

## Producción de anticuerpos en ratones inmunizados con la Toxina A producida en la microalga *Schizochytrium* sp.

Fernanda Valadez, Elizabeth Monreal-Escalante, Carlos Angulo

Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, S.C. Grupo de Inmunología y Vacunología, eangulo@cibnor.mx.

### Biotecnología y Ciencias Agropecuarias

#### Abstract

Recent studies have reported *V. parahaemolyticus* strains resistant to antibiotics, highlighting the need for prevention, control, and treatment. The PirA-like toxin (ToxA) of *V. parahaemolyticus* has been identified as a vaccine antigen. This study aimed to determine the immunogenicity of the ToxA produced in the microalga *Schizochytrium* sp. in a mouse model. Four groups of mice (n=5 per group) were orally and subcutaneously immunized on days 1, 8, 15, and 22 with the whole *Schizochytrium* sp.:ToxA or the wild-type microalgal strain (WT). Blood and fecal samples were collected on days 28 and 58 to quantify antibody levels. The vaccine induced specific IgA and IgG levels against ToxA in immunized mice through oral and subcutaneous routes. In conclusion, *Schizochytrium* sp.:ToxA is an immunogenic vaccine prototype that could combat *V. parahaemolyticus* infection.

**Keywords:** Animal health, immune system, bacterial diseases, vaccine candidate.

#### Resumen

Estudios recientes han informado sobre cepas de *V. parahaemolyticus* resistentes a antibióticos, resaltando la necesidad de prevención, control y tratamiento. La toxina similar a PirA (ToxA) de *V. parahaemolyticus* se ha identificado como un antígeno de vacuna. Este estudio tuvo como objetivo determinar la inmunogenicidad de la ToxA producida en la microalga *Schizochytrium* sp. en modelo de ratón. Los cuatro grupos de ratones (n=5 por grupo) fueron inmunizados por la vía oral y subcutánea los días 1, 8, 15 y 22 con *Schizochytrium* sp.:ToxA o la cepa silvestre (WT). Se recogieron muestras de sangre y heces en los días 28 y 58 para cuantificar los niveles de anticuerpos. La vacuna indujo niveles específicos de IgA e IgG contra ToxA en ratones inmunizados tanto por vía oral como subcutánea. En conclusión, *Schizochytrium* sp.:ToxA es un prototipo de vacuna inmunogénica que podría ser utilizado para combatir la infección por *V. parahaemolyticus*.

**Palabras clave:** Salud animal, sistema inmune, enfermedades bacterianas, candidato vacunal.

#### Problemática

Las investigaciones han identificado cepas de *V. parahaemolyticus* resistentes a antibióticos. No existe una vacuna disponible para prevenir la infección causada por este patógeno.

#### Usuarios

Comités de Sanidad Animal, Productores primarios, Secretaría de Agricultura y Desarrollo Rural (SADER), Servicio Nacional de Salud Animal, Inocuidad y Calidad Agroalimentaria.

#### Introducción

*Vibrio parahaemolyticus* es una bacteria Gram negativa que causa la enfermedad llamada vibriosis en organismos acuáticos y se asocia a gastroenteritis aguda en humanos por consumo de mariscos (Letchumanan, Chan & Lee, 2014). Las investigaciones recientes han reportado aislamientos de *V. parahaemolyticus* resistentes a antibióticos (Zhang et al, 2024), lo que demuestra la necesidad de buscar nuevas estrategias de prevención, control y tratamiento. Las vacunas recombinantes producidas en microalgas y administradas oralmente pueden proteger contra diversas enfermedades (Specht & Mayfield, 2014; Ramos-Vega et al., 2018). Recientemente se reportó que la inmunización de

#### Conclusiones

La microalga *Schizochytrium* sp. es capaz de producir la ToxA y su administración por vía oral y subcutánea en ratones BALB/c indujo una respuesta humoral mediante la producción de anticuerpos IgG e IgA detectada en heces y suero sanguíneo. En general, la producción de IgG en suero fue mayor en el grupo inmunizado por la vía subcutánea, mientras que la producción de IgA fue mayor en la mucosa intestinal en el grupo inmunizado por la vía oral.

#### Impacto Socioeconómico

La microalga *Schizochytrium* sp. es una alternativa para la producción de vacunas de interés. Esta plataforma destaca sobre otras por su facilidad de cultivo y la posibilidad de evitar o reducir el costo de la cadena en frío de las vacunas. Por otra parte, la tasa de mortalidad de animales acuáticos (peces, crustáceos y bivalvos) por vibriosis genera pérdidas económicas para los productores. Por ejemplo, en 2013, se reportó una fuerte incidencia de esta enfermedad en la región noroeste del país, ocasionando pérdidas económicas sustanciales y reduciendo la producción nacional en un 60%, Aguilar y Soto-Rodríguez, (2018). Esta enfermedad continúa siendo un riesgo crítico global, con alta prevalencia en la región asiática (Devadas et al. 2019). Por lo que una perspectiva de esta propuesta contra dicho patógeno sería su evaluación como vacuna en crustáceos, como una opción para prevenir enfermedades relacionadas y evitar la transmisión por alimentos al humano.

Artículo completo en <https://pcti.mx>  
Contacto PCTI: [hnlascosoria@gmail.com](mailto:hnlascosoria@gmail.com)

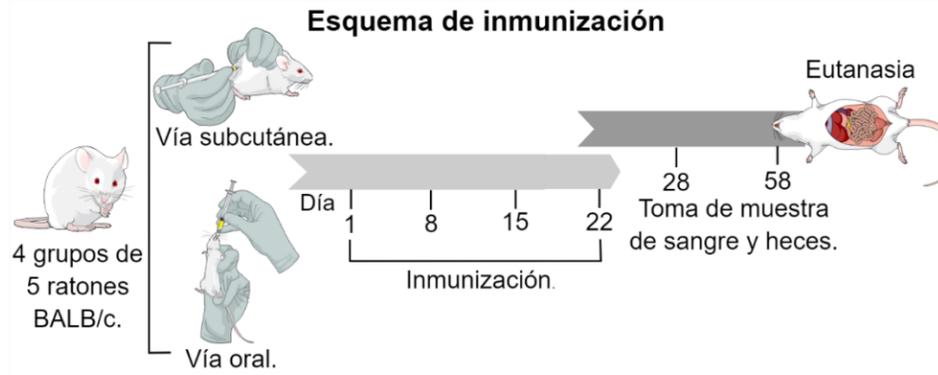


Figura 1. Esquema de inmunización para la evaluación de la inmunogenicidad de ToxA producida por *Schizochytrium* sp. en ratones de la línea BALB/c de 6 a 8 semanas de edad.

peces con la toxina similar a PirA (ToxA) purificada estimuló el sistema inmune innato e indujo la producción de anticuerpos IgA e IgG, proporcionando protección contra *V. parahaemolyticus* (Reyes-Becerril et al, 2017; Reyes-Becerril et al, 2016). La exploración de la respuesta inmune de ToxA producida en microalgas, evaluada en modelos mamíferos contribuiría a robustecer la posibilidad de su uso como vacuna en humanos.

#### Objetivos

Determinar la inmunogenicidad de la ToxA producida en la microalga *Schizochytrium* sp. en modelo de ratón.

#### Materiales y Métodos

**Producción de la Toxina A en la microalga *Schizochytrium* sp.** La transformación transitoria de *Schizochytrium* sp. mediante *Agrobacterium tumefaciens* se llevó a cabo conforme el protocolo descrito por Bañuelos-Hernández et al (2017). El cultivo se recuperó a las 48 h post-inducción por centrifugación (13,723 x g por 15 min). La biomasa total recuperada se liofilizó a -80° C por 8 h. Posteriormente, la proteína total (PT) se extrajo a partir de la biomasa liofilizada (Franklin et al, 2002) y se cuantificó por el método de Bradford (Waterborg y Matthews, 1994). El antígeno recombinante se visualizó por la técnica Western blot, previa electroforesis en gel de poliacrilamida SDS-PAGE al 12% (120 V por 3 h en frío) utilizando 20 µg de ToxA (35 µl de muestra y 5 µl de buffer de carga 5x) y sueros policlonales obtenidos previamente de ratones inmunizados con la ToxA purificada siguiendo el método descrito por Monreal-Escalante et al. (2019). Los niveles de ToxA en la microalga *Schizochytrium* sp. se cuantificaron usando los anticuerpos policlonales de suero anti-ToxA por ELISA indirecto (Monreal-Escalante et al., 2019).

**Evaluación inmunogénica de la Toxina A producida en la microalga *Schizochytrium* sp.** Cuatro grupos de ratones BALB/c (n=5 por grupo) fueron inmunizados por la vía oral (10 µg/ratón de ToxA) y subcutánea (5 µg/ratón) los días 1, 8, 15 y 22 con la microalga productora de la ToxA (grupo ToxA) o usando la microalga silvestre (WT) como control negativo. Los días 28 y 58 se tomaron muestras de sangre y heces para cuantificar los niveles de anticuerpos IgA e IgG mediante ELISA indirecto (Monreal-Escalante et al., 2019) (Figura 1).

#### Resultados y Discusión

La evaluación en ratones BALB/c demostró que la ToxA producida en la microalga *Schizochytrium* sp. es inmunogénica por la vía oral, ya que indujo la producción significativa de anticuerpos específicos IgA anti-ToxA a nivel de mucosa intestinal en el día 28 (Figura 2a). Este efecto también se observó a largo plazo (día 58), indicando la posible inducción de memoria inmunológica (Figura 2a). Como se esperaba, la administración de la ToxA producida en la microalga *Schizochytrium* sp. por vía subcutánea en ratones no estimuló la producción de IgA en la mucosa intestinal (Figura 2b). La producción de anticuerpos IgG anti-ToxA en suero fueron mayores en los ratones inmunizados vía oral y subcutánea con la microalga productora de la ToxA respecto al grupo de animales control que se les administró la microalga silvestre (WT) al día 28 (Figura 3a,b). El nivel de anticuerpos IgG anti-ToxA en suero a largo

plazo (día 58) disminuyó en todos los grupos; sin embargo, fue superior en los ratones inmunizados vía oral y subcutánea con la microalga productora de la ToxA. En el estudio realizado por Reyes-Becerril et al. (2016, 2017), la ToxA administrada en el huachinango del Pacífico (*Lutjanus peru*) y la Dorada (*Sparus aurata*) estimuló el sistema inmune de los peces. En otro estudio, Monreal-Escalante et al. (2019) reportaron que ratones BALB/c que recibieron por la vía oral la ToxA producida en plantas de tabaco (*Nicotiana tabacum*) produjeron anticuerpos específicos contra la toxina, pero no se logró demostrar la presencia de anticuerpos a largo plazo. Aunque estos resultados fueron prometedores, consideramos necesario evaluar la respuesta inmune de ToxA en una plataforma comestible con el propósito de explorar su papel como prototipo de vacuna oral.

### Anticuerpos IgA anti-ToxA en heces de ratón.

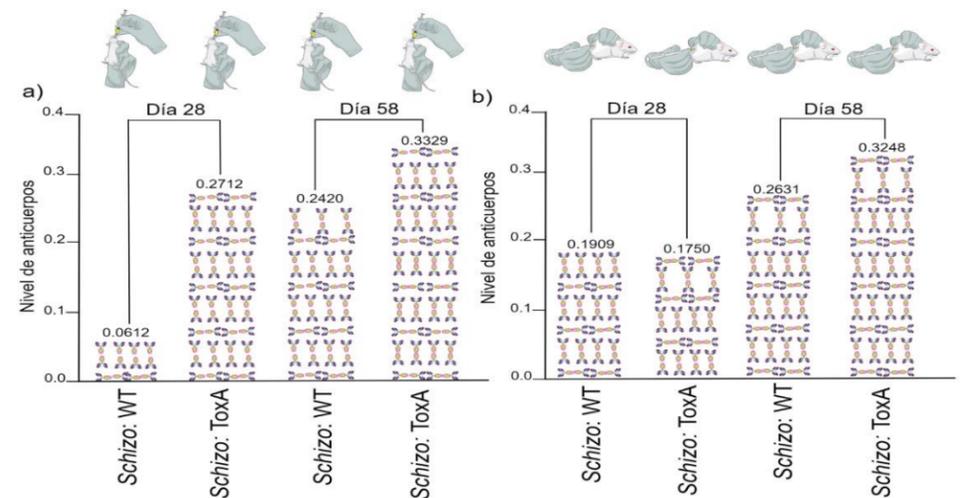


Figura 2. Producción de inmunoglobulina A anti-ToxA en heces de ratón BALB/c por la vía a) oral días 28 y 58 (largo plazo) y b) subcutánea días 28 y 58 (largo plazo). Schizo: WT = *Schizochytrium* sp.-Silvestre; Schizo: ToxA = *Schizochytrium* sp.-Transgénica. Observándose diferencia significativa entre los grupos p<0.05

### Anticuerpos IgG anti-ToxA en suero de ratón.

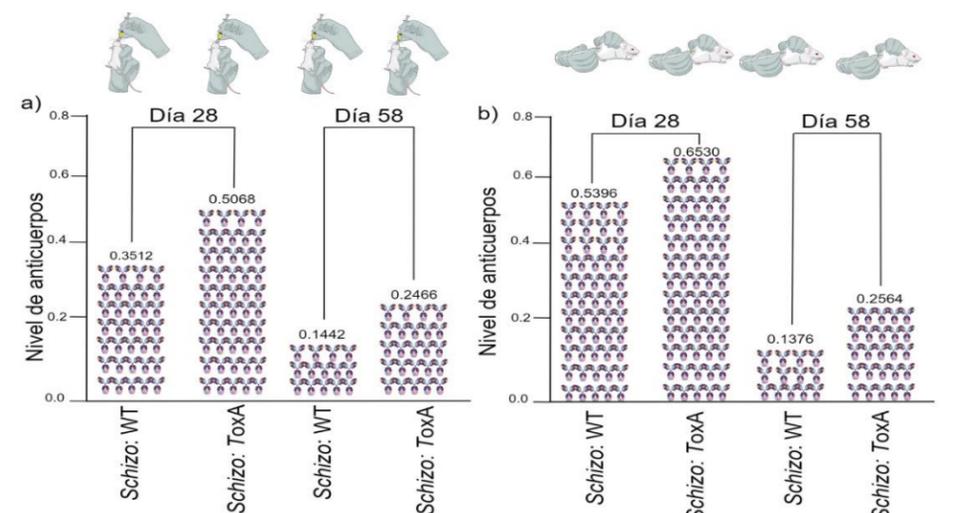


Figura 3. Producción de inmunoglobulina G anti-ToxA en suero de ratón BALB/c por la vía a) oral día 28 y 58 (largo plazo) y b) subcutánea día 28 y 58 (largo plazo). Schizo: WT = *Schizochytrium* sp.-Silvestre; Schizo: ToxA = *Schizochytrium* sp.-Transgénica.