



CENTRO DE INVESTIGACIONES BIOLÓGICAS
DEL NOROESTE, S.C.

Programa de Estudios de Posgrado

**DESARROLLO DE UNA VACUNA MULTIEPITÓPICA
EXPRESADA EN TEJIDO VEGETAL COMPUESTA DE
DETERMINANTES ANTIGÉNICOS DE BACTERIAS
ENTEROPATÓGENAS.**

T E S I S

Que para obtener el grado de

Doctor en Ciencias

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

P r e s e n t a

Edgar Asdrúbal Trujillo García

La Paz, Baja California Sur, noviembre de 2020.

ACTA DE LIBERACIÓN DE TESIS

En la Ciudad de La Paz, B. C. S., siendo las **16:30** horas del día **06** del Mes de **Noviembre** del **2020**, se procedió por los abajo firmantes, miembros de la Comisión Revisora de Tesis avalada por la Dirección de Estudios de Posgrado y Formación de Recursos Humanos del Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, S. C., a liberar la Tesis de Grado titulada:

"DESARROLLO DE UNA VACUNA MULTIEPITÓPICA EXPRESADA EN TEJIDO VEGETAL COMPUESTA DE DETERMINANTES ANTIGÉNICOS DE BACTERIAS ENTEROPATÓGENAS"

Presentada por el alumno:

Edgar Asdrúbal Trujillo García

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

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

LA COMISIÓN REVISORA



Dr. Carlos Eliud Angulo Valadez
Director de Tesis



Dr. Sergio Rosales Mendoza
Co-Tutor



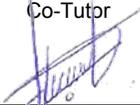
Dra. Luvia Enid Sánchez Torres
Co-Tutora



Dr. Hugo Esquivel Solís
Co-Tutor



Dr. Ángel Isidro Campa Córdova
Co-Tutor



Dra. Gracia Alicia Gómez Anduro,
Directora de Estudios de Posgrado y
Formación de Recursos Humanos

Conformación de Comités

Comité Tutorial

Dr. Carlos Eliud Angulo Valadez
Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste S.C.
Director de Tesis

Dra. Luvia Enid Sánchez Torres
Instituto Politécnico Nacional
Co-tutora

Dr. Sergio Rosales Mendoza
Universidad Autónoma de San Luis Potosí
Co-tutor

Dr. Hugo Esquivel Solís
Centro de Investigación y Asistencia en Tecnología y Diseño del Estado de Jalisco
A.C.
Co-tutor

Dr. Ángel Isidro Campa Córdova
Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste S.C.
Co-tutor

Comité Revisor de Tesis

Dr. Carlos Eliud Angulo Valadez
Dra. Luvia Enid Sánchez Torres
Dr. Sergio Rosales Mendoza
Dr. Hugo Esquivel Solís
Dr. Ángel Isidro Campa Córdova

Jurado de Examen

Dr. Carlos Eliud Angulo Valadez
Dra. Luvia Enid Sánchez Torres
Dr. Sergio Rosales Mendoza
Dr. Hugo Esquivel Solís
Dr. Ángel Isidro Campa Córdova

Suplentes

Dra. Elizabeth Monreal Escalante
Dr. Abraham Loera Muro

Resumen

A nivel mundial se estima que cerca de 1.7 millones de personas mueren al año a causa de enfermedades relacionadas con la diarrea, principalmente en países en vías de desarrollo. La vacunación es una alternativa para el control de este tipo de problemas de salud pública global. Sin embargo, se requieren nuevas vacunas de bajo costo, accesibles y fácil administración para cubrir las necesidades a nivel mundial. En este contexto, las plantas son una plataforma atractiva para la síntesis y entrega de subunidades vacunales, y aparecen como una alternativa para disminuir los costos de producción, almacenamiento y administración de agentes vacunales para este tipo de enfermedades. Por lo tanto, el objetivo de este trabajo fue desarrollar una vacuna multiepitópica expresada en células vegetales compuesta por epítopes de antígenos de las bacterias *Escherichia coli* enterotoxigénica, *Vibrio cholerae*, *Salmonella typhimurium* y *Vibrio parahaemolyticus*, que fuera inmunogénica y capaz de conferir protección ante un reto con estos patógenos entéricos. Se diseñaron dos genes que codifican para las proteínas multiepitópicas (LTBentero y ToxAentero) compuestas de epítopes de los antígenos: LT de *E. coli* ETEC, CT de *V. cholerae*, LptD de *V. parahaemolyticus* y FliC de *S. typhimurium*. La proteína LTBentero acoplada a la secuencia de LTB y la proteína ToxAentero a la secuencia de ToxA, ambas con función de adyuvante. Estas proteínas multiepitópicas fueron expresadas en plantas de tabaco, en las cuales se observaron niveles de expresión de hasta $5.29 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ de la proteína LTBentero y de $5.46 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ de la proteína ToxAentero en tejido vegetal fresco. Se demostró que ambas son inmunogénicas cuando son administradas de manera oral y subcutánea en ratones BALB/c, al inducir respuestas humorales tanto en suero como en intestino mediante la producción de anticuerpos IgG e IgA específicos contra cada uno de los epítopes incorporados. En ratones previamente inmunizados de manera oral se observó una disminución de la acumulación de fluidos cuando fueron retados con la toxina CT, asimismo, se observó una supervivencia del 50% (LTBentero) y 75% (ToxAentero) cuando los ratones fueron retados con *V. parahaemolyticus*.

Palabras clave: Patógenos entéricos, vacuna oral, multiepitópica, vacunas producidas en plantas

No. Orcid: 0000-0001-6722-020

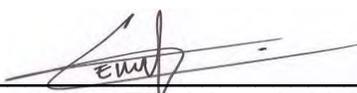

Vo. Bo. Dr. Carlos Eliud Angulo Valadez
Director de Tesis

Summary

Around 1.7 million people die annually due to enteric infections mainly in developing countries. Vaccination is an alternative to control this global health issue, therefore new low-cost vaccines are needed to ensure proper vaccine coverage. In this context, plants are attractive hosts for the synthesis and delivery of subunit vaccines that appears as an alternative to reduce the costs of production, storage and administration of vaccine agents for this kind of diseases. Therefore, the aim of this study was to develop a multiepitopic vaccine composed of epitopes from enterotoxigenic *Escherichia coli*, *Vibrio cholerae*, *Salmonella typhimurium* and *Vibrio parahaemolyticus* antigens produced in plant cells. Plant-made multiepitopic proteins containing epitopes from enterotoxigenic antigens was produced and found immunogenic and immunoprotective in mice. Two genes were designed (LTBentero and ToxAentero) coding for multiepitopic proteins of the antigens epitopes; the first one was coupled to a LTB sequence and the second one to the ToxA sequence, both as adjuvant function. The multiepitopic proteins were expressed in tobacco plants at up to $5.29 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ of the LTBentero protein and $5.46 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ of the ToxAentero protein in fresh leaf tissue. The LTBentero and ToxAentero antigens were found immunogenic in mice immunized by oral or subcutaneous routes in terms of the induction of IgG (sera) and IgA (feces) humoral responses against most of the target epitopes from the enteric pathogens. In orally immunized mice *V. cholera* toxin CT challenge resulted in a decrease of fluid accumulation while for *V. parahaemolitycus* bacterial challenge exhibited survival rates up to 50% (LTBentero) or 75% (ToxAentero).

Key words: enteric pathogens, oral vaccine, multiepitopic, plant-based vaccine

No. Orcid: 0000-0001-6722-020



Vo. Bo. Dr. Carlos Eliud Angulo Valadez
Director de Tesis

Dedicatoria

A mi familia, siempre estaré agradecido por darme un refugio en el mundo

Y mis amigos a largo de mi vida, por hacer de ese mundo un mejor lugar.

Agradecimientos

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por la ayuda recibida a lo largo del posgrado y la beca otorgada (301979).

Al Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste S.C. (CIBNOR) por darme la oportunidad de cursar un posgrado de calidad. En especial al personal administrativo y de Posgrado, por su amabilidad y facilitar los procesos administrativos.

Al Centro de Investigación en Ciencias de la Salud y Biomedicina de la Universidad Autónoma de San Luis Potosí (UASLP), por darme la oportunidad de hacer una estancia prolongada facilitándome los servicios y equipos de trabajo. En especial Al Laboratorio de Biofarmacéuticos Recombinantes encabezado por el Dr. Sergio Rosales Mendoza y su equipo de trabajo que me facilitaron los procesos de investigación e hicieron de mi estancia agradable y enriquecedora.

Al Laboratorio de Biotecnología de Organismos Marinos del Dr. Humberto Mejía y a su técnico M.C Rene Rebollar.

A la Dra. Martha Reyes por su apoyo y consejos en el Laboratorio.

Al Dr. Carlos Angulo por dirigir esta tesis, por su paciencia, por sus consejos y por ese ímpetu que le caracteriza, pero sobre le agradezco su amistad.

Al Dr. Sergio Rosales por darme la oportunidad de colaborar en su equipo de trabajo, por apoyarme en gran parte de este trabajo, por hacer mi estancia en San Luis muy amena y brindarme su amistad.

A la Dra. Luvia Sánchez por ser siempre atenta, por asesorarme y aconsejar para mejorar este trabajo.

Al Dr. Hugo Esquivel por su tiempo y su disposición por sus aportaciones y consejos.

Al Dr. Ángel Campa por sus consejos, y su disposición ayudar en este trabajo de tesis.

Al Grupo de Inmunología y Vacunología encabezado por el Dr. Carlos que formó un grupo trabajador que genera sinergia para cumplir los objetivos.

A mis amigos de Laboratorio en San Luis, Dania, Berna, Ely, Ivan, Omayra, Andrea y Jesús por ayudarme en el trabajo de Laboratorio, pero también por los momentos agradables que me hicieron pasar.

A mis compañeros de Laboratorio de La Paz, Miriam, Vero, Ana, Abel, Perla, Kevin por su apoyo en el Laboratorio y sobre todo la amistad y esos buenos momentos.

A todos los amigos que he hecho a lo largo de mi estancia en el CIB, en especial a las “Ven veras” Paupín, Carín y Gorettín.

Y Finalmente agradecer a mi familia por todo su apoyo, a mi madre basicamente gracias por todo, a mi hermana que siempre ha sido parte importante en mi vida, a mi hermano por ser como es, a mis sobrinos por inspirarme y por sorprenderme. Tambien a mi padre, por ser ese soñador y por todo el sacrificio que hizo por darme una educación y por dejarme ser yo todo el tiempo.

Contenido	
Resumen	i
Summary	ii
Dedicatoria	iii
Agradecimientos	iv
Lista de figuras	viii
Lista de tablas	ii
1. INTRODUCCIÓN	1
2. ANTECEDENTES	4
2.1 Patógenos entéricos.....	4
2.1.1 <i>Escherichia coli</i> enterotoxigénica (ETEC).....	4
2.1.2 <i>Vibrio cholerae</i>	5
2.1.3 <i>Salmonella typhimurium</i>	6
2.1.4 <i>Vibrio parahaemolyticus</i>	7
2.2 Vacunas licenciadas y antígenos candidatos para vacunas contra <i>E. coli</i> ETEC, <i>V. cholerae</i> , <i>S. Typhimurium</i> y <i>V. parahaemolyticus</i>	8
2.2.1 Antígenos de ETEC.....	10
2.2.2 Antígenos de <i>V. cholerae</i>	11
2.2.3 Antígenos de <i>S. typhimurium</i>	12
2.2.4 Antígenos de <i>V. parahaemolyticus</i>	14
2.3 Adyuvantes en mucosas.....	16
2.4 Toxina A.....	18
2.5 El sistema inmune en el intestino de ratones.....	19
2.6 Inmunización en la mucosa intestinal.....	20
2.7 Vacunas orales entéricas expresadas en plantas.....	24
3. JUSTIFICACIÓN	28
4. HIPÓTESIS	29
5. OBJETIVO	30
5.1 Objetivo general.....	30
5.2 Objetivos particulares	30
6. MATERIALES Y MÉTODOS	31
6.1 Diseño de los genes multiepitópicos LTBenfero y ToxAentero	31

6.3 Transformación de plantas de tabaco con <i>Agrobacterium tumefaciens</i>	32
6.4 Regeneración de callos y plantas transformadas	32
6.5 Detección de los transgenes <i>ltbentero</i> y <i>toxAentero</i> en las líneas de tabaco transformadas	33
6.6.1 Expresión y purificación de ToxA recombinante.....	33
6.6.2 Hiperinmunización.....	34
6.6.3 Extracción de proteínas.....	35
6.6.4 Dot blot.....	35
6.6.5 Western blot.....	36
6.6.6 ELISA	37
6.7 Ensayos de inmunogenicidad.....	38
6.8 Retos infecciosos	39
6.9 Expresión génica de IL-1 β y TNF α	39
6.10 Análisis estadístico	42
7. RESULTADOS	43
7.1 Diseño de los genes multiepitópicos.....	43
7.2 Construcción de vectores y clonación de los genes <i>ltbentero</i> y <i>toxAentero</i>	43
7.3 Regeneración de las plantas de tabaco transformadas.....	45
7.4 Detección de las líneas transgénicas Tabaco-LTBentero y Tabaco-ToxAentero	46
7.5 Detección de las proteínas recombinantes LTBentero y ToxAentero	48
7.6 Cuantificación de las proteínas recombinantes LTBentero y ToxAentero expresadas en Tabaco	49
7.7 Ensayos de inmunogenicidad.....	51
7.8 Ensayos de inmunoprotección	58
7.9 Expresión de génica de IL-1 β y TNF α	60
8. DISCUSIÓN.....	63
9. CONCLUSIONES	72
10. LITERATURA CITADA	73
11. ANEXOS	95

Lista de figuras

Figura 1. Representación simplificada de los componentes generales de sistema inmune en mucosas y de la respuesta generada por un antígeno administrado de manera oral y entregado al intestino por el bioencapsulamiento del tejido vegetal.	23
Figura 2. Esquema de inmunización ratones BALB/c con el material vegetal LTBentero y/o ToxAentero.. . . .	41
Figura 3. Diseño experimental de los retos con CT de <i>V. cholerae</i> , y <i>V. parahaemolyticus</i> en ratones BALB/c.....	41
Figura 4. Perfiles de restricción del vectores pBI121-LTBentero y pBI121-ToxAentero.	44
Figura 5. Construcciones de los vectores de expresión pBI121-LTBentero y pBI121-ToxAentero.	45
Figura 6. Aspecto de los cultivos de tabaco durante el proceso de transformación de plantas de tabaco con los vectores pBI121-LTBentero y pBI121-ToxAentero.	46
Figura 7. A) Electroforesis de las PCRs de ADN genómico de las plantas transformadas con los vectores pBI121-LTBentero y pBI121-ToxAentero.	47
Figura 8. A) Análisis de <i>Dot blot</i> y <i>Western blot</i> para la detección de las proteínas LTBentero y ToxAentero dentro.	49
Figura 9. A) Niveles de expresión de las proteínas recombinantes LTBentero y ToxAentero dentro del tejido vegetal de las diferentes líneas transgénicas de tabaco.	51
Figura 10. Niveles de anticuerpos IgG en suero de ratón medidos semanalmente después de ser inmunizados con tabaco LTBentero o ToxAentero vía subcutánea.	54
Figura 11. Niveles de anticuerpos IgG en suero de ratón medidos semanalmente después de ser inmunizados con tabaco LTBentero o ToxAentero vía oral.....	55
Figura 12. Niveles de anticuerpos IgA en heces de ratón medidos semanalmente después de ser inmunizados con tabaco LTBentero o ToxAentero vía subcutánea	56
Figura 13. Niveles de anticuerpos IgA en heces de ratón medidos semanalmente después de ser inmunizados con tabaco LTBentero o ToxAentero vía oral.....	57
Figura 14. Ensayo de Inmunoprotección mediante un reto con la toxina CT de <i>V. cholerae</i>	59
Figura 15. Ensayo de Inmunoprotección mediante un reto con <i>V. parahaemolyticus</i>	60
Figura 16. Expresión génica de IL-1 β y TNF α en sangre e intestino de ratones inmunizados oralmente con tabaco ToxAentero y retados con la toxina CT de <i>V. cholerae</i>	62

Lista de tablas

Tabla 1. Antígenos candidatos a vacunas de patógenos entéricos.....	155
Tabla 2. Vacunas entéricas producidas en plantas	27
Tabla 3. Epítopes de los antígenos de los patógenos entéricos.....	43

1. INTRODUCCIÓN

Las enfermedades entéricas prevalecen como un problema de salud pública a nivel mundial, principalmente en países en vías de desarrollo. La Organización Mundial de la Salud (OMS) estima que existen alrededor de 200 millones de casos de gastroenteritis al día, y que cerca de 1.7 millones de personas mueren al año por enfermedades relacionadas con la diarrea, principalmente adultos mayores y niños menores de cinco años (OMS, 2017; Dadonaite *et al.*, 2018). Existen varios patógenos relacionados con enfermedades entéricas como los adenovirus, astrovirus, rotavirus, y bacterias como las shigellas, campylobacterias, salmonelas y vibrios, particularmente el *Vibrio cholerae* (Girard *et al.*, 2006) así como la bacteria *Escherichia coli* enterotoxigénica (ETEC) causante de la denominada diarrea del viajero (Jiang y DuPont, 2017). Las enfermedades relacionadas con la diarrea son consecuencia de una inadecuada infraestructura en el tratamiento de aguas residuales, así como el mal manejo de cultivos y alimentos susceptibles a contaminarse, un problema que no parece que pueda resolverse en el mediano plazo en países en vías de desarrollo (Bergeron-Sandoval *et al.*, 2011; Beneduce *et al.*, 2017). Hasta ahora la mejor manera de contrarrestar las complicaciones de las enfermedades entéricas es mediante el uso de antibióticos. Sin embargo, el uso indiscriminado de los mismos ha generado cepas resistentes y por lo tanto agudizar los problemas de infecciones bacterianas (Gordon *et al.*, 2008). Se ha registrado que la ocurrencia de la diarrea causada por las enfermedades entéricas va disminuyendo con la edad, esto sugiere que hay una adquisición natural de inmunidad (Black *et al.*, 1981). Este fenómeno también es visto en viajeros que pasan mucho tiempo en áreas endémicas de las enfermedades (Dupont *et al.*, 1976). Es por eso que la vacunación se presenta como una alternativa viable capaz de generar inmunoprolifaxis contra los patógenos entéricos y por ende protección natural contra los mismos. Sin embargo, se requieren de vacunas efectivas que se puedan producir a bajo costo, que sean fáciles de administrar y que puedan distribuirse a los lugares donde más se necesitan.

El formato de subunidades vacunales ha mostrado ser efectivo para la producción de vacunas, ya que permite el diseño racional aprovechando la tecnología recombinante y sintética para el diseño de la vacunas. Este formato hace uso de la información generada por la literatura científica y/o con programas bioinformáticos para identificar elementos específicos de los agentes infecciosos (antígenos o epítopes) capaces de generar una respuesta inmune protectora específica (Rueckert y Guzmán, 2012).

Un reto importante dentro de la vacunación, es la capacidad de estimular la mucosa para generar protección como es el caso de la administración oral. Ya que las mucosas son sitios donde naturalmente ocurren la mayoría de las infecciones y donde se da el reconocimiento de diversos patógenos (Pabst y Mowat, 2012). Las vacunas orales permitirían una fácil administración sin la necesidad de personal capacitado, ni el uso de jeringas estériles (Walker *et al.*, 2007). Se estimularía directamente la mucosa intestinal generando una respuesta inmune en la primera línea de contacto. La inmunización oral aparentemente no es tan efectiva, debido a que la vacuna tiene que ser capaz de atravesar el ambiente agresivo del tracto digestivo sin degradarse (Mowat y Viney, 1997; Davitt y Lavelle, 2015). Además, se ha observado una pobre inducción de respuesta inmune en la mucosa del intestino mediante esta ruta de administración (Ogra *et al.*, 2001). Sin embargo, la evidencia sugiere que con la administración de agentes vacunales en conjunto con adyuvantes y/o acarreadores se pueden obtener niveles significativos de respuesta inmune en mucosas y a nivel sistémico capaces de generar protección (Mestecky *et al.*, 2008).

Una de las plataformas más atractivas para la producción de vacunas subunitarias son las plantas o el tejido vegetal (Penney *et al.*, 2011). Ya que además de poder producir el agente vacunal de una manera recombinante, el mismo tejido vegetal sirve como vehículo de entrega; la pared celular vegetal sirve de bioencapsulamiento para poder atravesar el tracto digestivo y que la entrega del agente vacunal sea de forma directa a la mucosa del intestino (Kwon *et al.*, 2013).

Otra particular ventaja del uso de las plantas como vehículos de entrega, es que la gran variedad de compuestos que producen, (polisacáridos, saponinas, flavonoides, alcaloides y compuestos fenólicos) ayudarían a estimular la respuesta inmune (Takeyama *et al.*, 2015).

La inmunización a través de tejido vegetal transgénico que exprese un agente vacunal se muestra como una alternativa viable, por lo que está generando interés de la comunidad científica. Ya que además de ser una plataforma que bajaría los costos de producción y almacenamiento, se administraría de manera oral facilitando así los programas de vacunación (Bergeron-Sandoval *et al.*, 2011).

2. ANTECEDENTES

2.1 Patógenos entéricos

Si bien los patógenos entéricos son variados, las bacterias ETEC y *V. Cholerae* son las de mayor recurrencia en los países de vías de desarrollo (Salem *et al.*, 2015). En los países desarrollados como en los Estados Unidos, las salmonelas persisten como un gran problema de salud pública relacionado al consumo de aves de corral y sus derivados (Majowicz *et al.*, 2010). En los países asiáticos como Japón, las enfermedades entéricas están relacionadas con el *V. parahaemolyticus* debido al alto consumo de peces y mariscos que normalmente son ingeridos poco cocinados y corren el riesgo de estar contaminados con este patógeno marino (Datta *et al.*, 2008).

2.1.1 *Escherichia coli* enterotoxigénica (ETEC)

La ETEC es el patógeno más común de enfermedades diarreicas tanto en humanos como en animales (Girard *et al.*, 2006). ETEC Afecta anualmente alrededor de 400 millones de personas, principalmente niños menores de 5 años en los países en vías de desarrollo y es responsable de 300,000–500,000 muertes cada año (Zheng *et al.*, 2005). Las ETEC colonizan las células epiteliales de la mucosa del intestino delgado por medio de fimbrias que tienen diversas formas denominadas factores de colonización (CF). Una vez adheridos a la mucosa liberan las toxinas Termo-labil (LT) y Termo-estable (ST) responsables de la diarrea. La toxina LT está compuesta por dos subunidades; la subunidad A y la subunidad B esta última compuesta por 5 péptidos iguales. Cabe mencionar que esta toxina es estructural y antigénicamente idéntica a la toxina del cólera (CT). Por otro lado, la toxina ST es un péptido de bajo peso molecular, no inmunogénico que tiene una correlación significativa con los episodios diarreicos. Las enterotoxinas ST y LT interrumpen la homeostasis de los fluidos del huésped causando una hipersecreción de líquido y electrolitos mediante la activación de la adenil ciclasa (LT) o la guanilato ciclasa (ST) en las células epiteliales del intestino delgado (Moon, 1978). La subunidad B de la toxina LT interactúa con el receptor

glangliósido GM1, este receptor introduce la subunidad A y esta activa la adenil ciclasa que produce adenosín monofosfato cíclica y causa la salida de iones de cloro y pérdida de agua causando diarrea (Mudrak y Kuehn, 2010). Mientras que la toxina ST se une y activa al receptor intestinal guanilato-ciclasa (GC-C), el cual es un receptor para los ligandos endógenos guanil y uroguanil. ST activa GC-C incluso con concentraciones submicromolares, la activación incrementa al mensajero cíclico intracelular GMP (cGMP) provocando la secreción de los iones de bicarbonato y cloro, resultando en diarrea acuosa (Uzzau y Fassano, 2000). Los datos epidemiológicos sugieren que más de dos tercios de los casos de diarreas son causados por ETEC en humanos y más de un cuarto en porcinos (Zhang y Zhang, 2010), y que cepas que secretan solo la ST y no LT inducen las diarreas más severas (Girard *et al.*, 2006).

2.1.2 *Vibrio cholerae*

El *V. cholerae* es un patógeno transmitido a través del agua y alimentos contaminados causante de diarrea aguda que prevalece como un problema de salud pública en países en vías de desarrollo (Lutz *et al.*, 2013). Existen cerca de 200 serotipos de *V. cholerae* conocidos hasta la fecha, sin embargo, solo los serotipos O1 y O139 son responsables de la vasta mayoría de brotes de diarrea (Chatterjee *et al.*, 2003). La OMS estima que existen entre 3-5 millones de casos relacionados al cólera y mueren cerca de 100 mil a 130 mil personas cada año (OMS, 2017).

La infección empieza normalmente por la ingestión de agua o comida contaminada con *V. cholerae*, subsecuentemente las bacterias que logran pasar a través del tracto digestivo llegan al intestino delgado y se adhieren a las células epiteliales donde eventualmente producen la toxina del cólera (CT) (Holmgren y Svennerholm, 1977). Aunque la CT parece no tener un papel directo en la colonización intestinal, datos experimentales obtenidos de un análisis con cepas mutantes *ctxAB* (con una delección del gen *ct*) sugiere que la actividad de CT podría aumentar el crecimiento bacteriano en el ambiente intestinal a través de la

destrucción de células epiteliales. En contraste, no hay evidencia experimental que muestre algún beneficio de la actividad de CT para *V. cholerae* fuera del huésped humano (Mekalanos, 1985). CT es el mayor factor de virulencia y como se mencionó anteriormente, es estructuralmente idéntica a la toxina LT que consiste en dos subunidades. Y al igual que la toxina LT, la intoxicación ocurre cuando la CT se une al receptor gangliósido GM1 en la superficie de las células epiteliales por medio de la subunidad B (CTB), CT es disociado; la subunidad A (CTA) es endocitada y entra en el citosol donde cataliza la ribosilación de ADP activando la adenil ciclasa que lleva a un incremento del cAMP intracelular lo cual resulta en consumo desparejo de sodio e incrementa la salida de cloro, causando la secreción de agua y por lo tanto diarrea (Sánchez y Holmgren, 2011).

2.1.3 *Salmonella typhimurium*

La salmonela puede causar diferentes tipos de enfermedades tanto en humanos como en animales, que van desde una leve gastroenteritis a una infección sistémica (Jia *et al.*, 2009). La salmonelosis es típicamente transmitida a través de alimento o agua contaminados y estas infecciones son responsables de brotes de gastroenteritis en países desarrollados y la fiebre tifoidea y no tifoidea en países en vías de desarrollo (Majowicz *et al.*, 2010). El consumo de aves de corral y los productos derivados son las principales fuentes de infección de salmonela en humanos (Glynn *et al.*, 2004; Kimura *et al.*, 2004). La OMS estima cerca de 22 millones de casos de fiebre tifoidea cada año y 200,000 muertes relacionadas ocurren anualmente en el mundo, además de cerca de 6 millones de casos de fiebre paratifoidea (Crump y Mintz, 2010). La infección por salmonela es una de las causas más comunes de enfermedades relacionadas con los alimentos en los Estados Unidos (Santos *et al.*, 2001). El Centro de Control y Prevención de Enfermedades (2020) estima que la *Salmonella entérica* serovar y *Salmonella typhimurium* causan un estimado de 1.4 millones de casos de enfermedad y cerca de 600 muertes cada año tan solo en los Estados Unidos.

Las bacterias del género *Salmonella* son mayormente patógenos intracelulares facultativos capaces de causar infecciones localizadas y sistémicas, así como también estados crónicos asintomáticos (Cookson y Beavan, 1997). El tracto gastrointestinal es su ruta natural de infección, donde las bacterias penetran la barrera de la mucosa en el íleon invadiendo a las células M y subsecuentemente se esparce a través de la sangre y linfa para colonizar hígado y bazo (Carter y Collins, 1974). Existen dos fases principales para las infecciones de salmonela en el intestino: primero es la adherencia y posteriormente la invasión (Haraga *et al.*, 2008). Son necesarias numerosas adhesinas y fimbrias para llevar a cabo la adhesión a las células epiteliales del intestino (Wagner y Hensel 2011). Una vez adherida puede utilizar diferentes mecanismos para atravesar el epitelio intestinal. La ruta principal de la invasión es a través de las células M en los Folículos Asociados al Epitelio (FAE) que recubren las Placas de Peyer (PP) mismas que se encargan de transportar antígenos y bacterias del lumen a la lámina propia (Jones *et al.*, 1994). Se sabe también que las salmonelas son capaces de inducir su internalización a través de enterocitos no-fagocíticos por medio de su sistema de secreción tipo 3 codificado por la isla de patogenicidad 1 (SPI-1) (Francis *et al.*, 1992). Además, se ha propuesto que la invasión puede ocurrir por otras rutas paracelulares después de la ruptura de las uniones estrechas de las células epiteliales (Jepson *et al.*, 1995) o vía macrófagos/DCs CX3CR1+ las cuales se intercalan entre las células epiteliales (Niess *et al.*, 2005). Sin embargo, aún sigue por ser bien determinada la importancia de estas rutas alternativas de invasión. Después de cruzar la barrera intestinal las bacterias fagocitadas se replican dentro un compartimento vacuolar en el citoplasma de la célula infectada (Haraga *et al.*, 2008).

2.1.4 *Vibrio parahaemolyticus*

El *V. parahaemolyticus* es una de las bacterias causantes de gastroenteritis aguda asociada al consumo de mariscos y pescado crudos o poco cocinados en los países asiáticos e incluso en los Estados Unidos (Datta *et al.*, 2008). Esta especie

del género *Vibrio* son bacterias Gram-negativas que residen comúnmente en aguas costeras o estuarinas en todo el mundo. Aunque la mayoría de estas bacterias no son dañinas, algunas especies pueden infectar un amplio espectro de peces y mamíferos, y por lo tanto causar serias enfermedades (Matsuda *et al.*, 2010). En Japón el *V. parahaemolyticus* participa en el 30% de las intoxicaciones relacionadas con el alimento (Broberg *et al.*, 2011). Se ha observado también que *V. parahaemolyticus* puede infectar heridas que pueden llevar a una septicemia causando la muerte (Zhang y Orht, 2013). En la acuicultura este patógeno es de gran relevancia junto con otras bacterias del genero *Vibrio* que resulta en grandes pérdidas económicas en este sector, lo cual se considera el mayor problema asociada con la acuicultura y la seguridad alimentaria (Liu y Zhang, 2011).

Al igual que la infección de otras bacterias entéricas, en la infección de *V. parahaemolyticus*, se puede observar la invasión, la colonización y la liberación de factores de virulencia que producen inflamación del intestino (Chatterjee *et al.*, 1984). Esta bacteria posee una amplia variedad de factores de virulencia: adhesinas, toxinas, sistemas efectores de secreción involucrados en el anclaje, colonización e infección. Dentro de los distintos factores de virulencia de esta bacteria, la toxina hemolisina termoestable directa (TDH) es considerada el mayor factor de virulencia, con una gran variedad de actividades biológicas como son: actividad hemolítica, citotoxicidad, cardiotoxicidad y enterotoxicidad (Matsuda *et al.*, 2010). Esta toxina es un tetrámero y tiene afinidad por los sitios llamados de embalse de las membranas celulares y forma poros de ≈ 2 nm los cuales permiten el paso de iones y agua a través de la membrana (Honda y Lida, 1993). Estas alteraciones en el flujo de iones en el intestino son responsables de la diarrea observada durante la infección.

2.2 Vacunas licenciadas y antígenos candidatos para vacunas contra *E. coli* ETEC, *V. cholerae*, *S. Typhimurium* y *V. parahaemolyticus*.

Existen pocas vacunas comerciales contra enfermedades entéricas (Tabla I). Por ejemplo en el mercado hay dos vacunas contra el cólera calificadas por la OMS;

Dukoral® que está compuesta por *V. cholerae* inactivada del serotipo O1 en conjunto con una proteína CTB recombinante, y la vacuna Shanchol® que contiene *V. cholerae* muerta de los serotipos O1 y O139 (Bi *et al.*, 2017). La vacuna Dukoral® es más cara debido a los costos relacionados a la producción de CTB recombinante y un buffer neutralizante para prevenir la degradación de CTB por los ácidos estomacales (Charles *et al.*, 2014). Actualmente no hay vacuna disponible en el mercado para ETEC, sin embargo, ya hay candidatos a vacuna en fases clínicas avanzadas como la vacuna ETVAX que es una vacuna oral de células atenuadas e inactivadas que está en fase II y la FTA que es una vacuna parental de subunidades antigénicas y que está en fase I (Bourgeois, 2018). Dukoral® tiene una protección arriba del 75% contra esta bacteria. Por otro lado, existen también dos vacunas licenciadas contra salmonela: La Vi CPS que está compuesta por el polisacárido Vi de la cápsula de la salmonela que solo provee una protección del alrededor del 60% (Benoun *et al.*, 2018) y la vacuna Ty21a que es una versión atenuada de una cepa de *S.typhi*. Esta última es altamente inmunogénica, sin embargo, un defecto práctico es que se requieren de 3-4 dosis de $2-6 \times 10^9$ CFU (Yanga *et al.*, 2013). Además, ambas vacunas solo confiere protección contra *S. typhi* y no contra *S. paratyphi*, *S. typhimurium* y *S. enteritidis* (MacLennan *et al.* 2014). De igual manera, no existen vacunas para prevenir infecciones de *V. parahaemolyticus* y solo hay algunos estudios a niveles preclínicos (Li *et al.*, 2014). Otro punto importante es que las vacunas existentes contra cólera y salmonela requieren de la cadena en frío para su almacenamiento y distribución, limitando así su cobertura a países pobres y en vías de desarrollo (Ashok *et al.*, 2017). Es por eso que aún se siguen buscando alternativas para la vacunación para este tipo de enfermedades y el enfoque de subunidades vacunales, se han identificado diversos elementos antigénicos para su implementación como agentes vacunales (Tabla I).

2.2.1 Antígenos de ETEC

Como se mencionó anteriormente, la toxina LT es el mayor factor de virulencia causante de diarrea y es un potente inmunógeno (Guang *et al.*, 2015). Es por eso que existen numerosos estudios que utilizan a la toxina LT o fracciones de esta toxina como antígeno para pruebas de vacunas, ya que se ha encontrado es altamente inmunogénica incluso solo la subunidad B llamada LTB (Svennerholm y Holmgren, 1995.) LTB se ha estado utilizando como prototipo de vacuna contra ETEC y cólera además de ser utilizado como un ayudante en mucosas (Nashar *et al.*, 2001). La toxina ST por sí sola no es inmunogénica, sin embargo, existen estudios que reportan inmunogenicidad cuando se administra en conjunto con otras moléculas como LT, LTB, CTB, algunas proteínas de membrana externa (OMPs) y flagelina de salmonela, confiriendo protección ante distintos retos con la toxina ST o con ETEC (Saarilahti *et al.*, 1989; Cárdenas y Clements, 1993; Pereira *et al.*, 2001; Taxt *et al.*, 2010).

Existen vacunas en fases preclínicas que están constituidas por ETEC inactivado, o cepas atenuadas que expresaran una mayor cantidad de antígenos como LTB, híbridos de Shigellas expresando antígenos de ETEC, híbridos atenuados de Shigellas, *V. cholerae* y *S. typhi* que contienen antígenos de ETEC (Walker *et al.*, 2007; Wu y Chung, 2007; Zheng *et al.*, 2005). En el 2010 Zhang y Zhang utilizaron la adhesina fimbrial ETEC como plataforma de expresión de LT y ST para obtener una fusión de antígenos adhesina-toxina para inducir inmunidad anti-toxina y anti-adhesina. Se utilizaron los epítopes de LTB (⁸LCSEYRNTQIYTIN²¹) y el epítope de ST (⁵CCELCCNPQCAGCY¹⁸) que fue embebida en la subunidad mayor de FaeG de la fimbria de *E. coli* K88ac. Se inmunizaron conejos y estos desarrollaron anticuerpos anti-K88ac, anti-LT y anti-ST, además los anticuerpos no solo inhibieron la adherencia de *E. coli* a los enterocitos del intestino delgado de cerdos, si no también neutralizaron a las toxinas LT, ST y a la toxina del cólera CT.

La toxina LT mutada o solo su subunidad B, son utilizados en gran parte de las formulaciones en el diseño de vacunas para ETEC con resultados exitosos para la protección ante una infección, al menos a corto plazo (Svennerholm, 2011). A pesar de que ST está presente en aproximadamente el 75% de cepas de ETEC, ya sea sola o en conjunto con LT, la inclusión de ST en las vacunas actuales ha sido limitada debido a su falta de inmunogenicidad (Wolf, 1997). Los esfuerzos por proveer de una vacunación como una propuesta preventiva efectiva a la infección contra ETEC están en curso (Mirhoseini *et al.*, 2018). Los candidatos a vacunas deben tener el mínimo requerimiento de generar al menos el 50% de protección contra enfermedades severas en los países en desarrollo durante los dos primeros años de vida (Walker *et al.*, 2007).

2.2.2 Antígenos de *V. cholerae*

Se ha estado utilizando CTB por si sola o en formulaciones con células bacterianas atenuadas en conjunto con otros antígenos como un inmunógeno con potencial vacunal, debido a su éxito en la protección contra episodios de infección. Además, debido a la similitud de las toxinas LT y CT, se ha observado que se puede inmunizar contra *V. cholerae* o *E. coli* ETEC utilizando tanto LTB como CTB indistintamente (Holmgren *et al.*, 1994).

Se sabe que las personas que han tenido algún episodio de cólera, tienen una protección significativa contra un segundo episodio y que los componentes antigénicos que más contribuyen a la respuesta inmune son CT, LPS, flagelos, fimbrias y proteínas de membrana externa (Levine y Tacket, 1994). Es por eso que además de medidas de control higiénicas y sanitarias, uno de los mayores esfuerzos para combatir las epidemias de cólera es mediante el desarrollo y uso de estrategias modernas de vacunación (Reidl y Klose, 2002). Los costos podrían ser reducidos por el desarrollo de métodos más efectivos para la producción de CTB y la formulación de la vacuna en una forma sólida para dosis oral capaz de pasar por el estómago y disolverse en el intestino (Charles *et al.*, 2014; Lajoinie *et al.*, 2014). De manera interesante, un experimento llevado a cabo en 1985 sugiere

que la célula completa muerta junto con CTB, es más efectiva que una vacuna con solo la célula sin CTB. En un experimento con niños de 2 a 10 años, se observó que al grupo que se les administró la vacuna completa con CTB, registraron una protección cerca del 92%, mientras que el grupo al que solo se le administró la vacuna de la célula sin CTB obtuvo solo el 53% de protección (Clemens *et al.*, 1986).

2.2.3 Antígenos de *S. typhimurium*

Se han implementado varias estrategias para el control de esta bacteria como la exclusión competitiva, antibióticos o ácidos orgánicos, con el fin de reducir el riesgo de infección de salmonella en las aves de corral y por lo tanto en humanos. Sin embargo, todas estas estrategias solas o combinadas han tenido un éxito limitado (Gordon *et al.*, 2008). Hoy en día varias cepas de salmonella muestran resistencia a antibióticos. Por lo tanto, la prioridad más importante para la salud global es el desarrollo de vacunas efectivas para este tipo de infecciones locales y sistémicas (Fraser *et al.*, 2007).

La vacunación contra salmonela ha sido exitosa en disminuir la incidencia de fiebre tifoidea, desafortunadamente este tipo de vacunación tiene algunas limitaciones (Van Inmerseel *et al.*, 2005). Las vacunas de células completas muertas de tifoidea son todavía utilizadas en algunos países y presentan efectos secundarios como fiebre, dolores de cabeza y reacciones en el lugar de las inyecciones. (Paterson y Maskell, 2010). Se están buscando opciones para la generación de una vacuna elaborada a partir de subunidades de antígenos de las diferentes bacterias del género *Salmonella* (Bergeron-Sandoval *et al.*, 2011).

La flagelina es un componente del flagelo de las bacterias que ha sido identificada dentro de los patrones moleculares asociados a patógenos (PAMPs). Se tienen identificados epítopes de este antígeno que son regiones conservadas de flagelina de varias especies de bacterias Gram-negativas. Estas mismas regiones comprenden los dominios reconocidos por el receptor tipo Toll 5 (TLR-5) (Bergman

et al., 2005). Recientemente la subunidad flagelar proteína FliC se ha convertido en un candidato por su amplia protección contra múltiples especies de salmonella. Esta proteína es expresada abundantemente en la superficie y es un blanco bien caracterizado para desencadenar inmunidad (Cummings *et al.*, 2006). La salmonella expresa dos tipos de proteínas de flagelina (FliC y FljB), conocidas como fuertes desencadenantes inmunológicos. La subunidad FljB de la flagelina de *S. typhimurium* mostró una respuesta humoral cuando se inmunizaron a ratones con un extracto de plantas transformadas que contenía la proteína recombinante FljB (Bergeron-Sandoval., 2011). La proteína filamentosa FliC es un antígeno natural reconocido por el TLR-5 y que es capaz de activar células T CD4+. Se ha mapeado la actividad antigénica de cuatro diferentes regiones de FliC y tres de las 4 regiones estuvieron presentes también en la flagelina subunidad FljB. Se ha observado que dos epítopes de FliC estuvieron también presentes en flagelinas de varias especies de bacterias entéricas Gram-negativas (Bergman *et al.*, 2005). Más importante aún, es que se han detectado anticuerpos anti-FliC en ratones infectados con *S. typhimurium* (Strindelius *et al.*, 2004). Además, se ha demostrado que la inmunización con FliC en ratones provee protección contra retos con diferentes salmonelas (McSorley *et al.*, 2000).

Cabe mencionar que también existen otros antígenos con potencial vacunal como la proteína OmpC, que produce una fuerte respuesta humoral y que también confirió protección ante un reto con *S. typhimurium* (Prejit *et al.*, 2013). Resultados similares se encontraron con la proteína OmpL que es una proteína ampliamente distribuida y conservada con homología a distintas especies de salmonella y donde se observó una respuesta tanto humoral como celular y además de 100% protección ante un reto con *S. typhimurium* en los grupos de ratones tratados con OmpL, donde además hubo una eliminación de la presencia de esta bacteria en el sistema retículo endotelial. (Yanga *et al.*, 2013). Incluso en humanos se han utilizado porinas de *Salmonella typhi*, en los cuales se observó la inducción de

anticuerpos de los isótopos IgG1 e IgG2 con actividad bactericida, así como también una respuesta celular del tipo Th1 (Salaza-Gonzalez *et al.*, 2004).

2.2.4 Antígenos de *V. parahaemolyticus*

Actualmente la medida principal para controlar las enfermedades causadas por complicaciones de infecciones de *V. parahaemolyticus* es mediante antibióticos (Liu *et al.*, 2011). Aunque los antibióticos son efectivos, el uso indiscriminado se ha convertido en serio problema de salud pública como se ha mencionado anteriormente (Lun *et al.*, 2014). Hasta el momento solo existen estudios preclínicos con algunos candidatos de antígenos. Por ejemplo, las proteínas de membrana externa (OMPs) las cuales son únicas en las bacterias Gram-negativas se han revelado como proteínas altamente inmunogénicas y representan ser buenas candidatas para el desarrollo de vacunas (Lin *et al.*, 2002). Ya se ha reportado la capacidad protectora de diferentes OMPs de *V. parahaemolyticus* en animales modelo previamente inmunizados con estos antígenos, como por ejemplo LptD, LamB, OmpA, OmpK, OmpU, VP0802, VP1243 y VP0966 (Li *et al.*, 2014). Dentro de estas OMPs la proteína LptD es altamente inmunogénica; la estructura y función de LptD en algunas especies Gram-negativas ha sido estudiada intensamente en los años recientes. LptD es una OMP integral que en conjunto con otras 6 proteínas (LptA, B, C, E, F y G) constituyen un complejo transmembranal responsable de transportar lipopolisacáridos (LPS) (Xiang *et al.*, 2014). LptD media la translocación final del LPS completamente sintetizado del periplasma hacia la capa más externa de la membrana externa. (Gu *et al.*, 2015). LPS juega un papel crítico en la protección al organismo de las agresiones de los ambientes, colonizando al huésped y evadiendo los ataques del sistema inmune del huésped y además, forma una barrera que previene la entrada de antibióticos hidrofóbicos (Zha *et al.*, 2016).

Tabla 1. Antígenos candidatos a vacunas de patógenos entéricos

Patógeno	Vacunas	Antígenos Candidatos a vacunas	Referencias
<i>E. coli</i> ETEC	Dukoral® (<i>V.cholorea</i> muerta del serotipo O1 y con CTB recombinante)	Factores de colonización (CFs): CFA/I, CS1 y CS6 Toxinas LT y ST Subunidad B de Toxina LT (LTB)	Zhang and Zhang, 2010 Guan et al. 2015
<i>V. cholerae</i>	Dukoral® (<i>V.cholorea</i> muerta del serotipo O1 y con CTB recombinante) Shanchol® (<i>V. cholerae</i> muertas de los serotipos O1 y O139).	Proteínas de membrana externa (OMPs) NlpD, OmpU, OmpW CFs: AcfA Subunidad B de Toxina Cólera (CTB)	Jacob et al. 1983, Lajoinie et al. 2011 Rashid et al. 2019
<i>V. parahaemolyticus</i>	No vacuna	Proteínas de membrana externa (OMPs): LamB, OmpA, OmpK, OmpU, VP0802, VP1243,VP0966 y LptD	Zha et al. 2016 Lun et al. 2014
<i>Salmonella spp.</i>	Vi: antígeno Vi purificado de <i>S. typhi</i> Ty21a: es la cepa <i>S. typhi</i> atenuada	OMPs Omp28, OmpL Flagelina FljB y FliC	Kremer et al. 2011 Yang et al. 2013 Saxena et al. 2017

2.3 Adyuvantes en mucosas

El diseño de subunidades vacunales se basa en una formulación de antígenos específicos en lugar de patógenos completos, sin embargo, se debe de considerar que muchas veces los antígenos por si solos suelen ser poco inmunogénicos (Clark y Cassidy-Hanley, 2005). Por lo tanto, muchas veces estos requieren de adyuvantes para resolver la falta de patrones moleculares asociados a patógenos (PAMPs) que normalmente tienen las vacunas de células completas (Vartak y Suheck, 2016). Estos elementos estimulan fuertemente el sistema inmune innato y así favorecen la inducción de respuestas inmunes adaptativas. La inmunización en mucosas generalmente requiere de la coadministración de adyuvantes para iniciar una respuesta y dar soporte a la transición de inmunidad innata hacia la inmunidad adaptativa (Clements y Norton, 2018). Los adyuvantes para vacunas en mucosas se pueden clasificar en dos: aquellos que actúan como inmunoestimuladores y aquellos que facilitan la entrega para la inducción de la inmunidad protectora (Cox *et al.*, 2006). Existen diferentes moléculas de origen bacteriano que son utilizados como adyuvantes: los oligodesoxinucleótidos sintéticos no metilados CpG (CpG ODN), los lípidos A monofosforilados (MLP) y las enterotoxinas CT de *V. cholerae* y LT de ETEC y sus derivaciones (Freytag y Clements, 2005). Los CpG ODN y los MLP son ligandos de TLRs que provocan la activación de la inmunidad innata que lleva a la producción de citocinas proinflamatorias y una sobreexpresión de moléculas coestimuladoras sobre las APCs (Vartak y Suheck, 2016). La inmunidad innata activada subsecuentemente lleva a poner en marcha a la respuesta inmune adaptativa contra el agente infeccioso, en otras palabras los TLRs son considerados como receptores de adyuvantes (Kaisho y Akira, 2001). Los dinucleótidos CpG son conocidos por ser ligandos del TLR-9 y que tiene actividad inmunoestimuladora sobre linfocitos y APCs. Mientras que los derivados de LPS como los MLP estimulan a través del TLR-4 (Lawson *et al.*, 2011). En contraste, las toxinas LT y CT no utilizan la ruta de TLRs, aunque no se sabe bien los mecanismos, se sabe que estas moléculas inmunoestimuladoras pueden inducir respuestas Th1 o Th2 (Yuki y Kiyono, 2003).

Las toxinas LT de *E. coli* ETEC y CT de *V. cholerae* son conocidas por tener fuertes propiedades inmunogénicas en mucosas y se ha demostrado que tiene potencial adyuvante cuando es administrado con diferentes antígenos (Elson y Ealding, 1984; Clements et al. 1988; Yamamoto *et al.*, 2001). Aún no son dilucidados totalmente los mecanismos de la actividad de adyuvante de estas enterotoxinas en las mucosas. Lo que se sabe, es que estas estimulan células presentadoras de antígenos (APCs) para aumentar la expresión del complejo principal de histocompatibilidad II (MHCII) y moléculas coestimuladoras, así como también la secreción de citocinas promotoras de secreción de IgA como la IL-1, IL-6, y IL-10. Su actividad adyuvante también se explica por la expansión de células antígeno-específicas Th2 y Th17, las cuales ayudan a la producción de IgA vía secreción de las citocinas IL-4, IL-6 IL-10 e IL17A (Boyaka *et al.*, 2003).

La enterotoxicidad de estas toxinas dentro del intestino hace que no puedan ser utilizadas como adyuvantes en humanos. Se han buscado otras opciones como la creación de mutantes que no presentan toxicidad, como es el caso de la doble-mutante toxina lábil (dmLT), así como también el uso de solo las subunidades B tanto de la CT como de LT (Seo *et al.*, 2020). Aún no se han dilucidado los mecanismos por los cuales LTB y CTB estarían actuando como adyuvantes. Sin embargo, se propone que estarían incrementando la captación y la presentación de antígenos (Zhang *et al.*, 2016) o que activarían la diferenciación selectiva de linfocitos (Williams, 2000), activarían la maduración células dendríticas induciendo la expresión de CD86 (Ji *et al.*, 2015) o probablemente estarían aumentando la expresión de otros marcadores de activación como el CD40, CD25 e ICAM-1 (Nashar *et al.*, 1997). Aún no se saben los mecanismos exactos de cómo es que estos adyuvantes desencadenan estos eventos, sin embargo, se sugiere que están relacionados directamente con el reconocimiento al receptor GM1 (Yongping, 2016).

2.4 Toxina A

Se ha estado prestando particular atención en el desarrollo y descubrimiento de adyuvantes potentes y seguros y las subunidades de toxinas constituyen un nicho relevante en este campo. Se han estado buscando alternativas para incorporar nuevas moléculas, como las subunidades de toxinas que son reconocidas por el sistema inmune sin causar un efecto adverso y que potencien la respuesta ante el reconocimiento de un antígeno. Por ejemplo, se ha estado estudiando a la toxina A (ToxA) que es producida por una cepa de *Vibrio parahaemolyticus* y que en conjunto con la toxina B (ToxB) conforman un complejo molecular llamado Toxina AB causante de la enfermedad de necrosis hepatopancreática aguda (AHPND) en camarones (Sirikharin *et al.*, 2015). Estas toxinas solo habían sido descritas en el género *Phortohabdus* como toxinas PirA y PirB, las cuales son toxinas insecticidas que afectan el epitelio del intestino de insectos y al hepatopáncreas de camarones (Lee *et al.*, 2015). Aún se desconoce el mecanismo virulento de estas toxinas, sin embargo, se ha sugerido que estas podrían actuar como lo hace la toxina Cry de *Bacillus thuriangiensis* ya que aunque no tienen homología aminoacídica, si tienen una estructura conformacional tridimensional casi idéntica como complejo AB. Esto sugiere que podría estar actuando de la misma manera (Lee *et al.*, 2015). La toxina Cry es también una toxina insecticida que daña el intestino de los insectos. Esta toxina se secreta como prototoxina y es hidrolizada por proteasas digestivas, se une a la caderina por medio del dominio III y empieza la oligomerización formando un poro en la membrana celular (Waterfield *et al.*, 2005) La toxina Cry se ha venido estudiando desde el punto de vista inmunológico y se ha observado que es un potente inmunógeno sistémico y de mucosas con propiedades adyuvantes con respuestas celulares y humorales fuertes (Moreno-Fierros *et al.*, 2003; 2015). En la conformación tridimensional del complejo ToxAB, la subunidad A correspondiente a la toxina A, emularía el dominio III de la toxina Cry que es el dominio que está involucrado en el reconocimiento con los receptores. En trabajos recientes se ha observado que en peces la administración de la toxina A indujo la producción de anticuerpos IgM y aumentó la expresión de genes asociados a la

respuesta inmune proinflamatorias como la IL-1 β , la actividad de las enzimas superóxido dismutasa (SOD) y catalasa (CAT) también se vio aumentada, incluso se pudo observar una reducción el daño patológico por *V. parahaemolyticus* a nivel histológico cuando los peces fueron inmunizados previamente con la toxina A (Reyes-Becerril *et al.*, 2016). Incluso en camarones, se encontró un efecto de protección contra *V. parahaemolyticus* cuando a estos se les administraba ToxA (Campa-Córdoba *et al.*, 2017). En ratones la inmunización con ToxA indujo la producción de anticuerpos en lo particular un aumento en IgG. También se pudo constar inmunoprotección contra *V. parahaemolyticus* ya que los ratones previamente inmunizados con la toxina A mostraron una tasa de mortalidad menor a los que no fueron inmunizados (León-Gallo *et al.*, 2016). Aún más interesante es que Monreal-Escalante *et al.* (2019) demostraron que la ToxA también es inmunogénica en ratones cuando esta es producida en tabaco de manera recombinante y administrada dentro del tejido vegetal. La inmunogenicidad que se ha observado en estos diversos estudios, hacen de la ToxA una molécula atractiva para seguir explorando su actividad inmunogénica, así como también su potencial inmunoestimulante en el intestino.

2.5 El sistema inmune en el intestino de ratones

La mucosa intestinal posee un sistema inmune complejo que está compuesto por la barrera epitelial intestinal, la lámina propia y el tejido linfoide asociado al intestino (GALT). El epitelio intestinal está conformado por enterocitos, células endocrinas, células M, células Goblet y células Paneth. Las células Goblet están especializadas en la secreción de mucinas (componentes importantes en la capa de mucus intestinal) y las células de Paneth secretan proteínas antimicrobianas (AMPs). Estos componentes constituyen la primera barrera protectora contra los patógenos (Kim y Ho 2010; Peterson y Artis, 2014). También contiene numerosos linfocitos intraepiteliales (IELs) que contribuyen en el mantenimiento y protección de la barrera de la mucosa y la homeostasis del intestino (Wershil y Furuta, 2008). La lámina propia consiste en la capa de tejido conectivo situado debajo del epitelio

y constituye el mayor reservorio de células inmunes intestinales, también la integran el suministro de sangre, el drenaje linfático y las funciones del sistema nervioso (Mowat y Agace, 2014). La población de linfocitos en este tejido se compone por células Th, células T citotóxicas, células Treg y células plasmáticas (Gommerman *et al.*, 2014). También cuenta con una gran población de células de la inmunidad innata como células dendríticas (DCs), macrófagos, mastocitos, eosinófilos y células linfoides innatas (Kayama y Takeda, 2016). El GALT está compuesto por las placas de Peyer (PP), los folículos linfoides aislados y los nódulos linfáticos mesentéricos (MLNs) (Mason *et al.*, 2008; Brandtzaeg *et al.*, 2008). Las placas de Peyer están localizadas mayormente en el íleon distal, su estructura se compone de grandes folículos de células B con pequeñas áreas de células T organizados como estructura en forma de domo (Reboldi y Cyster, 2016). Los folículos linfoides aislados son similares a las PP, pero más pequeños y se les encuentra diseminados a través del intestino en la lámina propia. Los MLNs están conformados por compartimentos llamados paracorteza, corteza y médula; se componen de gran número de linfocitos que continuamente transitan dentro estos compartimentos. Estas estructuras constituyen el escenario en la inducción adaptativa de la respuesta inmune. La linfa proveniente del intestino se filtra y los antígenos o las APCs cargados con antígenos migran de la lámina propia al encuentro de linfocitos para establecer la sinapsis inmunológica que lleva a la activación y diferenciación de linfocitos. Los linfocitos ya activados también pueden llegar de la lámina propia para sufrir una mayor diferenciación en los ganglios linfáticos mesentéricos (Buettnerand y Bode, 2012).

2.6 Inmunización en la mucosa intestinal

Cuando sucede la inmunización oral, el antígeno puede atravesar la barrera epitelial y llegar al GALT de diferentes maneras: (1) a través de células epiteliales que pueden tomar antígenos solubles que se han difundido a través de uniones epiteliales estrechas o también por rutas transcelulares, (2) a través de la toma directa de células dendríticas CX3CR1⁺ que capturaran directamente antígenos

en el lumen intestinal, (3) así como también puede ser transportado a través de las células M (Soloff y Barratt-Boyes, 2010). Una vez que el antígeno es tomado las DCs/macrófagos CX3CR1⁺ lo procesan y presentan para establecer la sinapsis inmune y desencadenar la activación y diferenciación de linfocitos en los MLNs (Wang *et al.*, 2014; Ohno, 2016). La activación de linfocitos inicia con el reconocimiento de un epítoto asociado con el complejo principal de histocompatibilidad II (MHCII) que están expuestos en la superficie de las APCs. De parte de los linfocitos, el receptor de células T (TCRs) establece la interacción con el complejo MHC-epítoto, llevando a la generación de señales intracelulares que orquestan la activación de linfocitos (Brandtzaeg *et al.*, 2008) (Fig 1). Una vez que las DCs/macrófagos adquieren un fenotipo activo y maduro, imprimen un patrón de referencia sobre los linfocitos como es la expresión de receptores como $\alpha 4/\beta 7$ y CCR9, que son específicos para la molécula-1 de adhesión celular direccionada a la mucosa asociada al intestino (MAdCAM-1) y a TECK/CCL5, respectivamente (Johansson-Lindbom y Agace, 2007). De esta manera, los linfocitos B y T activados en la mucosa son capaces de entrar en el sistema circulatorio y pueden migrar de regreso a los sitios efectores de la mucosa, incluyendo compartimentos de la mucosa diferentes a los sitios de activación (Czerkinsky y Holmgren, 2012). Se han descrito diferentes subconjunto de APCs en la lámina propia incluidas células CD11b⁺CX3CR1⁺ las cuales no migran a los nódulos linfáticos mesentéricos pero producen IL-10 (Berin y Shreffler, 2016), y las células CD11c⁺CD103⁻CX3CR1⁻ que pueden migrar a los nódulos linfáticos mesentéricos presentan el antígeno a células CD4⁺ naïve y promover la diferenciación a células T reguladoras (Tregs) en un proceso que involucra la secreción de metabolitos como ácido retinoico, enzimas como indoleamina 2,3 dioxigenasa y retinol dehidrogenasa, así como citocinas como TNF- β e IL-10 (Schiavi *et al.*, 2015). En contraste con las DCs periféricas que son activadas por el reconocimiento de PAMPs, las DCs intestinales son continuamente expuestas a PAMPs de la microbiota intestinal esto hace que requiera de señales adicionales para su activación, por lo tanto las DCs intestinales inducen tolerancia (Aliberti,

2016). Sin embargo, ciertos componentes en la microbiota como las bacterias filamentosas inducen respuestas Th17 (Mann *et al.*, 2013). La expansión de células Treg lleva a una supresión de las células B y células T citotóxicas y otro subconjunto de células CD4+ (Goodman y Pizarro, 2013). Además, las células Tregs promueven la tolerancia mediante la migración hacia la lámina propia suprimiendo la acción de la migración las células dendríticas CD11c+CD103–CX3CR1 que provienen de los MNLs (Hadis *et al.*, 2011). Estos hechos explican porqué la línea entre la inducción de la tolerancia y la activación de la respuesta inmune es muy delgada en las vacunas orales, que requieren de adyuvantes que puedan inducir o aumentar la respuesta inmune para superar estos mecanismos tolerogénicos. Cuando la inducción de la inmunidad activa es llevada a cabo con fines profilácticos y terapéuticos, la vacuna debe sortear la expansión de las células Tregs. Dentro los factores que definen el tipo y magnitud de la respuesta inmune inducida están la naturaleza del antígeno, los adyuvantes coadministrados con el antígeno y la dosis. (Newsted *et al.*, 2015).

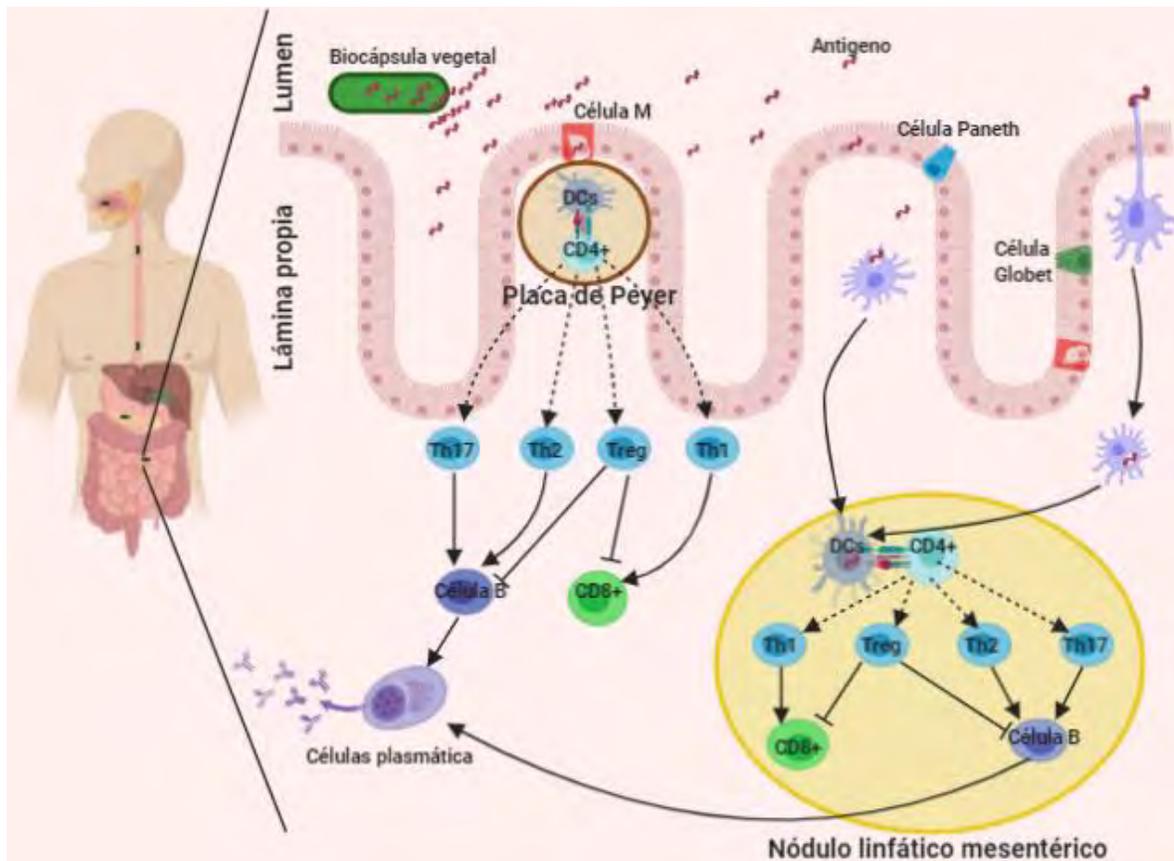


Figura 1. Representación simplificada de los componentes generales de sistema inmune en mucosas y de la respuesta generada por un antígeno administrado de manera oral y entregado al intestino por el bioencapsulamiento del tejido vegetal. Se muestran tres rutas por las cuales el antígeno es presentado a las células T cooperadoras. (1) La entrada del antígeno mediado por las células M y transportado a las placas de Peyer. (2) El antígeno puede entrar a la lámina propia por las uniones estrechas del epitelio o por transcitosis mediada por el epitelio. (3) El antígeno es tomado directamente del lumen por células dendríticas (DCs) que extienden sus dendritas por las uniones intraepiteliales. Una vez que el antígeno es tomado por alguna célula presentadora de antígeno (APC) ya sea macrófagos o DCs, este es procesado dentro de la APC y presentado mediante el MHCII al TCR de una célula T cooperadora en un proceso llamado sinapsis inmunológica y dependiendo de la naturaleza del antígeno la célula T cooperadora naíve puede diferenciarse en las subpoblaciones Th1, Th2, Th17 o Treg generando diferentes respuestas.

2.7 Vacunas orales entéricas expresadas en plantas

La ruta oral es la vía natural de las infecciones causantes de diarrea. Es por eso que los esfuerzos para crear una vacuna efectiva contra los diversos patógenos entéricos es que sea de carácter oral, ya que es importante generar protección eficiente en la primera línea de contacto dentro de los compartimentos intestinales (Serazin *et al.*, 2010). La mucosa intestinal es protegida por componentes especializados del sistema inmune tanto innato como adaptativo; la primera provee de células capaces de tomar y procesar antígenos y secretar señales proinflamatorias, mientras que el sistema adaptativo es responsable del reconocimiento específico del antígeno, de respuestas efectoras específicas y de la memoria inmunológica (Pasetti *et al.*, 2011). Dentro de la mucosa, las células M son las responsables de capturar y transportar, mientras que las DCs además procesan y presentan a los antígenos de patógenos; en cambio, los linfocitos B y T realizan funciones efectoras especializadas (secreción de anticuerpos, citocinas y funciones citotóxicas) (Soloff y Barratt-Boyes, 2010). Las vacunas orales dependiendo su naturaleza, pueden activar mecanismos efectoros específicos del sistema inmune. Por ejemplo, se puede generar la producción de anticuerpos IgA de la mucosa que previenen el anclaje y la invasión de patógenos o neutralizar enterotoxinas; o generar anticuerpos IgG en suero que neutralizan a los patógenos tanto en la mucosa como en a nivel sistémico; o se puede activar respuestas de citotoxicidad celular (Pasetti *et al.*, 2011).

Las plantas son una plataforma efectiva para la producción de subunidades vacunales, además de las propiedades intrínsecas de la planta se ha observado que algunos compuestos (polisacáridos, saponinas, flavonoides, alcaloides y compuestos fenólicos) ayudarían a potenciar la respuesta inmune (Takeyama *et al.*, 2015). Además el carácter comestible de algunas de ellas genera un plus para su fácil entrega. Existen varias vacunas entéricas producidas en plantas en diferentes niveles de experimentación, desde fases preclínicas hasta fases clínicas nivel I. Se han utilizado diferentes tipos de plantas (arroz, zanahoria, maíz y papa)

para producir antígenos entéricos, como las subunidades B de la toxina Termolábil (LT) de ETEC o de la toxina del cólera (CT) de *V. cholerae*. En los diferentes ensayos se han observado que cuando se ha administrado de manera oral dentro del tejido vegetal, éstos han generado producción de anticuerpos IgA e IgG específicos que son capaces de generar protección cuando son sometidos a retos infecciosos tanto en animales como en humanos (Haq *et al.*, 1995; Mason *et al.*, 1998; Tacket *et al.*, 1998; Lamphear *et al.*, 2002; Tacket, 2004; Rosales-Mendoza *et al.*, 2008; 2011). Los ensayos con humanos han mostrado resultados interesantes. En un primer experimento, para mostrar la efectividad de LTB producida en papa, 40 voluntarios fueron inmunizados de manera oral con 100g del material vegetal que contenía 0.4–1.1 mg de LTB. Del total, 91% de los voluntarios desarrollaron anticuerpos anti-LT de los cuales el 71% desarrollaron anticuerpos neutralizantes y la mitad de ellos se detectaron anticuerpos IgA en las heces (Tacket *et al.*, 1998). En otro ensayo clínico se administró germinado de maíz que expresaba LTB a voluntarios adultos para evaluar la seguridad y la inmunogenicidad. El 78% de los vacunados cuadruplicaron sus niveles de anticuerpos IgG anti-LT después de la tercera dosis (Tacket *et al.*, 2004).

También se han expresado en tejido vegetal de tabaco y zanahoria proteínas quiméricas, fusiones de LTB con otras toxinas o factores de colonización como por ejemplo LTB con ST (Rosales-Mendoza *et al.*, 2011). Por otro lado, también se han realizado estudios de vacunas entéricas polivalentes capaces de proteger contra dos o más patógenos causantes de enfermedades entéricas. Por ejemplo, Yu y Langridge en el 2001 construyeron un prototipo de vacuna polivalente que se componía de CTB, de la enterotoxina NSP4 de rotavirus y del factor de colonización CFA/II de ETEC. Se observaron niveles detectables de anticuerpos específicos, niveles elevados de IL-2 e INF γ , indicando una fuerte respuesta Th1, así como también se redujo la diarrea en los ratones inmunizados que fueron retados con rotavirus.

Las vacunas contra enfermedades entéricas producidas en plantas que están en fases de experimentación avanzadas son precisamente la CTB y LTB expresadas tanto en arroz como en maíz respectivamente alcanzan ya la fase clínica I. Así como también una vacuna contra el rotavirus, ya que es de los patógenos que más casos aporta a este tipo de padecimientos. Se han producido partículas virales en diversos tejidos vegetales, principalmente en lechuga, y los estudios de esta vacuna ya alcanzan niveles clínicos de fase I también (Takeyama *et al.*, 2015). Por lo tanto, existe mucha evidencia positiva del uso de vacunas orales producidas en plantas para varias enfermedades entéricas a diferentes niveles de experimentación. Sin embargo, aún es necesario el desarrollo de ensayos clínicos en fases avanzadas (Tabla II).

Tabla 2. Vacunas entéricas producidas en plantas

Patógeno	Antígeno	Planta	Nivel de expresión	Fases clínicas	Referencia
<i>V. cholerae</i>	CTB	Arroz	2.35 µg/g	Preclínica	Yuki et al. 2013
<i>V. cholerae</i>	CTB	Arroz	2.2% TSP	Preclínica	Ozvald et al. 2008
<i>V. cholerae</i>	CTB	Maíz	0.19% TSP	Preclínica	Karaman et al.2012
ETEC	Fimbria y epítopes de rotavirus	Papa	0.1% TSP	Preclínica	Lee et al. 2004
ETEC	LTB y ST	Tabaco/ zanahoria	2.3% TSP	Preclínica	Rosales- Mendoza et al. 2009, 2011
ETEC	LTB	Arroz	0.12% TPS	Preclínica	Kim et al. 2010
Rotavirus y Salmonella	VP7 y VP4 FljB	Tabaco	4.1 – 12.3µg/g	Preclínica	Bergeron-Sandoval et al. 2010
Rotavirus, <i>V. cholerae</i> y ETEC	Epitpes de toxina NSP4 CTB y CFA/1	Papa	0.75- 10 µg/g	Preclínica	Yuand Langridge, 2001
ETEC	LTB	Papa	11µg/g	Fase I	Tacket et al. 1998
ETEC	LTB	Germinado de Maíz	0.5mg/g	Fase I	Tacket et al. 2004

3. JUSTIFICACIÓN

Las enfermedades entéricas persisten como problema de salud pública en los países en vías de desarrollo afectando principalmente a adultos mayores y niños menores de 5 años. El inadecuado manejo de alimento, la falta de sanidad y el agua contaminada son las causas principales de la propagación de las enfermedades entéricas. La manera como se ha tratado esta problemática es mediante la administración de antibióticos. Sin embargo, el uso indiscriminado de los mismos ha generado cepas resistentes y por lo tanto agudiza los problemas de infecciones bacterianas. Por lo anterior, es necesario el buscar alternativas para contrarrestar el problema de las infecciones bacterianas y la vacunación se presenta como una alternativa viable capaz de generar inmunoprolaxis contra estos patógenos. Existen vacunas licenciadas contra cólera y rotavirus, no obstante, estas vacunas necesitan de una cadena en frío para su mantenimiento y distribución lo cual encarece y dificulta su administración. La producción de vacunas a base de plantas ha mostrado ser una buena alternativa para superar estas limitantes en la generación de vacunas de bajo costo y fácil administración ya que no requieren de cadena en frío y al poder ser administradas de manera oral no requeriría del uso de jeringas ni personal capacitado. Sumado a las nuevas tecnologías informáticas y moleculares que permiten generar subunidades vacunales de manera recombinante que podría diseñarse de una manera multiepitópica y polivalente para generar una inmunidad más eficiente y capaz de generar protección contra un patógeno determinado o varios a la vez.

4. HIPÓTESIS

Si una proteína recombinante compuesta de diferentes determinantes antigénicos de los patógenos *E. coli* ETEC, *V. cholerae*, *V. parahaemolyticus* y *S. typhimurium* se expresa dentro del tejido vegetal entonces cuando este tejido vegetal se administre en ratones BALB/c, este será inmunogénico e inducirá anticuerpos específicos para cada uno de los epítopes incorporados y generará protección ante retos infecciosos.

5. OBJETIVO

5.1 Objetivo general

Desarrollar una vacuna multiepitópica expresada en tejido vegetal compuesta de determinantes antigénicos de las bacterias enteropatógenas: *E. coli* enterotoxigénica, *V. cholerae*, *S. typhimurium* y *V. parahaemolyticus*.

5.2 Objetivos particulares

Diseñar y construir dos vectores con genes multiepitópicos con secuencias de los epítopes de antígenos de las bacterias *E. coli* ETEC, *V. cholerae*, *S. typhimurium* y *V. parahaemolyticus*, uno fusionado a LTB y otro fusionado a ToxA.

Obtener líneas transgénicas de plantas de tabaco transformadas con los vectores (pBI121-ToxAentero y pBI121-LTBentero) que expresen las proteínas multiepitópicas.

Evaluar la inmunogenicidad del tejido vegetal que expresa las proteínas multiepitópicas LTBAentero y ToxA entero en ratones inmunizados vía subcutánea y vía oral con el tejido vegetal del tabaco transformado.

Evaluar la inmunoprotección del tejido vegetal que expresa las proteínas multiepitópicas en ratones inmunizados con el tabaco transformado mediante retos con la toxina CT y la bacteria *V. parahaemolyticus*.

6. MATERIALES Y MÉTODOS

6.1 Diseño de los genes multiepitópicos LTBentero y ToxAentero

Los genes multiepitópicos fueron diseñados con base a un escrutinio de literatura reportada. Se seleccionaron epítopes de antígenos inmunogénicos de los patógenos entéricos *E. coli* ETEC, *V. cholerae*, *Salmonella typhimurium* y *V. parahaemolyticus* (Jacob *et al.* 1983, 1985; Newton *et al.* 1989; Bergman *et al.* 2005; Kremer *et al.* 2011; Rosales-Mendoza *et al.* 2011; Zha *et al.* 2016). Además de las secuencias de los epítopes de los patógenos, se incorporó la secuencia de un acarreador/adyuvante. A un gen se le agregó la secuencia de la subunidad B de la toxina LT de *E. coli* ETEC y se le llamó *ltbetentero*, y otro gen se le incorporó la secuencia de la toxina A de *V. parahaemolyticus* y fue nombrado *toxAentero*. Los genes diseñados cuentan con la secuencia del péptido señal de *Glycine max* y la secuencia señal de retención en el retículo endoplásmico SEKDEL. Las secuencias fueron flanqueadas con los sitios de restricción de *SacI*, *SmaI* y *BamHI* para poder ser ligados al vector pBI121. Una vez diseñados se mandaron a sintetizar a la casa comercial Genscript®

6.2 Construcción de los vectores y clonación de los genes *ltbentero* y *toxAentero*

Los genes sintetizados fueron clonados en células *E. coli* top 10 con los vectores de origen (pUC-LTBentero y pUC-ToxAentero) para su propagación mediante una transformación convencional por choque térmico (Sambrook y Russell, 2001). Después fueron digeridos con las enzimas *SacI* y *SmaI* y los genes de interés fueron separados por electroforesis. Se purificaron las bandas correspondientes (639 pb ambos genes) con el kit de purificación *illustra GFX PCR DNA and Gel Band Purification Kit* de GE Healthcare® para posteriormente ser ligados en vectores pBI121.

Posteriormente se realizó la transformación por choque térmico de las células *E. coli* Top 10 con las construcciones obtenidas pBI121-LTBentero y pBI121-

ToxAentero. Las células transformadas se pusieron a crecer en medio de selección Luria-Bertani (LB) kanamicina (50 µg/mL). Se realizaron perfiles de digestión para corroborar la clonación. Las colonias transformadas con la construcción pBI121-LTBentero se digirieron con la enzima *HindIII* y las colonias transformadas con la construcción pBI121-ToxAentero con la enzima *ClaI*.

6.3 Transformación de plantas de tabaco con *Agrobacterium tumefaciens*

Primero se germinaron semillas esterilizadas de tabaco (*Nicotiana tabacum* cv. Petite Havana SR1) en frascos de 15 cm de alto y 5 cm de diámetro en medio RMOP hasta la generación de una plántula con hojas verdaderas. La transformación de células competentes de *Agrobacterium tumefaciens* GV3101 se realizó por electroporación con los vectores pBI121-LTBentero y pBI121-ToxAentero como lo describió Horsch *et al.*, (1985). Se seleccionó una colonia de cada una de las transformantes que crecieron en el medio sólido de selección agar LB/ kanamicina (50 µg/mL). La colonia se inoculó en 10 mL de LB y se incubaron a 37 °C hasta alcanzar una DO₆₀₀ de 0.9. Para la agro-infección se tomaron segmentos de hojas de tabaco de aproximadamente 5mm x 5mm y se sumergieron en el cultivo de *A. tumefaciens* transformado. Por último se dejaron en co-cultivo por dos días en oscuridad a una temperatura de 28°C en medio RMOP.

6.4 Regeneración de callos y plantas transformadas

Después del co-cultivo con el *Agrobacterium* transformante, los explantes de hojas de tabaco agro-infectadas se pasaron a medio de selección RMOP con los antibióticos kanamicina (50 mg/L) y cefotaxcima (500mg/L) y se incubaron a una temperatura de 28°C y con un fotoperiodo de 24 h de luz y se realizó un recambio del medio cada 10 días. Los explantes que sobrevivieron al medio de selección formaron callo y posteriormente brotes que fueron transferidos a medio MS para enraizar. Una vez que las plántulas generaron raíz se pasaron a suelo en macetas donde permanecieron en invernadero en condiciones óptimas y constantes para su crecimiento.

6.5 Detección de los transgenes *Itbentero* y *toxAentero* en las líneas de tabaco transformadas

La detección de los transgenes se realizó por PCR punto final en las plantas transformadas con los genes *Itbentero* o *toxAentero*. Se utilizaron los cebadores del sitio del promotor 35S como sentido 5' CGCACAATCCCACTATCCTTCGC 3' y del terminador NOS como antisentido 5'AGGGTTTCGCTCATGTGTTGAGC3' que son característicos del vector pBI121. Brevemente, la extracción del ADN de las hojas de las plantas transformadas y silvestres se obtuvieron de acuerdo al protocolo de Dellaporta *et al.*, (1983). La mezcla de reacción para la PCR fue de; 25µL con 50ng de ADN 1.5mM de cloruro de magnesio 2.5 U de Taq polimerasa 1 mM de dNTPs y 1µM de los cebadores correspondientes. Las condiciones en el termociclador fueron las siguientes: 94 °C por 2 min para la desnaturalización inicial 35 ciclos de desnaturalización a 95°C por 30 s, alineación a 56 °C por 60 s, elongación a 72°C por 60 s, seguido de una extensión final de a 72°C por 5 min. Los productos de la PCR fueron analizados por electroforesis en geles de agarosa al 1%.

6.6 Inmunoreactividad: detección y cuantificación de las proteínas LT*Bentero* y ToxA*entero*

6.6.1 Expresión y purificación de ToxA recombinante

La obtención de la ToxA recombinante se realizó con la finalidad de tener una proteína de referencia y realizar una curva estándar para la cuantificación de la proteína ToxA*entero* en las hojas de tabaco. También para la hiperinmunización de ratones y obtener antisuero anti-ToxA para los análisis de *Dot blot*, *Western blot* y *ELISA*. Primero se clonó y purificó la construcción el gen *toxA* dentro del vector de expresión pET-32a en células *E. coli* Top 10. Después la construcción pET-32aToxA se utilizó para transformar a la cepa de expresión *E. coli* BL-21 (D3). Se obtuvieron colonias positivas por medio de selección Luria Bertani (LB) con antibiótico (ampicilina 50mg/mL) que crecieron a una incubación de 24 h a 37 °C. Se confirmó la inserción del vector por medio de una PCR convencional utilizando

los cebadores específicos T7 y se mandó a secuenciar a Genewiz Inc. Se tomó una colonia previamente confirmada y se cultivó en medio LB con antibiótico en agitación a 37 °C hasta que alcanzo una DO_{600} de 0.5. La expresión se indujo con Isopropil- β -D Tiogalactopiranosido (IPTG), el cultivo se incubó a 37 °C por 24 h. Las células fueron cosechadas por centrifugación a 8000 x g por 10 min a 4 °C, se resuspendió el pellet en amortiguador de lisis (Tris-HCl 20 mM, pH 7.0) y se ultrasonicó a una amplitud de 35%. Finalmente se centrifugó a 13,000 x g y se recuperó el sobrenadante que fue analizado por SDS-PAGE.

La purificación de la ToxA recombinante se realizó por Cromatografía de afinidad por iones metálicos inmovilizados (IMAC) utilizando el sistema BioRad BioLogic LP. Brevemente, se cargó la columna con 4.5 mL de Ni^{2+} y se estabilizó con amortiguador A (NaH_2PO_4 20 mM, NaCl 500 mM, pH 7.0) a un flujo de 0.5 mL/min. Se le inyectó la extracción de proteínas fase soluble a un flujo de 0.1 mL/min por 1 h. Se realizó la elución con amortiguador B (NaH_2PO_4 20mM NaCl, 500 mM e imidazol 500mM a un pH, 7.0) a un flujo de 0.5 mL/min. Se colectaron cinco fracciones de 1 ml que se analizaron por SDS-PAGE. Finalmente la concentración de ToxA fue determinado por el método de Lowry (Lowry *et al.*, 1951).

6.6.2 Hiperinmunización

La obtención de antisueros se realizó por hiperinmunización. Brevemente, se inmunizaron ratones macho BALB/c de 6-8 semanas de edad con CTB (invitrogen) y ToxA recombinante y con los péptidos de los epitopes de ST, LptD y FliC que se mandaron a sintetizar a GenScript®. La primera inmunización se realizó en la pata de los ratones con 10 μ g del péptido y 10 μ L del adyuvante completo de Freund. Las tres posteriores inmunizaciones se realizaron de manera intraperitoneal con 50 μ g del péptido con 50 μ L del adyuvante incompleto de Freund. La toma de sangre se realizó mediante sangrado de la cola a la semana 3 y 4. La sangre fue centrifugada a 3000 x g durante 10 minutos para recuperar el suero. Para la detección de los antisueros se realizó ELISA con los sueros colectados de las

semanas 3 y 4 haciendo diluciones seriadas. Brevemente, se depositaron 1 μg de cada péptido o proteína diluido en buffer de carbonato en un volumen de 50 μL . Se dejó la placa por toda la noche a 4 °C y después se realizaron los lavados con PBS-T [NaCl 100 mM, Na₂HPO₄ 10 mM, KH₂PO₄ 3 mM (pH 7.2), Tween-20 0.05% (v/v)] 3 veces se bloqueó con 200 μL de leche descremada al 5% (0.5 g de leche en 10 mL de PBST) y se dejó incubando por 2 h a temperatura ambiente, se lavó 3 veces con PBST e se depositaron las diluciones en un volumen de 50 μL PBST. Se dejó incubando la placa durante toda la noche a 4 °C. Posteriormente se agregó el segundo anticuerpo anti-IgG de ratón conjugado con la peroxidasa diluido 1:2000 (Sigma, St. Louis, MO) y se dejará incubando por 2 h a temperatura ambiente. Se realizan los últimos lavados con PBS-T y se le añadió 50 μL del substrato ABTS con agua oxigenada al 3% se incubó máximo 2 h en oscuridad leyéndose cada 5 o 10 min a una absorbancia de 405 nm en el lector de microplacas iMark™ (Bio-Rad, Hercules, CA).

6.6.3 Extracción de proteínas

Para la detección y cuantificación de las proteínas LTBAentero y ToxAentero en el tejido vegetal se realizó la extracción de proteínas descrito por Ibarra y colaboradores en 2011. Primero se homogenizaron 50 mg de tejido vegetal en un mortero frío, posteriormente se agregaron 500 μL de Buffer de extracción proteínas vegetales (750 mM Tris-HCl pH 8.0 15% Sacarosa, 1 mM inhibidor de proteasas PMSF, pH 8). Enseguida se centrifugan los tubos a 16000 x g durante 10 minutos a 20-25 °C y se tomó el sobrenadante para los posteriores análisis.

6.6.4 Dot blot

Se utilizaron membranas de Polidivilino de Fluoruro (PVDF) BioTrace (Pall Corporation, NY) donde se depositó directamente 1 μL del extracto proteico de cada una de los extractos de las líneas de tabaco transformadas. Como controles positivos se utilizaron 1 μg del péptido ST sintético (Genscript®) para la detención de la proteína LTBAentero y 1 μg la toxina A recombinante para la detección de ToxAentero. Como control negativo se utilizó el extracto de proteínas de una

planta de tabaco sin transformar (WT). Se dejó incubar la membrana por dos min a temperatura ambiente y después se bloqueó con PBS-T [NaCl 100 mM, Na₂HPO₄ 10 mM, KH₂PO₄ 3 mM (pH 7.2), Tween-20 0.05% (v/v)] y leche descremada al 5% y se dejó incubando por 2 h en agitación a temperatura ambiente y se realizaron tres lavados de 5 min con PBS-T. Ya lavadas la membranas se le agrego 5 mL de PBS con antisuero anti-ST a una dilución 1:500 a la membranas las proteínas de las plantas transformadas con pBI121-LTBentero, y con el antisuero anti-ToxA a una dilución 1:500 a la membrana con las proteínas de las plantas transformadas pBI121-ToxAentero, y se dejaron incubando 24 h a 4°C. Se lavaron 3 veces con PBS-T y luego se incubó con el segundo anticuerpo anti-IgG de ratón conjugado con peroxidasa a una dilución 1:2000 (Sigma, St. Louis, MO) y se dejó incubando por 2 h en agitación a temperatura ambiente. Por último se volvió a lavar la membrana con PBS-T y se reveló en oscuridad con 250 µL de las soluciones 1 y 2 del kit PIERCE® ECL Western Blotting Substrate (Thermo Scientific) se incubó por 1 min y se colocó la membrana dentro del cassette junto la placa de revelado y se dejó por 5 min, para finalmente colocarla en la solución revelado (Kodak) para visualizar los puntos.

6.6.5 Western blot

Se corrieron electroforesis en geles de poliacrilamida con dodecilsulfato sódico (SDS-PAGE) de los extractos de proteínas de líneas de tabaco transformadas con pBI121-LTBentero y pBI121-ToxAentero. Como controles positivos se utilizaron CTB (SIGMA) y la ToxA respectivamente, y como control negativo extracto de proteínas de tabaco sin transformar (WT). Una vez finalizado el SDS-PAGE se realizó la transferencia a una membrana de Polidivilino de Fluoruro (PVDF) BioTrace (Pall Corporation, NY). Brevemente, se humedecieron los componentes (papel filtro, esponjas y la membrana) con buffer de transferencia (Tris-BASE 20 mM, Glicina 150 mM, Metanol 20%) y se fijaron en el cassette de transferencia. Después se realizó la electrotransferencia a 400 mA durante 30 minutos, una vez terminada la transferencia se colocó la membrana en PBS-T con leche

descremada al 5% para bloquearla durante 2 h en agitación a temperatura ambiente. Se realizaron tres lavados con PBS-T durante 5 min y se incubó durante toda la noche con el antisuero anti-LTB a una dilución 1:500 para las líneas transformadas con pBI121-LTBentero y antisuero anti-ToxA 1:500 para las transformadas con pBI121-ToxA. Se lavó en PBS-T 3 veces durante 5 min y se incubó durante 2 h con el segundo anticuerpo anti-IgG de ratón conjugado con peroxidasa a una dilución 1:2000 (Sigma, St. Louis, MO) y se dejó incubando por 2 h en agitación a temperatura ambiente. Por último, se lavó la membrana con PBS-T y se reveló en oscuridad con 250 μ L de las soluciones 1 y 2 del kit PIERCE® ECL Western Blotting Substrate (Thermo Scientific) y se colocó la membrana dentro del cassette junto la placa de revelado, se dejó por 5 min para finalmente colocarla en la solución revelado (Kodak) para las proteínas transferidas.

6.6.6 ELISA

Se realizaron análisis por ELISA para la cuantificación de las proteínas recombinantes de las diferentes líneas de tabaco en las cuales se detectaron las proteínas LTBAentero o ToxAentero. Se utilizaron los antisueros anti-CTB o anti-ToxA respectivamente. Brevemente, se colocaron 50 μ L del extracto de proteínas de las líneas transformadas con pBI121-LTBentero o las transformadas con pBI121-ToxAentero y se dejó incubando toda la noche a 4°C. Se lavó 3 veces por 5 min con PBS-T. Se bloqueó la placa con 50 μ L de leche descremada al 5% en PBS-T y se incubó por 2 h a temperatura ambiente. Se lavó 3 veces con PBS-T y se agrega 50 μ L del antisuero anti-LTB o anti-ToxA a una dilución 1:500 y se dejó incubando también toda la noche a 4 °C. Al siguiente día se realizaron los lavados y se añadió el segundo anticuerpo anti-IgG de ratón conjugado con la peroxidasa diluido 1:2000 (Sigma, St. Louis, MO) y se dejará incubando por 2 h a temperatura ambiente. Se realizaron los últimos lavados con PBS-T y se le añadieron 50 μ L del substrato ABTS con agua oxigenada al 3% se incubó máximo 2 h en oscuridad leyéndose cada 5 o 10 min a una absorbancia de 405 nm en el lector de microplacas iMark™ (Bio-Rad, Hercules, CA).

6.7 Ensayos de inmunogenicidad

Se utilizaron ratones hembra BALB/c de 12 semanas de edad, estas fueron alimentadas con alimento estéril y agua ad libitum siguiendo los procedimientos indicados por el Regulación Federal para el Cuidado y Experimentación Animal (SAGARPA, NOM-062-ZOO-1999, México) utilizando el protocolo aprobado por el Comité institucional de Ética (CIED). Se utilizaron cuatro ratones por grupo (n4) a los cuales se les administro vía subcutánea 10 mg (≈ 70 ng de LTBAentero o ToxAentero) de extracto de tejido vegetal fresco o vía oral 50 mg (≈ 300 ng de LTBAentero o ToxAentero) de tejido vegetal fresco molido. Como control se administró tejido vegetal fresco sin transformar (WT) de misma manera 10 mg vía subcutánea y 50 mg vía oral. El esquema fue de 4 inmunizaciones semanales, un día previo a las inmunizaciones se tomaron muestras de sangre y heces (Fig.2).

El ensayo de inmunogenicidad fue determinado por anticuerpos IgA en heces e IgG en suero mediante ELISA. Brevemente, se sensibilizaron los pozos de las placas de 96-pozos con 250 ng de CTB o con 1 μ g de los péptidos sintéticos en 50 μ L de buffer de carbonatos (15 mM Na₂CO₃, 35 mM NaHCO₃) y se dejaron incubando por una noche a 4°C. Al día siguiente se lavaron 3 veces con PBS-T y se bloqueó con PBS-T leche semicondensada al 5% por 2 h a temperatura ambiente. Se realizaron otros 3 lavados y se añadió el extracto de 100 mg heces diluido en PBS-T leche 5% en diluciones de 1:2, 1:4, 1:8 y 1:16 para la determinación de IgA o el suero en diluciones 1:20, 1:40, 1:80 y 1:160 para la determinación de IgG y se incubó por una noche a 4°C. Al día siguiente se realizaron los respectivos lavados y se añadió el segundo anticuerpo anti-ratón conjugado con peroxidasa anti-IgA o anti-IgG respectivamente (Sigma, St. Louis, MO) y se incubó por 2 h a temperatura ambiente. Finalmente se le agregó el sustrato ABTS (Sigma, St. Louis, MO) con peróxido de hidrogeno, se incubó máximo 2 h en oscuridad leyéndose cada 10 min a una absorbancia de 405 nm en el lector de microplacas iMark™ (Bio-Rad, Hercules, CA).

6.8 Retos infecciosos

Para medir la inmunoprotección de LTBenfero y ToxAentero se realizaron dos retos infecciosos en ratones hembras BALB/c de 8 semanas de edad (n4) previamente inmunizados vía oral con 50 mg del material vegetal tabaco LTBenfero o ToxAentero con el mismo esquema mencionado en el ensayo de inmunogenicidad. Un reto fue con la toxina CT de *V. cholerae* (10 µg) que fue administrada vía oral disuelta en 500 µl NaHCO₃ al 10%. Se realizó el modelo de bucle de intestino sellados para medir protección contra actividad enterotoxigénica (acumulación de fluidos en el intestino) (Richardson *et al.*, 1984). A las seis horas después del reto los animales fueron pesados y sacrificados, se colectó el intestino delgado ligado de ambos extremos y fue pesado. Se calculó la acumulación de fluido (mg de intestino) / (g de peso corporal) con la fórmula $FA = G/(B - G) \cdot 1,000$, donde la *G* es el peso del intestino más los fluidos en gramos y *B* es el peso corporal en gramos. El siguiente reto se realizó con *V. parahaemolyticus* (1X10⁸ UFC) resuspendido en PBS administrado vía intraperitoneal y se midió el tiempo sobrevivencia (Fig. 3).

6.9 Expresión génica de IL-1β y TNFα

Se extrajo ARN de las muestras de sangre e intestino ratones inmunizados vía oral con tejido vegetal LTBenfero o ToxAentero y después de retarlos con la toxina CT. La extracción de ARN se realizó por el protocolo del Trizol® Reagent (Invitrogen EUA) y se evaluó la integridad mediante la visualización en gel de agarosa al 1.5% y se cuantificó la concentración mediante la lectura de su absorbancia ($\lambda=260$ y $\lambda=280$ nm) en un espectrofotómetro (Eppendor Biophotometer plus 22331). Las muestras se trataron con ADNsa I (Life Technologies) y se realizó la síntesis de ADNc a partir de 1 µg de ARN, mediante el kit de ImProm-II™ Reverse Transcription (Promega, EUA).

Se diseñaron cebadores para genes de las citocinas IL-1β y TNFα utilizando los programas bioinformáticos Primer3, Primer-BLAST, así como los programas

OligoEvaluator™ (SIGMA-ALDRICH) y RNAfold WebServer. El análisis de RT-qPCR se realizó con un equipo CFX96 Touch™ Real-Time PCR Detection System Bio-Rad, el reactivo SsoFast™ EvaGreen® Supermix (Bio-Rad). Cada reacción de PCR se llevó a cabo en un volumen de 10 μ l (5 μ l de SsoFast™ EvaGreen Supermix, 3 μ l de agua de grado biología molecular, 0.5 μ l de cada uno de los cebadores a 10 pM tanto sentido como antisentido y 1 μ l de ADNc de las muestras a una concentración de 50 ng/ μ l. Las mezclas de reacción se incubaron a 98 °C durante 30 s; seguido de 40 ciclos a 98 °C durante 10 s; a 60 °C durante 10 s, y finalmente a 65-95 °C para la curva de disociación (melt). La especificidad del producto de PCR en tiempo real se analizó mediante una curva de disociación realizada después de la amplificación en la que se observó un solo pico a la temperatura de fusión esperada (T_m). El nivel de expresión de los genes se normalizó con el gen constitutivo de la beta-actina. La expresión relativa de cada gen en los grupos inmunizados versus control se calculó mediante la ecuación de Pfaffl. Los valores superiores a uno expresan un aumento, mientras que los valores inferiores a uno expresan una disminución.

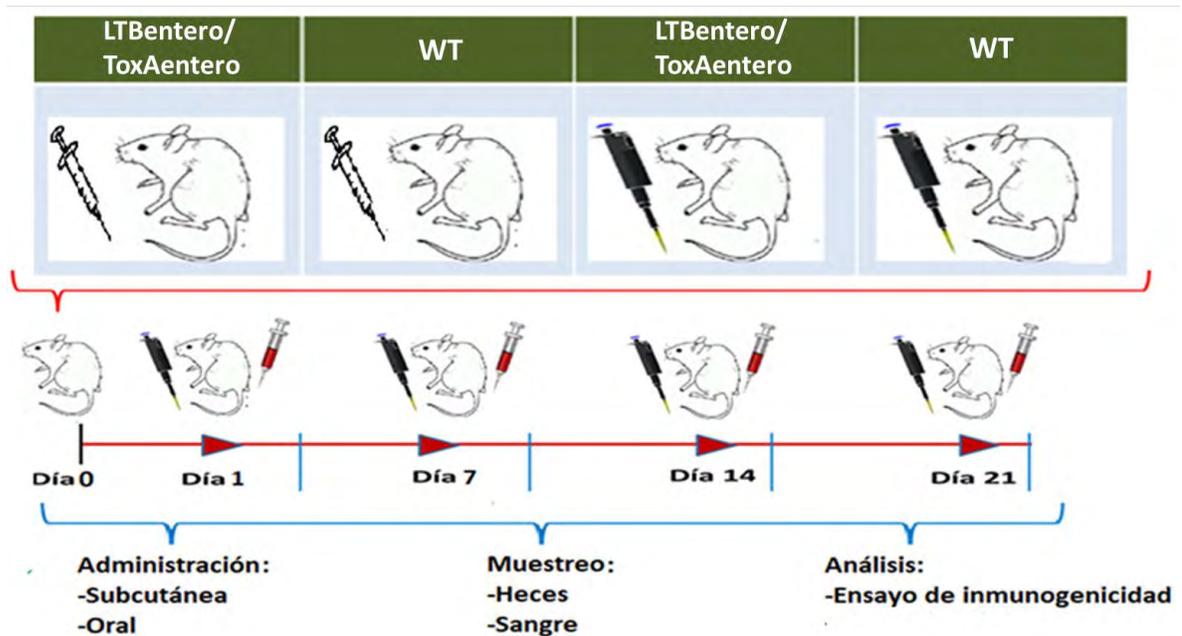


Figura 2. Esquema de inmunización ratones BALB/c con el material vegetal LTBentero y/o ToxAentero. Como control que se administró la planta sin transformar (WT). Las inmunizaciones fueron aplicadas semanalmente. El día previo a la inmunización se tomó muestras de sangre y heces.

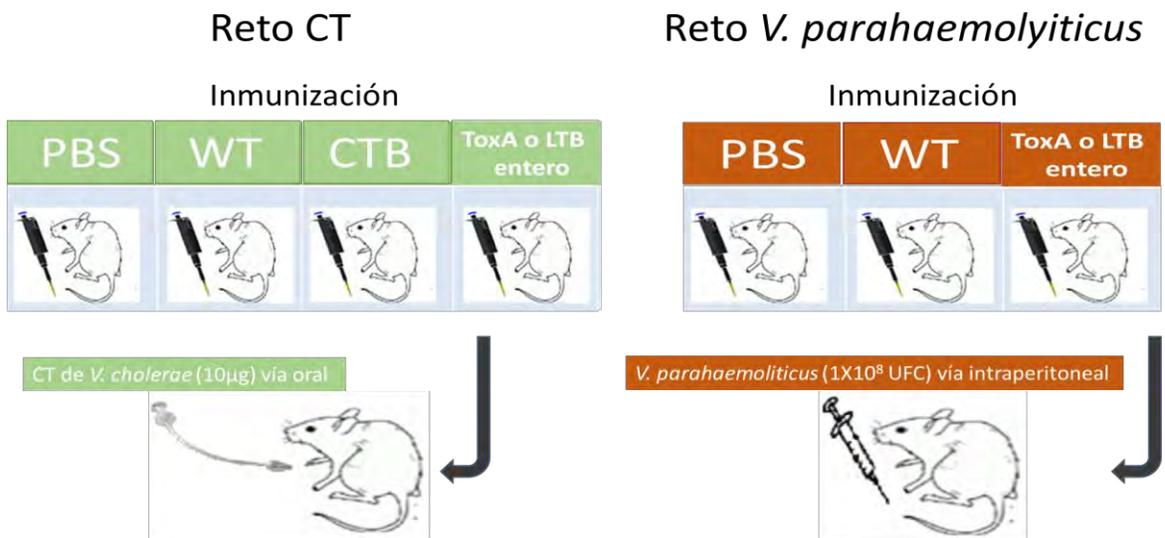


Figura 3. Diseño experimental de los retos con CT de *V. cholerae*, y *V. parahaemolyticus* en ratones BALB/c previamente inmunizados vía oral con el material vegetal Tabaco LTBentero, que contiene la proteína multiépítópica

LTBentero. Como controles negativos se trataron ratones con PBS y con tabaco silvestre (WT). Como control positivo se inmunizó con CTB para el reto con CT.

6.10 Análisis estadístico

Las diferencias significativas de los valores entre los grupos de los ensayos de inmunogenicidad, expresión de genes y la acumulación de fluidos, fueron determinadas por Análisis de Varianza (ANOVA) seguido del test Tukey como prueba post-hoc. Las diferencias se consideraron estadísticamente significativas cuando $P < 0.05$. Todos los datos fueron analizados con el programa STATISTICA 10 (StatSoft, Inc. (2011). STATISTICA (Data analysis software system, versión 10).

7. RESULTADOS

7.1 Diseño de los genes multiepitópicos

Se determinó que los epítopes de los antígenos LT y ST de *E. coli* ETEC, CT de *V. cholerae*, FliC de *S. typhimurium* y LptD de *V. parahaemolyticus* fueran incorporados a los genes multiepitópicos. Estos antígenos y sus respectivos epítopes fueron reportados en varios trabajos donde mostraban una alta inmunogenicidad (Tabla III).

Tabla 3. Epítopes de los antígenos de los patógenos entéricos.

Patógeno	Antígeno	Epítope	Referencia
<i>E. coli</i> ETEC/ <i>V. cholerae</i>	LT/CT	VEVPGSQHIDSQK	Jacob et al. 1983, 1985; Newton et al. 1989
<i>E. coli</i> ETEC	ST	SNSSNYCCELCCNPACTGCYV	Rosales et al. 2011
<i>V. parahaemolyticus</i>	LptD	WENQAIGSTGSSPEY	Zha et al. 2016
<i>S. typhimurium</i>	FliC	VQNRFNSAITNLGNT	Bergman et al. 2005; Kremer et al. 2011

7.2 Construcción de vectores y clonación de los genes *ltbentero* y *toxAentero*

Después de elegir los epítopes de los antígenos de cada una de las bacterias entéricas, se realizó el diseño de los dos genes nombrados *ltbentero* y *toxAentero*. Estos genes completos estaban constituidos por las secuencias que codifican para el péptido señal, el adyuvante (LTB o ToxA), cada uno de los epítopes, el enlazador GPGP, y la secuencia SEKDEL flanqueados por las secuencias para las enzimas de restricción *SacI* y *SmaI* para clonar en el vector pBI121 (Fig. 5).

Los genes fueron clonados en el vector pBI121 en células top10 y se obtuvieron colonias transformadas con del vector llamado pBI121-LTBentero confirmadas por perfil restricción con la enzima *HindIII* (Fig. 4a). Así como también colonias

transformadas con el vector llamado pBI121-ToxAentero que fueron confirmadas con la enzima *ClaI* (Fig. 4b).

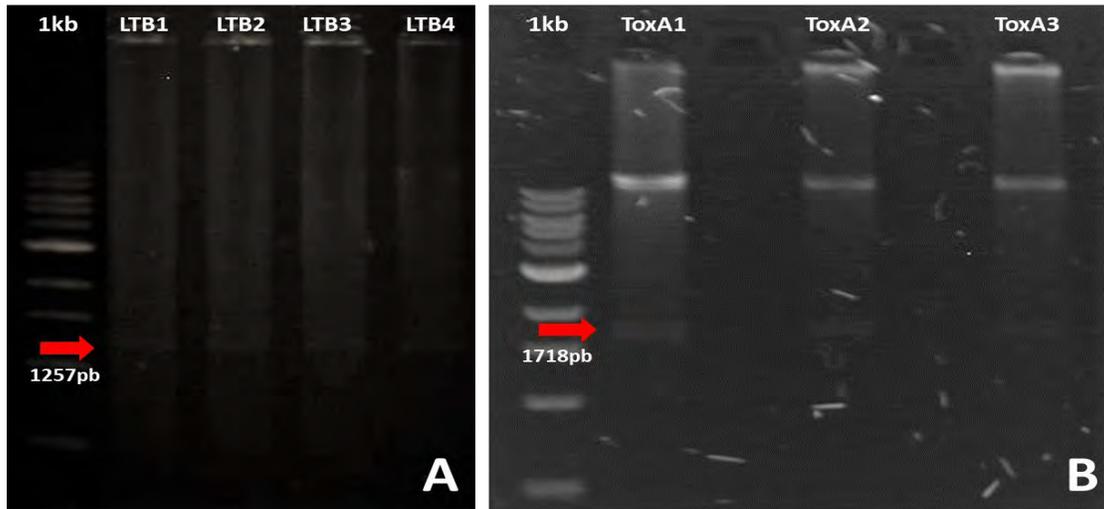
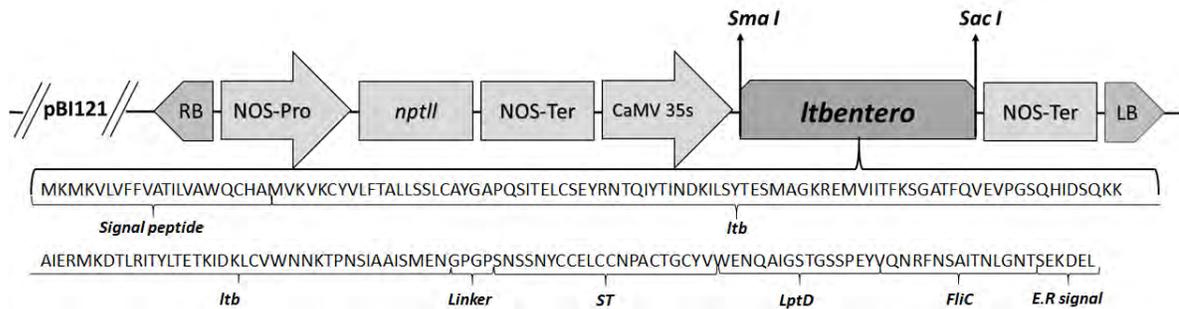


Figura 4. A). Perfil de restricción del vector pBI121-LTBentero con la enzima *HindIII*. LT1-LT4 son cuatro colonias transformadas las cuales presentan el fragmento esperado de 1257 pb. B) Perfil de restricción del vector pBI121-toxAentero con la enzima de restricción *ClaI* de tres colonias transformadas donde se encuentra el fragmento esperado de 1718 pb.



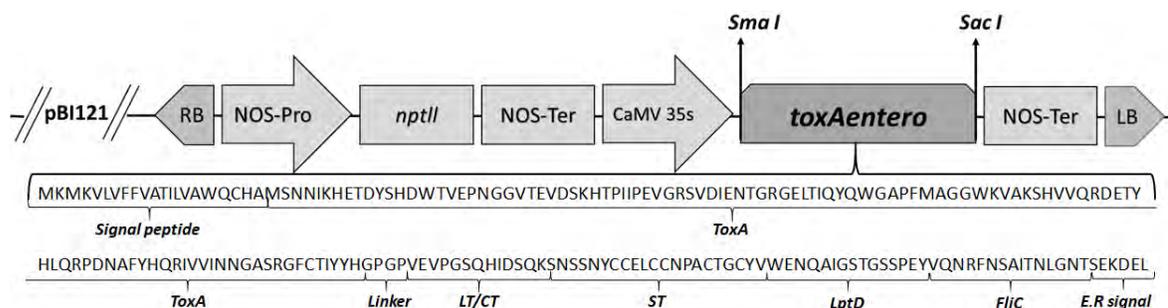


Figura 5. A) Construcción del vector de expresión pBI121-LTBentero. El gen *ltbentero* está compuesto por las secuencias que codifican para el péptido señal *Glycine max*, la secuencia completa la subunidad B de la toxina termolábil de *E. coli*, un enlazador de cuatro aminoácidos, seguido de los epítopes de ST, LptD y FliC y al final la secuencia de retención en el retículo endoplasmático SEKDEL. B) Construcción del vector de expresión pBI121-ToxAentero. El gen *toxAentero* está compuesto por las secuencias que codifican para el péptido señal *Glycine max*, la secuencia completa de la Toxina A de *V. parahaemolyticus* un enlazador de cuatro aminoácidos seguido de los epítopes de LT/CT, ST, LptD y FliC y al final la secuencia SEKDEL. El vector pBI121 tiene el promotor constitutivo 35SCaMV y es gen *nptII* que le confiere a las plantas transformadas resistencia a kanamicina.

7.3 Regeneración de las plantas de tabaco transformadas

Los explantes transformados con pBI121-LTBentero y pBI121-ToxAentero crecieron en el medio de selección con antibiótico hasta formar callo a los 30 días. Los callos fueron creciendo hasta formar plántulas las cuales se cortaron del tallo y se pasaron a medio de enraizamiento MS en frascos. Después de formar raíz se trasplantaron a suelo en maceta a condiciones de invernadero donde crecen y se les poda las hojas cada semana que se guardan a -80 °C para que posteriormente sean liofilizadas. Finalmente, algunas plantas ya están floreciendo para su autopolinización (Fig. 6).



Figura 6. Aspecto de los cultivos de tabaco durante el proceso de transformación de plantas de tabaco con los vectores pBI121-LTBentero y pBI121-ToxAentero. A) Formación de callo B) Regeneración de brotes a las 6 semanas post-infección C) Generación de raíz de Plántulas; D) Plantas adultas con flor en invernadero.

7.4 Detección de las líneas transgénicas Tabaco-LTBentero y Tabaco-ToxAentero

Se evaluaron 12 plantas de tabaco transformadas con el vector pBI121-LTBentero que fueron resistentes en el medio de selección, ocho plántulas dieron positivo para el transgén según los resultados revelados por la electroforesis donde se visualizó un fragmento esperado de 769 pb (Fig. 7a). También se analizaron 11 plantas transformadas con el vector pBI121-ToxAentero de las cuales nueve dieron positivo con un fragmento de 769 pb que se observa en la electroforesis (Fig. 7b).

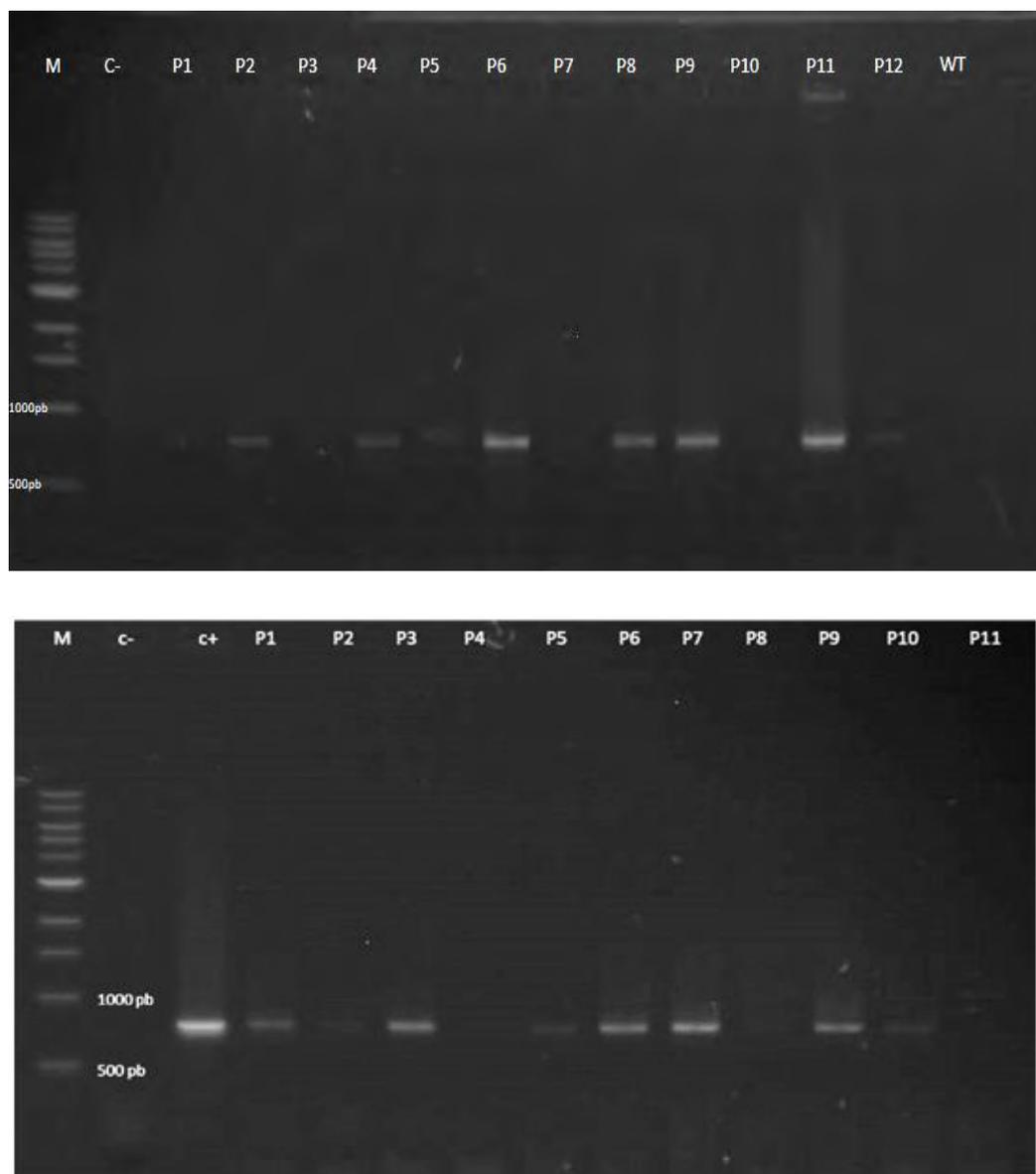


Figura 7. A) Electroforesis de la PCR de ADN genómico de 12 plantas transformadas con el vector pBI121-LTB entero. En el primer carril se encuentra el marcador de peso molecular 1 kpb (M), en el segundo carril el control negativo sin ADN, los carriles posteriores son del ADN de las líneas transformadas (P1-P12) y el último carril ADN de planta sin transformar (WT). Ocho de las 12 líneas fueron positivas donde observa una banda esperada de 769 pb. B) Electroforesis de la PCR del ADN genómico de 11 plantas transformadas con el vector pBI121-ToxA entero. En el primer carril está el marcador de peso molecular 1 kpb (M), en el segundo carril el control negativo ADN de planta sin transformar (C-) el tercer carril el vector pBI121-LTB entero purificado como control positivo (C+) y los

siguientes carriles el ADN genómico de las 11 líneas transformadas (P1- P11). Las bandas corresponden al fragmento esperado es de 769 pb.

7.5 Detección de las proteínas recombinantes LTBentero y ToxAentero

En el análisis por dot blot de las líneas que dieron positivo para el transgén *ltbentero* se observó que de las ocho líneas en siete de ellas se detectó la proteína recombinante LTBentero dentro del tejido vegetal (Fig. 8a). Posteriormente se realizó un Western blot con las proteínas de las siete líneas positivas en el dot blot. Donde se pudo corroborar la presencia de la proteína recombinante LTBentero así como su integridad y tamaño de 28 kDa (Fig. 8b). En el caso de la proteína recombinante ToxAentero, los resultados del análisis por dot blot arrojaron que de las nueve líneas que dieron positivas para el transgén *toxAentero* en seis de ellas se detectó la proteína recombinante (Fig. 8c). El análisis de Western blot corroboró la presencia y la integridad de la proteína así como también el tamaño esperado de 28 kDa (Fig. 8d).

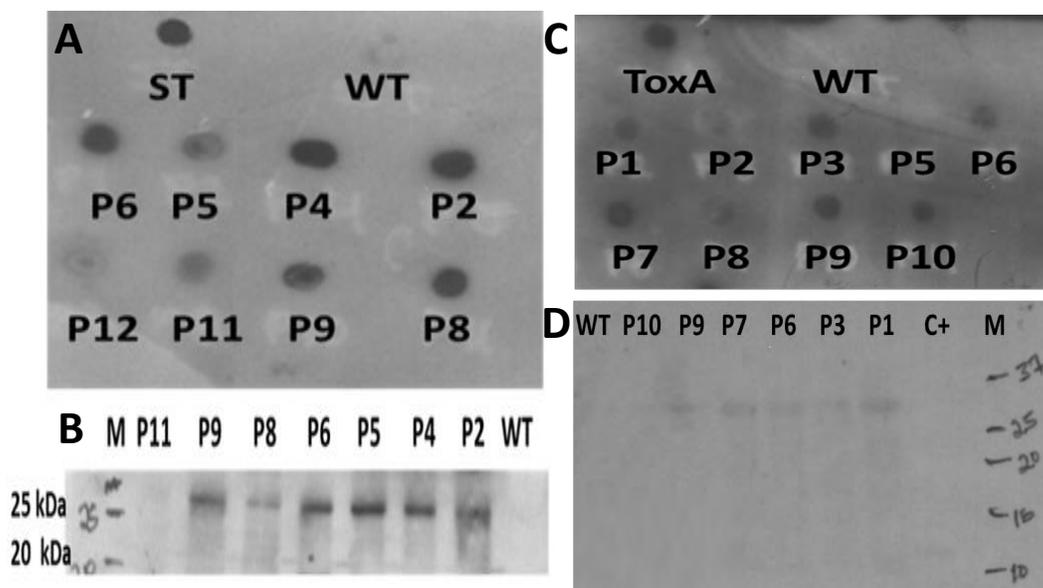
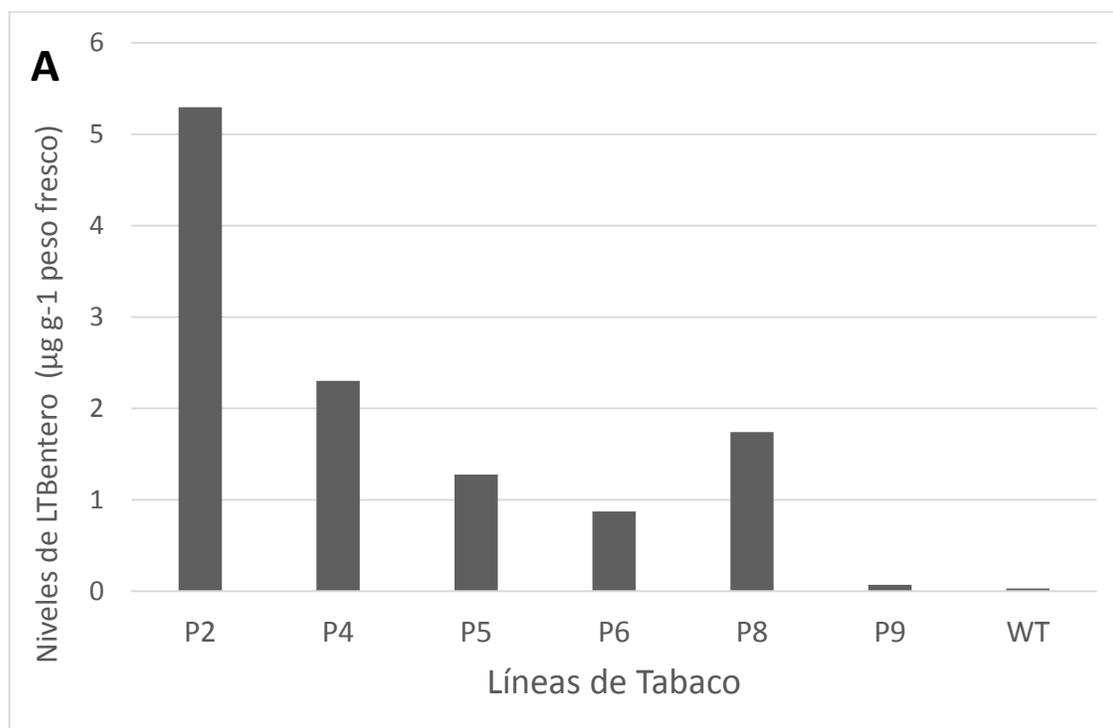


Figura 8. A) Análisis de *Dot blot* con el antisuero anti-ST para la detección de la proteína LTBentero. Se fijaron las proteínas totales de las líneas de tabaco positivas para el transgen *ltbentero* (P2, P4, P5, P6, P8, P9, P11 y P12). Como control positivo se utilizó el péptido ST y como control negativo proteínas totales de una planta de tabaco sin transformar (WT). B) Análisis de *Western blot* con el antisuero anti-LT para corroborar el tamaño e integridad de la proteína LTBentero. Se analizaron las proteínas totales de las líneas de tabaco positivas para el *Dot blot* (P2, P4, P5, P6, P8, P9 y P11). Se utilizaron proteínas totales de una planta de tabaco sin transformar como control negativo (WT). C) Análisis de *Dot blot* con el antisuero anti-ToxA para la detección de la proteína ToxAentero. Se fijaron las proteínas totales de las líneas de tabaco positivas para el transgen *toaentero* (P1, P2, P3, P5, P6, P7, P8, P9 y P10). Se utilizó ToxA purificada como control positivo y como control negativo proteínas totales de una planta sin transformar (WT). D) Análisis de *Western blot* con el antisuero anti-ToxA donde se corroboró el tamaño y la integridad de la proteína ToxAentero. Se analizaron proteínas totales de las líneas positivas en el *Dot blot* (P1, P3, P6, P7, P9 y P10). Se utilizó proteína ToxA purificada (13 kDa) como control positivo (C+) y proteínas totales de una planta sin transformar como control negativo (WT).

7.6 Cuantificación de las proteínas recombinantes LTBentero y ToxAentero expresadas en Tabaco

Los niveles de expresión de la proteína LTBentero de las líneas de tabaco donde se detectó la proteína transformada determinados por ELISA, revelaron una

acumulación de los niveles la proteína que oscila entre los 0.07 a 5.29 $\mu\text{g/g}$ de peso fresco de las siete líneas evaluadas, siendo la línea P2 donde se cuantificó la mayor cantidad (Fig. 9a). En el caso de las líneas que expresan la proteína ToxAentero se cuantificaron rangos de entre 0.08 a 5.46 $\mu\text{g/g}$ de peso fresco, de las siete líneas evaluadas dentro de las cuales la línea P9 fue la que presentó mayor acumulación de la proteína (Fig. 9b)



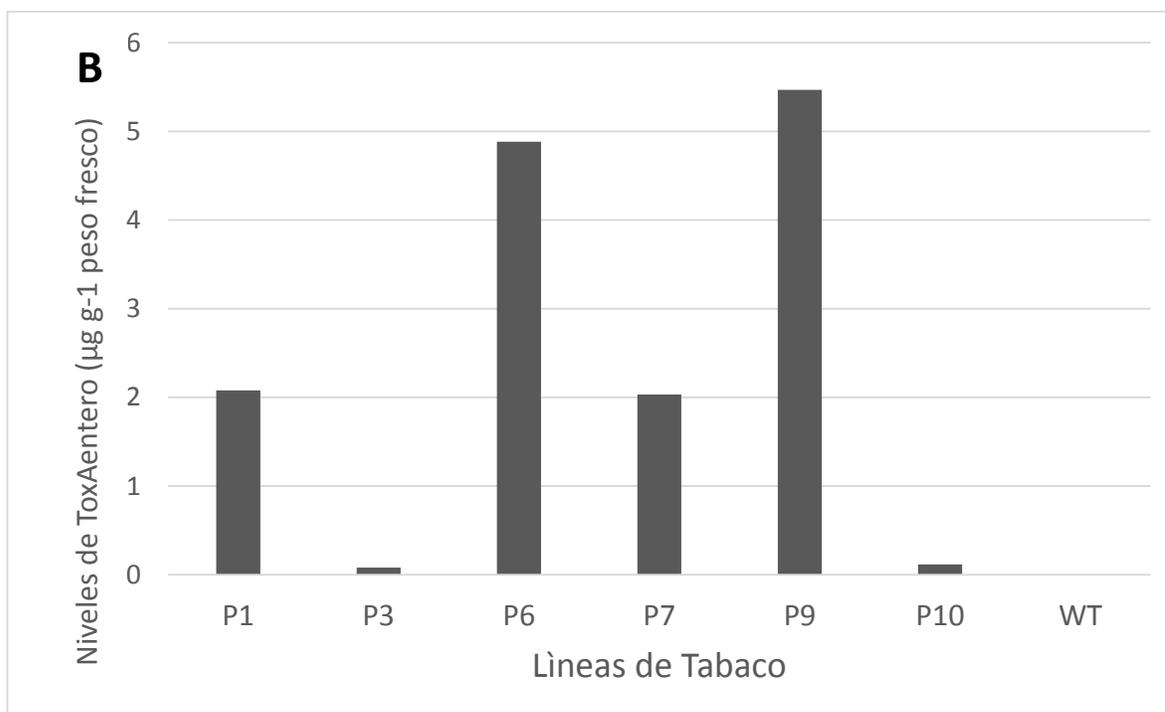


Figura 9. A) Niveles de expresión de la proteína recombinante ToxAentero dentro del tejido vegetal de las diferentes líneas transgénicas de tabaco (P2, P4, P5, P6, P8 y P9). Como control negativo se utilizó una línea de tabaco silvestre (WT). Los niveles fueron determinados por ELISA en reacción con el suero anti-LTB. B) Niveles de expresión de la proteína recombinante ToxAentero dentro del tejido vegetal de las líneas transgénicas (P1, P3, P6, P7, P9 y P10) como control negativo se utilizó una línea de tabaco silvestre (WT). Los niveles fueron determinados por ELISA en reacción con el suero anti-ToxA.

7.7 Ensayos de inmunogenicidad

La inmunogenicidad de las proteínas LTBAentero y ToxAentero expresada en tabaco fue evaluada en ratones BALB/c los cuales fueron inmunizados vía oral con 50 mg (300 ng de proteína multiepitópica) de tejido fresco o vía subcutánea con 10 mg (70 ng) de extracto del tejido de tabaco y con tejido de tabaco silvestre (WT) como control.

Se observó un aumento significativo en los niveles de IgG anti-LT/CT y anti-ST en suero a partir de la segunda inmunización en los ratones inmunizados

subcutáneamente con ambas proteínas. Ambas proteínas indujeron los mismos niveles de anticuerpos IgG anti-LT/CT (título=160) y anti-ST (título=80) (Fig. 10a y 10b). También se observaron niveles significativos de anticuerpos IgG anti-LptD a partir de la tercera inmunización subcutánea en el suero de los ratones. El título más alto se observó en la cuarta inmunización con ToxAentero (título=160) (Fig. 10c). Respecto a los niveles de IgG anti-FliC, se observaron anticuerpos a partir de la tercera inmunización subcutánea con ToxAentero. En contraste, no se observó niveles significativos de anticuerpos anti-FliC en los ratones inmunizados con LTBentero (Fig. 10d).

En el suero de los ratones inmunizados oralmente también se observó un aumento significativo tanto de IgG anti-LT/CT como anti-ST. Sin embargo, ToxAentero indujo mayor cantidad de anticuerpos anti-LT/CT y anti-ST (título=160) después de la cuarta inmunización en comparación a los ratones inmunizados con LTBentero (título=80) (Fig. 11a y 11b). También se observó niveles mayores de IgG anti-LptD de los ratones inmunizados vía oral con ToxAentero (título=160), mientras que en los ratones inmunizados con LTBentero el título de IgG anti-LptD fue de 40. (Fig. 11c). Al igual que los ratones inmunizados con LTBentero por vía subcutánea, los ratones inmunizados de manera oral tampoco se observaron niveles de IgG anti-FliC. Mientras que los ratones inmunizados vía oral con ToxAentero si se encontraron anticuerpos IgG anti-FliC (título=40) (Fig. 11d).

En lo que respecta a los niveles de anticuerpos IgA anti-LT y anti-ST en heces de ratones inmunizados vía subcutánea, se observó niveles mayores anti-LT/CT (título=8) y anti-ST (título=4) en los ratones inmunizados con LTBentero. Mientras que los niveles de IgA en ratones inmunizados con ToxAentero los niveles fueron menores anti-LT (título=4) y anti-ST (título=2) (Fig. 12a y 12b). Los niveles IgA anti-LptD e IgA anti-FliC de los ratones inmunizados con ToxAentero subcutáneamente fueron iguales (título=2). No se observaron niveles de IgA anti-LptD e IgA anti-FliC cuando los ratones fueron inmunizados con LTBentero (Fig. 12c y 12d).

Los niveles de IgA anti-LT/CT (título=8) e IgA anti-ST (título=16) en los ratones inmunizados oralmente con ToxAentero fueron más altos que en los ratones inmunizados con LTBenetero (Fig. 13a 13b). Mientras que los niveles de anticuerpos IgA anti-LptD (título=8) fueron mayores en los ratones inmunizados con LTBenetero (Fig. 13c). Niveles significativos de IgA anti-FliC solo se observaron después de la cuarta inmunización con niveles mayores en ratones inmunizados con LTBenetero (Fig. 13d).

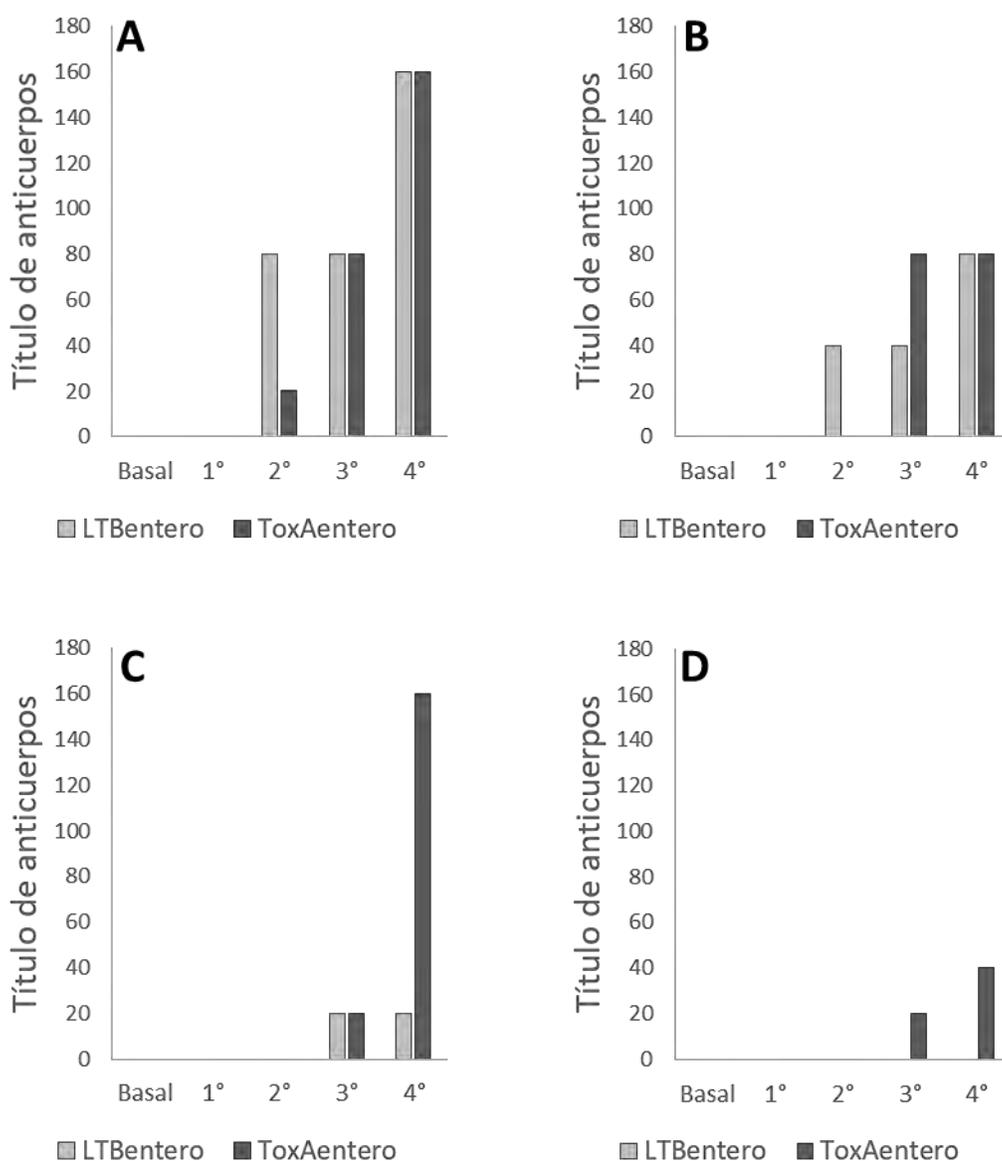


Figura 10. Niveles de anticuerpos IgG en suero de ratón medidos semanalmente después de ser inmunizados con tabaco LTBentero o ToxAentero vía subcutánea (s.c) A) Título de IgG anti-LT/CT, B) Título de IgG anti-ST C) Título de IgG anti-LptD D) Título de IgG anti-FliC. El título de anticuerpos fue determinado por absorbancia a una DO de 405 nm. El título se calculó como el recíproco de la dilución más alta que tiene una absorbancia media por encima de la absorbancia media del grupo control (WT) mas 2x DS.

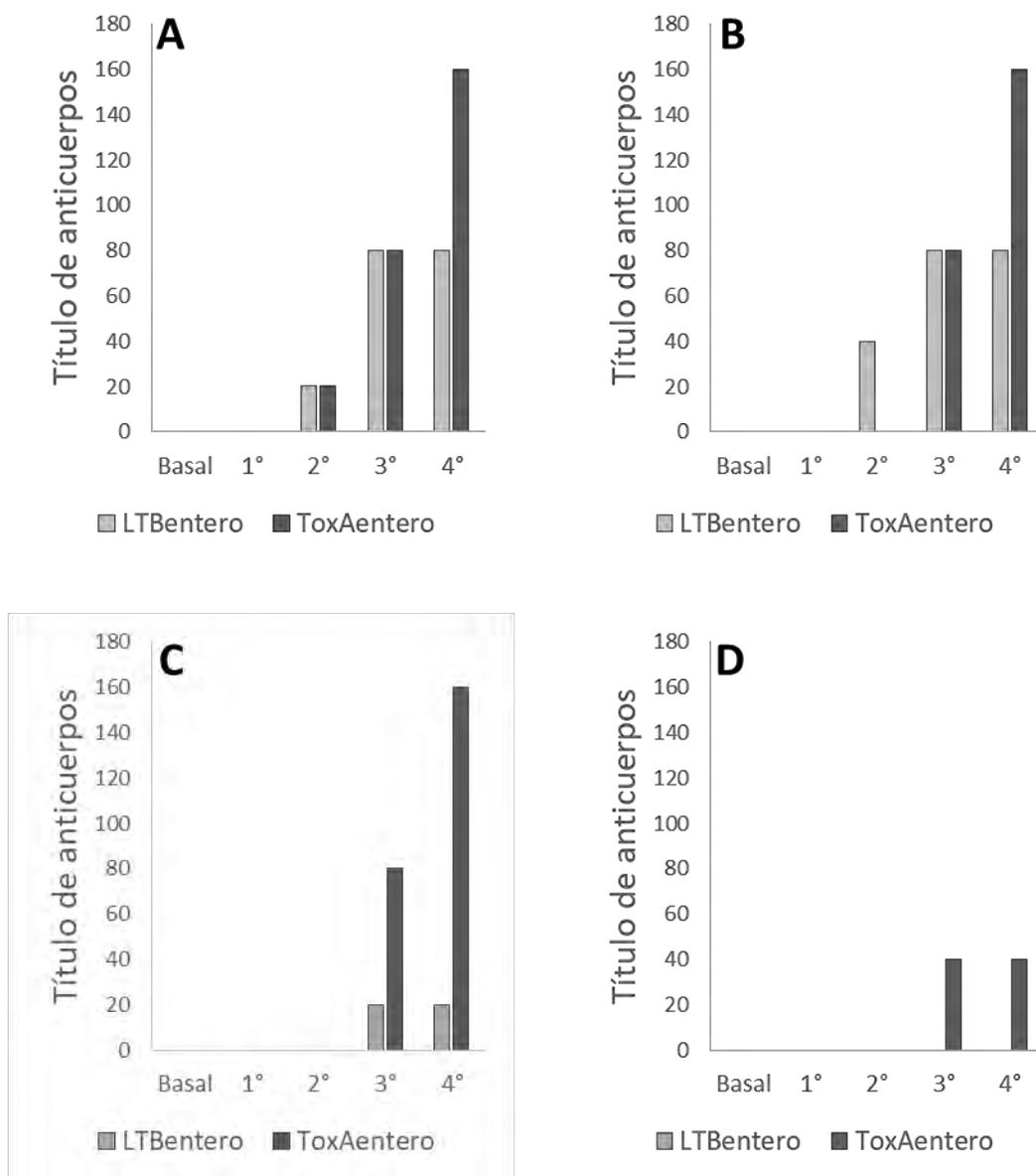


Figura 11. Niveles de anticuerpos IgG en suero de ratón medidos semanalmente después de ser inmunizados con tabaco LTBenetero o ToxAentero vía oral (p.o.) A) Título de IgG anti-LT/CT, B) Título de IgG anti-ST C) Título de IgG anti-LptD D) Título de IgG anti-FliC. El título de anticuerpos fue determinado por absorbancia a una DO de 405 nm. El título se calculó como el recíproco de la dilución más alta que tiene una absorbancia media por encima de la absorbancia media del grupo control (WT) mas 2x DS.

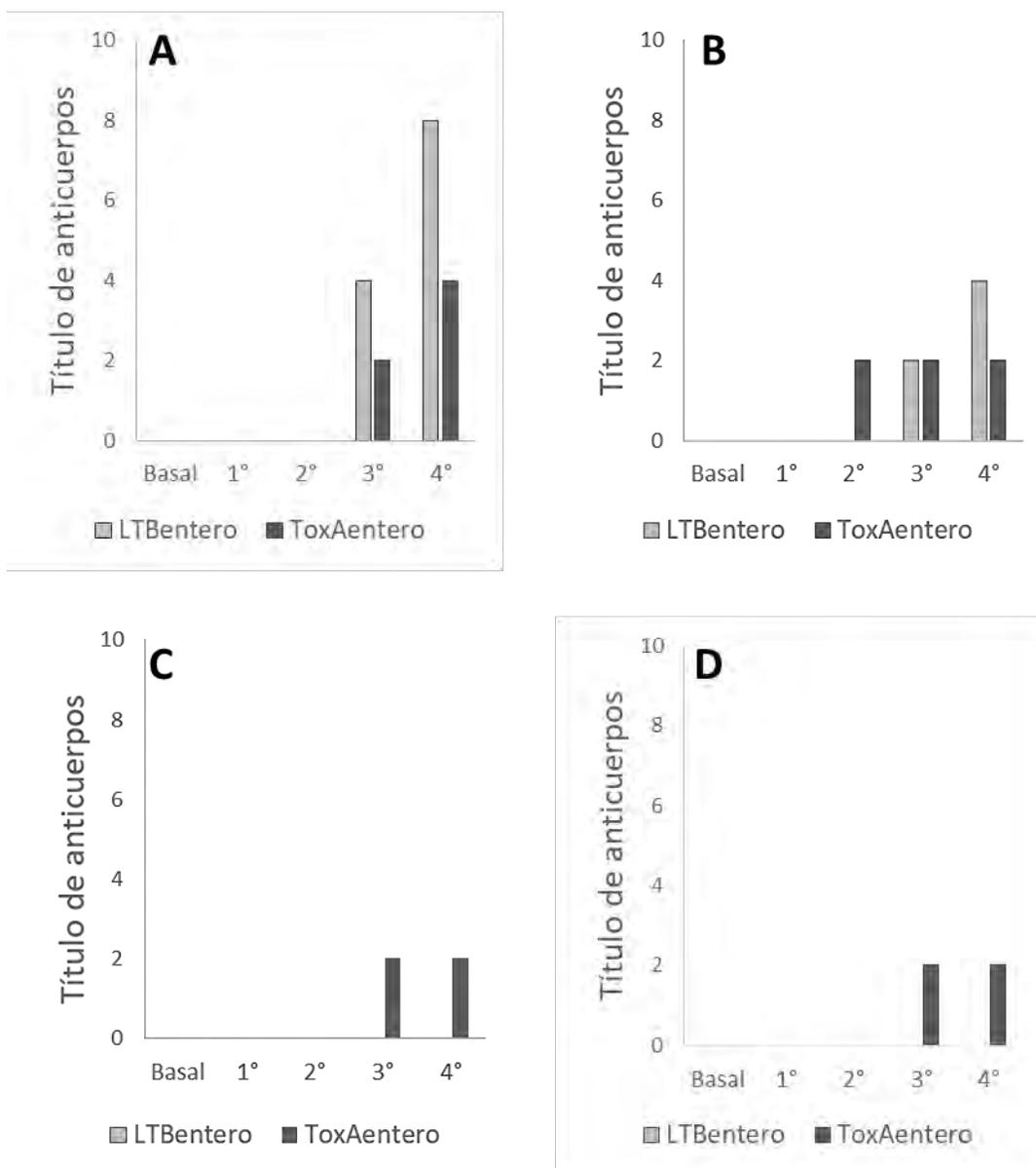


Figura 12. Niveles de anticuerpos IgA en heces de ratón medidos semanalmente después de ser inmunizados con tabaco LTBentero o ToxAentero vía subcutánea (s.c.) A) Título de IgA anti-LT, B) Título de IgA anti-ST C) Título de IgA anti-LptD D) Título de IgA anti-FliC. El título de anticuerpos fue determinado por absorbancia a una DO de 405 nm. El título se calculó como el recíproco de la dilución más alta que tiene una absorbancia media por encima de la absorbancia media del grupo control (WT) mas 2x DS.

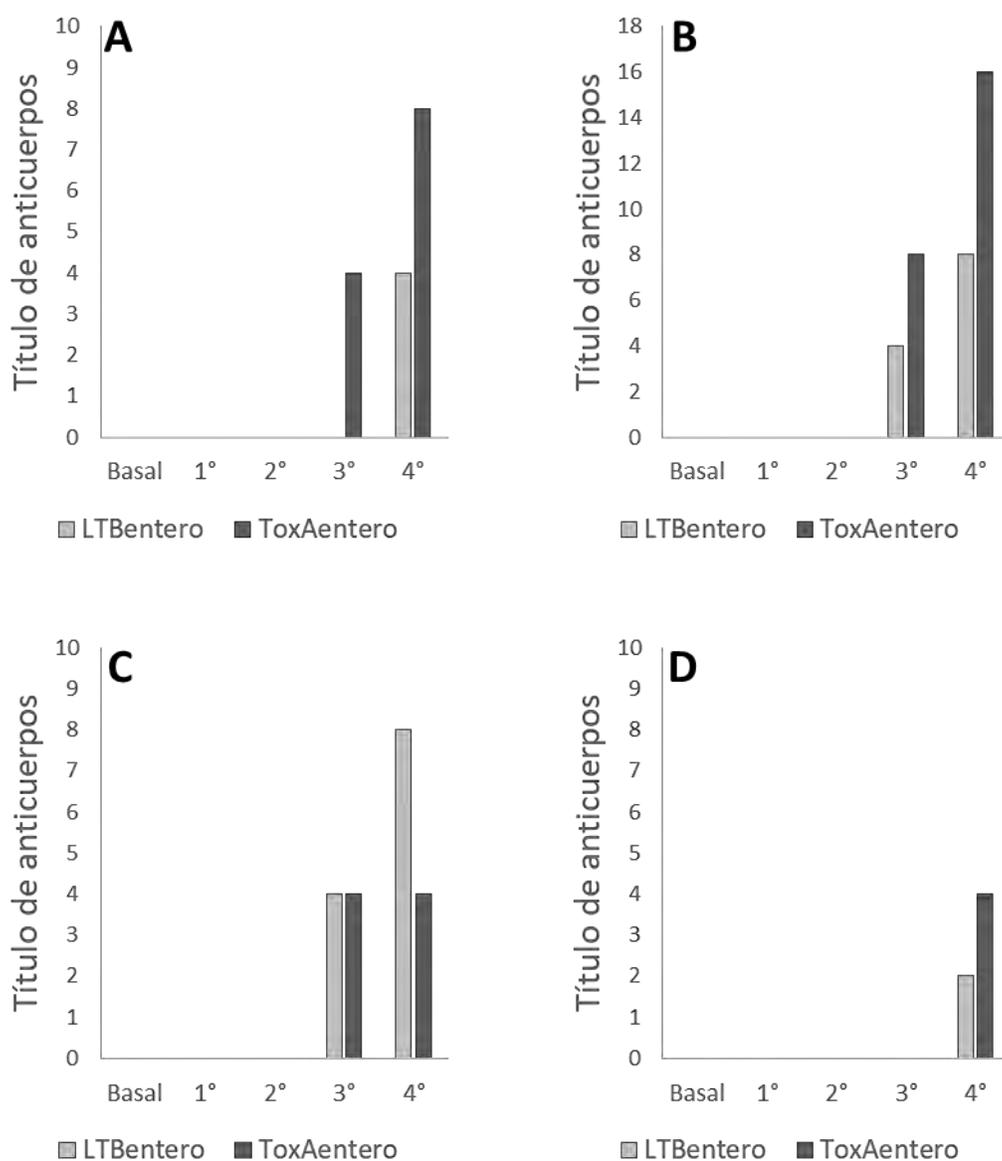


Figura 13. Niveles de anticuerpos IgA en heces de ratón medidos semanalmente después de ser inmunizados con tabaco LTBentero o ToxAentero vía oral (p.o.) A) Título de IgA anti-LT/CT, B) Título de IgA anti-ST C) Título de IgA anti-LptD D) Título de IgA anti-FliC. El título de anticuerpos fue determinado por absorbancia a una DO de 405 nm. El título se calculó como el recíproco de la dilución más alta que tiene una absorbancia media por encima de la absorbancia media del grupo control (WT) mas 2x DS.

7.8 Ensayos de inmunoprotección

La capacidad protectora de LTBenetero y ToxAentero fue evaluada mediante dos retos infecciosos en ratones. La protección contra CT de *V. cholerae* fue evaluada midiendo la acumulación de fluidos mediante el modelo de bucle de intestino sellado. En este reto se observó una diferencia significativa en la acumulación de fluidos (FA) en los grupos tratados con LTBenetero (90.79 mg/g) y ToxAentero (87.35 mg/g), respecto a los grupos controles negativos tratados con tabaco WT (98.76 mg/g) y PBS (99,93 mg/) (Fig. 14). La capacidad de conferir protección contra *V. parahaemolyticus* (1×10^8 UFC) se evaluó midiendo la sobrevivencia de ratones previamente inmunizados con LTBenetero o ToxAentero. En este reto se observó que el grupo inmunizado con LTBenetero tuvo una sobrevivencia del 50%, mientras el grupo inmunizado con ToxAentero tuvo una sobrevivencia del 75%. Una diferencia importante con respecto a los grupos control tratados con PBS o tabaco sin transformar (WT), en los cuales se observó una mortalidad del 100% dentro las 48 h. (Fig. 15).

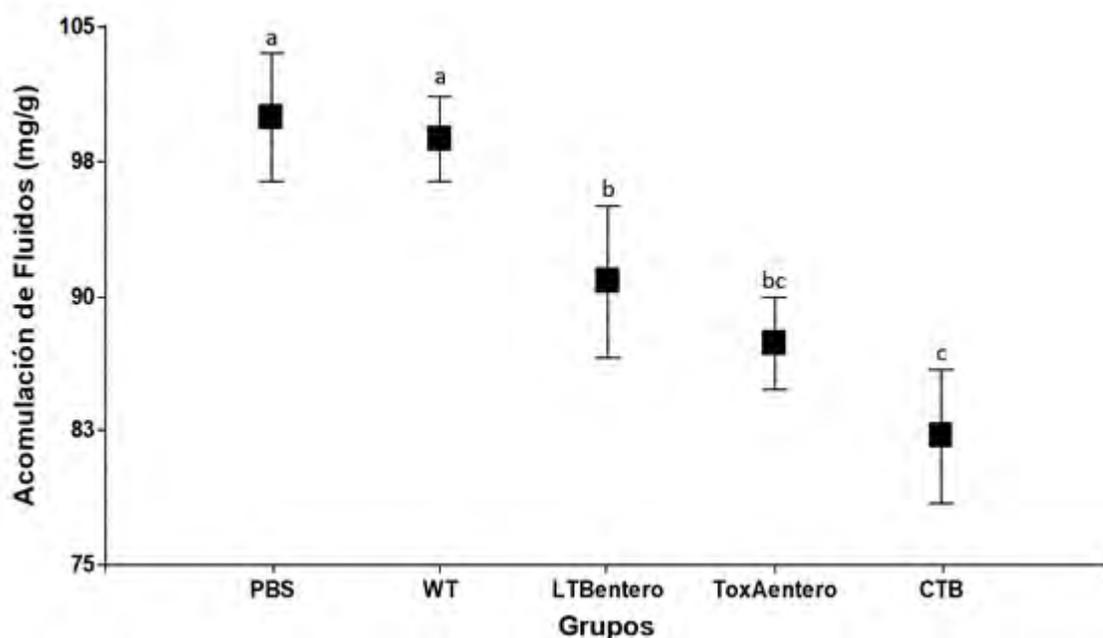


Figura 14. Ensayo de Inmunoprotección mediante un reto con la toxina CT de *V. cholerae*. Los ratones (n4) fueron inmunizados oralmente por cuatro semanas con 50 mg de tejido vegetal de tabaco transformado que contiene ≈ 300 ng de LT Bentero o ToxAentero. Como controles negativos ratones fueron inmunizados con PBS y tejido vegetal de tabaco silvestre (WT). Como control positivo ratones inmunizados con 1 μ g de CTB. A todos los grupos se les administró 10 μ g de la toxina CT vía intragástrica. La protección se evaluó por la acumulación de fluidos (FA). En la gráfica se muestra la media de FA de cada grupo (n=4) y su desviación estándar. Las diferentes letras indican diferencias significativas ($p < 0.05$) entre los grupos.

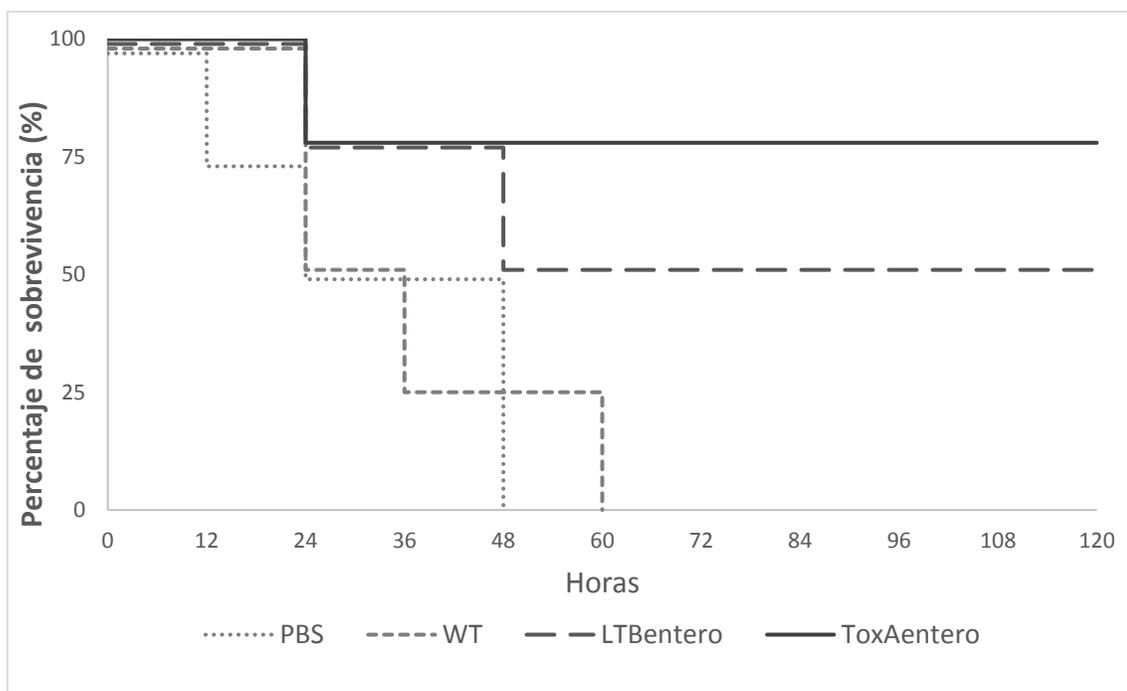
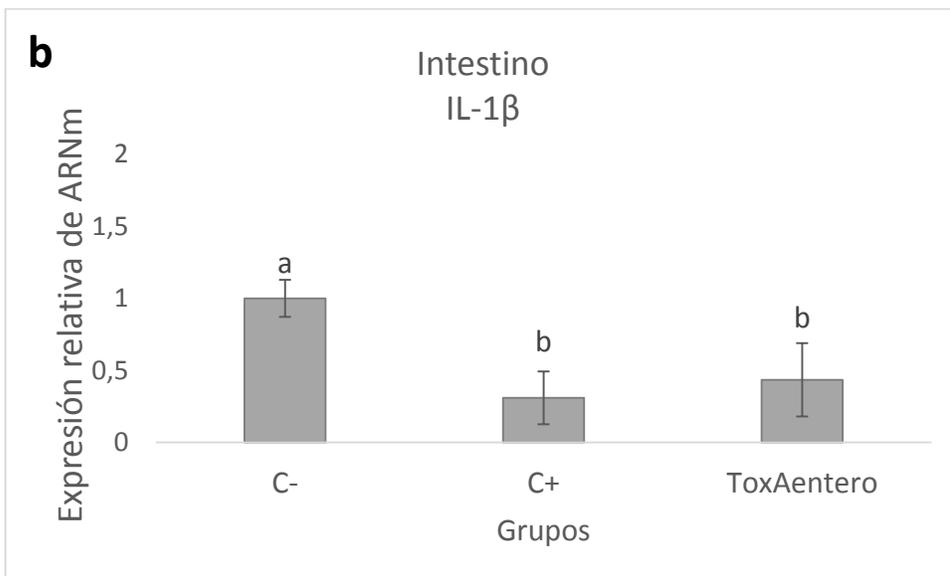
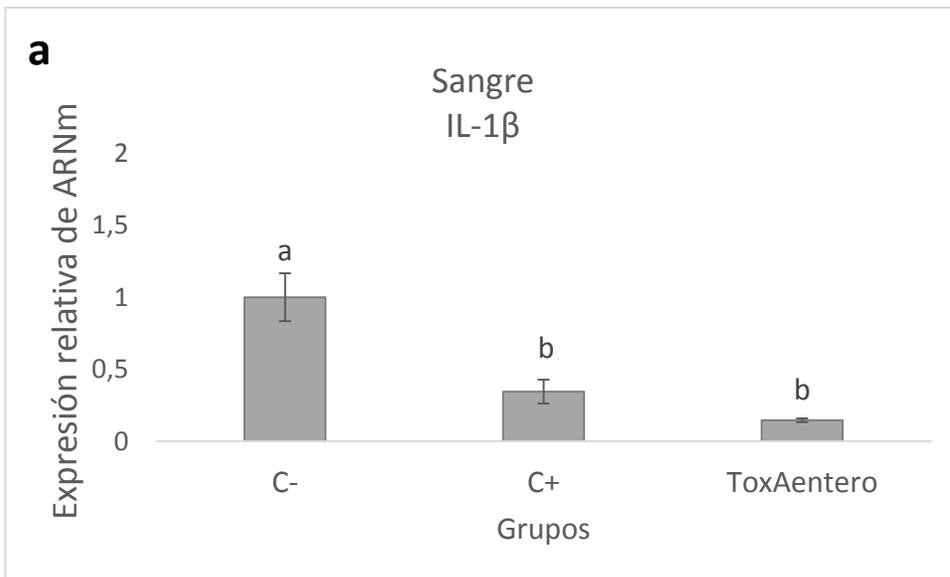


Figura 15. Ensayo de Inmunoprotección mediante un reto con *V. parahaemolyticus*. Los ratones fueron inmunizados por cuatro semanas con 50 mg de tejido vegetal de tabaco con ≈ 300 ng LTBenetero o ToxAentero. Como controles negativos se inmunizaron ratones inmunizados con tabaco silvestre (WT) y otro grupo tratado solo con PBS. Como reto se les administró (1×10^8 UFC) de *V. parahaemolyticus* vía intraperitoneal. La protección se evaluó por porcentaje de supervivencia durante 120 h.

7.9 Expresión de génica de IL-1 β y TNF α

Se analizó la expresión de los genes de IL-1 β y TNF α en tejido intestinal y sangre de ratones que fueron inmunizados con tabaco ToxAentero de manera oral y retados con la toxina CT de *V. Cholerae*. De manera interesante se observó una disminución significativa ($p < 0.05$) en la expresión de ambas citocinas, tanto en tejido intestinal como en sangre en los ratones inmunizados con ToxAentero (Fig 16).



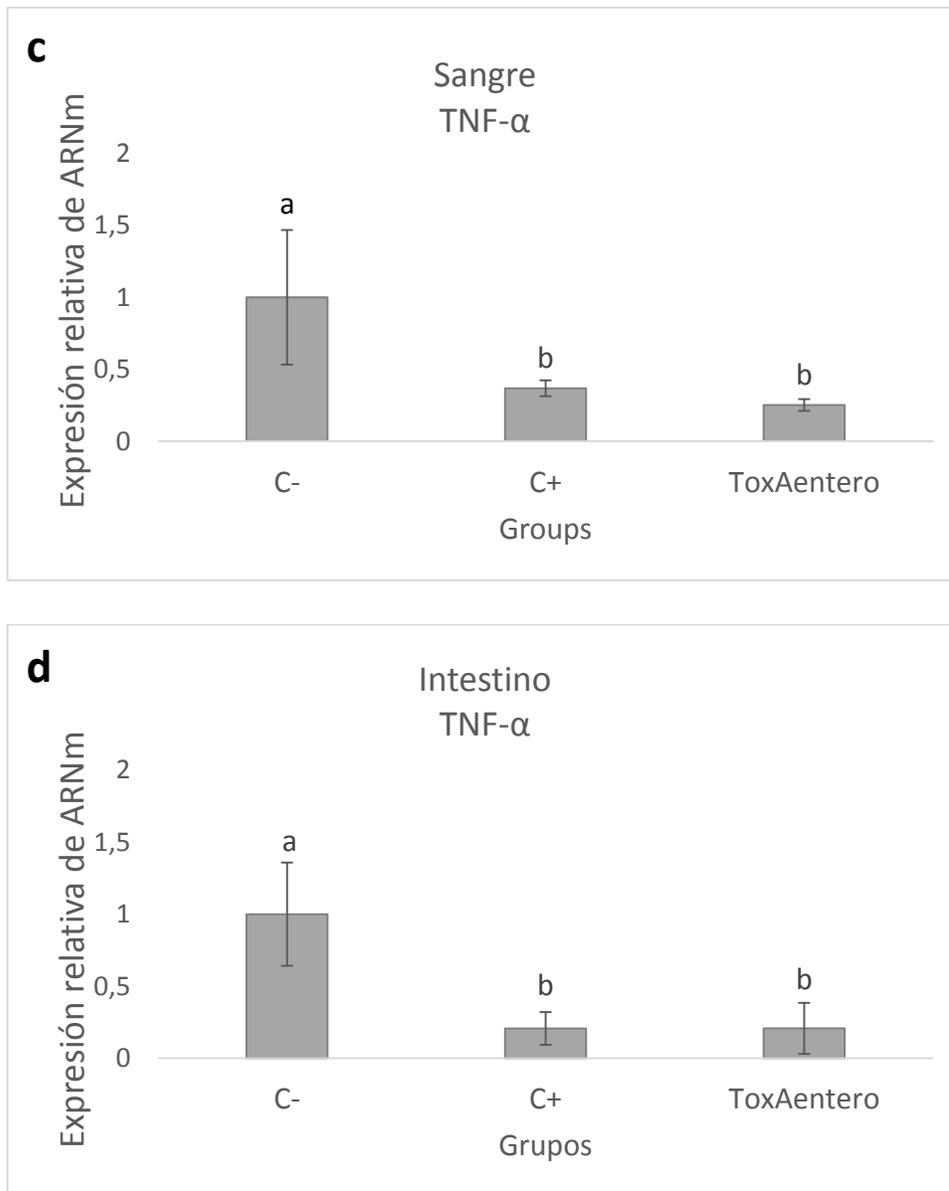


Figura 16. Expresión génica de IL-1 β y TNF α en sangre e intestino de ratones inmunizados oralmente con tabaco ToxAentero y retados con la toxina CT de *V. cholerae*. El grupo control negativo inmunizado con un línea de tabaco sin transformar (C-), grupo control positivo inmunizados con CTB pura (C+) y Grupo inmunizado con tabaco ToxAentero. Las barras representan la media \pm el error estándar de la media ($n=3$). Las letras indican diferencias significativas ($p < 0.05$) entre los grupos.

8. DISCUSIÓN

En este trabajo se propuso el diseño de dos proteínas multiepitópicas producidas en células vegetales que pudieran ser entregadas de manera oral para la estimulación directa la mucosa intestinal y generar una respuesta inmune tanto a nivel local como a nivel sistémico. Se incorporaron secuencias de epítopes que en estudios anteriores mostraron su efectividad para generar una respuesta inmune humoral y protección contra los patógenos entéricos; *E. coli* enterotoxigénica, *V. cholerae*, *V. parahaemolyticus* y *S. typhimurium*. (Jacob et al., 1983, 1985; Newton et al., 1989; Rosales et al., 2011; Zha et al., 2016; Bergman et al., 2005; Kremer et al., 2011). En uno de los diseños multiepitópicos se incorporó la secuencia completa de la subunidad B de la toxina LT (LTB) de ETEC, como un adyuvante que ha demostrado su capacidad de aumentar la respuesta inmune en mucosas (Yamamoto *et al.*, 2001). En el segundo diseño se incorporó la secuencia Toxina A (ToxA) de una cepa de *V. parahaemolyticus* en lugar de la secuencia LTB, para evaluar su potencial como adyuvante de manera inferencial.

El diseño de las proteínas se realizó con la finalidad de que fueran capaces de generar una respuesta inmune contra antígenos de los patógenos mencionados arriba, es por eso que se optó por el formato multiepitópico. La selección de los epítopes fue mediante una búsqueda minuciosa dentro de la literatura científica de antígenos y/o determinantes antigénicos que fueron reportados de generar anticuerpos y/o protección contra los patógenos. En el diseño multiepitópico llamado LTBentero se incorporó la secuencia de LTB por dos razones; primero por su capacidad de adyuvante/acarreador que potencia la respuesta inmune en mucosas al incrementar la presentación del antígeno vía células dendríticas (Yamamoto *et al.*, 2001) y segundo porque es un antígeno altamente inmunogénico y que es capaz de generar anticuerpos de manera cruzada que reconocen tanto a LT de ETEC y a CT de *V. cholerae* (Nashar *et al.*, 2001). También se eligió incorporar como la secuencia completa de la toxina ST de la bacteria ETEC, Ya que como se mencionó anteriormente, esta toxina es

responsable de diarreas más severas en las cepas de ETEC. Esta toxina no es inmunogénica por sí sola, sin embargo, se ha demostrado que cuando es coadministrada con otros antígenos como LTB hay una respuesta humoral específica contra ST (Girard *et al.*, 2006). Posteriormente se eligió un epítipo de la proteína FliC de la flagelina de *S. typhimurium*. Este epítipo además de ser altamente inmunogénico se encuentra conservado en el género *Salmonella* (Bergman *et al.*, 2005), convirtiéndolo en un blanco atractivo para neutralizar diferentes tipos de salmonelas. Para contrarrestar al *V. parahemolyticus* se eligió un epítipo de la proteína de membrana externa LptD, esta proteína forma parte de un complejo transmembranal que se encarga de producir lipopolisacáridos en la membrana celular de esta bacteria. Zha *et al.* (2016) encontraron que anticuerpos generados como respuesta a este epítipo eran capaces de bloquear esta proteína. Además de ser un determinante antigénico para generar respuesta humoral, el bloqueo de esta proteína por parte de los anticuerpos genera una disminución en la producción de LPS dejando a las bacterias expuestas volviéndose más susceptibles a antibióticos débiles hidrofóbicos.

En el segundo diseño multiepitópico llamado ToxAentero además de incorporar las secuencias de ST, LptD y FliC, en este diseño se tuvo que incorporar un epítipo conservado de LT/CT ya que este no contaba con la secuencia completa de LTB (Jacob *et al.*, 1983, 1985; Newton *et al.*, 1989). Sin embargo a este diseño se le incorporó la secuencia de la ToxA de una cepa de *V. parahaemolyticus* con el fin de dar una aproximación a su potencial uso como adyuvante, ya que en trabajos anteriores se ha observado que una alta inmunogenicidad cuando fue administrada de manera oral en peces y ratones (Reyes-Becerril *et al.* 2016; León-Gallo *et al.* 2016).

En este estudio se exploró la producción de estas proteínas multiepitópicas en células vegetales de tabaco, con el propósito evaluar la capacidad de esta plataforma para producir y entregar proteínas quiméricas funcionales capaces de inducir una respuesta inmune contra cada uno de los epítopos incorporados. En

los ensayos de PCR para la detección de los transgenes *ltbentero* y *toxAentero*, se observó que el rendimiento de transformación de los explantes de tabaco con *Agrobacterium tumefaciens* GV3101, fue arriba del 70% de efectividad ya que de las 12 líneas evaluadas que fueron transformadas con el vector pBI121-LTBentero, se detectaron ocho con el transgén y de las 11 plantas transformadas con el vector pBI121-ToxA se detectaron ocho líneas con el transgén. Se utilizó el método de transformación mediado por *A. tumefaciens*, ya que este método tiene rendimientos de transformación muy altos (Jones *et al.*, 2005). Además de la relativa simplicidad técnica no requiere de equipos sofisticados, la integración del vector es un proceso relativamente preciso con baja probabilidad de rearrreglos, permite la introducción de segmentos largos de DNA y bajo número de copias del vector transferido. La gran mayoría de las ventajas que presenta este sistema, se explican por el proceso de infección de las células vegetales por la bacteria y la posterior integración del vector en el genoma vegetal (Hansen y Wright, 1999; Veluthambi *et al.* 2003; Filipecki y Malepszy, 2006).

Los análisis de dot blot permitieron detectar las proteínas recombinantes, mientras que los análisis de Western blot confirmaron la integridad y peso molecular de 28 kDa de ambas proteínas. De acuerdo a los ELISA realizados a seis líneas transgénicas de tabaco LTBentero, los niveles de expresión de la proteína recombinante fluctuaron de 0.029 a 5.29 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ peso fresco mientras que los niveles de expresión de ToxAentero fueron de 0.08 a 5.46 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$. Se obtuvieron valores similares lo cuales están dentro del rango de los valores obtenidos en otras proteínas quiméricas que expresan LTB en tabaco, lechuga, tomate y *Arabidopsis thaliana* que oscilanan de 24.5 a 2 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ (Ríos-Huerta *et al.*, 2017; Rosales-Mendoza *et al.*, 2007, 2011; Martínez-González *et al.*, 2011; Rigano *et al.*, 2004; Walmsley *et al.*, 2003). Las diferencias de expresión de la proteína entre las líneas, puede atribuirse a la inserción azarosa de los transgenes dentro del genoma del tabaco (Kim *et al.*, 2007). No se observa una aparente correlación entre los niveles de expresión de las proteínas determinados por ELISA y la

intensidad de las bandas observadas en los análisis de Western blot. Sin embargo, se debe tomar en cuenta que el análisis de Western blot no se realizó con fines cuantitativos y por lo tanto solo se analizó una sola dilución de las proteínas totales, lo cual podría estar saturando y creando un efecto de fondo (Bass *et al.*, 2016). Mientras que los ELISA, por ser una técnica más precisa para la cuantificación de los analitos, se realizaron diluciones seriadas y curvas estándar para cuantificar la expresión y/o acumulación de las proteínas LTBentero y ToxAentero dentro del tejido vegetal.

De manera interesante no se observaron alteraciones fenotípicas en las diferentes líneas de tabaco, incluyendo aquellas con altos niveles de expresión. Se ha observado que subunidades de toxinas de otras bacterias han ejercido cierta toxicidad en algunas especies de plantas. Por ejemplo, Manson *et al.* (1998) reportaron que altos niveles de LTB en plantas de papa, afectó severamente el fenotipo causando un crecimiento lento resultando en plantas enanas y tubérculos mal desarrollados. Así como también Rawat *et al.* (2011) demostraron que la expresión de la toxina Cry1Ac causaba alteraciones fenotípicas en el desarrollo de plantas de tabaco y algodón.

Los ensayos de inmunogenicidad revelaron que ambas proteínas multiepitópicas son inmunogénicas cuando son administradas de manera subcutánea y más importante cuando son administradas de manera oral. Se pudo constatar que hubo respuesta a nivel de mucosa intestinal donde se detectaron anticuerpos IgA en heces, así como también respuesta a nivel sistémico donde se detectaron anticuerpos IgG en suero contra cada uno de los epítopes incorporados en ambas proteínas multiepitópicas.

El primer aspecto a destacar, es que los niveles más altos de anticuerpos detectados fueron anti-LT/CT y anti-ST tanto en heces como en suero. Es sabido que LTB y CTB son inmunógenos que funcionan como adyuvantes en mucosas y se sugiere que los efectos inmunoestimuladores de LTB o CTB podrían ser el

resultado de cinco factores: (1) aumentando la presentación por parte del complejo principal de histocompatibilidad clase I (MHC I) y Clase II (MHC II) (Nashar *et al.*, 2001; Zhang *et al.*, 2016), (2) activando la diferenciación selectiva de linfocitos (Williams, 2000), (3) propiciando la activación y maduración de células dendríticas (Ji *et al.*, 2015), (4) induciendo la expresión de CD86 de las células presentadoras de antígenos (APCs) seguida de una estimulación de linfocitos CD4+ (Yamamoto *et al.*, 2001) y (5) aumentando la expresión de marcadores de activación como MHC II, B7.1, CD40, CD25, e ICAM-1 (Nashar *et al.*, 1997). Aún no se saben los mecanismos exactos de cómo es que este adyuvante desencadena estos eventos, sin embargo, podría estar relacionado directamente con el reconocimiento al receptor GM1 (Yongping, 2016). Cabe mencionar que también se ha comprobado que es altamente inmunogénico cuando es administrado dentro de células vegetales (Rosales-Mendoza *et al.*, 2010; Hongli *et al.*, 2013). Acorde a nuestros resultados, en otros estudios han obtenido niveles significativos de IgG en suero e IgA en el intestino de ratones inmunizados oralmente tanto con maíz y con zanahoria transgénica para LTB (Chikwamba *et al.*, 2002; Rosales-Mendoza *et al.*, 2008). Incluso en humanos se ha demostrado que existe una respuesta humoral importante después de administrarse de manera oral dentro en tejido vegetal (Tacket *et al.*, 2004). Respecto a los altos niveles de anticuerpos anti-ST detectados en los ratones inmunizados con ambas proteínas resulta interesante, ya que como se mencionó anteriormente se sabe que ST no es inmunogénica cuando se administra por si sola (Klipstein *et al.*, 1986). Sin embargo, se le ha reportado inmunogenicidad cuando se coadministra o se administra fusionada con un adyuvante (Pereira *et al.*, 2001). Se ha reportado en numerosos trabajos la producción de anticuerpos específicos anti-ST cuando se inmunizan animales con LTB y ST (Saarilahti *et al.*, 1989; Clements, 1990; Zheng *et al.*, 2005; Zhang *et al.*, 2010; Liu *et al.*, 2011; You *et al.*, 2011). Así como también se ha reportado inducción de anticuerpos específicos anti-ST en intestino (IgA) y en suero (IgG) en ratones inmunizados oralmente con tabaco que expresaba LTB-ST después de la tercera inmunización (Rosales-Mendoza *et al.*, 2011).

También se observaron niveles significativos de anticuerpos específicos contra LptD. Los ratones inmunizados con ToxAentero presentan niveles más altos de anticuerpos. Sin embargo, no se detectaron IgA anti-LptD en ratones inmunizados vía subcutánea. Los niveles de anticuerpos anti-FliC detectados fueron significativamente menores comparado con los otros anticuerpos específicos contra los otros epítopes. Incluso en los ratones inmunizados con LTBAentero no se detectaron anticuerpos IgG anti-FliC y solo se detectaron IgA anti-FliC en el grupo inmunizado oralmente. Las diferencias de los niveles de anticuerpos específicos para cada epítope podría deberse al plegamiento resultante de la traducción de las proteínas multiepitópicas (Nyambi *et al.*, 2000), que podría estar definiendo el tipo y magnitud de la respuesta inmune debido a la naturaleza de las proteínas (Théry y Amigorena, 2001).

Otro aspecto importante es que aparentemente los niveles de anticuerpos IgG e IgA son mayores en ratones inmunizados con ToxAentero en comparación con los inmunizados con LTBAentero. Podríamos caer en la tentación de decir que por los resultados obtenidos parece ser que la ToxA es un adyuvante más inmunogénico que LTB. Sin embargo como se mencionó antes, no se sabe los mecanismos exactos del por qué LTB es un buen inductor y activador de APCs, se cree que tiene que ver con su capacidad de ser reconocido por el receptor GM1 (Yongping, 2016). Esta interacción podría estar funcionando como anclaje en el epitelio en la unión con este receptor reteniendo a la proteína (de Haan *et al.*, 1998; Nashar *et al.*, 2001) esto facilitaría la toma directa del lumen de células APCs particularmente (Scott *et al.*, 2011) activando los mecanismos inmunomoduladores antes mencionados.

Por otro lado, se sabe mucho menos de cómo la ToxA podría estar inmunomodulando la respuesta. Se cree que los mecanismos por los que podría estar interactuando ToxA es por su parecido estructural con el dominio III de la prototoxina Cry de *Bacillus thuringiensis* (Lee *et al.*, 2015). Se ha demostrado la capacidad inmunoestimulante de esta toxina (Joshi *et al.*, 2016). Se cree que

Cry está involucrada en la activación de APCs principalmente macrófagos induciendo la expresión de moléculas coestimuladoras como CD80 y CD86 y la sobreproducción de citocinas proinflamatorias IL-6, TNF- α y la quimiocina MCP-1 (Matinez y Moreno-Fierros, 2017). No se sabe bien el mecanismo exacto para la activación de los macrófagos, sin embargo, se cree que es por la interacción con proteínas de superficie de choque térmico (HSPs) en específico la HSPs70 que induce la activación vía las MAPKs ERK1/2, JNK y p38 (Vazquez-Padrón *et al.*, 2000; Moreno-Fierros *et al.*, 2013)..

Los retos con CT y *V. parahaemolyticus* demostraron que la respuesta inmune generada por LTEnterero y ToxAentero administradas de manera oral es lo suficientemente protectora. Se demostró con las pruebas de acumulación de fluidos que el intestino de los ratones previamente inmunizados tenían menos contenido de agua respecto a los grupos control. Estos resultados son similares a los reportados por Rosales *et al.* (2007) y Chikwamba *et al.* (2002) en ratones inmunizados oralmente con zanahoria y maíz que expresaba LTEnterero respectivamente.

Pero más interesante aún, es que estas proteínas LTEnterero y ToxAentero, también fueron capaces de disminuir la letalidad en un 50 y 75% respectivamente en el reto con *V. parahaemolyticus*. Zha *et al.* (2016) reportaron una sobrevivencia del 100% sin embargo, ellos inmunizaron con la proteína LptD purificada vía parenteral. Los resultados obtenidos son interesantes por tres razones: (1) por que se demostró que solo un epítipo de LptD genera una respuesta humoral y también inmunoprotección, (2) por que la inmunización fue de manera oral y (3) por que la inmunización fue mediante la producción y entrega de las proteínas multiepitópicas dentro del tejido vegetal. Es posible que los anticuerpos IgA de la mucosa intestinal hayan tenido un papel fundamental para la neutralización de la CT. Los anticuerpos IgA de mucosas se presentan en forma de dímeros y son llamados IgA secretora, estos neutralizan toxinas, bacterias patógenas, así como moléculas inflamatorias de origen microbiano, como sería el ejemplo del LPS

(Cerutti y Rescigno, 2008) y aunque no fijan complemento ni es opsonina, su importancia es enorme al impedir el ingreso de microorganismos y toxinas al organismo (Cerutti, 2008). Si bien es cierto que la inmunización en mucosas se asocia con la inducción de tolerancia de algunos antígenos, también es cierto que se ha observado que con la coadministración de ayudantes apropiados y/o con esquemas de inmunización eficientes se puede generar respuesta inmunitarias protectoras en la mucosa. La inmunización en mucosas puede llevar a mecanismos efectores de protección no solo en otros compartimentos distintos al lugar donde se llevó a cabo la inmunización sino también a nivel sistémico (Davitt y Lavelle, 2015). Estudios posteriores podrían explorar la persistencia de los anticuerpos en el tiempo y su capacidad inmunoprotectora.

Para obtener un panorama más amplio acerca de las rutas de activación de los diferentes grupos celulares sería necesario analizar la presencia e intensidad de citocinas en los tejidos de los ratones inmunizados. Una manera de hacer este análisis de forma indirecta es midiendo la expresión de genes de citocinas. En este trabajo solo se pudieron medir la expresión génica de las citocinas, IL-1 β y el Factor de Necrosis Tumoral alfa (TNF- α). Se observó que en ratones inmunizados oralmente con ToxAentero y posteriormente retados con CT la expresión de ambos genes de citocinas fue significativamente menor comparado con la expresión génica de los ratones que se les administró el tejido vegetal silvestre. La IL-1 β es una interleucina que está relacionada como mediador de la respuesta inflamatoria, que se presenta en grandes cantidades durante alguna enfermedad crónica y daño tisular agudo (Sutton *et al.*, 2009). El TNF- α también es una citocina inflamatoria y está estrechamente relacionada con IL-1 y favorece el reclutamiento neutrófilos (Gulati *et al.*, 2016). Hasta ahora los resultados estarían perfilando hacia la conclusión de que los ratones que no están inmunizados con ToxAentero posiblemente estén activando rutas proinflamatorias ante el efecto de la CT y que en los ratones inmunizados con ToxAentero no se estaría generando efecto de la CT en el intestino. En estudios posteriores se evaluaría la expresión

de más citocinas para poder inferir las posibles rutas que se estarían activando como la inflamación, la regulación y que subpoblaciones celulares se estarían diferenciando.

9. CONCLUSIONES

Se pudo expresar de manera recombinante las dos proteínas multiepitópicas funcionales a niveles significativos dentro del tejido vegetal sin afectar el crecimiento y el fenotipo de la planta. Se pudo constatar que ambas proteínas multiepitóipicas son inmunogénicas en ratones cuando son administradas dentro del tejido vegetal de manera subcutánea y oral. Se detectaron niveles significativos de IgG en suero e IgA en heces contra cada uno de los epítopes incorporados dentro de las proteínas multiepitópicas y de manera interesante se encontraron mayores niveles de anticuerpos en ratones inmunizados con ToxAentero de manera oral.

Ambas proteínas generaron inmunoprotección ante los retos con CT de *V. cholerae* y el reto bacteriano con *V. parahaemolyticus*. Así mismo se observó una menor expresión génica de las citocinas proinflamarias IL1- β y TNF- α en los ratones que fueron inmunizados oralmente con ToxAentero.

Como perspectivas de estos estudios incluyen (1) medir persistencia de los anticuerpos IgG e IgA en los ratones inmunizados. (2) hacer un análisis de expresión de genes de grupo inmunizado con LTBAentero así como un grupo control sin retar con CT (3) El análisis de expresión de más citocinas.

10. LITERATURA CITADA

Aliberti J. 2016. Immunity and tolerance induced by intestinal mucosal dendritic cells. *Mediat. Inflamm* 2016:3104727.

Ashok A, Brison M, LeTallec Y. 2017 Improving cold chain systems: Challenges and solutions. *Vaccine*, 35(17), 2217-2223.

Bass J.J., Wilkinson D.J., Rankin D., Phillips B.E., Szewczyk N.J., Smith K., Atherton P.J. 2016. An overview of technical considerations for Western blotting applications to physiological research. *Scand J Med Sci Sports* 27(1):4–25.

Beneduce L., Gatta, G., Bevilacqua, A., Libutti, A., Tarantino, E., Bellucci, M., Spano, G. 2017. Impact of the reusing of food manufacturing wastewater for irrigation in a closed system on the microbiological quality of the food crops. *International Journal of Food Microbiology*, 260, 51-58.

Benoun J.M, N.G., Peres, N. Wang, O.H. Pham, V.L. Rudisill, Z.N. Fogassy, P.G. Whitney, D. Fernandez-Ruiz, T. Gebhardt, Q. Pham, L. Puddington, S. Bedoui, R.A. Strugnell, S.J. McSorley. 2018. Optimal protection against *Salmonella* infection requires noncirculating memory. *Proceedings of the National Academy of Sciences*; (2018)08339.

Bergeron-Sandoval L., Girard A., Ouellet F., Archambault D., Sarhan F. 2011. Production of Human Rotavirus and *Salmonella* Antigens in Plants and Elicitation of fljB-Specific Humoral Responses in Mice. *Mol Biotechnol.* 47:157–168.

Bergman M. A., Cummings L. A., Alaniz R. C., Mayeda L., Fellnerova I., Cookson B. T. 2005. CD4+-T-Cell Responses Generated during Murine *Salmonella enteric* Serovar Typhimurium Infection Are Directed towards Multiple Epitopes within the Natural Antigen FliC. *Infect Immun* 73, 11: 7226 7235.

Berin M.C., Shreffler W.G. 2016. Mechanisms underlying induction of tolerance to foods. *Immunol Allergy Clin N Am* 36(1):87–102.

Buettner M., Bode U. 2012. Lymph node dissection-understanding the immunological function of lymph nodes. *Clin Exp Immunol* 169:205–212.

Bi Q. E. Ferreras, L. Pezzoli, D. Legros, L.C. Ivers, K. Date, J. Lessler. 2017. Protection against cholera from killed whole-cell oral cholera vaccines: a systematic review and meta-analysis. *The Lancet Infectious Diseases*, 17(10), 1080-1088.

Black R.E., Merson M.H., Rowe B., Taylor P.R., Abdul Alim A.R., Gross R.J. 1981. Enterotoxigenic *Escherichia coli* diarrhoea: acquired immunity and transmission in an endemic area. *Bull WHO* 59:263–8.

Bourgeois A.L. 2018. Status of Vaccine Development for ETEC. Presentation to WHO Product Development for Vaccine Advisory Committee (PDVAC). Geneva, Switzerland.

Boyaka P.N., Ohmura M., Fujihashi K., Koga T., Yamamoto M., Kweon M.N., Takeda Y., Jackson R.J., Kiyono H., Yuki Y., McGhee J.R. 2003. Chimeras of labile toxin one and cholera toxin retain mucosal adjuvanticity and direct Th cell subsets via their B subunit. *J Immunol* 170:454–462.

Brandtzaeg P., Kiyono H., Pabst R., Russel M.W. 2008 Terminology: nomenclature of mucosa-associated lymphoid tissue. *Mucosal Immunol* 1:31–37.

Broberg C.A., Calder T.J., Orth K. 2011. *Vibrio parahaemolyticus* cell biology and pathogenicity determinants. *Microbes and Infection / Institut Pasteur*.13 (12-13):992-1001. doi: 10.1016/j.micinf.2011.06.013.

Campa-Córdova A.I, León-Gallo AF, Romero-Maldonado A, Ibarra-Serrano AC, 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, *J. Fish Dis.* 40 (11) 1725–1729.

Cardenas, L., J. D. Clements. 1993. Development of mucosal protection against the heat-stable enterotoxin (ST) of *Escherichia coli* by oral immunization with a genetic fusion delivered by a bacterial vector. *Infect. Immun*; 61:4629–4636.

Carter P. B. y F. M. Collins. 1974. The route of enteric infection in normal mice. *J. Exp. Med*; 139:1189.

Centers for Disease Control and Prevention. 2020. Salmonella. <http://www.cdc.gov/salmonella/>.

Cerutti A., Rescigno M. 2008. The biology of intestinal immunoglobulin A responses. *Immunity*, 28 pp. 740-750.

Cerutti A. 2008. The regulation of IgA class switching. *Nat Rev Immunol*, 8 pp. 421-434.

Charles R.C., Hilaire I.J., Mayo-Smith L.M., Teng J.E., Jerome J.G., Franke M.F., Saha A., Yu Y., Kovac P., Calderwood S.B. 2014. Immunogenicity of a killed bivalent (O1 and O139) whole cell oral cholera vaccine, Shanchol, in Haiti. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 8, e2828.

Chatterjee B.D., Mukherjee A., Sanyal S.N. 1984. Enteroinvasive model of *Vibrio parahaemolyticus*. *Indian J Med Res*; 79:151–8.

Chatterjee S., Ghosh K., Raychoudhuri, A., Pan A., Bhattacharya M.K., Mukhopadhyay A.K., Ramamurthy T., Bhattacharya S.K., Nandy R.K. 2003. Phenotypic and genotypic traits and epidemiological implication of *Vibrio cholerae* O1 and O139 strains in India during. *J. Med. Microbiol*; 2007, 56, 824–832.

Chikwamba R., Cunnick, J., Hathaway D., McMurray J., Mason H., Wang, K. 2002. A functional antigen in a practical crop: LT-B producing maize protects mice against *Escherichia coli* heat labile enterotoxin (LT) and cholera toxin (CT). *Transgenic Res.* 11: 479-493.

Clark T.G., D. Cassidy-Hanley D. 2005. Recombinant subunit vaccines: potentials and constraints. *Developments in biologicals*, 121, 153-163.

Clemens J.D., Sack D.A., Harris J.R., Chakraborty J., Khan M.R., Stanton B.F., Kay B.A., Khan M.U., Yunus M., Atkinson W. 1986. Field trial of oral cholera vaccines in Bangladesh. 2, 124–127.

Clements J.D. 1990. Construction of a nontoxic fusion peptide for immunization against *Escherichia coli* strains that produce heat-labile and heat-stable enterotoxins. *Infect. Immun.* 58: 1159–1166.

Clements J.D., Hartzog N.M., Lyon F.L. 1988. Adjuvant activity of *Escherichia coli* heat-labile enterotoxin and effect on the induction of oral tolerance in mice to unrelated protein antigens. *Vaccine* 6:269–277.

Clements J.D., Norton E.B. 2018. The mucosal vaccine adjuvant LT (R192G/L211A) or dm LT. *mSphere* 3(4): pii: e00215-18

Cookson B.T. y Bevan M.J. 1997. Identification of a Natural T Cell Epitope Presented by Salmonella-Infected Macrophages and Recognized by T Cells from Orally Immunized Mice *J Immunol*; 158: 4310-4319.

Cox E., Verdonck F., Vanrompay D., Goddeeris B. 2006. Adjuvants modulating mucosal immune responses or directing systemic responses towards the mucosa.

Crump J.A. y Mintz E.D. 2010. Global trends in typhoid and paratyphoid fever. *Clin Infect Dis*; 50:241–6.

Cummings L.A., Wilkerson W.D., Bergsbaken T., Cookson B. T. 2006. In vivo fliC expression by *Salmonella enterica* serovar Typhimurium is heterogeneous, regulated by ClpX, and anatomically restricted. *Mol. Microbiol*; 61:795–809.

Czerkinsky C., Prince S. J., Michalek S. M., Jackson S., Russell M. W., Moldoveanu Z., McGhee J. R, Mestecky J. 1987. IgA antibody-producing cells in

peripheral blood after antigen ingestion: evidence for a common mucosal immune system in humans. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 84:2449– 2453.

Dadonaite B., Ritchie H., Roser M. 2018. Diarrheal diseases. Publicado en OurWorldInData.org. Recuperado de: <https://ourworldindata.org/diarrheal-diseases>.

Datta S., Janes E., Simonson J.G. 2008. Immunomagnetic separation and coagglutination of *Vibrio parahaemolyticus* with anti-flagellar protein monoclonal antibody. *Clin Vaccine Immunol*; 15(10):1541–6.

Davitt C.J., Lavelle, E.C. 2015. Delivery strategies to enhance oral vaccination against enteric infections. *Advanced drug delivery reviews*, 91, 52-69.

Dellaporta S.L., Wood J., Hicks J.B. 1983. A plant DNA miniprep: version II. *Plant Mol Biol Rep* 1:19–21.

De Haan L., Verweij W.R., Holtrop M., Brands R., Van Scharrenburg G.J, Palache A.M. 2001. Nasal or intramuscular immunization of mice with influenza subunit antigen and the B subunit of *Escherichia coli* heat-labile toxin induces IgA-or IgG-mediated protective mucosal immunity. *Vaccine*. 19: 2898-2907.

DuPont H.L., Olarte J., Evans D.G., Pickering L.K., Galindo E., Evans D.J. 1976. Comparative susceptibility of Latin American and United States students to enteric pathogens. *N Engl J Med*; 295:1520–1.

Elson C.O., Ealding W. 1984. Generalized systemic and mucosal immunity in mice after mucosal stimulation with cholera toxin. *J Immunol* 132:2736–2741.

Filipecki M., S. Malepszy. 2006. Unintended consequences of plant transformation: a molecular insight. *J. Appl. Genet.* 47(4):277-286.

Francis C.L., Starnbach M.N., Falkow S. 1992. Morphological and cytoskeletal changes in epithelial cells occur immediately upon interaction with *Salmonella typhimurium* grown under low-oxygen conditions. *Mol Microbiol*; 6:3077-87.

Fraser A., Paul M., Goldberg E., Acosta C.J., Leibovici L. 2007. Typhoid fever vaccines: systematic review and meta-analysis of randomised controlled trials. *Vaccine*; 25:7848–57.

Freytag L.C., Clements J.D. 2005. Mucosal adjuvants. *Vaccine*, 23(15), 1804-1813.

Gallichan W.S., Woolstencroft R.N., Guarasci T., McCluskie M.J., Davis H.L., Rosenthal K.L. 2001. Intranasal immunization with CpG oligodeoxynucleotides as an adjuvant dramatically increases IgA and protection against herpes simplex virus-2 in the genital tract. *J Immunol* 166:3451–3457.

Girard, M. P., D. Steele, C. L. Chaignat, and M. P. Kieny. 2006. A review of vaccine research and development: human enteric infections. *Vaccine* 24: 2732–2750.

Glynn, M. K., V. Reddy, L. Hutwagner, T. Rabatsky-Her, B. Shiferaw, D. J. Vugia, S. Segler, J. Bender, T. J. Barrett, and F. J. Angulo. 2004. Prior antimicrobial agent use increases the risk of sporadic infections with multidrug-resistant *Salmonella entérica* serotype Typhimurium: A Foodnet case-control study, 1996-1997. *Clin. Infect. Dis.* 38(Suppl. 3): S227–S236.

Gomes T.A, Rassi V., MacDonald K.L, Ramos S.R, Trabulsi L.R., Viera M.A. 1991. Enteropathogens associated with acute diarrheal disease in urban infants in Sao Paulo, Brazil. *J Infect Dis.* 164:4195–8.

Goodman W.A., Pizarro T.T. 2013. Regulatory cell populations in the intestinal mucosa. *Curr Opin Gastroenterol* 29:614–620.

Gordon M.A., Graham S.M., Walsh A.L., Wilson L., Phiri A., Molyneux E. 2008. Epidemics of invasive *Salmonella enterica* serovar enteritidis and *S. enterica* serovar Typhimurium infection associated with multidrug resistance among adults and children in Malawi. *Clin Infect Dis.* 46:963–9.

Gu Y. 2015. Lipopolysaccharide is inserted into the outer membrane through an intramembrane hole, a lumen gate, and the lateral opening of LptD. *Structure* 23, 496–504.

Guan W., Liu W., Bao J., Li J., Yuan Ch., Tang J., Shi D. 2015. Analysis and application of a neutralizing linear epitope on liable toxin B of enterotoxin *Escherichia coli* *Appl Microbiol Biotechnol.* 99:5985–5996.

Gulati K., Guhathakurta, S., Joshi, J., Rai, N., Ray, A. 2016. Cytokines and their role in health and disease: a brief overview. *MOJ Immunol*, 4(2), 1-9.

Hadis U., Wahl B., Schulz O., Hardtke-Wolenski M., Schippers A., Wagner N., Müller W., Sparwasser T., Förster R., Pabst O. 2011. Intestinal tolerance requires gut homing and expansion of FoxP3+regulatory T cells in the lamina propria. *Immunity* 34(2):237–246.

Hansen G., M Wright. 1999. Recent advances in the transformation of plants. *Trends Plant Sci. Rev. (USA)*. 4(6):226-231.

Haq T.A., Mason H.S., Clements J.D., Arentzen C.J., 1995. Oral immunization with a recombinant bacterial antigen produced in transgenic plants. *Science*; 268:714–6.

Haraga A., Ohlson M.B., Miller S.I. 2008. Salmonellae interplay with host cells. *Nat Rev Microbiol*; 6: 53-66.

Hongli L., Xukui L., Ting L., Wensheng L., Lusheng S., Jin Z. 2013. Transgenic tobacco expressed HPV16-L1 and LT-B combined immunization induces strong

mucosal and systemic immune responses in mice. *Hum Vaccin Immunother* 9:83–89.

Holmgren J. y Svennerholm A.M. 1977 Mechanisms of disease and immunity in cholera: a review. *J. Infect. Dis.* 36, 105-112.

Holmgren J., Czerkinsky C., Lycke N., Svennerholm A.M. 1994. Strategies for the induction of immune responses at mucosal surfaces making use of cholera toxin B subunit as immunogen, carrier, and adjuvant. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 50, 42–54.

Honda T., Iida T. 1993. The pathogenicity of *Vibrio parahaemolyticus* and the role of the thermostable direct hemolysin and related hemolysin. *Rev. Med. Microbiol.* 4 106–113.

Horsch R.B., Fraley R.T., Rogers S.G., Sanders P.R., Lloyd A .1985. A simple and general method for transferring genes into plants. *Science* 227:1229–1231.

Jacob C.O., Sela M., Arnon R. 1983. Antibodies against synthetic peptides of the B subunit of cholera toxin: crossreaction and neutralization of the toxin. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 80(24), 7611-7615.

Jacob C.O, Leitner M., Zamir A., Salomon D., Arnon R. 1985. Priming immunization against cholera toxin and *E. coli* heat-labile toxin by a cholera toxin short peptide-beta-galactosidase hybrid synthesized in *E. coli*. *The EMBO journal*, 4(12), 3339-3343.

Jepson M.A., Collares-Buzato C.B., Clark M.A., Hirst B.H., Simmons N.L. 1995. Rapid disruption of epithelial barrier function by *Salmonella typhimurium* is associated with structural modification of intercellular junctions. *Infect Immun*; 63:356-9.

Ji J., Griffiths K.L., Milburn P.J., Hirst T.R., O'Neill H.C. 2015. The B subunit of *Escherichia coli* heat-labile toxin alters the development and antigen-presenting capacity of dendritic cells. *J Cell Mol Med.* 19(8): 2019-31.

Jia K., Thomas C., Akbar M., Sun Q., Adams-Huet B., Gilpin C. 2009. Autophagy genes protect against *Salmonella typhimurium* infection and mediate insulin signaling-regulated pathogen resistance. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 106:14564–9.

Jiang Z.D., DuPont, H. L. 2017. Etiology of travellers' diarrhea. *Journal of Travel Medicine*, 24(suppl_1), S13-S16.

Johansson-Lindbom B., Agace W.W. 2007. Generation of gut-homing T cells and their localization to the small intestinal mucosa. *Immunol Rev* 215:226–242.

Jones B.D., Ghori N., Falkow S. 1994. *Salmonella typhimurium* initiates murine infection by penetrating and destroying the specialized epithelial M cells of the Peyer's patches. *J Exp Med*; 180:15-23.

Jones D.H., A. Doherty, H. Wu. 2005. Review of methodologies and a protocol for the *Agrobacterium*-mediated transformation of wheat. *Plant Methods* 1: 5

Joshi S. S., Barnett, B., Doerrer, N. G., Glenn, K., Herman, R. A., Herouet-Guicheney, C., & Papineni, S. 2016. Assessment of potential adjuvanticity of Cry proteins. *Regulatory Toxicology and Pharmacology*, 79, 149-155.

Kaisho T, Akira S. 2002. Toll-like receptors as adjuvant receptors. *Biochim Biophys Acta*; 1589: 1–13.

Kang T.J., Han S.C., Jang M.O., Kang K.H., Jang Y.S., Yang M.S. 2004. Enhanced expression of B-subunit of *Escherichia coli* heat-labile *Appl Microbiol Biotechnol*.

Kayama H., Takeda K. 2016. Functions of innate immune cells and commensal bacteria in gut homeostasis. *J Biochem* 159(2):141–149.

Kim S.I, Veena J.H., Gelvin S.B 2007. Genome-wide analysis of *Agrobacterium*T-DNA integration sites in the *Arabidopsis* genome generated under non-selective conditions. *Plant J* 51:779–791.

Kim Y.S., Ho S.B. 2010. Intestinal goblet cells and mucins in health and disease: recent insights and progress. *Curr Gastroenterol Rep* 12:319–330.

Kim, T.G., Langridge, W.H.R. 2003. Assembly of cholera toxin B subunit full-length rotavirus NSP4 fusion protein oligomers in transgenic potato. *Plant cell reports*, 21(9), 884-890.

Kimura A. C., Reddy V., Marcus R., Cieslak P. R., Mohle-Boetani J. C., Kassenborg H. D., Segler S. D, Hardnett F. P., Barrett T., Swerdlow D. L. 2004. Chicken consumption is a newly identified risk factor for sporadic *Salmonella enterica* serotype Enteritidis infections in the United States: A case-control study in FoodNet sites. *Clin. Infect. Dis.* 38(Suppl. 3): S244–S252.

Klipstein FA, Engert RF, Houghten RA. 1986. Immunisation of volunteers with a synthetic peptide vaccine for enterotoxigenic *Escherichia coli*. *Lancet*. 1: 471-472.

Kwon K. C., Verma, D., Singh, N. D., Herzog, R., Daniell, H. 2013. Oral delivery of human biopharmaceuticals, autoantigens and vaccine antigens bioencapsulated in plant cells. *Advanced drug delivery reviews*, 65(6), 782-799.

Lajoinie A., Henin E., Kassai B., Terry D. 2014. Solid oral forms availability in children: A cost saving investigation. *Br. J. Clin. Pharmacol.* 78, 1080–1089.

Lamphear B.J., Streatfield S.J., Jilka J.M., Brooks C.A., Barker D.K., Turner D.D. 2002. Delivery of subunit vaccines in maize seed. *J Control.* 85:169–80.

Lawson L.B., Norton E. B., Clements J.D. 2011. Defending the mucosa: adjuvant and carrier formulations for mucosal immunity. *Current opinion in immunology*, 23(3), 414-420.

Lee C., T. Chen, Y. Yang, T. Ko, Y. Huang, J. Huang, M. Huang, L. Lin, C. Chen, S. Lin, D.V. Lightner, H. Wang, A. Wang, H. Wang, L. Horb, C. Lo. 2015. The opportunistic marine pathogen *Vibrio parahaemolyticus* becomes virulent by acquiring a plasmid that expresses a deadly toxin. PNAS. 112: 10798–10803.

León-Gallo A., Carlos Angulo C., Romero-Maldonado A., González-Ortega O., Hirono I., Rosales-Mendoza S. 2016. Immunogenic properties of the ToxA toxin from *Vibrio parahaemolyticus* in mouse. M&I journal. Enviado.

Levine M.M. y Tacket C.O. 1994. Recombinant live cholera vaccines. In: *Vibrio cholerae* and Cholera: Molecular to Global Perspectives (Wachsmuth, K.I., Blake, P.A. and Olsvik, O., Eds.), pp. 395-415. American Society for Microbiology, Washington, DC.

Li C., Z. Ye, L. Wen, R. Chen, L. Tian, F. Zhao, J. Pan. 2014. Identification of a novel vaccine candidate by immunogenic screening of *Vibrio parahaemolyticus* outer membrane proteins. Vaccine, 32(46), 6115-6121.

Lin J., Huang S., Zhang Q. 2002. Outer membrane proteins: key players for bacterial adaptation in host niches. Microbes Infect. 4(3):325–31.

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 Shellfish Immunol; 30(6):1241–8.

Liu M., Ruan X., Zhang, C., Lawson, S.R., Knudsen D.E., Nataro JP, Robertson D.C., Zhang W. 2011. Heat-labile- and heat-stable-toxoid fusions (LTR192G-STaP13F) of human enterotoxigenic *Escherichia coli* elicit neutralizing antitoxin antibodies. Infect. Immun. 79: 4002-4009.

Lowry O.H., Rosebrough N.J., Farr A.L., Randall R.J. 1951. Protein measurement with the Folin phenol reagent, J. Biol. Chem. 193 265e275.

Lun J., Xia C., Yuan C., Zhang Y., Zhong M., Huang T. 2014. The outer membrane protein, LamB (maltoporin), is a versatile vaccine candidate among the *Vibrio* species. *Vaccine*. 32(7):809–15.

Lutz C., Erken M., Noorian P., Sun S., McDougald D. 2013. Environmental reservoirs and mechanisms of persistence of *Vibrio cholerae*. *Front. Microbiol.* 4, 375.

Majowicz S.E., Musto J., Scallan E., Angulo F.J., Kirk M., O'Brien S.J. 2010. The global burden of nontyphoidal *Salmonella* gastroenteritis. *Clin Infect Dis*; 50:882–9.

Mann E.R, Landy J.D., Bernardo D., Peake S.T., Hart A.L., Al-Hassi H.O., Knight S.C. 2013. Intestinal dendritic cells: their role in intestinal inflammation, manipulation by the gut microbiota and differences between mice and men. *Immunol Lett* 150:30–40.

Martínez-González M., Rosales-Mendoza S., Soria-Guerra R.E., Moreno-Fierros L., López-Revilla R., Korban S.S., Guevara-Arauz J.C., Alpuche-Solís A.G. 2011. Oral immunization with a lettuce-derived *Escherichia coli* heat-labile toxin B subunit induces neutralizing antibodies in mice. *Plant Cell Tissue Org Cult* 107:441–449.

Mason H.S., Haq T.A., Clements J.D., Arntzen C.J. 1998. Edible vaccine protects mice against *Escherichia coli* heat-labile enterotoxin (LT): potatoes expressing a synthetic LT-B gene. *Vaccine*.16:1336–43.

Mason K.L., Huffnagle G.B., Noverr M.C., Kao J.Y. 2008. Overview of gut immunology. *Adv Exp Med Biol* 635:1–14.

Matsuda S., Kodama T., Okada N., Okayama K., Honda T., Iida T. 2010. Association of *Vibrio parahaemolyticus* thermostable direct hemolysin with lipid rafts is essential for cytotoxicity but not hemolytic activity. *Infect. Immun.* 78 603–610.

McLennan C.A., L.B. Martin, F. Micoli, F. 2014. Vaccines against invasive Salmonella disease: current status and future directions. *Human vaccines & immunotherapeutics*, 10(6), 1478–1493.

McSorley, S. J., Cookson B. T, Jenkins M. K. 2000. Characterization of CD4+ T cell responses during natural infection with *Salmonella typhimurium*. *J. Immunol.* 164:986–993.

Mekalanos, J.J. 1985. Cholera toxin: genetic analysis, regulation and role in pathogenesis. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 118; 97-118.

Mestecky J., Nguyen H., Czerkinsky C., Kiyono H. 2008. Oral immunization: an update. *Curr Opin Gastroenterol* 24:713–719.

Mirhoseini A., Amani J., Nazarian S. 2018. Review on pathogenicity mechanism of enterotoxigenic *Escherichia coli* and vaccines against it. *Microbial pathogenesis*, 117, 162-169. Moon H. W. 1978. Mechanisms in the pathogenesis of diarrhea: a review. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 172:443–448.

Monreal-Escalante E., Rosales-Mendoza S, Govea-Alonso D.O Campa-Córdova A.I, Angulo C. 2019. Genetically-engineered plants yield an orally immunogenic PirA-like toxin from *Vibrio parahaemolyticus*. *Int J Biol Macromol.* 137: 126–131.

Moreno-Fierros L., Ruiz-Medina E., Esquivel R., López-Revilla R., Piña-Cruz S. 2003. Intranasal Cry1Ac Protoxin is an Effective Mucosal and Systemic Carrier and Adjuvant of *Streptococcus pneumoniae* Polysaccharides. *Scand J Immunol.* 57 (1) 45–55.

Moreno-Fierros L, García-Hernández AL, Ilhuicatzí-Alvarado D, Rivera-Santiago L, Torres-Martínez M, Rubio-Infante N, Legorreta-Herrera M. 2013. Cry1Ac protoxin from *Bacillus thuringiensis* promotes macrophage activation by upregulating CD80 and CD86 and by inducing IL-6, MCP-1 and TNF- α cytokines. *Int Immunopharmacol* 17(4):1051–66.

Moreno-Fierros L., Verdín-Terán S., García-Hernández A. 2015. Intraperitoneal Immunization with Cry1Ac protoxin from *Bacillus thuringiensis* provokes upregulation of Fc-Gamma-II/and Fc-gamma-III receptors associated with IgG in the intestinal epithelium of mice, Scand J Immunol. 82 35-47.

Mowat A.M., Viney J.L. 1997. The anatomical basis of intestinal immunity. Immunol Rev 156:145–166.

Mowat AM. 2003. Anatomical basis of tolerance and immunity to intestinal antigens. Nat RevImmunol 3:331–341.

Mowat A.M., Agace W.W. 2014 Regional specialization within the intestinal immune system. Nat Rev Immunol 14:667–685.

Mudrak B., Kuehn M.J. 2010. Heat-labile enterotoxin: beyond G(m1) binding. Toxins (Basel) 2(6):1445–1470.

Nashar T.O., Betteridge Z.E., Mitchell R.N. 2001. Evidence for a role of ganglioside GM1 in antigen presentation: binding enhances presentation of *Escherichia coli* enterotoxin B subunit (EtxB) to CD4 (+) T cells. Int Immunol 13(4):541–551.

Newsted D., Fallahi F., Golshani A., Azizi A. 2015. Advances and challenges in mucosal adjuvant technology. Vaccine 33:2399–2405.

Newton S.M., Jacob C.O., Stocker B.A. 1989. Immune response to cholera toxin epitope inserted in Salmonella flagellin. Science, 244(4900), 70-72.

Niess J.H., Brand S., Gu X., Landsman L., Jung S., McCormick B.A. CX3CR1 mediated dendritic cell access to the intestinal lumen and bacterial clearance. Science 2005; 307:254-8.

Nyambi P.N., Mbah H.A., Burda S., Williams C., Gorny M.K., Nádas A., Zolla-Pazner S. 2000. Conserved and exposed epitopes on intact, native, primary human immunodeficiency virus type 1 virions of group M. *J Virol* 74: 7096–7107.

Ogra P.L., Faden H., Welliver R.C. 2001. Vaccination strategies for mucosal immune responses. *Clinical microbiology reviews*, 14(2), 430-445.

Ohno H. 2016. Intestinal M cells *J Biochem* 159(2):151–160.

Pabst O., Mowat A.M. 2012. Oral tolerance to food protein. *Mucosal Immunol* 5:232–239.

Paterson G.K., Maskell D.J. 2010. Recent advances in the field of Salmonella Typhi vaccines. *Hum Vaccin*; 6:379–84.

Penney C.A., Thomas D.R., Deen S.S., Walmsley A.M. 2011. Plant-made vaccines in support of the millennium development goals. *Plant Cell Rep* 30:789–798.

Pasetti M. F., Simon J. K., Sztein M. B., Levine, M. M. 2011. Immunology of gut mucosal vaccines. *Immunological reviews*, 239(1), 125-148.

Pereira C. M., Guth B. E., Sbrogio-Almeida M. E., Castilho B. A. 2001. Antibody response against *Escherichia coli* heat-stable enterotoxin expressed as fusions to flagellin. *Microbiology* 147:861–867.

Peterson L.W., Artis D. 2014. Intestinal epithelial cells: regulators of barrier function and immune homeostasis. *Nat Rev Immunol* 14:141–153.

Prejit Agarwal R. K., Porteen, K., Dubal, Z. B., Asha, K., Shweta, S., Ripan, B. 2013. Evaluation of recombinant outer membrane protein based vaccine against *Salmonella typhimurium* in birds. *Biologicals*, 41(3), 162–168.

Rawat P., Singh A.K., Ray K., Chaudhary B., Kumar S., Gautam T., Burma P.K. 2011. Detrimental effect of expression of Bt endotoxin Cry1Ac on in vitro

regeneration, in vivo growth and development of tobacco and cotton transgenics. *Journal of Biosciences*, 36(2), 363-376.

Reidi, J., Klose K. E. 2002. *Vibrio cholerae* and cholera: out of the water and into the host. *FEMS Microbiology Reviews*, 26(October), 125–139.

Reboldi A., Cyster J.G. 2016. Peyer's patches: organizing B-cell responses at the intestinal frontier. *Immunol Rev* 271(1):230–245.

Reyes-Becerril M., Maldonado-García M., Guluarte C., León-Gallo A., Rosales-Mendoza S., Ascencio F., Hirono I., Angulo C. 2016. Evaluation of ToxA and *Vibrio parahaemolyticus* lysate on humoral immune response and immune-related genes in Pacific red snapper. *FSI journal*.

Rigano M.M., Alvarez M.L., Pinkhasov J., Jin .Y, Sala F., Arntzen C.J., Walmsley A.M. 2004. Production of a fusion protein consisting of the enterotoxigenic *Escherichia coli* heat-labile toxin B subunit and a tuberculosis antigen in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell Rep* 22:502–508.

Ríos-Huerta R., Monreal-Escalante E., Govea-Alonso D.O., Angulo C., Rosales-Mendoza S. 2017. Expression of an immunogenic LTB-based chimeric protein targeting Zaire ebolavirus epitopes from GP1 in plant cells. *Plant Cell Reports*, 36(2), 355–365.

Rosales-Mendoza S., Soria-Guerra R.E., Lopez-Revilla R., Moreno-Fierros L., Alpuche-Solis A.G. 2008. Ingestion of transgenic carrots expressing the *Escherichia coli* heat-labile enterotoxin B subunit protects mice against cholera toxin challenge. *Plant Cell Rep.*; 27:79–84.

Rosales-Mendoza S., Alpuche-Solís A.G., Soria-Guerra R.E., Moreno- Fierros L., Martínez-González L., Herrera-Díaz A, Korban S.S. 2010. Expression of an *Escherichia coli* antigenic fusion protein comprising the heat labile toxin B subunit

and the heat stable toxin, and its assembly as a functional oligomer in transplastomic tobacco plants. *Plant J* 57:45–54.

Rosales-Mendoza S., Soria-Guerra R.E, Moreno-Fierros L., Govea-Alonso D.O, Herrera-Díaz A., Korban S.S., Alpuche-Solís A.G. 2011. Immunogenicity of nuclear-encoded LTB:ST fusion protein from *Escherichia coli* expressed in tobacco plants. *Plant Cell Rep.*; 30:1145–1152.

Rueckert C., Guzmán C.A. 2012. Vaccines: from empirical development to rational design. *PLoS Pathog*, 8(11), e1003001.

Saarilahti H. T., Palva E. T., Holmgren J., Sanchez J.1989. Fusion of genes encoding *Escherichia coli* heat-stable enterotoxin and outer membrane protein OmpC. *Infect. Immun.* 57:3663–3665.

Salazar-González R.M., Maldonado-Bernal C., Ramirez-Cruz, N.E., Rios-Sarabia N., Beltrán-Nava J., Castañón-González J., Isibasi A. 2004. Induction of cellular immune response and anti-Salmonella enterica serovar typhi bactericidal antibodies in healthy volunteers by immunization with a vaccine candidate against typhoid fever. *Immunology letters*, 93(2-3), 115-122.

Salem W., Leitner D.R., Zingl F.G., Schratte G., Prassl R., Goessler, W., Schild S. 2015. Antibacterial activity of silver and zinc nanoparticles against *Vibrio cholerae* and enterotoxic *Escherichia coli*. *International Journal of Medical Microbiology*, 305(1), 85-95.

Sanchez J. y Holmgren, J. 2011. Cholera toxin—A foe & A friend. *Indian J. Med. Res.*, 133, 153–163.

Santos R. L., Zhang S., Tsohis R. M., Kingsley R. A., Adams L. G., Baumler A. J. 2001. Animal models of Salmonella infections: Enteritis versus typhoid fever. *Microbes Infect.* 3:1335–1344.

Schiavi E., Smolinska S., O'Mahony L. 2015. Intestinal dendritic cells. *Curr Opin Gastroenterol.* 31(2):98–103.

Scott CL, Aumeunier AM, Mowat AM. 2011. Intestinal CD103+ dendritic cells: master regulators of tolerance? *Trends Immunol* 32:412–419.

Seo H, Lu T., Mani S., Bourgeois A.L., Walker R., Sack, D.A., Zhang, W. 2020. Adjuvant effect of enterotoxigenic *Escherichia coli* (ETEC) double-mutant heat-labile toxin (dmLT) on systemic immunogenicity induced by the CFA/II/III/IV MEFA ETEC vaccine: Dose-related enhancement of antibody responses to seven ETEC adhesins (CFA/I, CS1-CS6). *Human Vaccines & Immunotherapeutics*, 16(2), 419-425.

Serazin A.C., L.A. Shackelton, C. Wilson, M.K. Bhan. 2010. Improving the performance of enteric vaccines in the developing world. *Nature immunology*, 11(9), 769-773.

Sirikharin R., Taengchaiyaphum S., Sanguanrut P., Chi T.D., Mavichak R., Proespraiwong P. 2015. Characterization and PCR Detection of Binary, Pir-Like Toxins from *Vibrio parahaemolyticus* Isolates that Cause Acute Hepatopancreatic Necrosis Disease (AHPND) in Shrimp. *PLoS ONE* 10(5): e0126987.

Soloff AC, Barratt-Boyes SM. 2010. Enemy at the gates: dendritic cells and immunity to mucosal pathogens. *Cell Res* 20:872–885.

Strindeliu L., Filler M., Sjöholm I. 2004. Mucosal immunization with purified flagellin from *Salmonella* induces systemic and mucosal immune responses in C3H/HeJ mice. *Vaccine* 22:3797–3808.

Sutton C. E., Lalor S.J., Sweeney C. M., Brereton C. F., Lavelle E. C., Mills Kingston H.G. 2009. Interleukin-1 and IL-23 Induce Innate IL-17 Production from $\gamma\delta$ T Cells, Amplifying Th17 Responses and Autoimmunity. *Immunity*. 31(2): 331–341.

Svennerholm A. M. y Holmgren J. J. 1995. Oral vaccines against cholera and enterotoxigenic *Escherichia coli* diarrhea. *Adv. Exp. Med. Biol.* 371B: 1623–1628.

Svennerholm A. M. 2011. From cholera to enterotoxigenic *Escherichia coli* (ETEC) vaccine development. *The Indian journal of medical research*, 133(2), 188.

Tacket C.O., Mason H.S., Losonsky G., Clements J.D., Levine M.M., Arntzen C.J. 1998. Immunogenicity in humans of a recombinant bacterial antigen delivered in a transgenic potato. *Nat Med.* 4:607–9.

Tacket CO. 2004. Plant-derived vaccines against diarrheal diseases. *Expert Opin Biol Ther.* 4:719–28.

Tacket C.O Pasetti M.F., Edelman R., Howard J.A., Streatfield S. 2004. Immunogenicity of recombinant LT-B delivered orally to humans in transgenic corn. *Vaccine* 22:4385–4389.

Tacket C.O. 2009. Plant-based oral vaccines: results of human trials. *Plant-produced Microbial Vaccines.* 332: 103-117.

Takeyama N., H. Kiyono, Y. Yuki. 2015. Plant-based vaccines for animals and humans: recent advances in technology and clinical trials. *Therapeutic Advances in Vaccines*, 3(5–6), 139–154.

Théry C, Amigorena S. 2001. The cell biology of antigen presentation in dendritic cells. *Curr Opin Immunol* 13(1):45–51.

Taxt A., Aasland R., Sommerfelt H., Nataro J., Puntervoll P. 2010. Heat-Stable Enterotoxin of Enterotoxigenic *Escherichia coli* as a Vaccine Target. *INFECT IMMUN.* 78:1824–1831.

Uzzau, S., Fasano A. 2000. Cross-talk between enteric pathogens and the intestine. *Cell. Microbiol.* 2:83–89.

Veluthambi K., A Gupta, A. Sharma. 2003. The current status of plant transformation Technologies. *Current Sci.* 84:368-380.

Van Immerseel F., Methner U, Rychlik I., B. Nagy, P. Velge, G. Martin, N. Foster, R. Ducatelle, and P. A. Barrow. 2005. Vaccination and early protection against non-host-specific *Salmonella* serotypes in poultry: Exploitation of innate immunity and microbial activity. *Epidemiol. Infect.* 133:959–978.

Vartak A., S. J. Sucheck. 2016. Recent advances in subunit vaccine carriers. *Vaccines*, 4(2), 12.

Vázquez-Padrón R.I., Gonzáles-Cabrera J., García-Tovar C., Neri-Bazan L., López-Revilla R., Hernández M. 2000. Cry1Ac protoxin from *Bacillus thuringiensis* sp. kurstaki HD73 binds to surface proteins in the mouse small intestine. *Biochem Biophys Res Commun* 271:54–8.

Wagner C., Hensel M. 2011. Adhesive mechanisms of *Salmonella enterica*. *Adv Exp Med Biol*; 715:17-34.

Walker R., Steele D., Aguado T. 2007. Review: Analysis of strategies to successfully vaccinate infants in developing countries against enterotoxigenic *E. coli* (ETEC) disease. *Vaccine* 25: 2545–2566.

Walmsley A.M., Alvarez M.L., Jin Y., Kirk D.D., Lee S.M., Pinkhasov J., Rigano M.M., Arntzen C.J., Mason H.S. .2003. Expression of the B subunit of *Escherichia coli* heat-labile enterotoxin as a fusion protein in transgenic tomato. *Plant Cell Rep* 21:1020 1026.

Wang M., Gao Z., Zhang Z., Pan L., Zhang Y. 2014. Roles of M cells in infection and mucosal vaccines. *Hum Vaccin Immunother* 10(12):3544–3551.

Waterfield N., Kamita S. G., Hammock B. D., French-Constant R. 2005. The Photorhabdus Pir toxins are similar to a developmentally regulated insect protein but show no juvenile hormone esterase activity. *FEMS Microbiol Lett* 245, 47–52.

WHO .2017. Diarrhoeal disease: <http://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/diarrhoeal-disease>. Accesad el 29 April 2020.

Wershil B.K., Furuta G.T. 2008. Gastrointestinal mucosal immunity. *J Allergy Clin Immunol* 121:S380–S383.

Williams N.A. 2000. Immune modulation by the cholera-like enterotoxin B-subunits: from adjuvant to immunotherapeutic. *Int J Med Microbiol.* 290(4-5): 447-53.

Wolf M.K. 1997. Occurrence, distribution, and associations of O and H serogroups, colonization factor antigens, and toxins of enterotoxigenic *Escherichia coli*. *Clin. Microbiol. Rev.* 10, 569–584.

Wu C.M., Chung T.C. 2007. Mice protected by oral immunization with *Lactobacillus reuteri* secreting fusion protein of *Escherichia coli* enterotoxin subunit protein. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* 50:354–365.

Xiang Q.J., Wang H.Y., Wang Z.S., Zhang Y.Z., Dong C. J. 2014. Characterization of lipopolysaccharide transport protein complex. *Cent Eur J Biol* 9, 131–138.

Yamamoto M., Mcghee J.R, Hagiwara Y., Otake S., Kiyono H. 2001. Genetically manipulated bacterial toxin as a new generation mucosal adjuvant. *Scand J Immunol.* 53(3): 211-7.

Yanga Y., Wanb C., Xua H., Weia H. 2013. Identification and characterization of OmpL as a potential vaccine candidate for immune-protection against salmonellosis in mice. *Vaccine* 31: 2930–2936.

Yongping M.A. 2016. Recent advances in nontoxic *Escherichia coli* heat-labile toxin and its derivative adjuvants, *Expert Review of Vaccines*, 15:11, 1361-1371.

You J., Xu Y., He M, McAllister T.A., Thacker P.A., Li X., Wang T., Jin L. 2011. Protection of mice against enterotoxigenic *E. coli* by immunization with a polyvalent enterotoxin comprising a combination of LTb, STa, and STb. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 89: 1885-1893.

Yu J., Langridge W.H. 2001. A plant-based multicomponent vaccine protects mice from enteric diseases. *Nat Biotechnol* 19:548–552.

Yuki Y., Kiyono H. 2003. New generation of mucosal adjuvants for the induction of protective immunity. *Reviews in medical virology*, 13(5), 293-310.

Zha Z., Li C., Li W., Ye Z., Pan J. 2016. LptD is a promising vaccine antigen and potential immunotherapeutic target for protection against *Vibrio* species infection. *Nature. Scientific Reports*. 6: 38577.

Zhang C., Zhang W. 2010. *Escherichia coli* K88ac Fimbriae Expressing Heat-Labile and Heat-Stable (STa) Toxin Epitopes Elicit Antibodies That Neutralize Cholera Toxin and STa Toxin and Inhibit Adherence of K88ac Fimbrial *E. coli*. *Clin Vaccine Immunol*.17:1859–1867.

Zhang L., Orth K. 2013. Virulence determinants for *Vibrio parahaemolyticus* infection. *Curr. Opin. Microbiol*. 16 70–77. 10.1016/j.mib.2013.02.002.

Zhang J., Fan H.Y, Zhang Z., Zhang J., Zhang J., Huang J.N. 2016. Recombinant baculovirus vaccine containing multiple M2e and adjuvant LTB induces T cell dependent, cross-clade protection against H5N1 influenza virus in mice. *Vaccine*. 34(5): 622-9.

Zheng J. P., Zhang Z. S., Li S. Q., Liu X. X, Yuan S. L., Wang P., Zhan D. W., Wang L. C., Huang C. F. 2005. Construction of a novel *Shigella* live-vector strain coexpressing CS3 and LTB/STm of enterotoxigenic *E.coli*. *World J. Gastroenterol*. 11:3411–3418.