <i>VP_ridx</i> de DNA extraído de cultivos de <i>E. coli</i> TOP10.	42

INTRODUCCIÓN

El consumo de alimentos contaminados representó el 76% de las enfermedades bacterianas alrededor del mundo de 1973 al 2006 (Elbashir et al., 2018; Tauxe, 2002). Además, se ha incrementado el consumo de alimentos marinos ya que son más prácticos para la preparación de comidas y presentan nutrientes (ácidos grasos, Omega-3, vitamina D, etc.) con grandes beneficios para la salud (neuronales, cardiovasculares, etc.) (Ali et al., 2020; Elbashir et al., 2018). Sin embargo, los alimentos marinos pueden estar contaminados por gran variedad de bacterias, entre las que destacan especies que pertenecen a los géneros *Shigella spp.*, *Salmonella spp.* y *Vibrio spp.* (Letchumanan et al., 2019).

Las infecciones por *Vibrio* han sido más frecuentes en los últimos años en comparación con otros géneros (Baker-Austin et al., 2017), y además de la infección de heridas y septicemia primaria, causan principalmente la enfermedad de la vibriosis, la cual se caracteriza por una gastroenteritis aguda con vómito, diarrea y consecuentemente deshidratación y acidosis (Souza Valente & Wan, 2021). Se conocen más de 142 especies de *Vibrio spp.*, de las cuales 15 causan enfermedad a los humanos (Letchumanan et al., 2019) y las más importantes son *Vibrio cholerae*, *Vibrio vulnificus*, y *Vibrio parahaemolyticus* (Elbashir et al., 2018; Letchumanan et al., 2019). Estas bacterias se encuentran distribuidas ampliamente en ambientes húmedos, marinos y estuarinos, donde crecen en sedimentos y distintos tipos de plancton e infectan una gran variedad de peces, crustáceos y mariscos que han funcionado como vectores de la enfermedad a través de su consumo (Ali et al., 2020). Además, son consideradas un problema en el sector acuícola y de importancia en la salud humana ya que son bacterias que derivan en zoonosis (que pueden infectar a humanos), por lo tanto, si no se llevan las medidas de higiene correctas, desde el cultivo hasta la preparación de alimentos, podrían derivar en posibles brotes epidémicos.

V. parahaemolyticus es uno de los principales causantes de enfermedades por consumo de alimentos marinos a nivel mundial (Nelapati et al., 2012). Desde el primer caso en Osaka Japón en 1951 (Letchumanan et al., 2019), se han registrado casos alrededor del mundo, principalmente en países asiáticos y zonas tropicales o con temperaturas promedio mayores a 25°C; asimismo se ha registrado un aumento de incidencia en los meses cálidos de verano donde se presentan mayores temperaturas (Nelapati et al., 2012).

En México se han registrado pequeños brotes desde principios del 2004, por lo cual no se le considera de importancia médica a diferencia de *V. cholerae*. Sin embargo, ha afectado estados costeros del océano Pacífico y del golfo de México como Baja California Sur, Sinaloa, Guerrero, Tamaulipas, Veracruz y Yucatán, así como estados sin costa como Ciudad de México y Puebla, siendo el consumo de ostras, ceviche y camarón los vectores de la enfermedad (Franco-Monsreal & Flores-Abuxapqui, 1989; López-Hernández et al., 2014).

Desde 1996, el Centro para el Control y Prevención de Enfermedades (CDC, por sus siglas en inglés) ha registrado los casos por infección de cada especie de *Vibrio spp.* incluyendo *V. parahaemolyticus*. Se ha visto un incremento de las infecciones con un 28% de los pacientes hospitalizados y con tendencia de más casos en los meses más cálidos. En los últimos 10 años, *V. parahaemolyticus* es el responsable con un 44% de enfermedades por *Vibrio spp.* (Centers for

Disease Control and Prevention, 2021). A falta de un marco de vigilancia mundial, Estados Unidos ha empleado el Servicio de Información sobre el Cólera y Otros Vibrios (COVIS, por sus siglas en inglés) de los CDC que ha reportado la presencia en más de 50 estados de Estados Unidos desde 2007 (Baker-Austin et al., 2018).

V. parahaemolyticus es una bacteria Gram negativa, crece en condiciones un poco más salinas de 3.6 a 8%, pH óptimo entre 7.5 a 8.6 y una temperatura óptima de 35 a 37°C (Zamora-Pantoja et al., 2005). Existen diferentes serotipos basados en los 12 antígenos somáticos (O), 76 antígenos capsulares (K) (Drake et al., 2007; Letchumanan et al., 2019; Nelapati et al., 2012; Praja & Safnurbaiti, 2018).

Existen diversos serotipos basados en los antígenos somáticos y capsulares con gran potencial patogénico como O4:K12, O4:K68, O3:K64 y O1:K no detectable (Heitmann et al., 2005; Wang et al., 2015) siendo el serotipo más común el O3:K6, el cual ha sido registrado inusualmente en países europeos y está siendo más habitual en países cálidos o que consumen más alimentos marinos (Nelapati et al., 2012; Praja & Safnurbaiti, 2018; Su & Liu, 2007). Este serotipo presenta características más patogénicas gracias a la presencia de diversos factores como las proteínas Hemolisina Termoestable Directa y Hemolisina Relacionada (TDH y TRH, respectivamente por sus siglas en inglés) (Drake et al., 2007; Su & Liu, 2007). Las proteínas TDH y TRH son los principales factores de virulencia ya que causan la ruptura de eritrocitos mediante la creación de poros y afectando las células hospederas mediante la alteración de flujos iónicos, mientras que la proteína TLH tiene un papel importante para la identificación ya que se encuentra en todas las especies y se cree que juega un papel en el mecanismo de patogenicidad (Drake et al., 2007; Wang et al., 2015).

Hasta el momento, los tratamientos disponibles para los casos de gastroenteritis causados *V. parahaemolyticus* en humanos están basados en el uso de antibióticos como ciprofloxacinos, tetraciclinas y cefalosporinas, no obstante, los antibióticos dejan de ser la opción viable gracias al mal uso o automedicación que favorece los mecanismos de resistencia antibiótica (Elbashir et al., 2018; Praja & Safnurbaiti, 2018; Souza Valente & Wan, 2021). Ante la variedad de hospederos y las fallas en tratamientos y manejos contra esta enfermedad, las herramientas inmunoinformáticas y moleculares en vacunas garantizaría no sólo una protección inmunológica, sino también un mejor control de la enfermedad a nivel mundial.

En este sentido, el biopharming es el enfoque de desarrollo de vacunas recombinantes que busca nuevas plataformas de producción accesibles, de bajo costo y de fácil escalamiento como en plantas y microalgas que demuestran ventajas moleculares y productivas.

Las microalgas, en especial el género *Schizochytrium sp.*, se encuentran ampliamente distribuidas en distintos ambientes acuáticos y aunque han sido utilizadas para la producción de lípidos funcionales, también se ha visto su promisorio ventaja en la producción de biofármacos recombinantes ya que realizan las modificaciones postraduccionales similares a las realizadas en líneas celulares de mamíferos y su capacidad de aceptar material exógeno de manera estable o transitoria (Bayne et al., 2013; Rosales-Mendoza et al., 2020).

De igual forma, las plantas como *Daucus carota* o *Nicotiana tabacum* han sido ampliamente utilizadas para la expresión de candidatos vacunales contra enfermedades infecciosas como

hepatitis B, virus de la inmunodeficiencia humana (VIH), virus del SARS-CoV, entre otros que presentan ciertas ventajas como la estabilidad genética, son inocuas para el humano, además de su fácil escalamiento y rápidos tiempos de producción (Hager et al., 2022; Rosales-Mendoza & Tello-Olea, 2015; Tremblay et al., 2010).

A pesar de que se ha desarrollado investigación en torno a la evaluación de candidatos vacunales contra especies de *Vibrio spp.*, hasta el momento no existe ninguna vacuna comercial contra *V. parahaemolyticus*. Por lo anterior se ha explorado la posibilidad de producir una vacuna recombinante evaluando la proteína PirA (ToxA) de *V. parahaemolyticus* en plantas de *Nicotiana tabacum* y se ha evaluado su capacidad inmunogénica en modelos animales (Monreal-Escalante et al., 2019). A pesar de haber demostrado resultados promisorios, es necesario evaluar nuevos antígenos que puedan potenciar la respuesta inmune contra *V. parahaemolyticus*, por consiguiente, en este trabajo se propone diseñar y desarrollar una vacuna recombinante *in silico* basada en las toxinas TDH, TRH y TLH de *V. parahaemolyticus* que pueda ser producida en plantas y microalgas.

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Desde la primera identificación de *Vibrio parahaemolyticus* en Japón en 1950 y su posterior diseminación por todo el mundo, se puede catalogar a esta bacteria como un patógeno silenciosamente alarmante gracias a la facilidad de transmitirse por alimentos y agua (Baker-Austin et al., 2017; Zamora-Pantoja et al., 2005). La persistencia de *V. parahaemolyticus* se debe a múltiples fallas en la salubridad y a la mala eliminación desde el cultivo acuícola en tanques, inocuidad del agua, almacenamiento y el consumo de mariscos poco cocidos o crudos hasta la creciente incidencia en ambientes húmedos o marinos naturales (Letchumanan et al., 2019; Zamora-Pantoja et al., 2005). En humanos, el tratamiento de la infección consiste en el uso de antibióticos que, al tener un mal empleo tanto en humanos infectados como en los sistemas de producción acuícola, ha propiciado el surgimiento de cepas multirresistentes (Ji et al., 2020; Souza Valente & Wan, 2021).

La vacunación juega un papel muy importante para prevenir futuras infecciones de vibrios. Actualmente existen vacunas para humanos licenciadas, por ejemplo, contra *V. cholerae* que se basan bajo células inactivadas o células atenuadas, necesitan condiciones específicas de almacenamiento y distribución, además de que dificultan su administración y necesitan personal o material especial (Ada, 2005; Czerkinsky & Holmgren, 2015).

Ante estos retos, el biopharming genera ventajas de exhibe ventajas de producción y administración hasta ventajas en la eficacia, seguridad y manejo de nuevas propuestas vacunales. Lo anterior mencionado se logra al uso de herramientas inmunoinformáticas y de análisis *in silico* que facilitan el desarrollo para formular vacunas de subunidades eficaces, con base en la identificación de epítomos inmunodominantes de los factores de virulencia que pueden generar una adecuada respuesta inmune a largo plazo de manera segura. Hasta el momento no existe una vacuna disponible contra *V. parahaemolyticus* y los candidatos explorados han demostrado buenos resultados, sin embargo, es necesario evaluar nuevos prototipos que puedan ser producidos en plataformas de bajo costo y que puedan aumentar el rendimiento, niveles de expresión y una respuesta inmune adecuada (Merlin et al., 2017; Yan et al., 2016).

JUSTIFICACIÓN

Vibrio parahaemolyticus ha demostrado ser una bacteria que se puede conservar a lo largo del sector acuícola hasta la preparación de alimentos ya puede estar presente desde el agua contaminada, consumo o contacto con alimentos contaminados y mediante contaminación cruzada que se ha extendido a lo largo del mundo (Franco-Monsreal & Flores-Abuxapqui, 1989; Zamora-Pantoja et al., 2005). Por el riesgo sanitario que conlleva, y además de que no existe un tratamiento protector para su infección, es importante la formulación de una vacuna eficaz, segura y fácil de administrar que induzca una respuesta inmune en los humanos para evitar brotes epidémicos. Las proteínas TDH y TRH juegan un papel importante en la patogénesis de la infección por *Vibrio parahaemolyticus* (Raghunath, 2014) y TLH ha servido como identificador de la especie tanto en cepas clínicas como ambientales, además de que se considera que tiene un papel importante en la patogénesis en ausencia de las proteínas TDH y TRH (Drake et al., 2007; Praja & Safnurbaiti, 2018).

Por lo anterior, la exploración mediante análisis inmunoinformáticos de zonas antigénicas conservadas (epítomos) de estas proteínas, podría permitir el desarrollo *in silico* de una vacuna multiepitópica contra *V. parahaemolyticus*, la cual sería expresada en vectores de transformación que permitirían la producción eficiente en plataformas viables de bajo costo como plantas y/o microalgas, con la finalidad de formular una vacuna oral con rendimientos de producción de interés comercial y que genere una respuesta inmune humoral y celular óptima.

HIPÓTESIS

Si los vectores de expresión *pBI121* y *pALGEVIR* han demostrado ser herramientas útiles para la expresión de antígenos recombinantes, entonces el gen *VP_ridx* se expresará eficazmente en los vectores *pBI121* y *pALGEVIR* en células de *Agrobacterium tumefaciens* para su posterior producción en plantas y microalgas.

OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL

Desarrollar, a través de estrategias de ingeniería genética, una vacuna multiepitópica basada en las proteínas TDH, TRH y TLH de *Vibrio parahaemolyticus* usando los vectores *pALGEVIR* y *pBI121* para su posterior transformación *Agrobacterium tumefaciens* en plantas y la microalga *Schizochytrium sp.*

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Diseñar y caracterizar *in silico* una quimera de epítomos basada en las proteínas TDH, TRH y TLH a través de herramientas inmunoinformáticas.
2. Diseñar, a través de herramientas bioinformáticas, primers específicos para el análisis e identificación de la quimera generada.
3. Clonar los genes en los vectores *pALGEVIR* y *pBI121*.
4. Transformar genéticamente las cepas TOP10 de *Escherichia coli* y GV3101 de *Agrobacterium tumefaciens* con la construcción (*VP_ridx*).

MARCO TEÓRICO

BIOLOGÍA DEL GÉNERO *Vibrio* spp.

El género *Vibrio* pertenece a la familia *Vibrionaceae* que incluye a géneros como *Aeromonas* spp., *Plesiomonas* spp. y *Photobacterium* spp., dentro de *Vibrio* spp. se encuentran más 142 especies de las cuales 15 son patógenas para el humano (Letchumanan et al., 2019) tales como: *Vibrio cholerae*, *Vibrio alginolyticus*, *Vibrio vulnificus*, *Vibrio parahaemolyticus*, entre otras (Drake et al., 2007; Heitmann et al., 2005; Souza Valente & Wan, 2021).

Las bacterias del género *Vibrio* spp. son Gram negativas, aerobios o anaerobios facultativos que en su mayoría poseen un único flagelo polar (Souza Valente & Wan, 2021). Tienen una forma de “coma” o rectangular ligeramente curvada con un tamaño de 1.4 a 2.6 μm de longitud y 0.5 a 0.8 μm de diámetro con una reproducción que se da cada 10 a 12 minutos (Drake et al., 2007; Zamora-Pantoja et al., 2005). Sus genomas están divididos en dos cromosomas, el primero tiene un tamaño aproximado de 3 Mb que codifica a proteínas esenciales mientras que el segundo tiene un tamaño variable entre especies y codifica a proteínas accesorias donde ambos cromosomas están expuestos a frecuentes recombinaciones y transferencia horizontal de genes (Baker-Austin et al., 2018).

La mayoría de los vibrios crecen en condiciones variables de pH entre 7 a 8.6, temperaturas entre 20°C a 37°C y en ambientes acuosos o condiciones húmedas ya sea halófilos o no halófilos dependiendo de las concentraciones y características específicas para el crecimiento óptimo de cada especie (Belkin & Colwell, 2005; Souza Valente & Wan, 2021). El crecimiento en ambientes acuosos de estas bacterias comprende aguas estuarinas o marinas donde se encuentran en mayor desarrollo en meses cálidos cuando la temperatura de las aguas aumenta y a la vez, se presenta un aumento en la incidencia de la enfermedad por vibriosis (Letchumanan et al., 2019; Su & Liu, 2007; Zamora-Pantoja et al., 2005).

Se han encontrado distintas especies de vibrios en sedimentos marinos, zooplancton, en simbiosis con copépodos, conservados en excrementos de aves marinas (como patos, pelicanos y gaviotas) y conservados a lo largo de las cadenas de producción alimentarias mediante la contaminación cruzada, en presencia de biopelículas en criaderos acuícolas y en el consumo de los primeros hospederos (vectores) como bivalvos, crustáceos, peces y mariscos que conforman parte de la alimentación humana donde las especies patógenas tienen la capacidad zoonótica de infectar tanto a los vectores como a los humanos (Belkin & Colwell, 2005; Drake et al., 2007).

Agregado a esto, varias especies de *Vibrio* spp. afectan la producción en criaderos acuícolas que representan un foco de infección por zoonosis (Belkin & Colwell, 2005; Souza Valente & Wan, 2021). La erradicación en el sector acuícola ha fallado debido a los manejos de las condiciones del criadero (como el uso de antibióticos) y a los mecanismos naturales de los propios vibrios. El problema en el uso de antibióticos es de gran concierne por la multiresistencia antibiótica desarrollada por las cepas resistentes, debido a esto se han explorado nuevas estrategias con prebióticos, probióticos, bacteriófagos y vacunas que puedan inhibir y/o erradicar vibrios (Ji et al., 2020).

VIBRIOSIS POR *Vibrio parahaemolyticus*

V. parahaemolyticus es uno de los principales patógenos que se encuentran en alimentos marinos y de esta forma aumentan los cuadros clínicos de gastroenteritis por vibriosis en los meses con temperaturas cálidas (Ji et al., 2020). Entre los alimentos con mayor reporte se encuentran las ostras y camarones, aunque se han encontrado también en cangrejos, almejas, ostiones, calamares, sardinas, langostas y pulpo (Letchumanan et al., 2019; Nelapati et al., 2012; Su & Liu, 2007; Zamora-Pantoja et al., 2005).

V. parahaemolyticus infecta estos alimentos (vectores), mediante la adherencia a sus superficies y la infiltración en mucosas (Ji et al., 2020). Así, daña los tejidos exteriores e interiores (como los tejidos digestivos) (Souza Valente & Wan, 2021) ya que absorbe los nutrientes disponibles causando letargo, ennegrecimiento de órganos, ablandamiento de caparazones, órganos atrofiados, etc. (Nelapati et al., 2012; Praja & Safnurbaiti, 2018; Zamora-Pantoja et al., 2005). Tan solo en camarones es la principal causa de la Enfermedad de Necrosis Hepatopancreática Aguda (AHPND, por sus siglas en inglés) y en otras especies marinas ocasiona varias enfermedades generando graves pérdidas económicas para la industria acuícola cerca del 40% (Praja & Safnurbaiti, 2018).

DISTRIBUCIÓN E IMPORTANCIA EN HUMANOS

V. parahaemolyticus se reportó por primera vez en Osaka, Japón en el año de 1951 debido a la presencia de diversos casos de gastroenteritis causada por alimentos y desde entonces han surgido distintos brotes colocándolo como la causa más común de enfermedad por consumo de alimentos marinos en dicho país. (Letchumanan et al., 2019; Nelapati et al., 2012). En el continente asiático predomina su incidencia en países como Japón, China, Indonesia, Bangladesh, Taiwán e India (Belkin & Colwell, 2005; Letchumanan et al., 2019; Nelapati et al., 2012; Su & Liu, 2007). Aunque prevalece en dichos países y otros con climas cálidos, se ha distribuido poco a poco alrededor del mundo en países desarrollados y en vías de desarrollo (Baker-Austin et al., 2018; Letchumanan et al., 2019).

Esta bacteria ha sido identificada de manera poco común en países europeos como Inglaterra, España, Francia, Italia y Grecia, debido a los cambios de las condiciones climáticas que favorecen su desarrollo (Belkin & Colwell, 2005; Franco-Monsreal & Flores-Abuxapqui, 1989; Letchumanan et al., 2019; Nelapati et al., 2012; Su & Liu, 2007). En el continente americano se ha reportado en Canadá, Panamá, Estados Unidos y Chile como causa de gastroenteritis (Franco-Monsreal & Flores-Abuxapqui, 1989; Heitmann et al., 2005; Letchumanan et al., 2019; Nelapati et al., 2012; Su & Liu, 2007).

En México se han reportado múltiples casos de gastroenteritis por vibriosis diagnosticada mediante examen visual y descripción de síntomas, sin embargo, la mayoría de los casos no procede a una confirmación de la especie por laboratorio y sólo existen pequeñas pautas en métodos epidemiológicos como la NOM-017-SSA2-201 para la Vigilancia Epidemiológica (Secretaría de Salud, 2013) y el Manual de Procedimientos Normalizados para la Vigilancia Epidemiológica de las Enfermedades Diarreicas Agudas emitido por la Dirección General de Epidemiología (León-Sicairos et al., 2022) que podrían servir para analizar el aumento de las cepas patógenas de *V.*

parahaemolyticus y otros vibrios en México y Estados Unidos en un 52% a comparación de otras enfermedades bacterianas (Hernández-Díaz et al., 2015).

Aunque hay casos desde 1989 en la costa oeste de México (Abbott et al., 1989), los brotes de *V. parahaemolyticus* más relevantes han sido en Sinaloa y en Veracruz en el año de 2004 con la presencia de distintos tipos de serotipos en muestras de alimentos marinos y de agua (Cabanillas-Beltrán et al., 2006; Cabrera-García et al., 2004). Actualmente, se ha reportado la presencia de *V. parahaemolyticus* en 22 estados mexicanos, (Figura 1) el 36.8% de los casos son estados del norte del pacífico, 16.6% del centro del golfo y 15.3% del norte del golfo donde los cinco estados con más casos han sido Campeche con el 13.8%, Tamaulipas con el 11.1%, CDMX con el 10.4%, Sonora con el 6.9% y Sinaloa con el 7.6% de los casos a nivel nacional (León-Sicairos et al., 2022).

Hasta el momento, no existe un registro exacto de infecciones por especies de *Vibrio spp.* debido a la poca importancia de los sistemas epidemiológicos (Baker-Austin et al., 2017) sin embargo, se ha visto que *V. parahaemolyticus* es un patógeno con potencial pandémico, en especial el serotipo O3:K6 (Ghenem et al., 2017). La incidencia del incremento de las infecciones se debe gracias al cambio climático que afecta el aumento de las temperaturas marinas propiciando ambientes ideales para su crecimiento y desarrollo de nuevas cepas zoonóticas (Letchumanan et al., 2019; Su & Liu, 2007).

En Asia, *V. parahaemolyticus* abarca el 25% de los casos clínicos respecto a otros vibrios (Praja & Safnurbaiti, 2018) y propicia una bioacumulación de sustancias tóxicas (López-Hernández et al., 2014) que sin las medidas de higiene adecuadas desde la producción hasta la preparación de alimentos representan focos de infección (Elbashir et al., 2018). Por lo tanto, se estima el crecimiento de las infecciones por vibrios en zonas costeras, zonas con poca salubridad en la preparación de alimentos y zonas que experimenten calentamiento global (Baker-Austin et al., 2018).

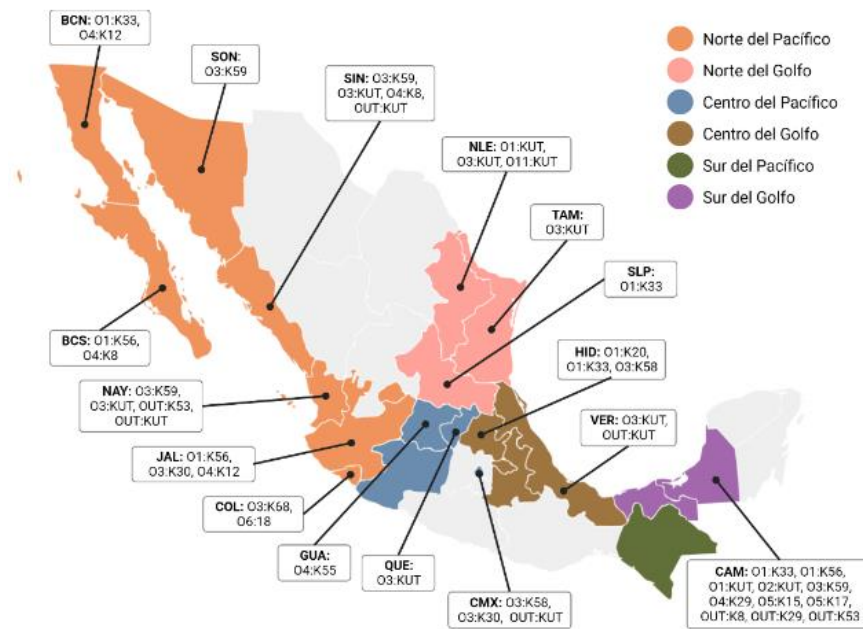
Para tratar y/o contrarrestar las infecciones de *V. parahaemolyticus*, se han usado una gran variedad y cantidad de antibióticos tanto en el sector acuícola como en el sector médico que han propiciado la creciente multiresistencia antibiótica, por lo que se han explorado nuevas alternativas más eficaces, de bajo costo y de fácil administración (Praja & Safnurbaiti, 2018; Souza Valente & Wan, 2021). En algunos países se ha restringido el uso de algunos antibióticos gracias a la resistencia a tetraciclina, doxiciclina, cefalosporinas, fluoroquinolona, penicilina, etc. (Ji et al., 2020; Letchumanan et al., 2019). Sin embargo, todavía en muchos países se usan ciprofloxacina, furazolidona, oxitetraciclina, cefuroxima, tetraciclina y ceftazidima, ampicilina en el sector acuícola que afectan la eficacia del uso de antibióticos al sector médico (Baker-Austin et al., 2018; Letchumanan et al., 2019; Souza Valente & Wan, 2021; Zamora-Pantoja et al., 2005). El desperdicio de antibióticos administrados mediante inmersión en el sector acuícola empeora la selección de resistencia para el sector médico ya que muchas veces los desperdicios o sobrantes no cubren una disposición final adecuada (Letchumanan et al., 2019).

Para identificar las cepas patógenas, se realiza clasificación con base en el serotipo. El serotipo O3:K6 es el principal registrado alrededor del mundo, en Estados Unidos, Japón y México causando gastroenteritis por el consumo de cangrejos u ostras, tanto en los estados del océano pacífico (Su & Liu, 2007), así como alrededor del golfo de México (Drake et al., 2007; Su & Liu, 2007). Se han identificado otros 49 distintos serotipos de interés epidemiológico cómo el O4:K68, O4:K12,

O5:K7, O6:K18, O1:K25 y O1:K indetectable (Abbott et al., 1989; Cabanillas-Beltrán et al., 2006; Ghenem et al., 2017).

Es importante mencionar que en los brotes alrededor del mundo se ha podido identificar a *V. parahaemolyticus* de entre otras especies y se han visto relacionados ya sea con la presencia de genes *tdh*, *trh*, *tlh* y/o el *orf8* (Abbott et al., 1989; Cabanillas-Beltrán et al., 2006; Hernández-Díaz et al., 2015; León-Sicauros et al., 2022), con la multirresistencia contra diferentes antibióticos (Hernández-Díaz et al., 2015) y la asociación con la presencia de contenidos fecales (Cabrera-García et al., 2004).

FIGURA 1. Distribución geográfica de los distintos serotipos de *V. parahaemolyticus* en México



Se recolectaron diversas cepas por región entre el año 2006 al 2011 en 22 estados mexicanos, donde todos los estados presentaron la cepa O3:K6 excepto en Guanajuato y Querétaro. Las siglas de los estados están conforme a la Norma ISO 3166-2. Información traducida y adaptada de León-Sicauros et al. (2022).

ENFERMEDAD

Los registros clínicos de *V. parahaemolyticus* apuntan a tres posibles cuadros clínicos. El primero y más común es la gastroenteritis aguda que se da por la nula o poca cocción de los alimentos marinos o por un mal procesamiento, mientras que los dos cuadros clínicos menos comunes son la infección cutánea por el contacto con agua o vectores contaminados y la septicemia primaria por la entrada de bacterias en cavidades (Acha & Szyfres, 2001; Franco-Monsreal & Flores-Abuxapqui, 1989; Nelapati et al., 2012; Praja & Safnurbaiti, 2018; Su & Liu, 2007). El tiempo de incubación en una persona infectada independiente de la ruta de entrada de la bacteria en el cuerpo varía de 3 a 96 horas, siendo desde las 4 a 72 horas la manifestación de los síntomas, con duración de 7 días máximo sin tratamiento (Belkin & Colwell, 2005; Heitmann et al., 2005; Praja & Safnurbaiti, 2018).

La gastroenteritis manifiesta síntomas comunes como diarrea, vómito, dolor abdominal y de cabeza, fiebre (menor a 39°C), náuseas, escalofríos y fiebre (Acha & Szyfres, 2001; Letchumanan et al., 2019; Nelapati et al., 2012; Praja & Safnurbaiti, 2018; Zamora-Pantoja et al., 2005). La diarrea puede tener una frecuencia de hasta 10 veces al día (Belkin & Colwell, 2005). Afecta el intestino grueso y las tres regiones del intestino delgado, así como el sitio rectal con inflamación aguda e infiltración de las bacterias al epitelio, cripta y lamina propia causando polimorfos de neutrófilos, edemas, congestión de vasos sanguíneos, acidosis hasta hemorragias y deshidratación (Belkin & Colwell, 2005; Praja & Safnurbaiti, 2018; Souza Valente & Wan, 2021).

Los síntomas y efectos de *V. parahaemolyticus* en el cuerpo causan desde septicemia (entrada de bacterias en la sangre) dependiendo de la gravedad y descontrol de la respuesta inmune, eritemas (contención de bacterias en ciertos vasos sanguíneos) y enrojecimiento de los capilares (Su & Liu, 2007; Zamora-Pantoja et al., 2005). De manera poco común, se ha reportado arritmia e infección de pulmones (Nelapati et al., 2012), leucocitos en heces, presión baja (Belkin & Colwell, 2005; Praja & Safnurbaiti, 2018), secreción de moco en fluidos y sangre en diarrea (Zamora-Pantoja et al., 2005).

Para identificar *V. parahaemolyticus*, el diagnóstico de gastroenteritis se determina mediante el análisis de heces, así como la manifestación de signos y síntomas (Zamora-Pantoja et al., 2005). La mayoría de los casos no se trata con médico o no se llevan a la comprobación para el laboratorio por lo que puede variar desde el tiempo de convalecencia a resultar en casos fatales (Acha & Szyfres, 2001; Belkin & Colwell, 2005). Aunque no existe una susceptibilidad de infección por cierto grupo poblacional, afecta ligeramente más a personas mayores e inmunocomprometidas (Heitmann et al., 2005). El tratamiento consiste en una rehidratación (Heitmann et al., 2005) y administración de antibióticos como tetraciclina, doxiciclina, sulfametoxazol y trimetoprima (Heitmann et al., 2005; Souza Valente & Wan, 2021).

Para la identificación de vibrios en el laboratorio, se usan distintos tipos de medios de cultivo en agar TCBS, agar BCVM, agar TSA y agar CV (Nelapati et al., 2012; Souza Valente & Wan, 2021; Zamora-Pantoja et al., 2005) y técnicas serológicas como distintos tipos de ELISA, técnicas moleculares distintos tipos de PCR entre otros que utilizan secuencias relacionadas a la virulencia como el gen *tlh* (Nelapati et al., 2012; Souza Valente & Wan, 2021; Su & Liu, 2007; Wang et al., 2015).

FACTORES DE VIRULENCIA

Durante la infección por *V. parahaemolyticus* existe actividad enzimática de lipasas, gelatinasas y proteínas hemolíticas (Drake et al., 2007) que funcionan como factores de virulencia para debilitar la célula huésped o fomentar el desarrollo y crecimiento de la bacteria y que repercuten en efectos cardiotóxicos, citotóxicos, enterotóxicos no comprendidos completamente (Nelapati et al., 2012; Praja & Safnurbaiti, 2018; Raghunath, 2014). Aunque la mayoría de las cepas de *V. parahaemolyticus* no cuentan con las proteínas Hemolisina Termoestable Directa y Hemolisina Relacionada a TDH (TDH y TRH, correspondientemente por sus siglas en inglés) y por lo tanto no son de concierne médico (Heitmann et al., 2005), sin embargo, cuentan con múltiples factores de

patogenicidad que le ayudan a la adherencia a las células huésped y evaden la respuesta del sistema inmune (Ji et al., 2020; Su & Liu, 2007).

Cuando *V. parahaemolyticus* ingresa al sistema digestivo utiliza las sales biliares y activa el Sistema de Secreción tipo 3 sistema 2 (T3SS2) (Letchumanan et al., 2019), este sistema y los principales genes de virulencia; *tdh*, *trh*, *tlh* y *ure* (con homología entre sí) se ubican en la isla patogénica Vp-Pal, se ha demostrado que se adquirieron mediante transferencia horizontal (Drake et al., 2007; Ghenem et al., 2017; Heitmann et al., 2005; Nelapati et al., 2012; Raghunath, 2014).

La principal proteína como factor de virulencia es la Hemolisina Termoestable Directa (TDH) (Su & Liu, 2007). Esta proteína β -hemolítica es característica de *V. parahaemolyticus* y es codificada por el gen *tdh*, fue encontrada gracias al fenómeno de Kanagawa que forma la ruptura de eritrocitos en medio agar Wagatsuma y posteriormente se encontró que la proteína TRH tiene la misma actividad (Drake et al., 2007; Nelapati et al., 2012; Praja & Safnurbaiti, 2018; Su & Liu, 2007; Zamora-Pantoja et al., 2005). Su nombre se debe a que después de 10 minutos a 100°C sigue mostrando actividad hemolítica (Drake et al., 2007; Ghenem et al., 2017), se ha reportado la sobreexpresión de *tdh* en condiciones similares al intestino (Raghunath, 2014) y ligado a la presencia de materia fecal por su crecimiento en tractos gastrointestinales (Belkin & Colwell, 2005).

V. parahaemolyticus se une a los eritrocitos y células epiteliales e intestinales mediante enlaces con fibronectina y ácido fosfatídico de las células huésped (Wang et al., 2015) donde forma poros o canales de membrana de 2 nm de diámetro con las proteínas TDH y TRH que provoca un flujo y desbalance iónico de Cl^- y Ca^{2+} , consecuentemente lisis osmótica coloidal con secreción intestinal de cloruro y aumento del mismo en el citosol (Ghenem et al., 2017; Ji et al., 2020; Nelapati et al., 2012; Praja & Safnurbaiti, 2018; Raghunath, 2014).

La proteína hemolítica Hemolisina Relacionada a TDH (TRH) es codificada por el gen *trh* y cuenta con una homología del 70% respecto al gen *tdh* (Ghenem et al., 2017; Nelapati et al., 2012; Raghunath, 2014). Se ha encontrado que en conjunto o en ausencia con la proteína TDH causa los mismos efectos hemolíticos, de permeabilidad vascular y acumulación de líquido (Heitmann et al., 2005; Nelapati et al., 2012). Se encuentra en cepas clínicas, aunque está más asociada a las cepas ambientales (Drake et al., 2007).

La proteína Hemolisina Termolábil o Hemolisina Dependiente de Lectina (TLH, antes LDH), codificada por el gen *tlh*, está presente en todos los casos clínicos positivos para TDH/TRH y todas las muestras ambientales, por lo que ha servido ampliamente para la identificación y clasificación de cepas de *V. parahaemolyticus* (Drake et al., 2007; Nelapati et al., 2012; Su & Liu, 2007; Wang et al., 2015). Aunque no se ha descrito el mecanismo de patogenicidad completo, se sobre expresa en condiciones parecidas al intestino y presenta actividad de fosfolipasa dependiente de lectina provocando vibrioferrinas en condiciones de poco o nulo Hierro (Ghenem et al., 2017; Nelapati et al., 2012; Wang et al., 2015) que puede provocar lisis de eritrocitos, por lo que también juega un papel importante en la patogenicidad (Drake et al., 2007; Praja & Safnurbaiti, 2018).

Los efectores de *V. parahaemolyticus* son diferentes tipos de moléculas que pueden ser secretadas en el citoplasma de la célula huésped para realizar diversos mecanismos para fortalecer el proceso de la patogénesis o debilitar el mecanismo inmune de la célula huésped. En el cromosoma

1, se han encontrado alrededor de cuatro efectores del T3SS1 y en la isla patogénica Vp-PAI del T3SS2 en el cromosoma 2 se han encontrado alrededor de siete efectores entre los que se destacan los siguientes (Wang et al., 2015):

El efector VopQ, en el T3SS1 ayuda a *V. parahaemolyticus* para la evasión de macrófagos y anclaje a las ATPasas de las vacuolas (Burdette et al., 2009) mientras que VPA0450 provoca cambios estructurales de la célula hospedera, así como la lisis del citoesqueleto y actúa de manera complementaria con otros efectores (Broberg et al., 2010).

Por otro lado, el efector VopL en el T3SS2 interrumpe la homeostasis de actina de las células del intestino y además propicia un ambiente favorable para el crecimiento de *V. parahaemolyticus* (Liverman et al., 2007) mientras que el efector VopZ es responsable de la acumulación de fluido, desprendimiento celular del hospedero, daño epitelial, y se ha visto que cuando se elimina, la colonización disminuye (Zhou et al., 2013).

RUMBO AL DESARROLLO DE UNA VACUNA CONTRA *Vibrio parahaemolyticus*

Bajo el escenario antes mencionado, el uso irracional de antibióticos ha ocasionado la resistencia bacteriana por *V. parahaemolyticus*, por lo tanto, la vacunación se propone como la primera medida preventiva contra esta enfermedad infecciosa. Aunque existen vacunas de uso veterinario para peces y mariscos de consumo humano contra diferentes especies de vibrios, ninguna está dirigida a *V. parahaemolyticus* (Ji et al., 2020), y tampoco existen vacunas comerciales contra vibrios dirigidas a humanos a excepción de *V. cholerae* (Baker-Austin et al., 2018). Por lo anterior, tener una vacuna disponible garantizaría la salud humana y una mejor calidad de vida ya que son costo-efectivas en comparación con un tratamiento de la enfermedad y a largo plazo se podría erradicar la enfermedad por completo (como pasó contra la viruela) (Ada, 2005; Tremblay et al., 2010).

CANDIDATOS VACUNALES

Diversas investigaciones se han centrado desde distintos enfoques en el estudio de candidatos vacunales contra *V. parahaemolyticus*.

Uno de los primeros enfoques de vacunas contra *V. parahaemolyticus* fue realizado por Mao et al. en el (2007) que presentaron el uso de Proteínas de la Membrana Externa (OMP's, por sus siglas en inglés) para formular vacunas de proteínas completas; OmpW con OmpV, OmpK solamente, OmpU con TolC. Estas vacunas se probaron en grupos de peces de *Larimichthys crocea* vía intraperitoneal con una concentración de 0.5 mg ml⁻¹ y mostraron respuesta de IgG a la semana 8 de hasta 1:1000 y Porcentaje Relativo de Supervivencia (RPS, por sus siglas en inglés) variable entre 80% a 90%. Por otro lado, Liu et al. en el (2011) aislaron un nuevo tipo de Serina Proteasa Putativa no encontrada en otras especies *Vibrio spp.* con actividad proteolítica. Purificaron esta proteína y mediante mutación dirigida a sitios específicos, formularon una vacuna de DNA e inyectaron vía intraperitoneal a individuos de *Scophthalmus* con diferentes concentraciones. La concentración de 50 µg/100 µl mostró un RPS del 96.11%, del mismo modo se indujeron títulos de anticuerpos tipo IgM de hasta más de 1:1000 e IgG de hasta 1:2000 después de la cuarta inmunización.

Posteriormente, Lun *et al.* en el (2014) analizaron la maltoporina LamB especial de las OMP's que se purificó y a partir de esta proteína, se aislaron epítomos para formular una vacuna de subunidades junto con el adyuvante de Freund incompleto con una concentración de 500 µg/ml. La vacuna se evaluó en un modelo de pez cebra (*Danio rerio*) obteniendo resultados de RPS en un 62.5% y respuesta de IgG de hasta 1:2000 en dos semanas después de la inmunización y mostrando también protección contra otras *Vibrio spp.*

En el (2016) Reyes-Becerrill *et al.* analizaron y purificaron de una expresión en un cultivo de *E.coli* a la toxina ToxA (Toxina PirA, monómero A) que administraron vía intraperitoneal con 40 µg en PBS a individuos de *Lutjanus peru* demostrando una respuesta humoral, incremento de IgM (de hasta 1: 2000 a la primera semana después de la inmunización) IL-1β y sobreexpresión de los genes para superoxidasa dismutasa y catalasa en las mucosas. En el mismo año, Peng *et al.* (2016) utilizaron varias OMP's, que administraron vía intraperitoneal (1.5 µg con montanida IMS 1312 VG) a individuos de *Danio rerio* demostrando que la proteína VP2309 genera mejores resultados con un RPS del 77.78% a 80% ya sea por inmunización activa o pasiva respectivamente y encontrando que esta proteína y las demás cuentan con epítomos altamente conservados a lo largo de la familia *Vibrionaceae*.

Campa-Códova *et al.* en el (2017) estudiaron la respuesta en un cultivo de camarón (*Litopenaeus vannamei*) ante la toxina PirA (ToxA) vía inmersión en una solución de 50 mg L⁻¹ con concentraciones variables por 30 min. De esta manera, encontraron una protección contra la enfermedad de ANPND sirviendo como inmunoestimulante y confirmando un RPS promedio de 98.33%.

Con otro enfoque, Huyen *et al.* en el (2020) realizaron variedad de mutantes de *V. parahaemolyticus* con rifampicina para analizar la toxina ToxR y formular vacunas de bacterias debilitadas. Se administraron mediante inyección de 10⁷ CFU/ml en PBS a individuos de *Epinephelus coioides* donde la cepa L4650 presentó un RPS de 88.67% la cual tiene una correlacionaron con el número de mutaciones en la secuencia *rpoB* usante de resistencia a rifampicina.

Estas vacunas propuestas han logrado resultados atrayentes como inmunoestimulantes para las especies marinas. Sin embargo, tomando en cuenta las mismas investigaciones anteriores, la mayoría ha sido enfocada en el uso de OMP's que, aunque demuestran ser inmunógenos favorables tienen ciertas desventajas o pautas en ventaja como: a) resultados variables de la eficacia de las distintas OMP's, b) el aislamiento de epítomos que se encuentren en bucles de la secuencia podría variar significativamente los resultados, c) analizar si el uso de proteínas completas deben de ser detoxificadas para evitar una respuesta inflamatoria excesiva por la presencia de lipopolisacáridos, d) la necesidad del uso de adyuvantes para activar la respuesta por linfocitos T y e) algunas OMP's no generan respuesta protectora en menores de 4 años (Maiti *et al.*, 2020; Saunders *et al.*, 1999). Agregado a lo anterior, las vacunas han sido administradas mediante inmersión a especies marinas o inyección a mamíferos lo que dificulta el escalamiento y asequibilidad para llevarlas a la administración a humanos y en especial a zonas donde es primordial y necesaria la vacunación.

Por otro lado, se ha explorado la posibilidad de generar una vacuna contra *V. parahaemolyticus* para humanos evaluando diversos prototipos en modelos animales y

aprovechando las ventajas de diferentes tipos y plataformas de administración, sin embargo, han sido muy pocas las investigaciones (Li et al., 2014; Monreal-Escalante et al., 2019). En este contexto, Li et al. (2014) detectaron y aislaron OMP's de las cuales la formulación de la proteína aislada VP0802 con el adyuvante de Freund (20 µg) mostró estar conservada en varias especies de *Vibrio spp.* y generó un RPS de 66.7% en ratones inyectados con esta proteína y mostró una elevada respuesta de anticuerpos.

TABLA 1. Antígenos candidatos como vacunas contra *V. parahaemolyticus*

ANTÍGENO	VÍA DE ADMINISTRACIÓN	ESPECIE	RESPUESTA INMUNE	REFERENCIA
OmpW con OmpV, OmpK, OmpU con ToIC	Intraperitoneal	<i>Larimichthys crocea</i>	RPS de hasta 90%, IgG a 1:1000	(Mao et al., 2007)
Serina proteasa FYZ8621.4 con mutaciones puntuales	Intramuscular	<i>Scophthalmus</i>	RPS de hasta 96.11%, IgG e IgM a 1:2000 y 1:1000 respectivamente	(Liu et al., 2011)
LamB con adyuvante de Freund incompleto	Intraperitoneal	<i>Danio rerio</i>	RPS de 62.5%, IgG a 1:2000	(Lun et al., 2014)
ToxA	Intraperitoneal	<i>Lutjanus peru</i>	IgM a 1: 2000, IL-1β y sobreexpresión de genes SOD y CAT	(Reyes-Becerril et al., 2016)
OMP VP2309 con adyuvante montanida IMS 1312 VG	Intraperitoneal	<i>Danio rerio</i>	RPS de 77.78%	(Peng et al., 2016)
ToxA	Inmersión	<i>Litopenaeus vannamei</i>	RPS promedio de 98.33%	(Campa-Córdova et al., 2017)
Cepa mutante con rifampicina L4650	Subcutánea	<i>Epinephelus coioides</i>	RPS de 88.67%	(Huyen et al., 2020)
OMP VP0802 con adyuvante de Freund	Intraperitoneal	<i>Mus musculus</i>	RPS de 66.7%	(Li et al., 2014)
ToxA en plantas de tabaco (<i>Nicotiana tabacum</i>)	Oral	<i>Mus musculus</i>	IgA e IgG a 1:2000	(Monreal-Escalante et al., 2019)

Recientemente, Monreal-Escalante et al. (2019) formularon una vacuna de subunidad con la toxina PirA (ToxA) expresada en plantas de tabaco (*Nicotiana tabacum*) como un prototipo de vacuna de bajo costo y sus promisorias ventajas. Esta vacuna se expresó en tejido vegetal mediante el vector pBI121, la vacuna se evaluó en un modelo de ratón por vía oral (administrando 1 µg de ToxA, aprox. 10 mg hojas de tabaco liofilizado en PBS). Los resultados demostraron la primera evidencia de inmunización en mamíferos vía oral con niveles prometedores anticuerpos IgA e IgG de hasta 1:2000 cuatro semanas después de la primera inmunización lo que demostró la capacidad de la vacuna de generar una respuesta inmune humoral.

NUEVAS PLATAFORMAS PARA LA PRODUCCIÓN DE VACUNAS

Los problemas por la falta de disponibilidad de vacunas han atraído la atención mundial para lograr una mejora en el desarrollo de vacunas más seguras, fáciles de producir y efectivas donde las vacunas de subunidades, vacunas en nuevas plataformas para su producción y las diferentes vías de administración resultan atractivas herramientas para vacunas innovadoras. En este sentido, el biopharming o agricultura molecular ha sido uno de los enfoques que desde los últimos 25 años busca satisfacer la demanda de vacunas y/o producción de moléculas biofarmacéuticas con herramientas biotecnológicas (Rosales-Mendoza & Tello-Olea, 2015).

Diversos biofármacos como anticuerpos, citocinas, enzimas entre otros, se han producido en plataformas de expresión como animales, levaduras, bacterias, plantas y microalgas (Rosales-Mendoza & Tello-Olea, 2015; Tremblay et al., 2010; Yan et al., 2016). En varios países como en Estados Unidos ya se están sentando las bases y pautas regulatorias para la producción de biofarmacéuticos en plantas, tan sólo el Departamento de Agricultura de los Estados Unidos y la Administración de Alimentos y Medicamentos de Estados Unidos (USDA y FDA, por sus siglas en inglés respectivamente) son las agencias de gobierno más avanzadas que regulan el desarrollo, pruebas preclínicas, de producción y comercialización de este tipo de productos ayudando a una mejor adaptación y uso de avances biotecnológicos en materia de vacunología (Tremblay et al., 2010).

Entre las plataformas de expresión, las plantas y microalgas tienen características promisorias para la producción de vacunas de nueva generación con ventajas moleculares hasta económicas. Las plantas tienen la gran facilidad de aceptación en el mercado ya sea para su consumo directo o para posterior purificación, presentan bajo costo de insumos con una gran escalabilidad, entre las ventajas genéticas no presentan riesgo de cruce entre enfermedades de las plantas-humanos, los cultivos propagados mediante clonas mantienen mejor control genético, realizan modificaciones post transcripcionales, las paredes celulares funcionan como encapsulantes para las proteínas recombinantes y pueden lograr altos rendimientos de biomasa (Merlin et al., 2017; Rosales-Mendoza & Tello-Olea, 2015; Tremblay et al., 2010). Sin embargo, sigue en investigación y mejoramiento si los compuestos naturales de las plantas se podrían usar como adyuvantes o inmunoestimulantes en las vacunas sin efectos secundarios, además al ser cultivos considerados como transgénicos deben ser tratados como biofarmacéuticos por lo que se debe mantener un estricto control para evitar la contaminación dentro y fuera de los cultivos, así como evitar los efectos deletéreos moleculares (Merlin et al., 2017; Rosales-Mendoza & Tello-Olea, 2015).

No obstante, se han desarrollado propuestas vacunales en plantas contra diferentes enfermedades infecciosas como virus de la hepatitis B, virus de la inmunodeficiencia humana (VIH, por sus siglas), tuberculosis, tétanos, virus del SARS-CoV, contra bacterias familiares como *V. cholerae* y *E. coli* enterotóxica, entre muchas otras que han podido expresar satisfactoriamente las nuevas vacunas y mostrado resultados satisfactorios a nivel de laboratorio y en pruebas clínicas abriendo la puerta a su uso en la agricultura molecular o biopharming (Hager et al., 2022; Merlin et al., 2017; Rosales-Mendoza & Tello-Olea, 2015; Tremblay et al., 2010).

Por otro lado, las microalgas han sido usadas en los sectores de biocombustibles, de alimentación y farmacéuticos entre otros (Gong et al., 2011) gracias a sus características especiales que pueden ser aprovechadas para la producción de vacunas. Dentro de las ventajas que presentan están: efectuar una mayor y rápida producción en contenedores con o sin necesidad de luz, un menor costo de producción y de mantenimiento en poco espacio gracias a su fácil cultivación, son de mayor escalabilidad generando mayor biomasa con mínimos nutrientes y menor generación de residuos (Gong et al., 2011; Ramos-Vega et al., 2018; Yan et al., 2016). Al igual que en las plantas, las microalgas realizan la encapsulación de proteínas recombinantes que podrían evitar la digestión y degradación en el tracto intestinal, también realizan modificaciones post transcripcionales y algunas especies son parte de la clasificación GRAS (Gong et al., 2011; Ramos-Vega et al., 2018).

Debido a las ventajas que se han mencionado, se han realizado propuestas vacunales en microalgas contra diferentes enfermedades infecciosas con resultados promisorios (Gong et al., 2011). Entre las principales especies utilizadas se encuentran *Chlamydomonas reinhardtii*, *Phaeodactylum tricornutum*, *Dunaliella* (Ramos-Vega et al., 2018; Yan et al., 2016) usadas para producir vacunas contra *Staphylococcus aureus*, virus del papiloma humano (VPH, por sus siglas), la enfermedad de la colera, el ántrax, la malaria, entre otras (Gong et al., 2011; Yan et al., 2016).

Sin embargo, existen ciertos aspectos por mejorar en la producción de vacunas en microalgas, entre ellos: evitar el silenciamiento genético, la inestabilidad de las clonas transformadas, la baja producción de proteínas a causa de la baja división celular por falta de nutrientes (Yan et al., 2016) además de una exploración para el mejoramiento de procedimientos y desarrollo de herramientas moleculares estandarizadas en los métodos de transformación de microalgas (Gong et al., 2011). Ante estos retos, Bañuelos-Hernández *et al.* en el (2017) desarrolló el vector *pALGEVIR*, un sistema de expresión geminiviral, para transformación transitoria en microalgas, con un promotor específico etanol inducible logrando una alta producción de proteínas recombinantes en un menor tiempo.

Recientemente, Ramos-Vega *et al.* (2018) han descrito las diversas características de la microalga *Schizochytrium sp.*, que aunque se ha usado para la producción de ácido docosahexaenoico (DHA, por sus siglas en inglés) y β -caroteno, puede ser una plataforma promisoriosa para la producción de vacunas recombinantes orales debido a que contiene compuestos como ácido palmítico (para la activación macrófagos y mejora la presentación por Células Presentadoras de Antígenos), escualeno (usado anteriormente como adyuvantes en vacunas como la vacuna Fluad MF59) y altos niveles de DHA y ácido eicosapentaenoico (EPA, por sus siglas en inglés) que pueden jugar un papel como inmunomoduladores ya que promueven la activación de linfocitos B y producción de anticuerpos como IgA.

METODOLOGÍA

ANÁLISIS BIOINFORMÁTICO DE LAS SECUENCIAS DE INTERÉS

Las secuencias de las proteínas hemolíticas se obtuvieron de la base de datos del NCBI con identificadores de WP_005478284.1 para TDH, AAB29385.1 para TRH y AYQ58325.1 para TLH. Se descargaron en formato fasta y analizaron bajo las plataformas VaxiJen 2.0 (<http://www.ddg-pharmfac.net/vaxijen/VaxiJen/VaxiJen.html>) y ANTIGENpro (<http://scratch.proteomics.ics.uci.edu/>) con los valores predeterminados para determinar la antigenicidad general de las secuencias. Las secuencias antigénicas en las plataformas fueron analizadas para la selección de epítomos de cada proteína dirigidos a los linfocitos B y linfocitos T.

SELECCIÓN DE EPITOPOS PARA LINFOCITOS B

Cada secuencia se analizó en la plataforma BCPREDS: B-cell epitope prediction server (<http://ailab.ist.psu.edu/bcpred/predict.html>) para obtener las predicciones de epítomos afines a linfocitos B de un tamaño de 20 aminoácidos. Al mismo tiempo, se analizó cada secuencia para visualizar las zonas antigénicas en la plataforma Immune Epitope Database (IEDB) Analysis Resource (<http://tools.iedb.org/bcell/>) bajo 6 métodos; Bepipred Linear Epitope 2.0, Chou & Fasman Beta-Turn, Emini Surface Accessibility, Karplus & Schulz Flexibility, Kolaskar & Tongaonkar Antigenicity y Parker Hydrophilicity.

Se correlacionaron los resultados entre las predicciones de epítomos con las zonas antigénicas para diferenciar los mejores resultados antigénicos de los epítomos de cada proteína. Se resume los resultados en la Tabla 4.

SELECCIÓN DE EPITOPOS PARA LINFOCITOS T

Las secuencias de cada proteína se analizaron en el software MHC-II Binding Predictions (<http://tools.iedb.org/mhcii/>) para obtener los epítomos con base en la unión a 27 tipos de receptores del Sistema del Antígeno Leucocitario Humano (HLA). Para obtener los epítomos candidatos, la plataforma necesita como *input* distintos tipos de receptores a utilizar, se utilizaron 6 tipos de receptores DP, 6 tipos de DQ, 15 tipos de DR reportados por Greenbaum *et al.* (2011) para obtener el mayor porcentaje de cobertura de población respecto a la variación de receptores en los humanos. Se estableció una longitud de epítomos de 20 aminoácidos y discriminaron los resultados con base a un rango percentil igual o menor a 10 y un número de copias de promiscuidad mayor a 10.

Del total de epítomos seleccionados previamente, se eligieron los epítomos que presenten el mayor número de copias de promiscuidad. Para la obtención de los epítomos inmunodominantes de las proteínas TDH y TLH se realizaron alineamientos locales con los epítomos predichos para linfocitos B en las respectivas proteínas con la plataforma de NCBI (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/BlastAlign.cgi>) para encontrar similitud y obtener el epítomo adecuado de acuerdo con la posible relación entre afinidad a epítomos descrita por Adler *et al.* en el (2017).

SELECCIÓN DE LINKER

Con base en la exploración de nuevos linkers, se realizó un escrutinio en la literatura reportada utilizando palabras clave como “unión de epítomos”, “quimera” y utilizado previamente tanto en la producción de vacunas en plataformas como plantas o microalgas. Junto con esto, se buscaron las características deseables en el proyecto (Amani et al., 2014; Clements, 1990; Guo et al., 2012; Jafari & Mahmoodi, 2021) tales como; que sea un linker flexible, de longitud corta, que mejore la expresión o exprese independiente las partes y que pueda mejorar la antigenicidad de la quimera.

DISEÑO DE LA QUIMERA *VP_ridx*

La quimera se diseñó *in silico* mediante la intercalación del linker entre los epítomos y la adición de la péptido señal de almacenamiento *Glycine max*, cola de histidinas, señal de retención SEKDEL, el codón de paro. Se incorporaron en los extremos los sitios de restricción *SmaI* al principio y *BamHI* y *SacI* al último para flanquear la quimera. El constructo final se muestra en la Figura 4.

EVALUACIÓN *in silico* DE PROPIEDADES DE LA VACUNA *VP_ridx*

La secuencia de la quimera diseñada *in silico* se caracterizó a través de un análisis de antigenicidad con las plataformas VaxiJen 2.0 y ANTIGENpro previamente utilizadas. De igual manera, se utilizaron las plataformas AllerTOP V2.0 (<https://www.ddg-pharmfac.net/AllerTOP/>), AlgPred (<https://webs.iitd.edu.in/raghava/algpred/submission.html>) y AllergenFP (<https://ddg-pharmfac.net/AllergenFP/>) para la determinación de alergenidad.

Posteriormente se realizó la predicción de las propiedades fisicoquímicas (estimación de vida media, hidrofobicidad, índice de alifático e índice de estabilidad, peso molecular, pH y punto isoeléctrico) con la plataforma de ProtParam (<https://web.expasy.org/protparam/>). La predicción de estructuras secundarias (hélice α y lámina β) se llevó a cabo con la plataforma PSIPRED (<http://bioinf.cs.ucl.ac.uk/psipred/>) mientras que la predicción de estructuras terciarias se realizó *ab initio*, a falta de una plantilla no apropiada, con el software Robetta (<https://rosetta.bakerlab.org/submit.php>), I-TASSER (<https://zhanggroup.org/I-TASSER/>) y Phyre2 (<http://www.sbg.bio.ic.ac.uk/~phyre2/html/page.cgi?id=index>) del cual se escogió el modelo con el valor más alto de confiabilidad para el refinamiento de la estructura terciaria mediante la plataforma GalaxyRefine2 (<https://galaxy.seoklab.org/cgi-bin/submit.cgi?type=REFINE2>) y la validación de la estructura con las herramientas ERRAT, VERIFY3D y PROCHECK de la plataforma de SAVES v6.0 (<https://saves.mbi.ucla.edu/>) y Expasy QMEAN (<https://swissmodel.expasy.org/qmean/>). La caracterización se muestra en la Figura 2.

Finalmente, se realizó la interpretación del modelo 3D con la plataforma iCn3D Web-based 3D Structure Viewer de NCBI (<https://structure.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/icn3d/>). El modelo se muestra en la Figura 4.

Una vez diseñado el gen y caracterizado se mandó sintetizar a la empresa Gene Universal™.

CONSTRUCCIÓN GENÉTICA

CLONACIÓN DEL GEN *VP_ridx* en los vectores *pBI121* y *pALGEVIR*

Se realizó una digestión del vector *pUC57* (vector comercial) para liberar el gen *VP_ridx* de un tamaño de 582 bp y la digestión de los vectores *pBI121* (Monreal-Escalante et al., 2019; Romero-Maldonado et al., 2016) y *pALGEVIR* (Bañuelos-Hernández et al., 2017) de un tamaño mayor a 14 kb. La reacción de digestión se realizó utilizando 5 µl de cada vector, 1 µl de buffer tango, 0.2 µl de cada enzima (*SmaI-SacI* para *pBI121* o *SmaI-BamHI* para *pALGEVIR*) y se ajustó a un volumen de 10 µl con agua estéril. Las reacciones de digestión se incubaron a las condiciones del proveedor (New England Biolabs®).

La liberación del gen de interés y el perfil de restricción de los vectores se analizó a través de electroforesis a 85 V por 40 a 90 min en un gel de agarosa al 1% utilizando un marcador de peso molecular (4 µl Kb plus de Invitrogen™ con 2 µl de buffer de carga) para observar los tamaños de los fragmentos esperados.

PURIFICACIÓN DE DNA EN GELES DE AGAROSA

Una vez analizados los fragmentos de las digestiones en el gel de agarosa, se purificaron las bandas conforme el Kit QIAEX II Gel Extraction (QIAGEN®). Las bandas visualizadas se cortaron y cada fragmento se trató con la solución Binding buffer. La mezcla se incubó a baño maría hasta disolver la agarosa para después colocarla en un tubo con columna de separación. Se centrifugaron a 13 000 rpm durante 75 s, se desechó el sobrenadante y se lavó dos veces con un volumen de la solución Wash buffer y se volvió a desechar el sobrenadante. Luego se centrifugaron a 13 000 rpm por 75 s y después se añadió 20 µl de la solución Elution buffer a cada muestra para incubarla a 45°C por 5 min. Se volvieron a centrifugar a 13 000 rpm por 75 s o hasta retirar completamente el sobrenadante. Finalmente, las muestras se suspendieron con 20 µl de buffer TE. La purificación se analizó por electroforesis en un gel de agarosa al 1% tomando 5 µl de cada muestra purificada con 2 µl de buffer de carga y 4 µl de marcador de peso molecular con 2 µl de buffer de carga a 85 v por 40 a 90 min.

REACCIÓN DE LIGACIÓN CON T₄ DNA LIGASA

La reacción de ligación se llevó a cabo de acuerdo con el protocolo del proveedor New England Biolabs® para unir el gen *VP_ridx* con los vectores *pBI121* o *pALGEVIR*. Para la reacción con *pBI121* se utilizaron 3 µl del vector, 6 µl del gen *VP_ridx*, 0.5 µl de la enzima T₄ DNA ligasa y 2 µl del buffer. Para la reacción con *pALGEVIR* se utilizaron 4 µl del vector, 8 µl del gen *VP_ridx*, 0.5 µl de la enzima T₄ DNA ligasa y 2 µl del buffer. Las muestras de las reacciones se mezclaron levemente en una microcentrífuga y se incubaron por 24 horas a 4°C.

TRANSFORMACIÓN DE *E. coli* TOP10 POR CHOQUE TÉRMICO

Las reacciones de ligación previamente descrita, construcciones *pBI121 + VP_ridx* y *pALGEVIR + VP_ridx* se clonaron en células de *E. coli* TOP10 calcio competentes (Invitrogen® C404003™) mediante el método de choque térmico (Sambrook et al., 1989).

De cada ligación se tomaron 3 µl y se mezclaron con 30 µl de células TOP 10 (de forma envolvente y en frío) para después incubarlas en hielo por 15 min. Después se incubaron en baño maría a 42° C por 1 min, e inmediatamente se incubaron en hielo por 10 min. Pasado el tiempo, se añadieron 600 µl de medio líquido LB donde las células se recuperaron incubando a 37°C por 45 min. Después de la incubación se centrifugaron las muestras a 6500 rpm, 15 min, y se descartó el medio; el pellet recuperado, se sembró en placas de medio LB selectivo sólido con 100 mg/L de kanamicina respectivamente y se incubaron a 37° C toda la noche. Al día siguiente se seleccionaron de 1 a 5 colonias visualizadas en las placas de cada construcción (*pBI121 + VP_ridx* y *pALGEVIR + VP_ridx*), se cultivaron en 30 ml medio LB líquido con 100 mg/L de kanamicina e incubando a 37°C por 24 horas para la proliferación de las células transformadas.

EXTRACCIÓN DE DNA PLASMÍDICO MEDIANTE MÉTODO DE LISIS ALCALINA

La extracción de DNA plasmídico se llevó a cabo mediante el método de lisis alcalina (Birnboim & Doly, 1979) tomando aproximadamente 15 ml de los cultivos previos y concentrando la biomasa por centrifugación 3 veces a 11,000 rpm por 5 minutos. Se descartó el sobrenadante y la biomasa obtenida de cada muestra, se trató con 150 µl de la solución BD I, y 20 µl de RNAasa, los tubos se mezclaron con vórtex, y después se añadieron 300 µl de la solución BD II mezclando por inversión y dejando incubar 10 min a temperatura ambiente. Luego, se agregaron 225 µl de la solución BD III y se mezclaron por inversión fuerte para posteriormente incubar a -80°C por 10 min. Después de la incubación, las muestras se centrifugaron a 11,000 rpm por 15 min, se recuperó el sobrenadante en tubos nuevos con 700 µl de isopropanol y 10% (del volumen del sobrenadante) de acetato de sodio 3M pH 5.4. Inmediatamente se incubaron las muestras a -80°C por 40 min para precipitar y después se centrifugaron a 11,000 rpm por 15 min para eliminar el sobrenadante. La pastilla recuperada se lavó con etanol al 70% (etanol y buffer TE) y se centrifugó a 11,000 rpm por 5 min. Se retiró el sobrenadante y se eliminó completamente el etanol por evaporación en un termoblock. Finalmente, el DNA se disolvió en 20 µl de buffer TE y 5 µl de RNAasa y las muestras se incubaron a 37°C por 1 hora.

La calidad del DNA purificado se analizó por electroforesis en un gel de agarosa al 1% tomando 2 µl de cada muestra con 2 µl de buffer de carga y se corrió a 85 v por 40 min; el gel se visualizó por exposición a luz UV en un fotodocumentador Gel Doc EZ System™ de Bio-Rad®.

TRANSFORMACIÓN DE *A. tumefaciens* GV3101 MEDIANTE MÉTODO DE ELECTROPORACIÓN

Una vez confirmada la clonación bacteriana de *E. coli* TOP10 con *pBI121 + VP_ridx* y *pALGEVIR + VP_ridx* por PCR y secuenciación, se procedió a transformar por electroporación la cepa GV3101 de *A. tumefaciens* electrocompetentes conforme el protocolo de (Angelosi et al., 1991). Se utilizó 1 µg de DNA de las construcciones previas y se puso en contacto con 50 µl de células electrocompetentes que se incubaron en hielo por 10 min y se transfirieron a celdas de electroporación de 0.1 cm. Las condiciones del equipo Gene Pulser Xcell Microbial System™ de Bio-Rad® fueron 25µF, 400Ω, 25kV por 8-9 milisegundos. Inmediatamente después, se añadieron 600 µL de medio de cultivo LB a cada celda y se transfirieron a tubos Eppendorf que se incubaron a 28°C por 2 h en oscuridad.

Posteriormente los cultivos se centrifugaron a 6500 rpm por 15 min, se eliminó el sobrenadante y el pellet obtenido se cultivó en medio YM con 50 mg/L de kanamicina por 3 días a 28°C en condiciones de oscuridad.

Una vez visualizado crecimiento de colonias bacterianas en los medios sólidos, se seleccionaron de 1 a 5 colonias para cada transformación (*pBI121 + VP_ridx* y *pALGEVIR + VP_ridx*) y cada colonia se cultivó en medio YM líquido con 100 mg/L de kanamicina y se incubaron a 200 rpm por 48 hrs a 28°C en oscuridad. Los cultivos en medio líquido con crecimiento bacteriano se seleccionaron para realizar extracción de DNA plasmídico por lisis alcalina (previamente descrito), así como el análisis de calidad del DNA a través de electroforesis en un gel de agarosa al 1%.

REACCIÓN EN CADENA DE POLIMERASA (PCR) POR PUNTO FINAL

DISEÑO DE PRIMERS

Para poder realizar PCR e identificar las clonas positivas, se diseñaron primers con base en la secuencia *VP_ridx* optimizada por la empresa Gene Universal®, que se analizó con el software Primer-BLAST (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>) utilizando los parámetros de porcentaje G-C entre 40 a 60%, temperatura de fusión +/- a 60°C, diferencia de temperatura entre cada primer igual o menor a 5°C y buscando un tamaño de amplicón de 1000 a 1500 bp. Las secuencias de ambos primers se analizaron en la plataforma RNAfold WebServer (<http://rna.tbi.univie.ac.at/cgi-bin/RNAWebSuite/RNAfold.cgi>) para observar y descartar la posible formación de horquillas y estabilidad adecuada mediante la visualización en la plataforma. Nuevamente se analizaron los primers emparejados para corroborar los resultados esperados, las secuencias de los primers se mandaron a sintetizar con la empresa T4Oligo®.

PCR PUNTO FINAL

Se llevó a cabo la confirmación molecular de las clonas positivas con las construcciones de *pBI121 + VP_ridx* y *pALGEVIR + VP_ridx* tanto para las muestras de *E. coli* TOP10 como para las muestras de *A. tumefaciens* GV3101 mediante PCR de punto final.

Utilizando los primers específicos proporcionados previamente, se realizó una PCR de gradiente para identificar la temperatura óptima de alineamiento con base a la temperatura de fusión de los primers sintetizados. Se preparó una mezcla de reacción multiplicando por el número de muestras, para 1 muestra de 25 µl se utilizaron 2.5 µl de buffer de PCR, 1.5 µl de MgCl₂, 0.5 µl de dNTP's, 0.6 µl de cada primer, 0.25 µl de Taq DNA, 1 µl del DNA y ajustó el volumen con H₂O estéril de grado biológico molecular. El protocolo que se llevó en el termociclador Veriti™ 96-Well con las condiciones especificadas en la Tabla 2. Finalmente, se realizó un gel de electroforesis al 1% y dejó correr a 85 v durante 40 min.

TABLA 2. Características de los primers diseñados para la amplificación por PCR punto final del gen *VP_ridx*

CÓDIGO	SECUENCIA 5' A 3'	LONGITUD (nt)	% CG	TM (°C)	PRODUCTO (nt)
<i>VP_ridx Fw</i>	CCCGGGATGAAGATGAAGG	19	57.29	57.29	482
<i>VP_ridx Rv</i>	GGTACTCTTGGATCGATGGC	20	55.00	57.84	

TABLA 3. Condiciones de PCR punto final para la detección del gen *VP_ridx*

PASO	CONDICIÓN
Desnaturalización I	95°C, 5 min
Desnaturalización II	95°C, 30 s
Alineamiento	63°C, 30 s para <i>pBI121+VP_ridx</i> 65°C, 40 s para <i>pALGEVIR+VP_ridx</i> x 35
Elongación I	72°C, 40 s
Elongación II	72°C, 5 min
Enfriamiento	4°C, 2 min

Los amplicones obtenidos por la reacción de PCR se mandaron sintetizar a la empresa GeneWiz® y se realizó un análisis de alineamiento en la plataforma NCBI (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) para confirmar la secuencia del gen.

RESULTADOS

SELECCIÓN DE EPÍTOPOS

La selección de epítomos inmunodominantes se realizó a través del reconocimiento por linfocitos B y linfocitos T. En el caso de linfocitos B se compararon los valores de afinidad más altos (mayores a 0.85 en una escala 0.0 a 1.0) de mostrados en BCPREDS y la antigenicidad de las secuencias mostrada en los diferentes métodos de predicción de la plataforma IEDB. Como se muestra en la Tabla 4, se eligieron los epítomos: epítomo 3 (parte A) para TDH, epítomo 5 (parte B) para TRH y epítomo 2 (parte C) para TLH.

TABLA 4. Epítomos dirigidos a linfocitos B

#	EPÍTOPO	AFINIDAD	Bepiped Linear Epitope Prediction 2.0	Chou & Fasman Beta-Turn Prediction	Emini Surface Accessibility Prediction	Karplus & Schulz Flexibility Prediction	Kolaskar & Tongankar Antigenicity	Parker Hydrophilic y Prediction
PARTE A. PROTEÍNA TDH								
1	KTSAFELPSVFPFAPGSDEI	0.991	Y	Y/N	N	N/Y	N/Y	N
2	DTTFNTQAPVNVKVSDFWTN	0.963	Y	N	N	Y	N/Y	Y
3	KRKPYEDVYGQSVFTTSGTK	0.968	Y	Y	Y	Y	N	Y
4	DETPEYFVNVEAYESGSGNI	0.974	Y	N/Y	Y	Y	N	Y
PARTE B. PROTEÍNA TRH								
1	KSFAIDLPSIPFPSPGSDEL	0.933	Y	Y	N	Y/N	Y	N
2	VRNTTIKTESPVNAIVDDYW	0.97	Y	N	N/Y	Y	N	Y
3	NIKRPKYKSVHGQSIFTTSG	0.869	Y	Y	Y	Y	N	Y
4	WLSAYMTVNINGNNYTMAAL	0.912	N	N	N	N	N	N
5	TKSEKTSLNQNYSSVSDFVG	0.985	Y	Y	Y	Y	N	Y
6	DETPEYFVNVEAYESGNGHM	0.968	Y	N	N/Y	N/Y	N/Y	Y
PARTE C. PROTEÍNA TLH								
1	EEPTLSPPEMVSASEVISTQE	0.868	Y	N	N	Y	Y	Y
2	TSYSKDDPATDWEWAKNEDG	0.954	Y	Y	Y	Y	N	Y
3	KNMFYTNQSVIRQRCEAT	0.971	Y/N	N/Y	N	Y	N/Y	Y
4	ASQWRFPNPNSWFLGHFSNG	0.858	N	Y	N	N	N	N
5	KAKNLPLYNWAVGGAAGENQ	0.845	Y	Y	N	N/Y	Y	N
6	PDATKAPQFKYSTQEEIDKI	0.886	Y	N	Y	Y	N	Y

En la primera columna se presenta el número de epítomo propuesto para dicha proteína, la segunda columna indica la secuencia en aminoácidos del epítomo. La afinidad está dada en un rango entre 0.0 a 1.0 siendo 1 el valor máximo. Las últimas seis columnas corresponden a los métodos empleados donde la simbología

representa (Y) una zona claramente antigénica, (Y/N) una zona ambigua mayormente antigénica, (N/Y) una zona ambigua mayormente no antigénica, (N) una zona no antigénica.

Se obtuvieron 4 epítomos candidatos para TDH, 6 candidatos para TRH y 6 candidatos para TLH, cada epítomo fue correlacionado con la posición correspondiente de la secuencia bajo cada método de predicción. Los diferentes métodos utilizan sus respectivos parámetros (Véase página 43 y 44) para determinar la secuencia de aminoácidos que posiblemente formen parte de un epítomo por arriba de la línea promedio de las gráficas, por lo que en una secuencia de 20 aminoácidos puede que parte de la secuencia se encuentre o no arriba o debajo de la línea promedio, es decir, que puede ser antigénica o no, lo cual se ve representado en los valores “Y/N” y “N/Y”.

En el caso de reconocimiento por linfocitos T se utilizó la plataforma MHC-II Binding Predictions que realiza la búsqueda de epítomos lineales bajo diferentes tipos de alelos del repertorio de HLA. Utilizando la lista de 27 tipos de HLA determinada por Greenbaum *et al.* (2011), se obtuvieron 30 epítomos candidatos de TDH, 47 candidatos de TRH y 92 candidatos de TLH repartidos a lo largo de los diferentes supertipos de receptores (DP, DQ y DR). Dada la gran cantidad de epítomos candidatos, se filtraron para obtener epítomos que se encuentren en los tres supertipos de receptores y presenten un número de copias de promiscuidad mayor a 10. En el caso de incertidumbre, como en las proteínas TDH y TLH, también se tomó en cuenta que los epítomos muestren similitud con los epítomos dirigidos a linfocitos B de las respectivas proteínas.

TABLA 5. Epítomos de TDH dirigidos a linfocitos T

#	EPÍTOMO	# de copias de promiscuidad	Similitud con el epítomo 1 de la tabla 4 parte A (%)
1	ISMLAAFKTSAFELPSVPPF	11	65
2	KHQYFAKKSFLFISMLAAFK	13	0
3	AKKSFLFISMLAAFKTSAFE	14	30
4	FAKKSFLFISMLAAFKTSAF	14	25
5	FISMLAAFKTSAFELPSVPPF	14	60
6	QYFAKKSFLFISMLAAFKTS	14	30
7	YFAKKSFLFISMLAAFKTSA	14	20
8	HQYFAKKSFLFISMLAAFKT	15	0
9	SFLFISMLAAFKTSAFELPS	15	45
10	LFISMLAAFKTSAFELPSVP	15	55
11	FLFISMLAAFKTSAFELPSV	16	50
12	KKSFLFISMLAAFKTSAFEL	16	35
13	KSFLFISMLAAFKTSAFELP	16	40

Los epítomos discriminados se encuentran en la segunda columna con su respectivo número de orden, el número de copias de promiscuidad toma en cuenta la repetición de la secuencia a lo largo de los 3 supertipos y la tercera columna la similitud encontrada en BLAST con el epítomo 1 dirigido a linfocitos B de la respectiva proteína.

TABLA 6. Epítomos de TRH dirigidos a linfocitos T

#	Epítopo	# de copias de promiscuidad
1	SLLLASIFSVSKSFAIDLPS	10
2	KLKLYFAFSLLLASIFSVSK	11
3	KLYFAFSLLLASIFSVSKSF	11
4	LKLYFAFSLLLASIFSVSKS	11
5	MKLKLYFAFSLLLASIFSVS	11
6	LYFAFSLLLASIFSVSKSFA	12
7	FSLLLASIFSVSKSFAIDL	13
8	AFSLLLASIFSVSKSFAIDL	15
9	FAFSLLLASIFSVSKSFAID	15
10	YFAFSLLLASIFSVSKSFAI	17

De igual manera que la Tabla 5, los epítomos discriminados se encuentran en la segunda columna con su respectivo número de orden y debido a la ausencia de similitud con epítomos de la misma proteína hacia linfocitos B, se tomó en cuenta el epítopo que presente mayor número de copias de promiscuidad.

TABLA 7. Epítomos de TLH dirigidos a linfocitos T

#	EPÍTOPO	# de copias de promiscuidad	Similitud con epítopo 4 de la tabla 4 parte c (%)	Similitud con epítopo 5 de la tabla 4 parte c (%)
1	FSNGFVWTEYIAKAKNLPLY	10	20	40
2	GFVWTEYIAKAKNLPLYNWA	10	0	55
3	KKTITLLTALLPLASAVAAE	10	0	0
4	NGFVWTEYIAKAKNLPLYNW	10	0	50
5	SNGFVWTEYIAKAKNLPLYN	10	0	35
6	KTITLLTALLPLASAVAE	11	0	0
7	MKKTITLLTALLPLASAVAE	11	0	0

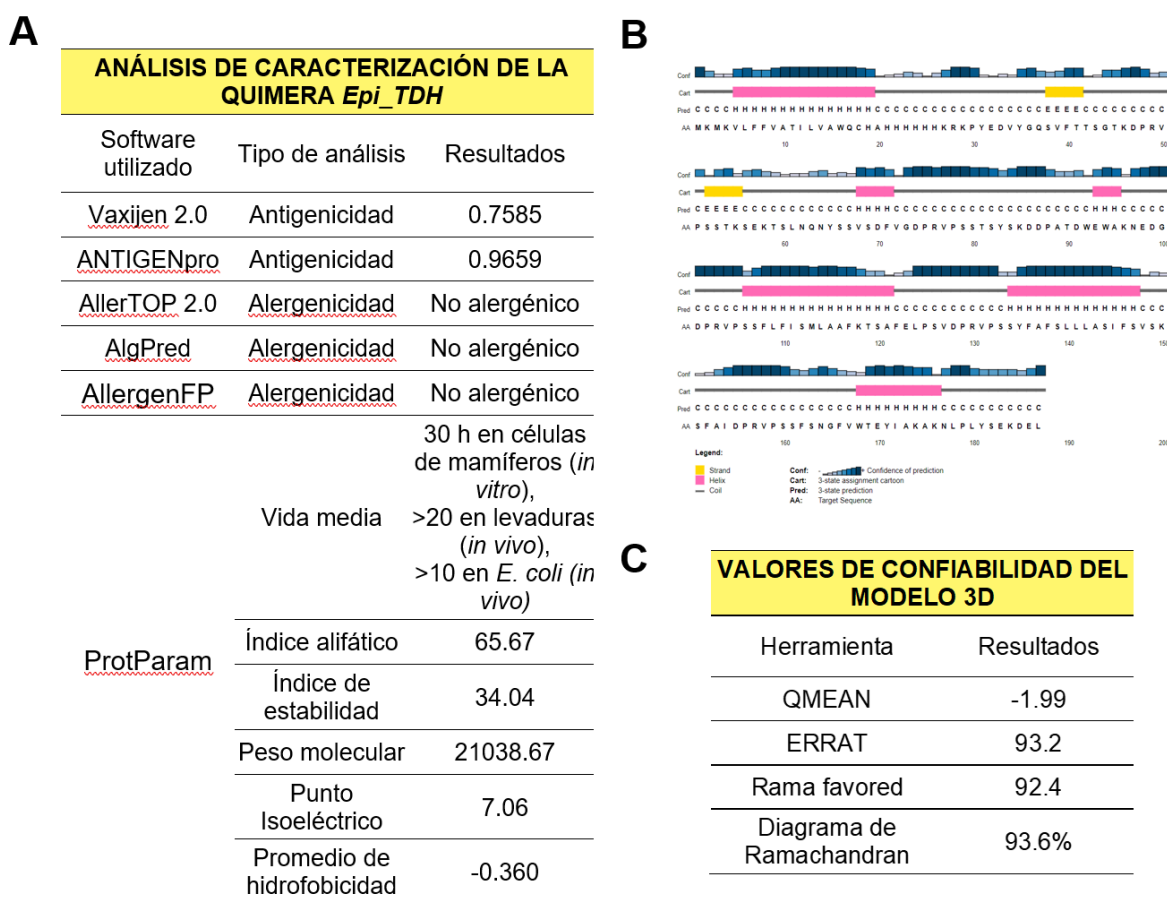
La secuencia de epítomos se encuentra en la segunda columna con su respectivo número de orden en la primera columna, en la tercera columna se muestran los números de copias de promiscuidad y en este caso se encontró similitud con dos epítomos dirigidos a linfocitos B de la respectiva proteína lo cual se muestra en la cuarta y quinta columna.

Como se muestran en las Tablas 5, 6 y 7, se mostraron mejores resultados inmunodominantes para el epítopo 11 con 16 copias de promiscuidad y un 50% de similitud con el epítopo 1 de la proteína TDH, para TRH se escogió el epítopo 10 con 17 copias de promiscuidad y para TLH se escogió el epítopo 1 con 10 copias de promiscuidad y un 20% de similitud con el epítopo 4 y 40% con el epítopo 5 de dicha proteína.

EVALUACIÓN *in silico* DE LA VACUNA VP_{ridx}

Se realizó el análisis y corroboración *in silico* de las propiedades antigénicas y de características fisicoquímicas propias y deseables de una vacuna para su posterior síntesis. En la Figura 2 se resumen las características encontradas, así como la estructura secundaria y terciaria responsables directas de sus propiedades biológicas.

FIGURA 2. Caracterización *in silico* de la quimera VP_{ridx}



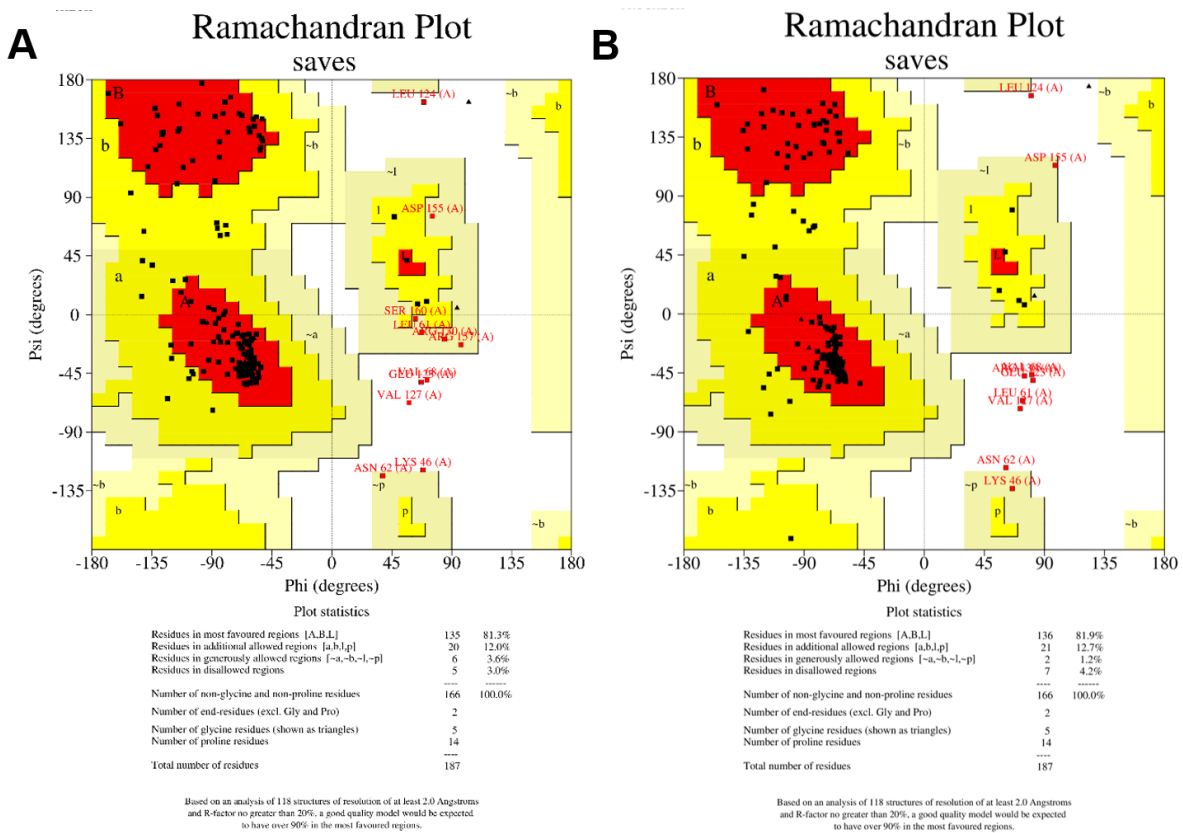
A) Características importantes de la quimera como prototipo vacunal en cuanto antigenicidad, alergenidad y propiedades fisicoquímicas. **B)** Predicción de estructura secundaria en PSIPRED. Muestra una distribución de 63.1% en 9 regiones formando estructuras de cola, 32.6% en 6 regiones formando hélices y 4.2% en 2 regiones formando estructuras laminares. **C)** Valores de confiabilidad de la estructura terciaria. Los rangos de las herramientas son de QMEAN 0 a 1, ERRAT 0 a 100, Rama favored sin escala establecida (dada por el modelo inicial) tomando en cuenta el mejor valor cómo el más alto, el valor del Diagrama de Ramachandran es la suma de los porcentajes de aminoácidos en regiones favorables y regiones adicionales a las favorables.

En el caso de la predicción de la estructura terciaria, se utilizó la plataforma de Robetta que genera 5 modelos de estructuras probables en un mismo archivo, por lo que se compararon los modelos con la herramienta QMEAN de ExPASy. Los modelos 1 y 3 de Robetta generaron valores de predicción de -1.47 y -1.12 respectivamente los cuales ayudaron a descartar las predicciones de I-TASSER con un valor de -17.68 y de Phyre2 con un valor de -15.62 con valores mucho menores de confiabilidad de predicción en la escala de 0.0 a 1.0.

Posteriormente, se realizó el refinamiento con la plataforma GalaxyRefine2, el cual genero 10 modelos refinados para cada modelo de Robetta escogido. Los modelos refinados del modelo 1 mostraron menor confiabilidad en Expasy por lo que se descartaron y continuaron los análisis con los modelos refinados del modelo 3 de Robetta.

Para determinar el mejor modelo refinado se valores específicos de Expasy y GalaxyRefine2 tales como QMEAN, rama favored, ERRAT y porcentaje de regiones favorecidas y adicionales a las favorecidas en el diagrama de Ramachandran (Figura 2). Tomando en cuenta esto, el modelo refinado 7 mostró, en general, mejores valores a los presentados del modelo 3 de Robetta sin refinar con un QMEAN de -1.12, rama favored de 91.4, ERRAT de 97.75 y Ramachandran de 93.3%.

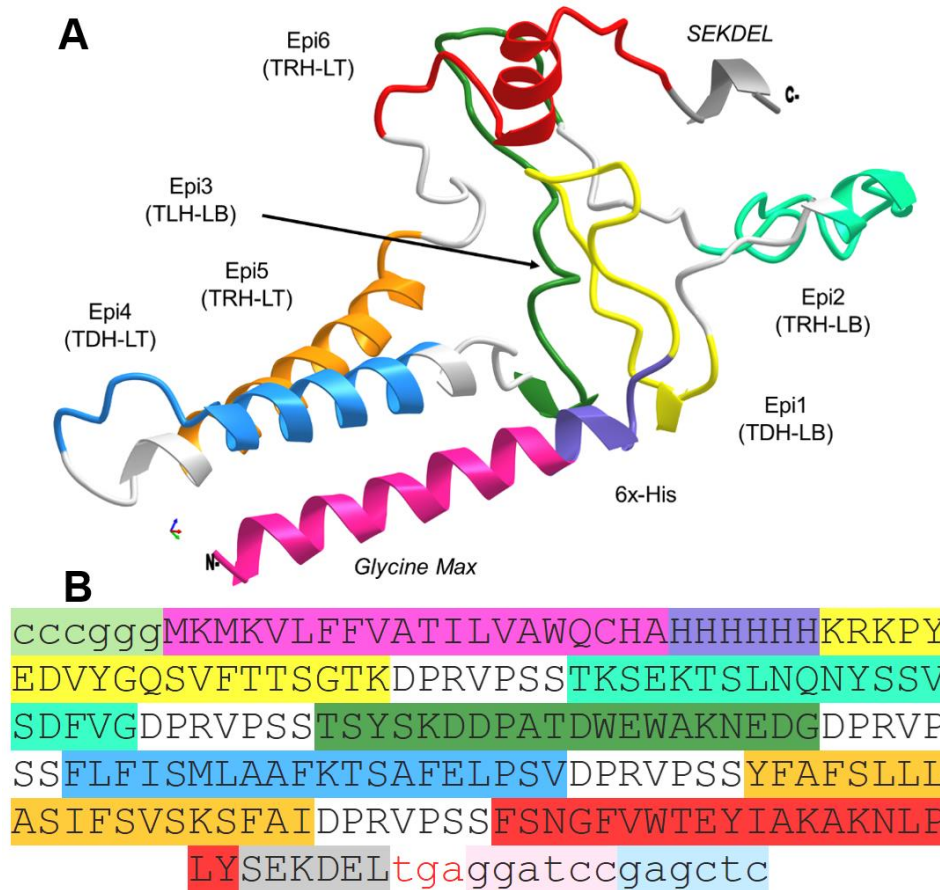
FIGURA 3. Validación de estructura antes (A) y después (B) del refinamiento de la estructura terciaria



El diagrama de Ramachandran es una herramienta gráfica que mediante la combinación de ángulos de enlaces peptídicos (Phi y Psi) permite identificar aminoácidos en las zonas permitidas, zonas adicionales a las permitidas, zonas generosamente permitidas y zonas no permitidas. En la parte A se muestra el modelo 3 de Robetta sin refinar con un total de 93.3% de aminoácidos en zonas aceptables, mientras que en el lado B se muestra el modelo 7 refinado de la parte A muestra un 94.6% aminoácidos en zonas aceptables. Los valores en rojo indican el tipo de aminoácido y su posición en la secuencia, que están en regiones generosamente permitidas y/o regiones no permitidas (de color blanco y color mostaza).

Existe un aumento de 1.3% de aminoácidos que se encuentran en mejores zonas, sin embargo, los aminoácidos LYS 46, LEU 61, ASN 62, VAL 68, GLU 123, LEU 124, ARG 130, ASP 155 se conservan zonas generosamente permitidas y/o zonas no permitidas. Lo anterior indica que las predicciones conformacionales para esos aminoácidos son inestables y, por lo tanto, la función podría variar.

FIGURA 4. Diseño final de la secuencia *VP_ridx*

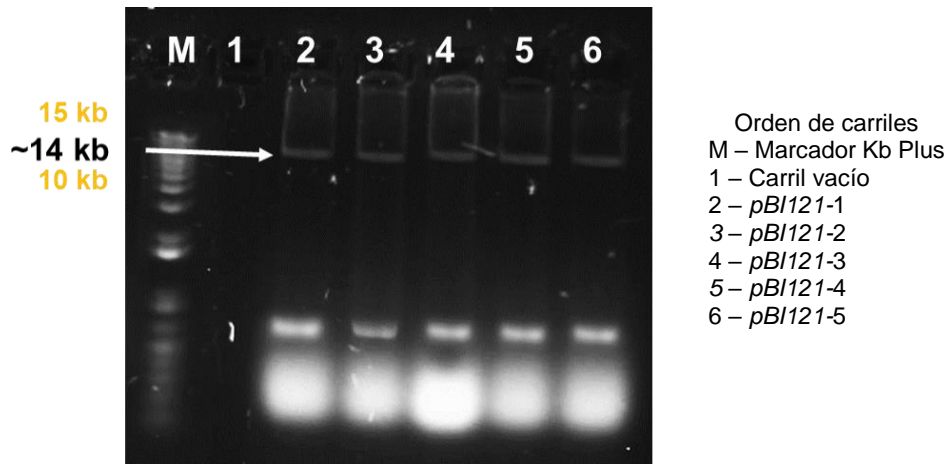


Tanto en la parte A (Modelo proteico de la vacuna) y B (Secuencia de la vacuna), la leyenda de los colores indica en rosa fuerte la péptido señal *Glycine max*, en morado la etiqueta de histidinas 6x-His, en amarillo el epítipo de TDH dirigido a LB, en cian el epítipo de TRH dirigido a LB, en verde el epítipo de TLH dirigido a LB, en azul el epítipo de TDH dirigido a LT, en naranja el epítipo de TRH dirigido a LT, en rojo el epítipo de TLH dirigido a LT, los linkers se encuentran en blanco y en gris la señal SEKDEL de retención. En la parte B se encuentran el sitio en verde claro *SmaI* que permite flanquear en el extremo 5' al vector *pALGEVIR* y *pBI121*, en rosa claro el sitio *BamHI* flanquea en el extremo 3' al vector *pALGEVIR* y en azul claro el sitio *SacI* flanquea en el extremo 3' al vector *pBI121*.

PERFILES DE DIGESTIÓN ENZIMÁTICA

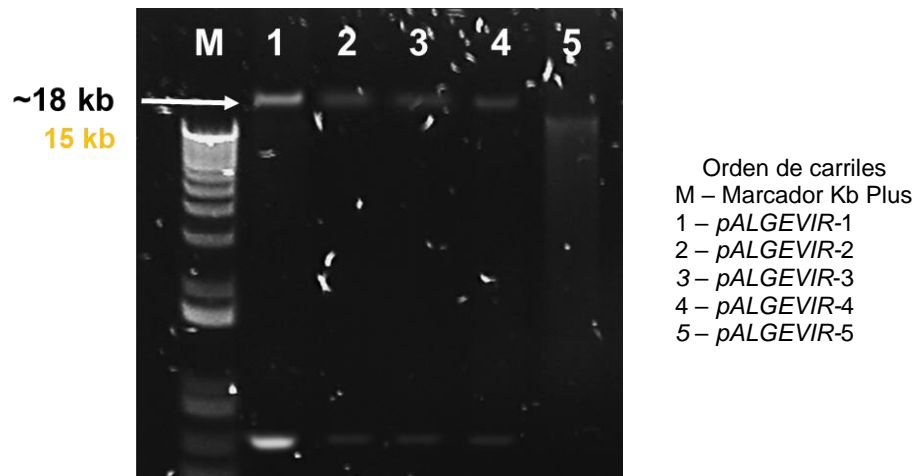
La digestión enzimática es una técnica ampliamente utilizada en la biología molecular para la obtención de vectores clonados y genes sintetizados. Para el proyecto, permitió la obtención exitosa de los vectores *pBI121* y *pALGEVIR*, así como del gen sintetizado *VP_ridx* del vector *pUC57* mediante repeticiones experimentales. En el caso de los vectores *pBI121* y *pALGEVIR*, el énfasis radicó en la obtención de los vectores y su identificación, por lo que no fue de interés el tamaño de los genes liberados. En todos los experimentos se empleó el marcador de peso molecular Kb plus de Invitrogen™, el cual cubre tamaños de bandas desde 100 hasta 15 000 bp.

FIGURA 5. Perfil de restricción del vector *pBI121*



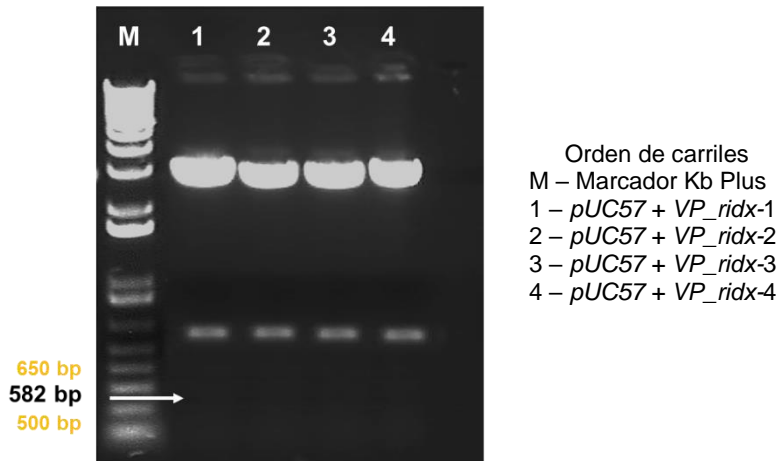
El vector *pBI121* fue digerido con las enzimas *SmaI* y *SacI* con un corte en el extremo romo y cohesivo respectivamente. En los carriles 2 a 5 se observa la obtención exitosa del vector mediante la visualización clara de las bandas de DNA del tamaño aproximado de 14 kb lo cual corresponde al vector digerido.

FIGURA 6. Perfil de restricción del vector *pALGEVIR*



El vector *pALGEVIR* fue digerido con las enzimas *SmaI* y *BamHI* las cuales hacen corte romo y cohesivo respectivamente. En los carriles 1 a 5 se observa la obtención exitosa del vector mediante la visualización clara de las bandas de DNA del tamaño aproximado de 18 kb lo cual corresponde al vector digerido.

FIGURA 7. Perfil de restricción del gen *VP_ridx* en el vector *pUC57*

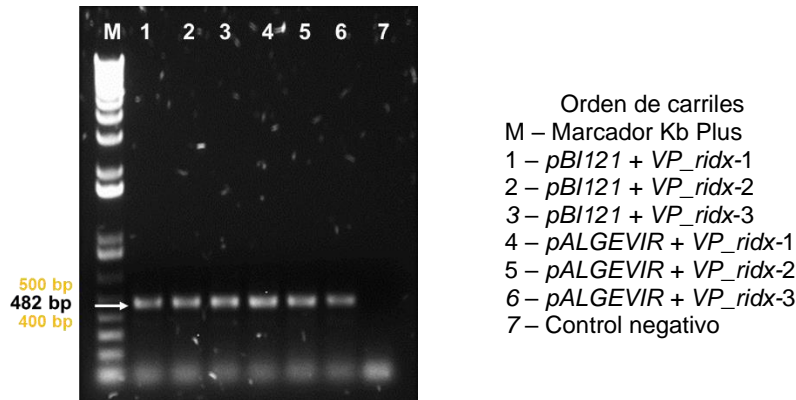


El vector comercial *pUC57* de un tamaño aproximado de 2 700 bp fue sometido a digestión con las enzimas *SmaI* y *SacI*, resultando en la liberación del gen sintetizado *VP_ridx*. En las repeticiones 1 a 4 se observa una banda de DNA de tamaño 582 bp correspondiente al gen, lo que confirma la expresión genética y aislamiento.

DETECCIÓN DEL GEN *VP_ridx* A TRAVÉS DE PCR

Después de la clonación y transformación en células de *E. coli* TOP10 mediante repeticiones experimentales con las construcciones genéticas se realizó la confirmación por PCR. Esta técnica permite la amplificación específica de DNA, lo que lo hace útil para la detección del gen.

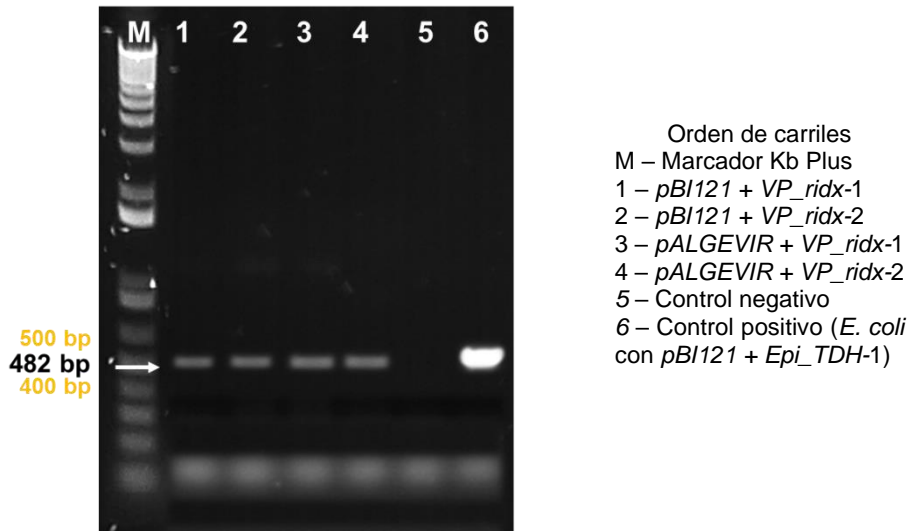
FIGURA 8. Producto de PCR de punto final en clonas de *E. coli* TOP10



Se realizó la amplificación por PCR utilizando los primers específicos desarrollados para el gen *VP_ridx* en *E. coli*. Se verificó la presencia de la construcción *pBI121* + *VP_ridx* en los carriles 1 a 3 y la construcción *pALGEVIR* + *VP_ridx* en los carriles 4 a 6 mediante la visualización de la banda de 482 bp correspondiente al amplicón esperado.

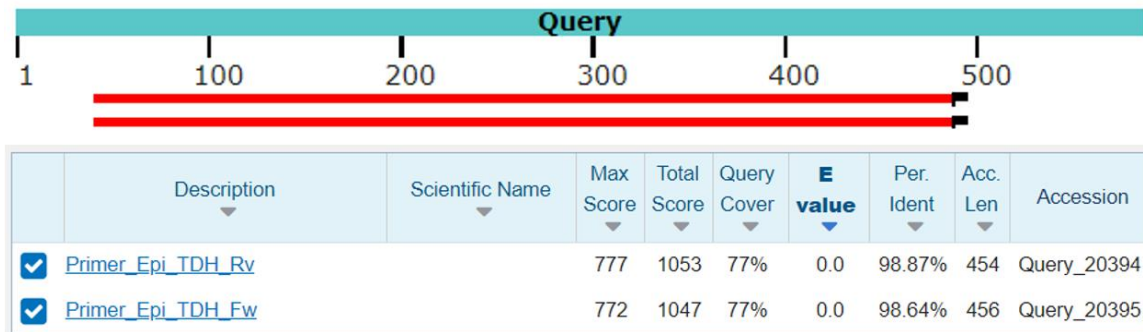
Después de la confirmación por PCR en células de *E. coli*, se procedió a enviar el producto de PCR a la empresa Genewiz (South Plainfield, NJ) para confirmar mediante secuenciación y confirmar la identidad del gen mediante el alineamiento con la secuencia sintetizada. Se obtuvo una identidad de al menos 98.64% con la secuencia del gen (Figura 10). Se utilizó la transformación por electroporación en las cepas de *A. tumefaciens* GV3101 seguido de una selección en medios de crecimiento con antibióticos.

FIGURA 9. Producto de PCR de punto final en clonas de *A. tumefaciens* GV3101



La visualización de bandas de DNA de un tamaño de 482 bp corresponde al tamaño esperado del amplicón con los primers específicos. En los carriles 1 y 2 se observa la identificación de la construcción *pBI121 + VP_ridx* en *A. tumefaciens* y en los carriles 3 y 4 se observa la identificación de la construcción *pALGEVIR + VP_ridx*. Se utilizó como control negativo el mix de reactivos sin muestra de DNA y como control positivo una muestra de *E. coli* confirmada previamente.

FIGURA 10. Confirmación mediante secuenciación del producto de PCR de *VP_ridx* de DNA extraído de cultivos de *E. coli* TOP10



Se realizó el alineamiento de la secuenciación del producto PCR con los primers sintetizados observando un 98.87% de identidad con el primer reverse y un 98.64% de identidad con el primer Forward formando las líneas rojas pertenecientes a la identidad. La línea del Query representa el tamaño del gen.

DISCUSIÓN

La presente investigación se basó en el desarrollo de una vacuna multiepitópica a partir de los principales factores de virulencia de *Vibrio parahaemolyticus* para su expresión en plantas y microalgas. Se exploró el uso de las proteínas TDH y TRH debido a sus características antigénicas y a su empleo como identificadores de diagnóstico médico (Nelapati et al., 2012; Raghunath, 2014). Por otra parte, la proteína TLH se ha relacionado como un marcador entre todas las cepas de *V. parahaemolyticus*, además de que diversas características le reflejan como un posible factor de virulencia (Ghenem et al., 2017; Wang et al., 2015). Por lo tanto, ya que estas proteínas de *V. parahaemolyticus* juegan un papel importante en la patogenicidad con la respuesta inmune del humano, pueden servir como candidatos vacunales gracias a su alta inmunogenicidad en la etapa de infección.

El desarrollo de la vacuna se centró en el diseño de una quimera multiepitópica que pueda servir en el reconocimiento de distintas proteínas involucradas en el múltiple reconocimiento del patógeno por el sistema inmune adaptativo. En este sentido, se han realizado propuestas vacunales basados en el uso de epítomos de factores de virulencia para combatir enfermedades infecciosas por: *Helicobacter Pylori* (Khan et al., 2019), *Staphylococcus aureus* (M. ul Q. Tahir et al., 2021), *Clostridium perfringens* (Aldakheel et al., 2021) y el virus de la fiebre hemorrágica Crimea-Congo (FHCC) (M. U. Q. Tahir et al., 2021) entre otros, obteniendo predicciones *in silico* favorables y con resultados prometedores.

La identificación de los epítomos de las secuencias (zonas antigénicas altamente reconocidas por células inmunes) con herramientas inmunoinformáticas permitió formular una vacuna de subunidad, específicamente una vacuna basada en epítomos, que a diferencia de las vacunas tradicionales muestra grandes ventajas como: a) la inducción de una respuesta inmune más específica a través de anticuerpos funcionales, b) el reconocimiento de epítomos a linfocitos B y linfocitos T da pie a un posible refuerzo por reconocimiento cruzado, aparte de c) una mejor estabilidad y bioseguridad (Ada, 2005; Oscherwitz, 2016).

PREDICCIÓN *in silico* DE EPÍTOPOS A LINFOCITOS B Y LINFOCITOS T

Los análisis *in silico* de epítomos lineales dirigidos a linfocitos B mostraron los mejores resultados para los siguientes epítomos: el epítomo 3 de TDH “KRKPYEDVYGQSVFTTSGTK”, el epítomo 5 de TRH “TKSEKTSLNQNYSSVDFVG” y el epítomo 2 de TLH “TSYSKDDPATDWEWAKNEDG” (Tabla 2 parte A, B y C respectivamente) correspondiente a los valores de afinidad y los resultados de los modelos de predicción utilizados tanto en BCPREDS y IEDB Analysis Resource.

BCPREDS (B-cell epitope prediction server) es una plataforma que utiliza un algoritmo SVM para analizar la secuencia mediante una evaluación quintuple cruzada de kernels con homología reducida entre epítomos y no epítomos, lo cual ha logrado obtener resultados más afinados de predicción en comparación a otros métodos (El-Manzalawy et al., 2008). Por otro lado, la plataforma IEDB Analysis Resource permite la robustez de elección de epítomos gracias a la visualización de los resultados bajo diferentes modelos de predicción. Se usaron 6 modelos que abarcan algoritmos de redes neuronales artificiales, propiedades fisicoquímicas de aminoácidos (accesibilidad, flexibilidad, hidrofobicidad, polaridad), HPLC y frecuencias de reconocimiento, lo cual permitió

analizar todas las características de un “buen epítopo” para el reconocimiento por linfocitos B (Chou & Fasman, 1978; Emini et al., 1985; Jespersen et al., 2017; Karplus & Schulz, 1985; Parker JM et al., 1986). Además, la comparación entre los modelos permitió discernir entre los resultados de los diferentes epítomos y evitar el error de predicción de los modelos, como pasó en el modelo de Kolaskar & Tongaonkar (1990) que muestra un error del 25% en su método semiempírico y mostrando en general epítomos no antigénicos.

Al contrario de los resultados en la elección de los epítomos de TDH y TLH, la proteína TRH mostró dos epítomos (epítopo 3 y 5 en la Tabla 2 parte B) con aparentemente las mismas características antigénicas, por lo que los valores más altos de afinidad y visualización de antigenicidad en los gráficos fueron los determinantes en su elección. La afinidad refleja la fuerza de unión del epítopo con la zona de reconocimiento por el anticuerpo, por lo que en el rango de 0 a 1 nuestros valores mostrados (0.968 para TDH, 0.985 para TRH y 0.954 para TLH) (Tabla 2) concuerdan con las zonas antigénicas generadas en los modelos de predicción.

Por otro lado, la predicción de epítomos dirigidos a linfocitos T se basó en el reconocimiento por el MHC, especialmente el tipo II. El MHC-II ó HLA-II para humanos, comprende un grupo de glicoproteínas de superficie presentes en las células APC (como células dendríticas, macrófagos y linfocitos B) que mediante el reconocimiento y procesamiento de antígenos presentan los fragmentos a los linfocitos T a través de los receptores TCR. Aunque las células con el receptor MHC-I ayudan a la generación de linfocitos T citotóxicos (provocando la destrucción de células dañadas, cancerosas o infectadas por virus), dada la infección de *V. parahaemolyticus* como bacteria extracelular, es más importante identificar epítomos de los antígenos dirigidos al MHC-II debido al diferente procesamiento que llevan y que esta subclase de glicoproteínas induce la proliferación y diferenciación a linfocitos T cooperadores (Th) y/o T reguladores (Treg) importantes para amplificar la respuesta inmune, generar inmunidad mediada por anticuerpos (inmunidad humoral) y generar respuesta inflamatoria y de defensa contra bacterias extracelulares (Adler et al., 2017; Sánchez-Trincado et al., 2017).

De igual manera, la predicción a HLA es compleja por la gran variabilidad de los alelos (polimorfismos) que se presentan en los humanos, por lo que el uso de HLA ventajosos es importante para la eficacia de la vacuna en la mayor parte de la población y en la menor gravedad de la enfermedad (Sánchez-Trincado et al., 2017). Para esto Greenbaum *et al.* (2011) realizó clusters de alelos con base en motivos o estructuras compartidas de unión a péptidos e identificó 27 tipos de alelos en 3 supertipos de HLA-II que logran abarcar el 98% de la población mundial. Con este número de tipos de alelos se realizó el análisis en la plataforma MHC-II Binding Predictions para encontrar los epítomos con mayor número de copias de promiscuidad, lo cual se ha relacionado anteriormente como identificador de péptidos más inmunogénicos, con mayor afinidad a MHC e inmunodominantes (Eisen et al., 2012; Greenbaum et al., 2011) que predicen mejores oportunidades de inducir una respuesta inmune.

Los análisis mostraron que los mejores epítomos fueron: el epítopo 11 de TDH “FLFISMLAAFKTSAPFELPSV” (Tabla 3), el epítopo 10 de TRH “YFAFSLLLASIFSVSKSFAI” (Tabla 4) y el epítopo 1 de TLH “FSNGFVWTEYIAKAKNLPLY” (Tabla 5). La selección de los epítomos TRH fue más concreta debido a la presencia de 17 copias de promiscuidad en comparación con otros epítomos, mientras que para las proteínas TDH y TLH no existía diferencia (+/- 1 copia) entre el

número de copias de promiscuidad entre los epítomos. Para esto, se realizó un alineamiento BLAST de NCBI de estos epítomos con los epítomos dirigidos a linfocitos B de las respectivas proteínas.

Los linfocitos B maduros son APC que exhiben moléculas MHC-II en su membrana utilizadas para la presentación de antígenos a linfocitos T que, aunque difieren los mecanismos de reconocimiento de antígenos y activación, comparten una estrecha relación de activación entre linfocitos B y linfocitos T (Adler et al., 2017). Para la activación de los linfocitos T, el complejo CD4+ y el receptor TCR se une al MHC-II de los linfocitos B provocando la diferenciación y proliferación de linfocitos T selectivos que reconocen los epítomos específicos activadores (y/o con afinidad a linfocitos B) y a la vez generan linfocitos B diferenciados por el tipo de antígeno reconocido tanto por BCR como por el MHC-II, generando diferentes Ig y/o subtipos de Th específicos (Ada, 2005; Adler et al., 2017).

DISEÑO Y CARACTERIZACIÓN *in silico* DE LA QUIMERA *VP_ridx*

Para el diseño final de la quimera se eligieron 6 epítomos, 2 de cada proteína y se conformaron en el diseño de la siguiente manera: KRKPYEDVYQGSVFTTSGTK, TKSEKTSLNQNYSSVSDFVG, TSYSKDDPATDWEWAKNEDG, FLFISMLAAFKTSAPFELPSV, YFAFSLLLASIFSVSKSFAI y FSNGFVWTEYIAKAKNLPLY, incorporando entre cada epítomo la secuencia “DPRVPSS” el cual es un linker flexible empleado por primera vez en (1990) por Clements y utilizado en el desarrollo de vacunas por sus características de flexibilidad, que conserva y promueve la competencia inmunológica de cada epítomo (como adyuvante) y evita la formación de nuevos epítomos (Amani et al., 2014; Guo et al., 2012; Jafari & Mahmoodi, 2021).

Para el diseño *in silico* de la quimera *VP_ridx* (Figura 4) se incorporó una cola de histidinas (6x-His), usada comúnmente en el diseño de vacunas recombinantes para facilitar la posible purificación y solubilidad de las proteínas (Ki & Pack, 2020), útil para la detección y cuantificación de antígenos a anticuerpos específicos anti-His en técnicas de inmunoanálisis como Western Blot y ELISA (Ramos-Vega et al., 2021) que ayudará para posteriores estudios serológicos. Se agregó la etiqueta 6x-His que puede inducir anticuerpos neutralizantes de mejor manera que cadenas más cortas (Chen et al., 2022) y puede ayudar en el proceso de producción y detección de la vacuna como lo reportado por Lovell *et al.* (2022) con la vacuna contra SARS-CoV-2 *EuCorVac-19* que se encuentra en fase III. También se añadieron las péptido señales *Glycine max* y SEKDEL en los extremos N-terminal y C-terminal, respectivamente. La secuencia de *Glycine max* permite el almacenamiento vegetativo de la construcción (Romero-Maldonado et al., 2016) y el direccionamiento de la construcción al RE (Klauer & Franceschi, 1997), mientras que la secuencia SEKDEL evita la secreción de la proteína recombinante (Ramos-Vega et al., 2021) y por su potencial antes descrito en la administración de vacunas orales en plataformas como *Schizochytrium sp.* (Ramos-Vega et al., 2018).

Los análisis de antigenicidad y alergenicidad de la quimera *VP_ridx* bajo diferentes softwares permitieron fortalecer que la vacuna es segura y efectiva, así mismo, los valores de ProtParam reflejan las características deseables como una vacuna (Figura 2). El punto isoeléctrico (pI) de 7.06 indica que la quimera es de naturaleza neutra, el índice de estabilidad (34.04) la considera una proteína estable en ensayos mientras que el índice alifático (65.67) demuestra que es termoestable

y el promedio de hidrofobicidad (GRAVY) es de -0.360 que indica la quimera es afín a la interacción con moléculas de agua, es decir, es hidrofílica (Gasteiger et al., 2005).

La predicción *ab initio* puede dificultar la predicción de la estructura terciaria al no tener una plantilla de referencia, esto es importante ya que, a pesar de mostrar una confiabilidad de predicción de estructura secundaria favorable, la predicción de estructuras terciarias mostró poca confiabilidad de resultados. Esto se ve reflejo en el valor QMEAN de -1.99 por debajo del rango de 0 a 1 de la escala, aun así, este resultado de Robetta fue mucho mejor al obtenido por las plataformas de I-TASSER y Phyre2.

Se optó por el modelo 7 refinado ya que muestra valores más alto al modelo 3 inicial de Robetta (Diagrama de Ramachandran y rama favorede), y aunque los valores de QMEAN y ERRAT no fueron más altos, no bajaron drásticamente como en los otros modelos, esto se debe ya que no se puede contar con una plantilla de referencia y generar el modelo *de novo* (Kim et al., 2004). Además, en varios modelos se generó una estructura laminar (no reportada en la predicción de estructura secundaria) lo cual va de acuerdo con la poca confiabilidad que se generó en esa misma zona en PSIPRED.

En la interpretación de confiabilidad para la predicción de estructura terciaria, los análisis por SAVES y ExPASy sirven como información complementaria para validar los modelos de proteínas ya que analizan las interacciones entre átomos, compatibilidad del modelo con la secuencia de aminoácidos y la estereoquímica (Bowie et al., 1991; Colovos & Yeates, 1993; Laskowski et al., 1993). De igual manera, aunque no se tuvieron datos favorables en las herramientas empleadas, el refinamiento por Galaxyrefine2 puede no mejorar la estructura o puede ser inexactos debido a las regiones donde no existe suficiente data experimental en plantillas o secuencias relacionadas (Lee et al., 2019). Además, como se muestra en los diagramas de Ramachandran (Figura 3), la posición de los aminoácidos en las diferentes zonas no logra situar al 85% de los aminoácidos en regiones únicamente favorables, por lo que según Yang et al. (2021) nuestro modelo no logra alcanzar el porcentaje mínimo aceptable de confiabilidad.

Conforme se ha realizado en otras investigaciones, se sugiere realizar posteriores análisis de comparación entre los epítomos elegidos con la secuencia conservada de cada proteína para determinar el alcance de la vacuna contra diferentes cepas y también, dados los valores de predicción se recomienda mejorar la predicción y refinamiento de la estructura terciaria de la quimera (Soria-Guerra et al., 2015).

OBTENCIÓN DE LAS CONSTRUCCIONES GENÉTICAS

Conforme se obtuvieron los vectores *pBI121* (Figura 5) y *pALGEVIR* (Figura 6) y la liberación del gen *VP_ridx* de un tamaño de 582 bp como se observa en la Figura 7, se realizaron las construcciones *pBI121 + VP_ridx* y *pALGEVIR + VP_ridx* expresadas tanto en *E. coli* (Figura 8) como en *A. tumefaciens* (Figura 9) cumpliendo con los objetivos esperados y confirmados también mediante secuenciación (Figura 10).

Los primers diseñados para la amplificación del gen *VP_ridx* resultaron adecuados para su uso en PCR y cumpliendo las características deseadas de primers mostradas en la Tabla 2. Además, fue importante la visualización de la formación de horquillas (hibridación de primers) ya que es una

característica que impediría la formación del amplicón, por lo que la plataforma RNA Fold Web Server nos sirvió a elegir los primers entre otros candidatos.

Se integró *VP_ridx* en los vectores *pBI121* y *pALGEVIR*, para su posible producción como vacuna recombinante en plantas y en la microalga *Schizochytrium sp.* Se decidió usar el vector binario *pBI121* por su anterior uso en la transformación de plantas para expresar proteínas recombinantes como vacunas (Monreal-Escalante et al., 2019; Romero-Maldonado et al., 2016) y que el uso de vacunas orales en plantas induce una mayor expresión de IgA e IgG (Merlin et al., 2017). Por otro lado, estudios previos demuestran el potencial de la microalga GRAS *Schizochytrium sp.* para la expresión de proteínas heterólogas con aplicaciones en vacunología (Bayne et al., 2013; Ramos-Vega et al., 2018). En este sentido, Bañuelos-Hernández et al. (2017) diseñaron un vector geminiviral para la transformación transitoria de microalgas que ha sido tomado para un enfoque vacunal poco explorado que permite la producción de biofarmacos en unas pocas horas sin complejidad metodológica, por lo que se ha utilizado en la producción de antígenos como: la subunidad B de la enterotoxina termolábil (LTB) de *E. coli* (Bañuelos-Hernández et al., 2017), un candidato vacunal para el tratamiento de Alzheimer (Ortega-Berlanga et al., 2018) y en una vacuna multiepítopo de la proteína de envoltura del virus del Zika (Márquez-Escobar et al., 2018) con rendimientos muy favorables.

Con la obtención de los vectores incorporados con el gen *VP_ridx*, se buscará transformar plantas de zanahoria y/o tomate y la microalga *Schizochytrium sp.* para generar la expresión en estas plataformas, posteriormente la identificación mediante la purificación de las construcciones dará pie a realizar ensayos de inmunización en modelo de ratón con esquemas de dosificación y reto de dosis letal para asegurar el alcance de la vacuna. Dependiendo de los datos obtenidos, se podría analizar el efecto de la vacuna junto con el adyuvante ToxA previamente demostrado que mejora la respuesta inmune (Campa-Córdova et al., 2017; Monreal-Escalante et al., 2019). Y el presente proyecto puede servir para explorar la protección parcial hacia otras especies de *Vibrio spp.* debido a la homología para las proteínas TDH y TRH (Drake et al., 2007; Ghenem et al., 2017; Raghunath, 2014).

En resumen, es importante el desarrollo de una vacuna contra *V. parahaemolyticus* ya que el número de brotes epidemiológicos por alimentos contaminados de *Vibrio spp.* (Baker-Austin et al., 2018; Drake et al., 2007). podría presentarse en cualquier época del año y bajo diversos factores. Además, la zoonosis y adaptación de esta bacteria mejora su resistencia a antibióticos y a la evasión de la respuesta inmune del huésped (Elbashir et al., 2018; Tauxe, 2002). Disponer de una vacuna oral contra *V. parahaemolyticus* además de generar una respuesta a nivel local y de mucosas; podría disminuir las dificultades logísticas, de equipo y personal capacitado (Czerkinsky & Holmgren, 2015; Ramos-Vega et al., 2018).

CONCLUSIONES

El análisis de epítomos de las proteínas TDH, TRH y TLH *Vibrio parahaemolyticus* a través de herramientas inmunoinformáticas permitió diseñar de manera adecuada una vacuna multiepitópica antigénica y no alergénica *in silico*, capaz de ser reconocida adecuadamente y de inducir una respuesta inmune humoral y celular.

La quimera multiepitópica *VP_ridx*, se expresó satisfactoriamente en los vectores *pBI121* y *pALGEVIR* que nos permiten la producción de la vacuna en plantas y microalgas gracias a la generación de líneas transgénicas de *E. coli* y *A. tumefaciens*.

Las construcciones generadas buscan generar líneas en plantas y microalgas para su función como vacunas orales, para evaluar el potencial inmunogénico de cada vacuna generada deberán ser analizadas mediante ensayos inmunológicos *in vivo* con parámetros de dosis, número de dosis y tiempos de respuesta por inmunoglobulinas. Además, sería deseable medir la prevalencia de las respuestas humoral y celular tiempo después de los ensayos, así como ensayos con diferentes parámetros para obtener los mejores esquemas de inmunización de las vacunas candidatas para, idealmente, ser probadas en retos infecciosos y verificar la protección que proveen.

Finalmente, los constructos *pBI121 + VP_ridx* y *pALGEVIR + VP_ridx*, basados en las toxinas TDH, TRH y TLH de *V. parahaemolyticus* contribuirán al desarrollo de una vacuna recombinante de bajo costo que pueda ser administrada por vía oral producida en plantas y microalgas.

BIBLIOGRAFÍA

- Abbott, S. L., Powers, C., Kaysner, C. A., Takeda, Y., Ishibashi, M., Joseph, S. W., & Janda, J. M. (1989). Emergence of a restricted bioserovar of *Vibrio parahaemolyticus* as the predominant cause of *Vibrio*-associated gastroenteritis on the West Coast of the United States and Mexico. *Journal of Clinical Microbiology*, 27(12), 2891–2893.
- Acha, P. N., & Szyfres, B. (2001). Vol. 1 Bacterioses and Mycoses. In *Zoonoses and Communicable diseases common to man and animals* (Vol. 3, pp. 138–141). Pan American Health Organization.
- Ada, G. (2005). Overview of Vaccines and Vaccination. *Molecular Biotechnology*, 29(3), 255–271.
- Adler, L. N., Jiang, W., Bhamidipati, K., Millican, M., Macaubas, C., Hung, S. chen, & Mellins, E. D. (2017). The other function: Class II-restricted antigen presentation by B cells. *Frontiers in Immunology*, 8(3), 1–14.
- Aldakheel, F. M., Abrar, A., Munir, S., Aslam, S., Allemailem, K. S., Khurshid, M., & Ashfaq, U. A. (2021). Proteome-wide mapping and reverse vaccinology approaches to design a multi-epitope vaccine against *Clostridium perfringens*. *Vaccines*, 9(10).
- Ali, A., Parisi, A., Conversano, M. C., Iannacci, A., D’Emilio, F., Mercurio, V., & Normanno, G. (2020). Food-borne bacteria associated with seafoods: A brief review. *Journal of Food Quality and Hazards Control*, 7(1), 4–10.
- Amani, J., Delfani, S., & Abbas Ali, I. F. (2014). In silico analysis for identifying potential vaccine candidates against *Staphylococcus aureus*. *Journal of Cell and Molecular Research*, 6(2), 57–64.
- Angelosi, G. A., Abest, E., Martinetti, G., & Nester, E. W. (1991). Genetic Analysis of *Agrobacterium*. *Methods in Enzymology*, 204, 384–397.
- Baker-Austin, C., Oliver, J. D., Alam, M., Ali, A., Waldor, M. K., Qadri, F., & Martinez-, J. (2018). *Vibrio* spp. infections. *Nature Reviews Disease Primers*, 4(1), 1–19.
- Baker-Austin, C., Trinanés, J., González-Escalona, N., & Martínez-Urtaza, J. (2017). Non-Cholera Vibrios: The Microbial Barometer of Climate Change. *Trends in Microbiology*, 25(1), 76–84.
- Bañuelos-Hernández, B., Monreal-Escalante, E., González-Ortega, O., Angulo, C., & Rosales-Mendoza, S. (2017). Algevir: An expression system for microalgae based on viral vectors. *Frontiers in Microbiology*, 8(6), 1–6.
- Bayne, A. C. v., Boltz, D., Owen, C., Betz, Y., Maia, G., Azadi, P., Archer-Hartmann, S., Zirkle, R., & Lippmeier, J. C. (2013). Vaccination against Influenza with Recombinant Hemagglutinin Expressed by *Schizochytrium* sp. Confers Protective Immunity. *PLoS ONE*, 8(4).
- Belkin, S., & Colwell, R. R. (2005). *Vibrio parahaemolyticus* Seafood Safety and Associations with Higher Organisms. In *Oceans and Health Pathogens in the Marine Environment* (pp. 277–290). Springer US.

- Birnboim, H. C., & Doly, J. (1979). A rapid alkaline extraction procedure for screening plasmid recombinant DNA. *Nucleic Acid Res*, 7, 15–19.
- Bowie, J. U., Lüthy, R., & Eisenberg, D. (1991). A Method to Identify Protein Sequences That Fold into a Known Three-Dimensional Structure. *Science*, 253(5016), 164–170.
- Broberg, C. A., Zhang, L., Gonzalez, H., Laskowski-Arce, M. A., & Orth, K. (2010). A *Vibrio* effector protein is an inositol phosphatase and disrupts host cell membrane integrity. *Science*, 329(5999), 1660–1662.
- Burdette, D. L., Seemann, J., & Orth, K. (2009). *Vibrio* VopQ induces Pu-kmase-independent autophagy and antagonizes phagocytosis. *Molecular Microbiology*, 73(4), 639–649.
- Cabanillas-Beltrán, H., Llausás-Magaña, E., Romero, R., Espinoza, A., García-Gasca, A., Nishibuchi, M., Ishibashi, M., & Gomez-Gil, B. (2006). Outbreak of gastroenteritis caused by the pandemic *Vibrio parahaemolyticus* O3:K6 in Mexico. *FEMS Microbiology Letters*, 265(1), 76–80.
- Cabrera-García, M. E., Vázquez-Salinas, C., & Quiñones-Ramírez, E. I. (2004). Serologic and molecular characterization of *Vibrio parahaemolyticus* strains isolated from seawater and fish products of the Gulf of Mexico. *Applied and Environmental Microbiology*, 70(11), 6401–6406.
- Campa-Córdova, A. I., León-Gallo, A. F., Romero-Maldonado, A., Ibarra-Serrano, A. C., Rosales-Mendoza, S., Hirono, I., & Angulo, C. (2017). Recombinant PirA-like toxin protects shrimp against challenge with *Vibrio parahaemolyticus*, the aetiological agent of acute hepatopancreatic necrosis disease. *Journal of Fish Diseases*, 16, 1–5.
- Centers for Disease Control and Prevention. (2021). *Foodborne Diseases Active Surveillance Network: Pathogen Surveillance*. CDC.
- Chen, L., Qi, X., Liang, D., Li, G., Peng, X., Li, X., Ke, B., Zheng, H., Liu, Z., Ke, C., Liao, G., Liu, L., & Feng, Q. (2022). Human Fc-Conjugated Receptor Binding Domain-Based Recombinant Subunit Vaccines with Short Linker Induce Potent Neutralizing Antibodies against Multiple SARS-CoV-2 Variants. *Vaccines*, 10(9), 1502.
- Chou, P. Y., & Fasman, G. D. (1978). Prediction of the secondary structure of proteins from their amino acid sequence. *Advances in Enzymology and Related Areas of Molecular Biology*, 47, 45–148.
- Clements, J. D. (1990). Construction of a Nontoxic Fusion Peptide for Immunization against *Escherichia coli* Strains That Produce Heat-Labile and Heat-Stable Enterotoxins. *INFECTION AND IMMUNITY*, 58(5), 1159–1166.
- Colovos, C., & Yeates, T. O. (1993). Verification of protein structures: Patterns of nonbonded atomic interactions. *Protein Science*, 2(9), 1511–1519.
- Czerkinsky, C., & Holmgren, J. (2015). Vaccines against enteric infections for the developing world. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 370(1671).

- Souza Valente, C., & Wan, A. H. L. (2021). *Vibrio* and major commercially important vibriosis diseases in decapod crustaceans. *Journal of Invertebrate Pathology*, 181(5).
- Drake, S. L., Depaola, A., & Jaykus, L. (2007). An Overview of *Vibrio vulnificus* and *Vibrio parahaemolyticus*. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 6(4), 120–144.
- Eisen, H. N., Hou, X. H., Shen, C., Wang, K., Tanguturi, V. K., Smith, C., Kozyrytska, K., Nambiar, L., McKinley, C. A., Chen, J., & Cohen, R. J. (2012). Promiscuous binding of extracellular peptides to cell surface class I MHC protein. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 109(12), 4580–4585.
- Elbashir, S., Parveen, S., Schwarz, J., Rippen, T., Jahncke, M., & DePaola, A. (2018). Seafood pathogens and information on antimicrobial resistance: A review. *Food Microbiology*, 70, 85–93.
- El-Manzalawy, Y., Dobbs, D., & Honavar, V. (2008). Predicting linear B-cell epitopes using string kernels. *Journal of Molecular Recognition*, 21(4), 243–255.
- Emini, E. A., Hughes, J. v, Perlow, D. S., & Boger, J. (1985). Induction of Hepatitis A Virus-Neutralizing Antibody by a Virus-Specific Synthetic Peptide. *Journal of Virology*, 55, 836–839.
- Franco-Monsreal, J., & Flores-Abuxapqui, J. (1989). Prevalencia de *Vibrio parahaemolyticus* en alimentos marinos de restaurantes de la ciudad de Mérida, Yucatán. *Salud Pública de México*, 31(1), 314–325.
- Gasteiger, E., Hoogland, C., Gattiker, A., Duvaud, S., Wilkins, M. R., Appel, R. D., & Bairoch, A. (2005). Protein Identification and Analysis Tools on the ExPASy Server. In *The Proteomics Protocols Handbook* (pp. 571–607). Humana Press.
- Ghenem, L., Elhadi, N., Alzahrani, F., & Nishibuchi, M. (2017). *Vibrio Parahaemolyticus*: A Review on Distribution, Pathogenesis, Virulence Determinants and Epidemiology. *Saudi Journal of Medicine & Medical Sciences*, 93–103.
- Gong, Y., Hu, H., Gao, Y., Xu, X., & Gao, H. (2011). Microalgae as platforms for production of recombinant proteins and valuable compounds: Progress and prospects. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 38(12), 1879–1890.
- Greenbaum, J., Sidney, J., Chung, J., Brander, C., Peters, B., & Sette, A. (2011). Functional classification of class II human leukocyte antigen (HLA) molecules reveals seven different supertypes and a surprising degree of repertoire sharing across supertypes. *Immunogenetics*, 63(6), 325–335.
- Guo, L., Li, X., Tang, F., He, Y., Xing, Y., Deng, X., & Xi, T. (2012). Immunological features and the ability of inhibitory effects on enzymatic activity of an epitope vaccine composed of cholera toxin B subunit and B cell epitope from *Helicobacter pylori* urease A subunit. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 93(5), 1937–1945.
- Hager, K. J., Pérez Marc, G., Gobeil, P., Diaz, R. S., Heizer, G., Llapur, C., Makarkov, A. I., Vasconcellos, E., Pillet, S., Riera, F., Saxena, P., Geller Wolff, P., Bhutada, K., Wallace, G.,

- Aazami, H., Jones, C. E., Polack, F. P., Ferrara, L., Atkins, J., ... Ward, B. J. (2022). Efficacy and Safety of a Recombinant Plant-Based Adjuvanted Covid-19 Vaccine. *New England Journal of Medicine*, 386(22), 2084–2096.
- Heitmann, G. I., Jofré M., L., Hormazabal O., J. C., Olea N., A., Vallebuonas S., C., & Valdés H., C. (2005). Revisión y recomendaciones para el manejo de diarrea por *Vibrio parahaemolyticus*. *Revista Chilena de Infectología*, 22(2), 131–140.
- Hernández-Díaz, L. de J., Leon-Sicairos, N., Velazquez-Roman, J., Flores-Villaseñor, H., Guadron-Llanos, A. M., Javier Martinez-Garcia, J., Vidal, J. E., & Canizalez-Roman, A. (2015). A pandemic *Vibrio parahaemolyticus* O3:K6 clone causing most associated diarrhea cases in the Pacific Northwest coast of Mexico. *Frontiers in Microbiology*, 6, 1–11.
- Huyen, V. T. B., Viet, N. X., Tam, P. T., Phuoc, M. H., Tung, H. V., Quang, N. D., & Van, D. T. (2020). Development of attenuated *vibrio parahaemolyticus* mutant strains as potential live vaccines. *Asia-Pacific Journal of Molecular Biology and Biotechnology*, 28(1), 52–67.
- Jafari, E., & Mahmoodi, S. (2021). Design, expression, and purification of a multi-epitope vaccine against *Helicobacter Pylori* based on Melittin as an adjuvant. *Microbial Pathogenesis*, 157.
- Jespersen, M. C., Peters, B., Nielsen, M., & Marcatili, P. (2017). BepiPred-2.0: Improving sequence-based B-cell epitope prediction using conformational epitopes. *Nucleic Acids Research*, 45(W1), W24–W29.
- Ji, Q., Wang, S., Ma, J., & Liu, Q. (2020). A review: Progress in the development of fish *Vibrio* spp. vaccines. *Immunology Letters*, 226(7), 46–54.
- Karplus, P. A., & Schulz, G. E. (1985). Prediction of Chain Flexibility in Proteins. *Naturwissenschaften*, 72, 212–213.
- Khan, M., Khan, S., Ali, A., Akbar, H., Sayaf, A. M., Khan, A., & Wei, D. Q. (2019). Immunoinformatics approaches to explore *Helicobacter pylori* proteome (Virulence Factors) to design B and T cell multi-epitope subunit vaccine. *Scientific Reports*, 9(1), 1–13.
- Ki, M.-R., & Pack, S. P. (2020). Fusion tags to enhance heterologous protein expression. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 104(6), 2411–2425.
- Kim, D. E., Chivian, D., & Baker, D. (2004). Protein structure prediction and analysis using the Robetta server. *Nucleic Acids Research*, 32, W526–W531.
- Klauer, S. F., & Franceschi, V. R. (1997). Mechanism of transport of vegetative storage proteins to the vacuole of the paraveinal mesophyll of soybean leaf. *Protoplasma*, 200(3–4), 174–185.
- Kolaskar, A. S., & Tongaonkar, P. C. (1990). A semi-empirical method for prediction of antigenic determinants on protein antigens. *FEBS*, 276, 172–174.
- Laskowski, R. A., MacArthur, M. W., Moss, D. S., & Thornton, J. M. (1993). PROCHECK: a program to check the stereochemical quality of protein structures. *Journal of Applied Crystallography*, 26(2), 283–291.

- Lee, G. R., Won, J., Heo, L., & Seok, C. (2019). GalaxyRefine2: simultaneous refinement of inaccurate local regions and overall protein structure. *Nucleic Acids Research*, 47(W1), W451–W455.
- León-Sicairos, N., Zatarain-Lopez, R., Angulo-Zamudio, U. A., Velazquez-Roman, J., Flores-Villaseñor, H., Martinez-Garcia, J. J., Moreno-Pérez, M. A., Buelna-Romero, A., Hernández-Monroy, I., Lopez-Martinez, I., Cuen-Diaz, H. M., Diaz-Quiñonez, J. A., & Canizalez-Roman, A. (2022). *Vibrio parahaemolyticus* Is Associated with Diarrhea Cases in Mexico, with a Dominance of Pandemic O3:K6 Clones. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 19(16).
- Letchumanan, V., Loo, K.-Y., Woan-Fei Law, J., Hei Wong, S., Goh, B.-H., Ab Mutalib, N.-S., Lee, L.-H., Sunway, B., Darul Ehsan, S., Ka Shing, L., & Cheah, J. (2019). *Vibrio parahaemolyticus*: The Protagonist Causing Foodborne Diseases. *Progress in Microbes and Molecular Biology*, 2(1), 1–8.
- Li, C., Ye, Z., Wen, L., Chen, R., Tian, L., Zhao, F., & Pan, J. (2014). Identification of a novel vaccine candidate by immunogenic screening of *Vibrio parahaemolyticus* outer membrane proteins. *Vaccine*, 32(46), 6115–6121.
- Liu, R., Chen, J., Li, K., & Zhang, X. (2011). Identification and evaluation as a DNA vaccine candidate of a virulence-associated serine protease from a pathogenic *Vibrio parahaemolyticus* isolate. *Fish and Shellfish Immunology*, 30(6), 1241–1248.
- Liverman, A. D. B., Cheng, H. C., Trosky, J. E., Leung, D. W., Yarbrough, M. L., Burdette, D. L., Rosen, M. K., & Orth, K. (2007). Arp2/3-independent assembly of actin by *Vibrio* type III effector VopL. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 104(43), 17117–17122.
- López-Hernández, K. M., Pardío-sedas, V. T., & Williams, J. D. J. (2014). Evaluación del riesgo microbiológico a *Vibrio* spp. en alimentos de origen marino en México. *Salud Pública de México*, 56(3), 295–301.
- Lovell, J. F., Baik, Y. O., Choi, S. K., Lee, C., Lee, J.-Y., Miura, K., Huang, W.-C., Park, Y.-S., Woo, S.-J., Seo, S. H., Kim, J.-O., Song, M., Kim, C.-J., Choi, J.-K., Kim, J., Choo, E. J., & Choi, J.-H. (2022). Interim analysis from a phase 2 randomized trial of EuCorVac-19: a recombinant protein SARS-CoV-2 RBD nanoliposome vaccine. *BMC Medicine*, 20(1), 462.
- Lun, J., Xia, C., Yuan, C., Zhang, Y., Zhong, M., Huang, T., & Hu, Z. (2014). The outer membrane protein, LamB (maltoporin), is a versatile vaccine candidate among the *Vibrio* species. *Vaccine*, 32(7), 809–815.
- Maiti, B., Dubey, S., Munang'andu, H. M., Karunasagar, I., Karunasagar, I., & Evensen, Ø. (2020). Application of Outer Membrane Protein-Based Vaccines Against Major Bacterial Fish Pathogens in India. *Frontiers in Immunology*, 11(7).

- Mao, Z., Yu, L., You, Z., Wei, Y., & Liu, Y. (2007). Cloning, expression and immunogenicity analysis of five outer membrane proteins of *Vibrio parahaemolyticus* zj2003. *Fish and Shellfish Immunology*, 23(3), 567–575.
- Márquez-Escobar, V. A., Bañuelos-Hernández, B., & Rosales-Mendoza, S. (2018). Expression of a Zika virus antigen in microalgae: Towards mucosal vaccine development. *Journal of Biotechnology*, 282, 86–91.
- Merlin, M., Pezzotti, M., & Avesani, L. (2017). Edible plants for oral delivery of biopharmaceuticals. *British Journal of Clinical Pharmacology*, 83(1), 71–81.
- Monreal-Escalante, E., Rosales-Mendoza, S., Govea-Alonso, D. O., Campa-Córdova, Á. I., & Angulo, C. (2019). Genetically-engineered plants yield an orally immunogenic PirA-like toxin from *Vibrio parahaemolyticus*. *International Journal of Biological Macromolecules*, 137, 126–131.
- Nelapati, S., Nelapati, K., & Chinnam, B. K. (2012). *Vibrio parahaemolyticus*- An emerging foodborne pathogen-A Review. *Veterinary World*, 5(1), 48–63.
- Ortega-Berlanga, B., Bañuelos-Hernández, B., & Rosales-Mendoza, S. (2018). Efficient Expression of an Alzheimer's Disease Vaccine Candidate in the Microalga *Schizochytrium* sp. Using the Algevir System. *Molecular Biotechnology*, 0123456789, 1–7.
- Oscherwitz, J. (2016). The promise and challenge of epitope-focused vaccines. In *Human Vaccines and Immunotherapeutics* (Vol. 12, Issue 8, pp. 2113–2116). Taylor and Francis Inc.
- Parker JM, Guo D, & Hodges RS. (1986). New hydrophilicity scale derived from high-performance liquid chromatography peptide retention data: correlation of predicted surface residues with antigenicity and X-ray-derived accessible sites. *Biochemistry*, 25, 5425–5432.
- Peng, B., Ye, J. Z., Han, Y., Zeng, L., Zhang, J. Y., & Li, H. (2016). Identification of polyvalent protective immunogens from outer membrane proteins in *Vibrio parahaemolyticus* to protect fish against bacterial infection. *Fish and Shellfish Immunology*, 54, 204–210.
- Praja, R. K., & Safnurbaiti, D. P. (2018). The infection of *Vibrio parahaemolyticus* in shrimp and human. *Oceana Biomedicina Journal*, 1(1), 44.
- Raghunath, P. (2014). Roles of thermostable direct hemolysin (TDH) and TDH-related hemolysin (TRH) in *Vibrio parahaemolyticus*. *Frontiers in Microbiology*, 5(12), 2–6.
- Ramos-Vega, A., Monreal-Escalante, E., Dumonteil, E., Bañuelos-Hernández, B., & Angulo, C. (2021). Plant-made vaccines against parasites: bioinspired perspectives to fight against Chagas disease. *Expert Review of Vaccines*, 20(11), 1373–1388.
- Ramos-Vega, A., Rosales-Mendoza, S., Bañuelos-Hernández, B., & Angulo, C. (2018). Prospects on the use of *Schizochytrium* sp. to develop oral vaccines. *Frontiers in Microbiology*, 9.
- Reyes-Becerril, M., Maldonado-garcía, M., Guluarte, C., Rosales-mendoza, S., Ascencio, F., Hirono, I., Le, A., & Angulo, C. (2016). Evaluation of ToxA and *Vibrio parahaemolyticus* lysate on

- humoral immune response and immune-related genes in Pacific red snapper. *Fish & Shellfish Immunology*, 56, 310–321.
- Romero-Maldonado, A., Monreal-Escalante, E., & Rosales-Mendoza, S. (2016). Expression in plants of two new antigens with implications in Alzheimer's disease immunotherapy. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)*, 126(2), 361–370.
- Rosales-Mendoza, S., García-Silva, I., González-Ortega, O., Sandoval-Vargas, J. M., Malla, A., & Vimolmangkang, S. (2020). The Potential of Algal Biotechnology to Produce Antiviral Compounds and Biopharmaceuticals. *Molecules*, 25(18), 1–25.
- Rosales-Mendoza, S., & Tello-Olea, M. A. (2015). Carrot Cells: A Pioneering Platform for Biopharmaceuticals Production. *Molecular Biotechnology*, 57(3), 219–232.
- Sambrook, J., Fritsch, E. R., & Maniatis, T. (1989). *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* (2nd ed.). Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Sánchez-Trincado, J. L., Gomez-Perosanz, M., & Reche, P. A. (2017). Fundamentals and Methods for T- and B-Cell Epitope Prediction. *Journal of Immunology Research*, 2017, 1–14.
- Saunders, N. B., Shoemaker, D. R., Brandt, B. L., Moran, E. E., Larsen, T., & Zollinger, W. D. (1999). Immunogenicity of intranasally administered meningococcal native outer membrane vesicles in mice. *Infection and Immunity*, 67(1), 113–119.
- Secretaría de Salud. (2013). *NORMA OFICIAL MEXICANA NOM-017-SSA2-2012, PARA LA VIGILANCIA EPIDEMIOLÓGICA*.
- Soria-Guerra, R. E., Nieto-Gomez, R., Govea-Alonso, D. O., & Rosales-Mendoza, S. (2015). An overview of bioinformatics tools for epitope prediction: Implications on vaccine development. In *Journal of Biomedical Informatics* (Vol. 53, pp. 405–414). Academic Press Inc.
- Su, Y. C., & Liu, C. (2007). *Vibrio parahaemolyticus*: A concern of seafood safety. *Food Microbiology*, 24(6), 549–558.
- Tahir, M. ul Q., Ahmad, S., Fatima, I., Ahmad, F., Shahid, F., Naz, A., Abbasi, S. W., Khan, A., Mirza, M. U., Ashfaq, U. A., & Chen, L. L. (2021). Designing multi-epitope vaccine against *Staphylococcus aureus* by employing subtractive proteomics, reverse vaccinology and immunoinformatics approaches. *Computers in Biology and Medicine*, 132.
- Tahir, M. U. Q., Ismail, S., Ahmad, S., Mirza, M. U., Abbasi, S. W., Ashfaq, U. A., & Chen, L. L. (2021). Development of a Novel Multi-Epitope Vaccine Against Crimean-Congo Hemorrhagic Fever Virus: An Integrated Reverse Vaccinology, Vaccine Informatics and Biophysics Approach. *Frontiers in Immunology*, 12.
- Tauxe, R. V. (2002). Emerging foodborne pathogens. *International Journal of Food Microbiology*, 78(1–2), 31–41.
- Tremblay, R., Wang, D., Jevnikar, A. M., & Ma, S. (2010). Tobacco, a highly efficient green bioreactor for production of therapeutic proteins. *Biotechnology Advances*, 28(2), 214–221.

- Wang, R., Zhong, Y., Gu, X., Yuan, J., Saeed, A. F., & Wang, S. (2015). The pathogenesis, detection, and prevention of *Vibrio parahaemolyticus*. *Frontiers in Microbiology*, 6, 1–13.
- Yan, N., Fan, C., Chen, Y., & Hu, Z. (2016). The potential for microalgae as bioreactors to produce pharmaceuticals. *International Journal of Molecular Sciences*, 17(6), 1–24.
- Yang, Z., Bogdan, P., & Nazarian, S. (2021). An in silico deep learning approach to multi-epitope vaccine design: a SARS-CoV-2 case study. *Scientific Reports*, 11(1), 3238.
- Zamora-Pantoja, D. R., Quiróz-Santiago, C., & Quiñónez-Ramírez, E. I. (2005). Un enemigo marino silencioso *Vibrio Parahaemolyticus*. *Revista Digital Universitaria*, 6(4), 1–9.
- Zhou, X., Gewurz, B. E., Ritchie, J. M., Takasaki, K., Greenfeld, H., Kieff, E., Davis, B. M., & Waldor, M. K. (2013). A *Vibrio parahaemolyticus* T3SS Effector Mediates Pathogenesis by Independently Enabling Intestinal Colonization and Inhibiting TAK1 Activation. *Cell Reports*, 3(5), 1690–1702.