



CENTRO DE INVESTIGACIONES BIOLÓGICAS
DEL NOROESTE, S.C.

Programa de Estudios de Posgrado

**UNA SALUD: EVALUACIÓN DE ADYUVANTES
RECOMBINANTES PARA EL DESARROLLO DE VACUNAS
ORALES CONTRA ENFERMEDADES ZONÓTICAS.**

T E S I S

Que para obtener el grado de

Maestra en Ciencias

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

P r e s e n t a

María Alejandra Cisneros Geraldo

La Paz, Baja California Sur, septiembre de 2025.

ACTA DE LIBERACIÓN DE TESIS

En la Ciudad de La Paz, B. C. S., siendo las 12 horas del día 9 del mes de septiembre del 2025, 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:

"UNA SALUD: EVALUACIÓN DE ADYUVANTES RECOMBINANTES PARA EL DESARROLLO DE VACUNAS ORALES CONTRA ENFERMEDADES ZONÓTICAS"

Presentada por la alumna:

MARÍA ALEJANDRA CISNEROS GERALDO

Aspirante al Grado de MAESTRA 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.

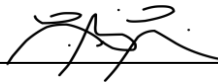
LA COMISIÓN REVISORA



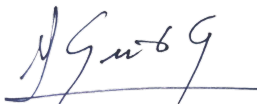
Dr. Carlos Eliud Angulo Valadez
Co-Director de Tesis



Dra. Elizabeth Monreal Escalante
Co-Directora de Tesis



Dr. Ramón Gaxiola Robles
Co-Tutor de Tesis



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



La Paz, Baja California Sur, a 11 de septiembre de 2025

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

- Herramienta antiplagio:
iThenticate
- Filtros utilizados:
Bibliografía
Texto citado
Coincidencias menores a 15 palabras
- Porcentajes de similitud: 7%
Se muestra captura de pantalla

✓ iThenticate

7% Similitud general

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

Filtrado desde el informe

- ▶ Bibliografía
- ▶ Texto citado
- ▶ Coincidencias menores (menos de 15 palabras)

Fuentes principales

- 7% Fuentes de Internet
- 0% Publicaciones
- 0% Trabajos entregados (trabajos del estudiante)

Marcas de integridad

N.º de alerta de integridad para revisión

- Caracteres reemplazados
127 caracteres sospechosos en N.º de páginas
Las letras son intercambiadas por caracteres similares de otro alfabeto.

Los algoritmos de nuestro sistema analizan un documento en profundidad para buscar inconsistencias que permitirían distinguirlo de una entrega normal. Si advertimos algo extraño, lo marcamos como una alerta para que pueda revisarlo.

Una marca de alerta no es necesariamente un indicador de problemas. Sin embargo, recomendamos que preste atención y la revise.

Director-Co/Directores

Dra. Elizabeth Monreal Escalante

Dr. Carlos Eliud Angulo Valadez

Estudiante

María Alejandra Cisneros Geraldo

Personal técnico de asesoría en el análisis

Lic. Ana María Talamantes

Conformación de Comités

Comité Tutorial

Dra. Elizabeth Monreal Escalante
Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, S. C.
Co-Directora de Tesis

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

Dr. Ramón Gaxiola Robles
Instituto Mexicano del Seguro Social (IMSS)
Co-Tutor de Tesis

Comité Revisor de Tesis

Dr. Carlos Eliud Angulo Valadez
Dra. Elizabeth Monreal Escalante
Dr. Ramón Gaxiola Robles

Jurado de Examen

Dr. Carlos Eliud Angulo Valadez
Dra. Elizabeth Monreal Escalante
Dr. Ramón Gaxiola Robles

Suplente

Dra. Martha Candelaria Reyes Becerril

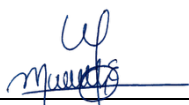
Resumen

La administración de vacunas orales es una vía natural y práctica. Sin embargo, la concentración necesaria de antígeno es generalmente más alta que en las vacunas inyectables. Ante esta problemática se han desarrollado adyuvantes para potenciar una respuesta inmune, e incluso existen autorizados por la FDA. Para ello, diversas plataformas se han utilizado para la producción de vacunas, en las que destacan las microalgas. El objetivo de esta investigación fue determinar el efecto adyuvante de GIV-AC1 y GIV-AC2 expresados en *Schizochytrium* sp. como plataforma de producción y vehículo de entrega de vacunas orales en el modelo de ratón Balb/c. Los adyuvantes GIV-AC1 y GIV-AC2 se expresaron en la microalga *Schizochytrium* sp. mediante transformación mediada por *Agrobacterium tumefaciens*. Las proteínas se identificaron a las 48 horas a través de Western Blot. Los niveles de producción de los adyuvantes fueron determinados por ELISA indirecta, donde se obtuvieron 591.4 µg/g y 215.35 µg/g de biomasa seca liofilizada para GIV-AC1 y GIV-AC2, respectivamente. La administración oral de células enteras de *Schizochytrium* sp. que expresaron ambas proteínas (equivalentes a 10 µg de GIV-AC1 y GIV-AC2 por dosis más 100 µg de albúmina de suero bovino como antígeno modelo) indujeron la producción de anticuerpos IgA específicos en la mucosa intestinal de ratones Balb/c. De esta manera, se potencia una respuesta inmune, procurando prevenir enfermedades de origen zoonótico. Bajo el enfoque de Una Salud, también se contribuye al bienestar animal previniendo sacrificio masivo y reduciendo pérdidas económicas. Además, la producción de adyuvantes recombinantes es sostenible al utilizar organismos (microalgas), siendo bioprocesos de bajo impacto ecológico. En conclusión, los adyuvantes se expresaron en *Schizochytrium* sp. de forma funcional en niveles suficientes, y su administración vía oral en ratones Balb/c potenció una respuesta inmunogénica mediante la producción de anticuerpos IgA. Estos resultados indican perspectivas prometedoras para su uso como potenciadores de la respuesta inmune de mucosas en una vacuna oral, y con ello, contribuir a la prevención, detección y tratamiento, que afectan la salud humana, animal y del medio ambiente (Una Salud).

Palabras clave: Vacuna de subunidades, proteínas recombinantes, antígenos, microalgas, inmunoestimulante.

ORCID: <https://orcid.org/0009-0004-6068-2020>

Vo. Bo. Co-Directores de Tesis



Dra. Elizabeth Monreal Escalante



Dr. Carlos Eliud Angulo Valadez

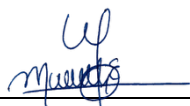
Summary

Oral vaccine administration is a natural and practical route. However, the required concentration of antigen is generally higher than in injectable vaccines. In response to this problem, recombinant adjuvants have been developed to enhance an immune response, and there are even those authorized by the FDA. For this purpose, several platforms have been used for vaccine production, among which microalgae stand out. The objective of this research is to determine the adjuvant effect of GIV-AC1 and GIV-AC2 expressed in *Schizochytrium* sp. as a production platform and delivery vehicle for oral vaccines in the Balb/c mouse model. The adjuvants GIV-AC1 and GIV-AC2 were expressed in the microalgae *Schizochytrium* sp. by transformation mediated by *Agrobacterium tumefaciens*. Proteins were identified within 48 hours via Western blot. Production levels of adjuvants were determined by indirect ELISA, where 591.4 µg/g and 215.35 µg/g of lyophilized dry biomass were obtained for GIV-AC1 and GIV-AC2, respectively. Oral administration of whole cells of *Schizochytrium* sp. expressing both proteins (equivalent to 10 µg GIV-AC1 and GIV-AC2 per dose plus 100 µg bovine serum albumin as model antigen) induced the production of specific IgA antibodies in the intestinal mucosa of Balb/c mice. Thus, an immune response is enhanced, preventing diseases of zoonotic origin. Under the One Health approach, it also contributes to animal welfare by preventing mass slaughter and reducing economic losses. In addition, the production of recombinant adjuvants is sustainable by using organisms (microalgae), being bioprocesses with low ecological impact. In conclusion, adjuvants were expressed in *Schizochytrium* sp. functionally at sufficient levels, and its oral administration in Balb/c mice enhanced an immunogenic response by the production of IgA antibodies. These results indicate promising prospects for their use as mucosal immune response enhancers in an oral vaccine, and thus contribute to prevention, detection and treatment, which affect human, animal and environmental health (One Health).

Keywords: subunit vaccine, recombinant proteins, antigens, microalgae, immunostimulant.

ORCID: <https://orcid.org/0009-0004-6068-2020>

Vo. Bo. Co-Directores de Tesis



Dra. Elizabeth Monreal Escalante



Dr. Carlos Eliud Angulo Valadez

Dedicatoria

*Para mis padres, hermana y abuelos.
Gracias por el apoyo incondicional, confianza y
tiempo para ayudarme a alcanzar mis sueños.
Siempre serán la motivación en mi vida.*

Agradecimientos

A la Secretaría de Ciencia, Humanidades, Tecnología e Innovación (SECIHTI) por la beca otorgada (No. 1319932).

Al Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, S.C., y a la Dirección de Estudios de Posgrado y Formación de Recursos Humanos, por ser la institución receptora de mis estudios de maestría, y por las instalaciones prestadas para el desarrollo del proyecto.

A mis Co-Directores de tesis, Dr. Carlos Eliud Angulo Valadez, Dra. Elizabeth Monreal Escalante y Dr. Ramón Gaxiola Robles, por guiarme, compartir su conocimiento y brindarme su apoyo académico y obtener los resultados esperados. Gracias por sus correcciones, asesoría y paciencia que me ayudaron a alcanzar este gran logro, sin su mentoría esto no sería posible. Muchas gracias.

Agradecemos al Dr. Sergio Rosales Mendoza de la Universidad Autónoma de San Luis Potosí por la donación del vector pAlgevir patentado (No. 412772) en co-titularidad con el CIBNOR para su uso académico. Reconocemos a la Universidad Autónoma de San Luis Potosí como co-titular del vector pAlgevir patentado (No. 412772) en colaboración con el CIBNOR para su uso académico.

Al técnico Guadalupe Sánchez Castro por su apoyo técnico en el Bioterio.

Al técnico Dr. Martín Ramírez Orozco por la accesibilidad para el uso de la liofilizadora.

A la M.C. Delia Irene Rojas Posadas, Técnico-Titular C, del Laboratorio de Genética Molecular, por las facilidades otorgadas en el uso de equipos.

Al grupo de Inmunología y Vacunología del CIBNOR (GIV) y al Laboratorio Nacional de Vacunas Veterinarias y Servicios de Diagnóstico (LNC-GVD) por el apoyo dentro y fuera del laboratorio.

A la Dra. Martha Reyes Becerril, responsable Técnico del Laboratorio de Inmunología y Vacunología, por brindarme experiencias científicas para compartir el conocimiento a niños y niñas de escuelas, y centros de estudios. Son recuerdos que me llevo en mi corazón. Gracias.

A Víctor, Kevyn, Jahir y Regina por ser mis acompañantes en este camino lleno de retos. Gracias por los momentos de risas, consejos y compañía.

A los que estuvieron al inicio y final de este viaje.

A Dios, por bendecirme con salud, perseverancia y darme fortaleza en momentos de dificultad.

Contenido

Resumen	i
Summary	ii
Dedicatoria.....	iii
Agradecimientos.....	iv
Contenido.....	vi
Lista de figuras.....	viii
Lista de tablas.....	ix
Abreviaturas.....	x
1. INTRODUCCIÓN	1
2. ANTECEDENTES	3
2.1 Adyuvantes.....	3
2.1.1 Historia de los adyuvantes	3
2.1.2 Clasificación de adyuvantes	4
2.1.2.1 Adyuvantes de vacunas a base de sal de aluminio	4
2.1.2.2 Adyuvantes de emulsión	4
2.1.2.2.1 MF59.....	4
2.1.2.2.2 AS03.....	5
2.1.2.3 Adyuvantes basados en agonistas de TLR.....	5
2.1.2.3.1 CpG-ODN	5
2.1.2.3.2 AS04.....	6
2.1.2.3.3 AS01B	6
2.1.2.4 Adyuvantes en investigación clínica.....	6
2.1.3 Plataformas de producción de adyuvantes recombinantes	8
2.1.3.1 Bacterias.....	8
2.1.3.2 Plantas.....	8
2.1.3.3 Algas	9
2.1.3.4 Células de insectos	9
2.1.3.5 Células de mamíferos.....	9
3. JUSTIFICACIÓN	11
4. HIPÓTESIS.....	12
5. OBJETIVOS	13
5.1 Objetivo general.....	13
5.2 Objetivos particulares	13
6. MATERIAL Y MÉTODOS	14
6.1 Extracción de ADN plasmídico de GIV-AC1::V1 y GIV-AC2::V1 a partir de cultivo de <i>A. tumefaciens</i>	14
6.2 Confirmación por PCR de los genes GIV:AC1 y GIV:AC2 en los vectores de expresión a partir del cultivo de <i>A. tumefaciens</i>	15
6.3 Transformación de cultivos de <i>Schizochytrium</i> sp. con GIV-AC1 y GIV-AC2.....	15
6.4 Cuantificación de proteínas totales extraídas de las muestras de <i>Schizochytrium</i> sp.	16

6.5 Detección y cuantificación de las proteínas recombinantes GIV-AC1 y GIV-AC2 de <i>Schizochytrium</i> sp.	16
6.6 Evaluación de inmunogenicidad	18
6.7 Análisis estadístico	19
6.8 Adyuvantes recombinantes bajo el enfoque de Una Salud	19
7. RESULTADOS.....	20
7.1 Extracción de ADN plasmídico de GIV-AC1::V1 y GIV-AC2::V1 a partir de cultivo de <i>A. tumefaciens</i>	20
7.2 Confirmación por PCR de los genes GIV:AC1 y GIV:AC2 en los vectores de expresión a partir del cultivo de <i>A. tumefaciens</i>	21
7.3 Transformación de cultivos de <i>Schizochytrium</i> sp. con GIV-AC1 y GIV-AC2.....	21
7.4 Cuantificación de proteínas totales extraídas de las muestras de <i>Schizochytrium</i> sp.	22
7.5 Detección y cuantificación de las proteínas recombinantes GIV-AC1 y GIV-AC2 de <i>Schizochytrium</i> sp.	23
7.6 Evaluación de inmunogenicidad	25
7.7 Adyuvantes recombinantes bajo el enfoque de Una Salud	27
7.7.1 Dengue	27
7.7.1.1 Salud humana.....	27
7.7.1.2 Salud animal	28
7.7.1.3 Salud ambiental.....	28
7.7.1.4 Prevención.....	28
8. DISCUSIÓN.....	29
8.1 Transformación transitoria de <i>Schizochytrium</i> sp.....	29
8.2 Detección y cuantificación de proteínas recombinantes GIV-AC1 y GIV-AC2 de <i>Schizochytrium</i> sp.	29
8.3 Evaluación de inmunogenicidad	30
8.4 Adyuvantes y Una Salud	31
9. CONCLUSIONES.....	33
10. LITERATURA CITADA	34
11. ANEXOS	41
Anexo A. Ensayo de estabilidad térmica	41
Anexo B. Cuantificación de citocinas.....	43
Anexo C. Actividades de divulgación.....	45

Lista de figuras

Figura 1. Esquema de inmunización de ratones Balb/c.....	18
Figura 2. Colonias de A) <i>A. tumefaciens</i> con la construcción genética de GIV-AC1 y B) <i>A. tumefaciens</i> con GIV-AC2.....	20
Figura 3. Electroforesis en gel de agarosa al 1.2% para ADN plasmídico extraído de <i>A. tumefaciens</i>	20
Figura 4. Electroforesis en gel de agarosa al 1.2% para ADN plasmídico extraído de <i>A. tumefaciens</i>	21
Figura 5. Curva estándar mediante el método de Bradford.....	22
Figura 6. Electroforesis SDS-PAGE de los extractos proteicos obtenidos de las líneas WT, y transformadas de <i>Schizochytrium</i> sp. con GIV-AC1 y GIV-AC2.....	23
Figura 7. Detección de la inmunorreactividad de GIV-AC1 y GIV-AC2 por <i>Schizochytrium</i> sp. determinada por análisis Western blot con anticuerpos anti-AC1 y anti-AC2.	24
Figura 8. Producción de las proteínas recombinantes GIV-AC1 y GIV-AC2 en <i>Schizochytrium</i> sp. por ELISA cuantitativo	24
Figura 9. Determinación de anticuerpos IgA anti-BSA en heces de ratones inmunizados.....	25
Figura 10. Determinación de anticuerpos IgG anti-BSA de suero sanguíneo de ratones inmunizados	26
Figura 11. Respuesta de anticuerpos en ratones inmunizados con <i>Schizochytrium</i> sp.-GIV:AC1 y GIV:AC2 posterior a la cuarta inmunización.	26
Figura 12. Análisis de la termoestabilidad del liofilizado de <i>Schizochytrium</i> sp.-GIV:AC1 y GIV-AC2 a los tres meses	42
Figura 13. Análisis de la termoestabilidad del liofilizado de <i>Schizochytrium</i> sp.-GIV:AC1 y -AC2 a los seis meses.	42
Figura 14. Niveles séricos de citocinas en ratones inmunizados. Los niveles séricos de A) IL-2, B) IL-4 y C) IL-10 se determinaron por ELISA.	44

Lista de tablas

Tabla 1. Grupos de ratones Balb/c (n=6) para la evaluación de inmunogenicidad. Vía de administración oral.	18
Tabla 2. Absorbancias de curva estándar mediante el método de Bradford para la cuantificación de proteínas totales, expresado en mg/mL.	22
Tabla 3. Cuantificación de proteínas totales de las líneas GIV-AC1, GIV-AC2, y WT mediante el método de Bradford, expresado en µg/mL.....	23

Abreviaturas

ASWm	Medio Agua de Mar Sintética Modificada
BS	Biomasa seca
BSA	Proteína Albúmina Sérica Bovina
CPA	Células presentadoras de antígenos
CTB	Subunidad B de la toxina del cólera
DHA	ácido docosahexaenoico
EPA	ácido eicosapentaenoico
GIV-AC1	Adyuvante recombinante a evaluar 1, producido en la microalga
GIV-AC2	Adyuvante recombinante a evaluar 2, producido en la microalga
kDa	Kilo Dalton, medida del peso molecular de proteínas
LTB	Subunidad B de la enterotoxina termolábil de <i>Escherichia coli</i>
PAMP	Patrones moleculares asociados a patógenos
PMSF	Inhibidor de proteasas (phenylmethylsulfonyl Fluoride)
PS	Peso seco
PT	Proteína Total
PTS	Proteína Total Soluble
ToxA	Toxina PirA de <i>Vibrio parahaemolyticus</i> , monómero A
WT	Cepa silvestre, sin modificación genética (<i>wild type</i>)

1. INTRODUCCIÓN

Las vacunas son el avance más significativo en salud pública, ya que previenen la morbilidad y mortalidad de millones de personas anualmente (Huleatt *et al.*, 2007). Su desarrollo se centra en organismos completos, ya sean vacunas vivas, atenuadas, inactivadas, o bien, de subunidades (Karch y Burkhard, 2016). Las vacunas atenuadas utilizan un microorganismo debilitado para no causar una infección grave. Las vacunas inactivadas consisten en microorganismos incapaces de replicarse o reproducirse (Raghavan *et al.*, 2002). Por su parte, las vacunas de subunidades se basan en uno o varios antígenos de un agente infeccioso que se requieren para inducir una respuesta inmune (Bohui *et al.*, 2018). Las vacunas pueden ser administradas oral y parenteralmente. La vía oral es una manera natural y práctica para la administración masiva de vacunas (Vela *et al.*, 2017). Sin embargo, la administración oral presenta desafíos. En primer lugar, su eficacia se ve comprometida con el entorno fisiológico e inmunológico del tracto gastrointestinal, está expuesta al ambiente ácido del estómago, enzimas proteolíticas, sales biliares, entre otros factores (Bohui *et al.*, 2018). Además, en las vacunas orales la concentración necesaria de antígeno para producir una respuesta inmune es generalmente más alta que en las vacunas inyectables (Vela *et al.*, 2017). Estos retos motivan la investigación para ofrecer alternativas de solución para resolver estas problemáticas.

Los adyuvantes pueden potenciar las respuestas inmunes innata y adaptativa (Firdaus *et al.*, 2022). Hasta ahora, la FDA y otras agencias reguladoras han aprobado muchos adyuvantes para vacunas parenterales humanas, pero ninguno para vacunas orales. Este escenario ha perseguido una demanda de nuevos adyuvantes orales con mayor potencia (Ou *et al.*, 2023). En este ámbito, se han estudiado adyuvantes recombinantes como FGK1, Ov-ASP-1, la toxina subunidad B del cólera (CTB) y la subunidad B de la enterotoxina termolábil (LTB) de *Escherichia coli* producidas en *E. coli* (He *et al.*, 2009; Segura *et al.*, 2013; Márquez *et al.*, 2018; Ortega *et al.*, 2018). Sin embargo, los adyuvantes recombinantes han sido habitualmente diseñados como quimeras con antígenos y producidos en plataformas basadas en bacterias (Yin *et al.*, 2024), levaduras (Bajoria *et al.*, 2022), células de mamífero (Phatarphekar *et al.*, 2022), células de insecto (Honda *et al.*, 2023), plantas (Seid *et al.*, 2015) y microalgas (Ramos *et al.*, 2024). Las microalgas se consideran una alternativa para la producción biofarmacéutica porque requieren menos espacio de producción, son escalables, rentables y no tienen riesgo de contaminación por patógenos.

animales (Zahmanova *et al.*, 2022). Sin embargo, nunca se han producido adyuvantes recombinantes en microalgas.

Schizochytrium sp. es una opción atractiva de microalga porque prolifera en condiciones heterótrofas en un medio de bajo coste, produciendo compuestos naturales con propiedades adyuvantes (Ramos Vega *et al.*, 2018). *Schizochytrium* sp. es unicelular, esférico con un rango entre 10 y 30 μm y se divide por bipartición para formar zoosporangios. Además, produce grandes colonias de color amarillo pálido debido a la producción de β -caroteno (Munish *et al.*, 2023). Esta microalga tiene componentes clasificados como GRAS (Generally Recognized As Safe) y desarrollados industrialmente para el consumo humano, lo que permite múltiples certificados de la Food and Drugs Administration (FDA), especialmente para el uso de aceite rico en ácido docosahexaenoico (DHA) y ácido eicosapentaenoico (EPA) (Castro-Cosío *et al.*, 2023). *Schizochytrium* sp. se ha utilizado para producir vacunas recombinantes de administración oral, entre las que se encuentran las de las enfermedades Ébola, Vibriosis, Alzheimer y Chagas (Bañuelos-Hernández *et al.*, 2017; Ramos Vega *et al.*, 2024; Trujillo *et al.*, 2024). Por lo tanto, el presente estudio tuvo como objetivo determinar el efecto adyuvante de GIV-AC1 y GIV-AC2 expresados en *Schizochytrium* sp. como plataforma de producción y vehículo de administración de vacunas orales en el modelo de ratón Balb/c.

2. ANTECEDENTES

2.1 Adyuvantes

Los adyuvantes son componentes (compuestos, moléculas) de las vacunas que potencian la respuesta inmune del cuerpo (Pulendran *et al.*, 2021). Los adyuvantes no suelen ser necesarios para las vacunas vivas atenuadas, porque estas se replican activamente y potencian la respuesta inmunitaria. Sin embargo, se utilizan con frecuencia para las vacunas de subunidades, ya que contienen menos antígenos y carecen de algunos componentes presentes en los patógenos completos que desencadenan la respuesta inmunitaria innata, por lo que es menos probable que se logre una efectiva respuesta adaptativa (Pasquale *et al.*, 2011).

Sin embargo, se ha demostrado que algunos materiales de administración también pueden actuar como adyuvantes al mejorar las respuestas inmunitarias adaptativas al imitar el tamaño o estructura espacial de los patógenos naturales, con ello, se facilita la captación y presentación de antígenos por las células presentadoras de antígenos (CPA) (Bachmann y Jennings, 2010). Los adyuvantes guían y mejoran respuestas inmunitarias adaptativas específicas al dirigirse a las células inmunitarias innatas y activar las vías de señalización de los receptores de reconocimiento de patrones (PRR) (Coffman *et al.*, 2010).

Los antígenos dirigen la especificidad de la respuesta inmunitaria adaptativa hacia un patógeno en particular, mientras que los adyuvantes estimulan el sistema inmunitario innato a través de receptores de reconocimiento de patrones (PRR), que reconocen patrones moleculares asociados a patógenos (PAMP) (Medzhitov y Janeway, 1997).

2.1.1 Historia de los adyuvantes

Alexander Glenny en 1926 descubrió que al mezclar sales de aluminio con antígenos e inyectarlas a conejillos de indias inducía más anticuerpos que administrar los antígenos solos (Glenny *et al.*, 1926).

Freund y colaboradores en la década de 1940 desarrollaron emulsiones de agua en aceite, lo que generó la creación de los adyuvantes de Freund. Sin embargo, este no es autorizado para su uso

en vacunas humanas debido a su toxicidad para los humanos (Freund y McDermott, 1942; Biehl y Vilter, 1982).

Hasta 1997 se autorizó en Europa la emulsión de aceite en agua MF59 como adyuvante en vacunas contra la gripe. 20 años después, se autorizaron cuatro adyuvantes en su uso en vacunas: AS01 (liposoma con MPL + QS-21), AS04 (3-deacil-MPL), AS03 (vitamina E/Surfactante polisorbato 80/Escualeno) y CpG ODN 1018 (Iwasaki y Omer, 2020). También, durante ese tiempo, se evaluaron otras clases diferentes de compuestos como adyuvantes, como lo son las sales minerales, productos microbianos, emulsiones, saponinas, polímeros, nanopartículas y liposomas (O'Hagan y Valiante, 2003).

2.1.2 Clasificación de adyuvantes

2.1.2.1 Adyuvantes de vacunas a base de sal de aluminio

Actualmente hay 25 vacunas humanas aprobadas por la FDA que contienen aluminio, por ejemplo, contra la difteria, el tétanos, la hepatitis B, etc. (Shi *et al.*, 2019). Los adyuvantes a base de sal de aluminio en las vacunas aprobadas por la FDA incluyen hidróxido de aluminio, fosfato de aluminio y sulfato de hidroxifosfato de aluminio amorfo. Los adyuvantes a base de sales de aluminio estimulan las respuestas inmunes Th2, mientras que la respuesta Th1 es mínima y en ocasiones nula (Hogenesch, 2012).

2.1.2.2 Adyuvantes de emulsión

2.1.2.2.1 MF59

MF59 está compuesto de escualeno, polisorbato 80, trioleato de sorbitán y citrato trisódico deshidratado. La fase oleosa utilizada en la formulación es escualeno, que es biodegradable y biocompatible (Noel *et al.*, 1986).

Este adyuvante, se utiliza principalmente en vacunas contra la influenza, ya que la adición de MF59 podría promover significativamente la producción de anticuerpos contra el antígeno y el refuerzo de las respuestas inmunitarias Th1 y Th2 (Fang y Hora, 2000; Galli *et al.*, 2009).

Además, mejora la captación de antígenos en el sitio de inyección y los principales tipos de células diana podrían ser monocitos, macrófagos y células dendríticas (Seubert *et al.*, 2008). Estas células activadas podrían secretar un complejo de quimiocinas para reclutar más células inmunes al sitio de inyección, lo que ayuda a formar un entorno inmunocompetente para un mejor transporte de antígenos a los ganglios linfáticos de drenaje (O'Hagan *et al.*, 2012). Una variedad de CPA con diferentes formas de procesamiento de antígenos conducirá a una respuesta inmune más competente, incluyendo el aumento de la absorción de antígenos y la acumulación de antígenos en los ganglios linfáticos de drenaje que contribuyen al transporte facilitado de las CPA (Cioncada *et al.*, 2017).

2.1.2.2.2 AS03

AS03 es otro adyuvante a base de emulsión de aceite en agua. La vacuna monovalente contra la influenza A (H5N1) con adyuvante AS03 fue autorizada por la FDA en 2013 (GlaxoSmithKline, 2018).

El AS03 está compuesto por el surfactante polisorbato 80 y dos aceites biodegradables, escualeno y DL- α -tocoferol (Garçon *et al.*, 2012). Este último componente lo distingue de MF59.

Un estudio demostró que el AS03 podría inducir la producción de citocinas y quimiocinas en los músculos y los ganglios linfáticos de drenaje (dGL), lo que provoca la migración de monocitos, células dendríticas y granulocitos a los dGL. Además, se descubrió que el AS03 puede estimular la respuesta inmunitaria específica de las células CD4⁺T, lo que podría explicar la producción persistente de anticuerpos neutralizantes y la mayor frecuencia de células B de memoria (Moris, 2011).

2.1.2.3 Adyuvantes basados en agonistas de TLR

2.1.2.3.1 CpG-ODN

Los oligodesoxinucleótidos de fosfoguanosina (CpG ODN) son moléculas de ADN sintéticas, que son ODN con estructura fosfotiotiato, que contienen motivos CpG no metilados (Scheiermann y Klinman, 2014). La característica única de CpG ODN es que puede utilizar como adyuvante para

la vacunación por vía intramuscular, subcutánea, oral e intranasal (Klinman, 2004; Krieg, 2002). Este adyuvante en vacunas eficientes, puede promover el efecto inmunoestimulador de los antígenos, activar las CPA y acelerar las respuestas inmunes (Bode *et al.*, 2011).

2.1.2.3.2 AS04

AS04 se prepara a partir de 3'-O-monofosforil lípido A (MPL) y sales de aluminio. MPL es un lipopolisacárido desintoxicado (LPS) que se ha informado que es un agonista específico de TLR4 (Garçon *et al.*, 2007). Se ha demostrado que AS04, en comparación con un adyuvante que contenía solo sal de aluminio, indujo una respuesta inmune eficaz a largo plazo y sostenible en las vacunas contra el VPH (Glannini *et al.*, 2006).

2.1.2.3.3 AS01B

AS01B es un adyuvante desarrollado por GlaxoSmithKline (GSK) Biologicals en la vacuna recombinante contra el herpes zóster Shingrix, que fue aprobada por la FDA en 2017 (Department of the Army). AS01B está formulado en liposoma con MPL y QS-21. MPL es un estimulador eficaz de las respuestas de anticuerpos y células T (Didierlaurent *et al.*, 2017). Mientras que QS-21 promueve la producción de linfocitos T citotóxicos e induce citocinas Th1, como la interleucina-2 (IL-2), interferón gamma (IFN- α) y anticuerpos IgG (Zhu y Tuo, 2016).

2.1.2.4 Adyuvantes en investigación clínica

Actualmente, las vacunas humanas tienen limitados tipos de adyuvantes, esto debido a la limitada comprensión de los mecanismos de acción, y a los limitados resultados de inmunidad adecuada y baja toxicidad (Gupta y Siber, 1995). Hasta el momento, diversos adyuvantes de vacunas se encuentra en diferentes etapas de ensayos clínicos.

- **A base de lípidos:** Se ha demostrado que la estructura vesicular de este tipo de adyuvantes es extremadamente adecuada para encapsular diversos materiales biológicamente activos, como ADN y ácidos grasos (Allison y Gregoriadis, 1974). GLA-SE y GLA-AF son análogos del lípido A y son particularmente eficaces para mejorar la protección contra H5N1 (Influenza aviar H5) con baja toxicidad y efectos secundarios limitados (Clegg *et al.*, 2014; Pillet *et al.*, 2018).

- **Emulsiones:** Montanide ISA 51 y Montanide ISA 720 son dos tipos de adyuvantes de emulsión de agua en aceite que se encuentran bajo investigaciones clínicas. Montanide ISA 51 se ha autorizado en una vacuna teraoéutica contra el cáncer de pulmón en Cuba (Van Doorn *et al.*, 2016), mientras que Montanide ISA 720 se prueba en la vacuna contra la malaria en un ensayo clínico de fase 2 (Ascareteil *et al.*, 2015). Ambos han demostrado ser capaces de promover una respuesta inmune eficaz, y una respuesta mejorada de linfocitos T citotóxicos específicos (Yamshchikov *et al.*, 2001).
- **Saponina:** Matrix MTM es un adyuvante de última generación basado en saponina (Podolak *et al.*, 2010). Se ha aprobado en una vacuna respiratoria combinada en un ensayo preclínico (Reimer *et al.*, 2012). Se demostró que este adyuvante podría aumentar el número de células en los ganglios linfáticos de drenaje y bazo, así como activar linfocitos, células dendríticas y granulocitos en los ganglios linfáticos (Reimer *et al.*, 2012).
- **Nucleótido:** El ARN bicatenario podría generar una respuesta inmune mediante la secreción de citocinas, como IFN- α e IFN- γ (Jin *et al.*, 2010). Ensayos recientes han demostrado que el ADN de IL-12 podría aumentar la respuesta inmune y demostró ser tolerado (Kalams *et al.*, 2012). Por ejemplo, el adyuvante Pika promueve la producción de interferón, IL-2 e IL-12, produciendo una inmunidad humoral (Shi *et al.*, 2019).
- **Citocinas:** Diversos estudios han demostrado que los adyuvantes moleculares podrían estimular una respuesta inmune eficaz, especialmente en vacunas de subunidades (Kassas y Kirkwood). Además, se ha evaluado el uso del factor estimulante de colonias de granulocitos y macrófagos (GM-CSF) en vacunas contra la hepatitis B y el VIH. Se cree que el efecto adyuvante está relacionado con su capacidad para estimular la diferenciación y proliferación de macrófagos y para activar las células presentadoras de antígenos (Disis *et al.*, 1996). Conjuntamente, las IL-12 y -15 se utilizan como adyuvantes en la vacuna contra el VIH que se encuentra en un ensayo de fase 1. Se demostró que estas citocinas tienen la capacidad de estimular la proliferación de células NK como células T (Baca *et al.*, 1999; Di Sabatino *et al.*, 2011).

2.1.3 Plataformas de producción de adyuvantes recombinantes

2.1.3.1 Bacterias

El sistema de expresión de proteínas basados en bacterias permite una producción rápida con bajo costo y facilidad de escalamiento, convirtiéndolo en un sistema versátil y eficiente para producir vacunas recombinantes (Ahn *et al.*, 2023). Hasta el momento, todas las vacunas aprobadas han sido producidas en *Escherichia coli*. Esta bacteria es el huésped más accesible para la producción de vacunas recombinantes debido a su rápida velocidad de crecimiento.

Algunos ejemplos de vacunas aprobadas para su uso en humanos son:

- Hecolin (aprobada en 2012) contra el virus de hepatitis E (vacuna basada en la proteína ORF2), formulación: partículas similares a virus (VLPs), una vacuna que sólo se utiliza en China.
- Trumenba (aprobada en 2014) contra *Neisseria meningitidis* serogrupo B (vacuna basada en la proteína fHbp).

En medicina veterinaria existen ejemplos como:

- Recombitek Lyme es una vacuna canina para la prevención de la enfermedad causada por *Borrelia burgdorferi* (vacuna basada en la proteína OspA) en adultos y cachorros.
- Nobivac LeuFel (2009) es una vacuna veterinaria que se utiliza en gatos para protegerlos contra el virus de leucemia felina. La vacuna es de subunidad porque contiene el antígeno purificado p45 de la envoltura del virus de la leucemia felina (FeLV) formulada con adyuvantes (hidróxido de aluminio al 3% y extracto purificado de Quillaja saponaria).

2.1.3.2 Plantas

Las plantas tienen la capacidad para producir biomasa a gran escala utilizando únicamente los insumos de luz, agua, suelo y nutrientes (Kang *et al.*, 2016). Diversas proteínas recombinantes se pueden producir utilizando sistemas vegetales in vivo o in vitro. En los sistemas in vitro, las células y órganos vegetales se cultivan en condiciones asépticas. Dichas células son desdiferenciadas y se pueden cultivar en forma de callo (Evans *et al.*, 2003). Un ejemplo de producto in vitro son las proteínas recombinantes candidatas a vacunas, como el antígeno de superficie del virus de la

hepatitis B producido en *Nicotiana tabacum*, el epítipo de la proteína viral 1 (VP1) del virus de la fiebre aftosa (FMDV) expresado en *Nicotiana benthamiana* y la enzima glucocerebrosidasa recombinante producida en *Daucus carota* (Smith *et al.*, 2002; Zhang *et al.*, 2010; Shaaltiel *et al.*, 2007).

2.1.3.3 Algas

Las algas se consideran una plataforma emergente para la producción de vacunas recombinantes debido al bajo costo de producción, altas tasas de crecimiento, rápida transformación y la capacidad de realizar modificaciones postraduccionales (Hernández *et al.*, 2020; Rosales *et al.*, 2016). Ejemplos: la microalga marina *Schizochytrium* sp. ha sido transformada con éxito para producir una vacuna candidata contra el virus del Zika (proteína ZK), la cual su administración oral generó anticuerpos específicos IgA e IgG en ratones (Márquez *et al.*, 2018).

2.1.3.4 Células de insectos

El sistema de expresión de células de insecto-baculovirus (BVES) es una plataforma que tiene la capacidad de crecer líneas celulares de insectos en suspensión en medio libre de suero y alcanzar altas densidades. Estas características se consideran ventajas como un sistema para la producción de antígenos (van Oers *et al.*, 2015). Algunos ejemplos de vacunas aprobadas para su uso en humanos son Cervarix (aprobada en 2009) contra el virus del papiloma (antígeno: proteína L1 de la cápside) y Nuvaxovid (aprobada en 2021) contra SARS-CoV-2 (antígeno: proteína Spike S) (de Pinho *et al.*, 2022). En medicina veterinaria, algunas vacunas porcinas son: Reprocyc ParvoFLEX (aprobada en 2019) que contiene el antígeno PPV 27a VP2 formulada con adyuvante (Carbómero) contra parvovirus porcino (PPV); y Porcilis Pesti (aprobada en 2000) con el antígeno E2 formulada con adyuvante (Parafina líquida) contra Virus de la peste porcina clásica.

2.1.3.5 Células de mamíferos

Los cultivos de células de mamíferos proporcionan tiempos de producción cortos y controlados, utilizando biorreactores de sistema cerrado. Diversas líneas celulares son fábricas eficientes para la producción de proteínas recombinantes, capaces de realizar modificaciones postraduccionales complejas y precisas. Entre las líneas celulares más utilizadas se encuentra una línea de ovario de hámster chino (CHO) que se ha usado para producir una vacuna intranasal de subunidad basada

en una proteína de pico D614G recombinante contra la COVID-19. Otra línea es la de riñón embrionario humano 293 (HEK293) en la que se han producido una vacuna candidata basada en partículas similares al virus (VLP) contra el virus del Ébola (EBOV), expresando VP40 y la glicoproteína de la envoltura del virus (Van der Ley et al., 2021; Heffner et al., 2021; Isabelle y Amine, 2003; Warfield et al., 2003).

3. JUSTIFICACIÓN

La globalización, explosión demográfica y la expansión de la población humana llevan implícitos una mayor circulación de personas, alimentos, animales y subproductos, y con ello, la aparición de nuevos patógenos y enfermedades. Según la Organización Mundial de la Salud, el 60% de todas las enfermedades infecciosas humanas que se registran en el mundo tiene un origen zoonótico, y cerca del 75% se transmite entre especies. Desde 2023, se han registrado más de 15 millones de muertes humanas y US\$4 billones en pérdidas económicas debido a enfermedades y pandemias. En contraste, el Banco Mundial en 2022 calculó que el beneficio previsto de “Una Salud” a nivel mundial sería de al menos US\$37 mil millones al año. Es por ello la importancia de contribuir a este plan de acción con el objetivo de entender y mantener el equilibrio de la salud animal-humana-ambiental.

Muchas de estas enfermedades potencialmente son prevenibles con vacunas, sin embargo, en países de bajos ingresos no se previenen adecuadamente debido a un uso insuficiente de vacunas existentes, algunas de las causas pueden ser la deficiente distribución y entrega, y el alto costo de la vacuna. En el caso de las vacunas de administración subcutánea o intramuscular presentan varios desafíos, por ejemplo, requieren una “cadena de frío”, lo que lleva consigo cargas económicas y logísticas adicionales. Es por ello, que la inmunización oral con vacunas termoestables es deseable ya que evita dispositivos especializados, costosos y personal capacitado para la administración.

Así mismo, las vacunas orales de subunidades presentan limitaciones como su baja inmunogenicidad, por lo que requieren dosis más altas y una administración con mayor frecuencia en los esquemas de inmunización, o bien, el uso de adyuvantes que permitan mejorar estos retos. Sin embargo, hasta la fecha, pocos adyuvantes han sido aprobados por agencias de regulación de fármacos en el mundo, debido a los efectos secundarios que pueda causar y su grado de toxicidad. Estos desafíos deben incentivar el desarrollo de nuevos compuestos inmunopotenciadores con menos efectos secundarios y que generen una eficiente respuesta inmune.

4. HIPÓTESIS

Si los adyuvantes recombinantes como CTB y LTB potencian la respuesta inmune de vacunas orales, entonces, los adyuvantes GIV-AC1 y GIV-AC2 en una vacuna quimérica serán producidos en *Schizochytrium* sp. de forma funcional en niveles suficientes (300 µg/g de peso seco) y su administración oral en ratones Balb/c potenciarán la respuesta inmune Th1/Th2 mediante la producción de anticuerpos específicos IgG en suero e IgA en mucosa intestinal.

5. OBJETIVOS

5.1 Objetivo general

Determinar el efecto adyuvante de GIV-AC1 y GIV-AC2 expresados en *Schizochytrium* sp. como plataforma de producción y vehículo de entrega de vacunas orales en el modelo de ratón Balb/c.

5.2 Objetivos particulares

1. Identificar y cuantificar los adyuvantes GIV-AC1 y GIV-AC2 producidos en la microalga *Schizochytrium* sp.
2. Analizar la inmunogenicidad del adyuvante GIV-AC1 y GIV-AC2 en una vacuna oral en ratones Balb/c.
3. Describir la relación del impacto de los adyuvantes recombinantes en vacunas orales bajo el enfoque de Una Salud.

6. MATERIAL Y MÉTODOS

Previamente, los adyuvantes fueron diseñados *in silico* (datos sin publicar), y las construcciones genéticas generadas con un antígeno modelo (GIV-AC1::V1 y GIV-AC2::V1), se clonaron en células de *Agrobacterium tumefaciens* (cepa GV3101) por electroporación (dos pulsos de 1.8 V).

6.1 Extracción de ADN plasmídico de GIV-AC1::V1 y GIV-AC2::V1 a partir de cultivo de *A. tumefaciens*

Cultivos de *A. tumefaciens* que contenían los genes se sembraron en placas de medio LB con kanamicina (50 mg/L) y se incubaron a 28 °C por 3 días. Transcurrido el tiempo, las colonias aisladas se seleccionaron y se resembraron en 10 mL de medio líquido LB con kanamicina en tubos cónicos de 1.6 mL y se incubaron a 28 °C y 150 rpm por 3 días.

La extracción de ADN plasmídico de los cultivos de colonias de *A. tumefaciens* con cada gen (GIV-AC1 y GIV-AC2) se llevó a cabo por el método de lisis alcalina (Birboin y Dolly, 1979) con SDS. Del cultivo de células de *A. tumefaciens* se concentraron 8 ml a 11000 rpm por 2 minutos, se extrajo todo el medio del pellet, y se añadieron 150 µL de la solución BDI (50 mM de glucosa: 25 mM de Tris HCl pH 8.0: 10 mM de EDTA pH 8.0) con 40 µL de RNAasa (5 mg/mL) y se homogeneizaron hasta disolver el pellet de células; se agregaron 300 µL de la solución BDII (0.2 N NaOH, 1% SDS), se invirtieron suavemente 5 veces y se incubó a temperatura ambiente 5 min. Posteriormente se añadieron 225 µL de la solución BDIII (5M Acetato de potasio, CH₃COOH) se mezclaron por inversión fuerte varias veces y se incubaron a -80 °C por 10 min. Pasado el tiempo, la muestra se centrifugó a 11000 rpm por 10 min y el sobrenadante se traspasó a un tubo con 700 µL de isopropanol frío, se añadió el 10% del volumen de la muestra de acetato de sodio (3M pH 5.2) y se incubó a -80 °C por 30 minutos. Después, los tubos se centrifugaron a 11000 rpm 10 min, se descartó todo el sobrenadante y el pellet se lavó con 500 µL de etanol al 70%, se centrifugó a 11000 rpm por 2 min y se secó a 60 °C. Finalmente, el pellet de ADN se resuspendió en 20 µL de buffer TE 1X (10mM Tris-HCl: 1mM EDTA-Na₂).

Para analizar la integridad de la extracción, se preparó un gel de agarosa al 1.2% con 50 mL de buffer TAE 1X (0.4 M de TRISMA base: 1M ácido acético: 0.001 M EDTA) y 5 µL de colorante SYBR safe. Se cargaron 3 µL de la muestra de ADN y 0.5 µL del marcador 1kb DNA Ladder N3232S con

2 µL de buffer de carga y se corrió a 85 V durante 30 min. El revelado de bandas se realizó por medio de un fotodocumentador Gel Doc EZ Gel Documentation System de Biorad.

6.2 Confirmación por PCR de los genes GIV:AC1 y GIV:AC2 en los vectores de expresión a partir del cultivo de *A. tumefaciens*

Para confirmar la presencia de los genes GIV:AC1 y GIV:AC2 en los vectores de expresión a partir del cultivo de *A. tumefaciens*, se realizó una PCR punto final utilizando la siguiente mezcla de reacción: 17.65 µL de agua destilada estéril, 2.5 µL de buffer (1942382 invitrogen), 1.5 µL de MgCl₂ (25 mM) (Y02016b Invitrogen), 0.5 µL de dNTPs (10 mM) (100004893 Invitrogen), 0.6 µL de cada primer específico (10 mM), 0.25 µL de Taq polimerasa (100021272 invitrogen) y 2 µL de ADN (100 ng/ µL). El amplicón generado de la reacción de la PCR se reveló con una electroforesis en gel de agarosa al 1.2%. Se cargaron 10 µL de la muestra, 0.5 µL del marcador 100 bp DNA Ladder (N3231S NEB) con 2 µL de buffer de carga y se corrió a 85 V durante 30 minutos. La visualización de las bandas se realizó por medio de un fotodocumentador Gel Doc EZ Gel Documentation System de Biorad.

6.3 Transformación de cultivos de *Schizochytrium* sp. con GIV-AC1 y GIV-AC2

Un preinóculo de cultivo de *Schizochytrium* sp. (colonias naranjas grandes, de borde irregular, lobuladas y rugosas) se sembró en 15 mL de medio YPD líquido (peptona bacteriológica 20 g/L, glucosa 20 g/L y extracto de levadura 10 g/L) durante 48 h, hasta que se observó una densidad óptica (D.O.) de 0,6. Posteriormente, el cultivo se sembró en 1 L de medio líquido ASWm durante 3 días, hasta que se observó una DO de 1. Una vez alcanzada la DO del cultivo, se añadieron 15 mL de la suspensión de *A. tumefaciens* con el inserto GIV-AC1 o GIV-AC2 a una DO de 1.5. También, se le añadió acetosiringona (1 mmol) y se incubó a 25°C en agitación a 150 rpm por 18 h. Después se añadió cefotaxima a 250 mg/mL, se incubó durante 4 h y se realizó la inducción. Posteriormente, se recolectó la biomasa a las 48 h. Para la recolección de la muestra se pesaron previamente tubos cónicos de 50 mL estériles y la muestra se centrifugó a 6500 rpm durante 15 min y se descartó el medio. A continuación, se almacenaron las muestras a -80°C y se liofilizaron para determinar su peso seco.

Posteriormente, 50 mg de biomasa liofilizada de *Schizochytrium* sp. se colocaron en tubos cónicos de 2 mL y se añadió 1 mL de buffer de extracción de proteínas (750 mM Tris HCl pH 8, 15% (p/v) sacarosa, 10 mM β -mercaptoetanol y 1 mM de PMSF). Las muestras se homogeneizaron hasta resuspenderse y se sonicaron en el equipo Qsonica CL-188 (2021090997) al 24% con 8000 rpm durante 4 ciclos de 4 segundos de sonicación por 4 segundos de reposo entre cada ciclo. Posteriormente, las muestras se centrifugaron a 8000 rpm a 4 °C durante 15 minutos y se recuperó el sobrenadante. El proceso de extracción se repitió en dos ocasiones consecutivas y se recuperó aproximadamente 1 mL de extracto.

6.4 Cuantificación de proteínas totales extraídas de las muestras de *Schizochytrium* sp.

Para la cuantificación de las proteínas totales de los extractos obtenidos se realizó una curva estándar, partiendo de 1 mL de una solución stock de albúmina de suero bovino (Sigma-Aldrich, SLBX9204) a 1 mg/mL y se realizaron 9 diluciones (8, 10, 15, 20, 25, 30, 60, 70, 80 μ g/mL) a un volumen final de 1 mL. Al mismo tiempo, se realizó una dilución 1:1000 de los 3 extractos de proteínas de *Schizochytrium* sp. a 48 h. Se colocarán 160 μ L de las soluciones de la curva estándar y las muestras por triplicado en una placa de 96 pocillos. Se les añadieron 40 μ L del reactivo de Bradford (BIO-RAD, Protein Assay Dye Reagent Concentrate) y se incubaron durante 15 minutos a temperatura ambiente en la oscuridad. Finalmente, se leyó la placa en el Varioscan Lux (Thermo Scientific, VLD0000D0) a 595 nm.

6.5 Detección y cuantificación de las proteínas recombinantes GIV-AC1 y GIV-AC2 de *Schizochytrium* sp.

La presencia e integridad de las proteínas recombinantes GIV-AC1 y GIV-AC2 producidas por *Schizochytrium* sp. se evaluaron mediante análisis de Western blot. La extracción de proteínas se realizó de acuerdo con Franklin y col. (2002) de la siguiente manera: 50 mg de biomasa de cada muestra se resuspendió en 1 mL de tampón de extracción (750 mM Tris-HCl, pH 8; 15% de sacarosa; 100 mM β -mercaptoetanol, y 1 mM PMSF [fluoruro de fenilmetilsulfonilo]) y sonificado (4 pulsos de 4 s de duración, con intervalos de 4 s cada uno) a 24% de amplitud, 5 veces. Las muestras se mantuvieron en hielo durante 15 min, se sonicaron y posteriormente centrifugaron a 8000 rpm; luego, el sobrenadante será transferido a nuevos tubos de 1.5 mL. La concentración total de proteína soluble (TSP) se determinó por el método de Bradford (Kruger, 2009).

Posteriormente, se mezcló un volumen correspondiente a 800 µg de proteína soluble total (TSP) con el mismo volumen de 5X reduciendo el buffer de carga (30 µL de muestra más 30 µL de tampón), sometiendo las muestras a desnaturalización en un termobloque a 95 °C durante 5 min. Las muestras se analizaron por electroforesis SDS-PAGE, utilizando 20 µL de cada una. Después de la electroforesis, se incubó el gel en una solución fijadora de agua ultrapura que contiene 50% de isopropanol + 5% de ácido acético, durante 15 minutos. Luego, se incubó con agua ultrapura durante 15 min y posteriormente se dejó en una solución de bloqueo con BSA al 5% y el anticuerpo primario antiHIS 6X (ABCAM Ms mAb tag®), en dilución 1:3000 toda la noche a 4°C. Al día siguiente se lavó el gel 3 veces durante 10 minutos con una solución de PBS + Tween 20 al 0.1% con agitación suave. Después, se incubó por 1 hora, con el anticuerpo secundario anti-IgG Alexa Fluor 488 (ab150117, Lot: GR3443841-1), en una dilución 1:3000 en PBS-T, y agitación suave a temperatura ambiente, en ausencia de luz. Trascurrido el tiempo, se lavó el gel 3 veces durante 10 minutos en PBS + Tween 20 al 0.1% con agitación suave, usando una cantidad generosa de solución de lavado. Finalmente, el gel se mantuvo en una solución de PBS 1X hasta su análisis. La presencia de la proteína de interés se visualizó en el equipo Imaging System ChemiDoc™ MP (BIORAD) utilizando el filtro de fluorescencia Alexa Fluor 488.

Para cuantificar la expresión de los adyuvantes GIV-AC1 y GIV-AC2, se realizó un ensayo de ELISA utilizando una placa de 96 pozos (Microwell Nunc™, Thermo Scientific™) que se sensibilizó con una concentración de 800 µg/ml de proteínas totales del extracto y se ajustó el volumen a 100 µL con buffer de carbonatos (0.2 M, pH 9.6). Para evitar la adhesión inespecífica se bloquearon los pocillos con 100 µL de una solución de leche descremada sin grasa (Svelty-NESTLÉ) al 5% en PBS-T a temperatura ambiente durante 2 horas. Después de tres lavados con PBS-T, la placa se incubó con suero hiperinmune de ratón que contiene anticuerpos anti-GIV-AC1 y -AC2 a una dilución 1:500 y 1:300 respectivamente, a 4 °C toda la noche. Al día siguiente, se añadió el anticuerpo secundario anti-IgG de ratón 1:2000 (Sigma, St Louis MO, EE. UU.) a temperatura ambiente durante 2 horas. Finalmente, la placa se reveló por inmunodetección con 100 µL de una solución de 1 mg de 3, 3', 5, 5' tetrametilbencidina (TMB) 23 (SIGMA; St. Louis, MO, EE. UU.) disuelta en 7.5 mL de buffer fosfato-citrato 0.1 M (pH 4.35) y H₂O₂ 30%, incubando a 25 °C hasta visualizar la señal. La reacción fue detenida con 50 µL de una solución de H₂SO₄ 1M. Los valores de densidad óptica (OD) se registraron a 450 nm en Varioskan™ Flash Multimode Reader (Thermo Scientific,

Wlatham, MA, EE. UU.). Se utilizaron el péptido de GIV-AC1 y extracto proteico de GIV-AC2 para construir la curva de calibración y cuantificar los niveles de proteína en *Schizochytrium* sp. (expresado como $\mu\text{g/g}$ de células de algas liofilizadas).

6.6 Evaluación de inmunogenicidad

La actividad adyuvante de *Schizochytrium* sp.- GIV-AC1 y GIV-AC2 se evaluó en ratones Balb/c de 6-8 semanas ($n=6$ por grupo). Se realizaron cuatro administraciones orales semanalmente (Fig. 1), según los siguientes grupos mostrados en la Tabla 1.

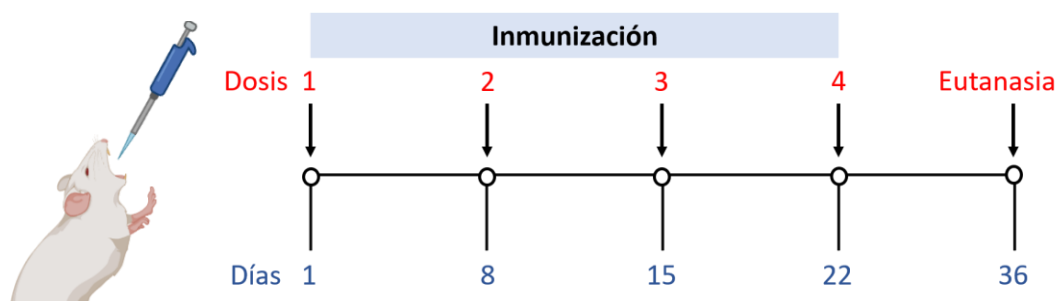


Figura 1. Esquema de inmunización de ratones Balb/c.

Tabla 1. Grupos de ratones Balb/c ($n=6$) para la evaluación de inmunogenicidad. Vía de administración oral.

GRUPO 1	GRUPO 2	GRUPO 3	GRUPO 4	GRUPO 5	GRUPO 6
PBS (control) vía oral	<i>Schizochytrium</i> sp. línea WT (control) Vía oral.	BSA en PBS	<i>Schizochytrium</i> sp.-GIV-AC1 (eq. a 10 μg) + BSA (100 μg)	<i>Schizochytrium</i> sp.-GIV-AC2 (eq. a 10 μg) + BSA (100 μg)	100 μg BSA + 5 μg CTB

En el día previo a la siguiente inmunización, se sangraron los ratones y se tomaron muestras de heces para realizar un ELISA preliminar y medir los títulos de anticuerpos. Para la recolección de heces se preparó previamente una solución de PBS-T con leche al 5% y 1 mM de PMSF, donde se depositaron 3 heces de cada ratón en tubos de 1.5 ml. Posteriormente, las heces se molieron con un pistilo hasta deshacer la mezcla, se homogenizó en vórtex y se centrifugó a 8000 rpm/15 min. Después, se recolectó el sobrenadante para utilizarlo como anticuerpo primario. En el caso de la toma de sangre, se tomaron aproximadamente 200 μl , se centrifugaron a 6500 rpm/15 min y se utilizó el sobrenadante (suero) como anticuerpo primario.

Para el análisis de anticuerpos (IgG o IgA), previamente la microplaca se sensibilizó durante la noche con 1 µg de BSA por pocillo. Al día siguiente, después de tres lavados con 200 µL de PBS-Tween (0.05) la placa se bloqueó con 100 µL de leche descremada al 5% disuelta en PBS-Tween a 25°C durante 2h, luego se incubó a 4°C durante la noche con suero de ratón y/o sobrenadante de heces a diferentes diluciones en 100 y 50 µL de PBS 1X, respectivamente. Al día siguiente la placa se incubó con los anticuerpos secundarios conjugados con peroxidasa Anti-IgG (A9044 SIGMA, St Louis MO USA) o Anti-IgA anti-ratón (A4789 SIGMA, St Louis MO USA) según corresponda, en una dilución de 1:2000 a 25 °C durante 2 h. Finalmente, la inmunodetección se llevó a cabo con una solución de 1 mg de 3,3',5,5'-tetrametilbencidina (TMB) (SIGMA; St. Louis, MO, USA) más 7.5 mL de tampón fosfato-citrato 0,1-M (pH 4,35) (SIGMA; St. Louis MO, EE.UU.) y 1 mM H₂O₂, incubando a temperatura ambiente hasta el desarrollo de color. La reacción enzimática se detuvo con 50 µL de ácido sulfúrico 1-M (H₂SO₄) y los valores de O.D. se midieron a 450 nm en el lector multimodo Flash LUX Varioskan (Thermo Scientific, Waltham, MA, USA).

Dos semanas después de la última inmunización, los ratones fueron autanasiados siguiendo los estándares del comité ético de investigación para uso animal para cuantificar la producción total de inmunoglobulinas (IgA e IgG) por ELISA indirecto, como se describió previamente. En el caso de la cuantificación de IgA, se lavó un segmento de 5 cm de intestino de ratón con 500 µL de leche al 5% en PBS 1 X más 25 µL de un inhibidor de proteasas; se centrifugó a 12000 rpm durante 10 min, y se utilizó directamente el sobrenadante.

6.7 Análisis estadístico

Los datos derivados de los ensayos ELISA se probaron para comprobar la normalidad y se compararán utilizando ANOVA unidireccional seguido de la prueba de Duncan. Todos los análisis se realizarán en IBM SPSS Statistics 23 y P<0.05 se considera estadísticamente significativo.

6.8 Adyuvantes recombinantes bajo el enfoque de Una Salud

La relación entre los adyuvantes recombinantes y el enfoque de Una Salud se describió con base en una búsqueda bibliográfica, abordando los tres pilares de esta orientación: la salud humana, salud animal y salud ambiental.

7. RESULTADOS

7.1 Extracción de ADN plasmídico de GIV-AC1::V1 y GIV-AC2::V1 a partir de cultivo de *A. tumefaciens*

Las colonias seleccionadas de *A. tumefaciens* con la construcción genética de GIV-AC1 y *A. tumefaciens* con GIV-AC2, en placas con medio LB con kanamicina, se muestran en la Fig. 2. Dichas colonias fueron escaladas a pre-inóculos, de los cuales se realizó la extracción de ADN plasmídico. La calidad de producto de la extracción de ADN plasmídico se muestra en la Fig. 3A para AC1 y Fig. 3B para AC2.

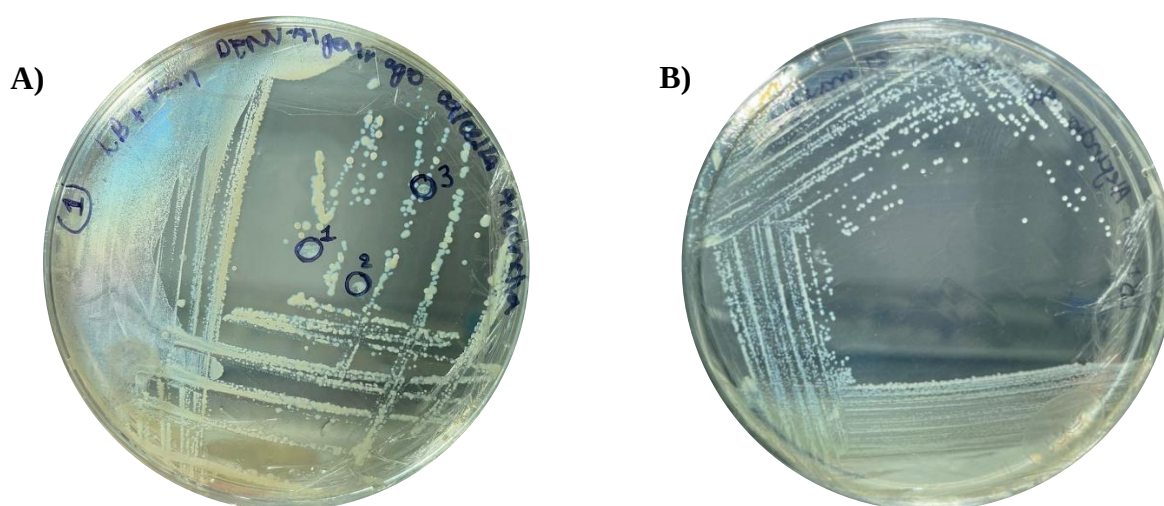


Figura 2. Colonias de **A)** *A. tumefaciens* con la construcción genética de GIV-AC1 y **B)** *A. tumefaciens* con GIV-AC2, en placas con medio LB con kanamicina (50 mg/L).

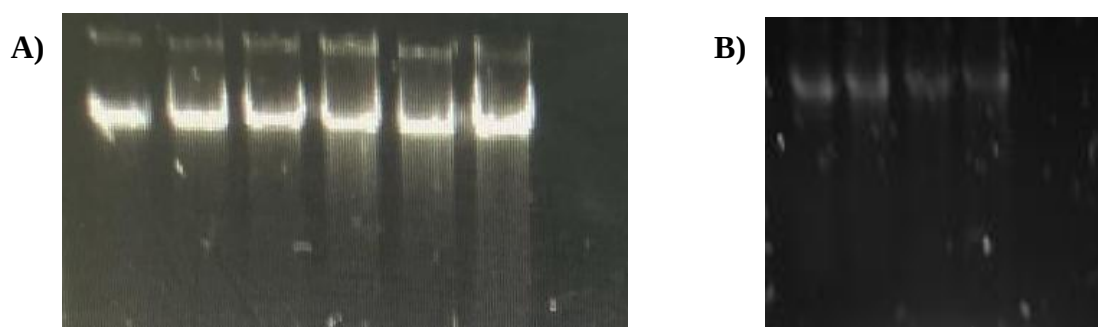


Figura 3. Electroforesis en gel de agarosa al 1.2% para ADN plasmídico extraído de *A. tumefaciens*. **a)** gel de calidad de GIV-AC1. **b)** gel de calidad de GIV-AC2.

7.2 Confirmación por PCR de los genes GIV:AC1 y GIV:AC2 en los vectores de expresión a partir del cultivo de *A. tumefaciens*

La inserción de los genes GIV:AC1 y GIV:AC2 en el vector de expresión (vector pBI121 modificado) clonados en *A. tumefaciens* se determinó por PCR punto final. En la Fig. 4A se muestran los amplicones de ~657 pb para el gen GIV:AC1 y, en la Fig. 4B los productos de ~150 pb para GIV:AC2.

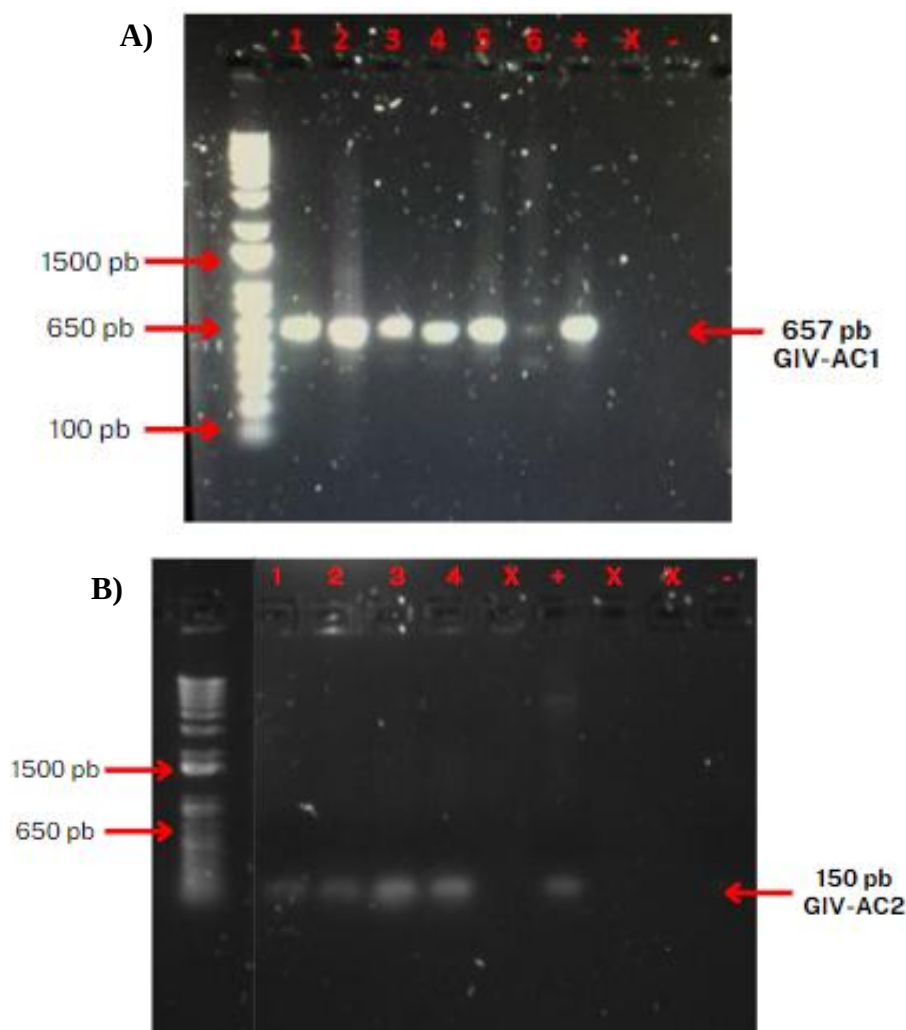


Figura 4. Electroforesis en gel de agarosa al 1.2% para ADN plasmídico extraído de *A. tumefaciens*. a) amplicones de PCR punto final del gen GIV-AC1 (~657 pb). b) amplicones de PCR punto final del gen GIV-AC2 (~150 pb).

7.3 Transformación de cultivos de *Schizochytrium* sp. con GIV-AC1 y GIV-AC2

La recolección de biomasa de *Schizochytrium* sp. transformada se llevó a cabo a las 48 h, según Ojeda, 2023 y Castro, 2023, quienes obtuvieron rendimientos máximos de producción de biomasa total a las 48 h post-inducción. Los pesos de biomasa liofilizada de *Schizochytrium* sp.

transformada con GIV-AC1 y GIV-AC2, fueron de 1.96 g y 1.45 g respectivamente; mientras que el cultivo sin transformar (WT) tuvo una producción de 2.35 g.

7.4 Cuantificación de proteínas totales extraídas de las muestras de *Schizochytrium* sp.

La curva de estándar (Tabla 2 y Fig. 5) realizada mediante el método de Bradford ($R^2 = 0.977$), permitió cuantificar las proteínas totales extraídas de las muestras de *Schizochytrium* sp. transformadas con las líneas GIV-AC1, GIV-AC2, y WT, mediante la ecuación de la recta (Tabla 3).

Tabla 2. Absorbancias de curva estándar mediante el método de Bradford para la cuantificación de proteínas totales, mostradas en mg/mL.

[$\mu\text{g/mL}$]	Absorbancia	$\mu\text{g/mL}$	mg/mL
0	0.275		
8	0.387	6.832	0.0113
10	0.382	6.405	0.0109
15	0.433	10.545	0.0151
20	0.517	17.252	0.0218
25	0.491	15.227	0.0197
30	0.508	16.558	0.0211
60	1.065	61.460	0.0660
70	1.127	66.505	0.0710
80	1.220	73.977	0.0785

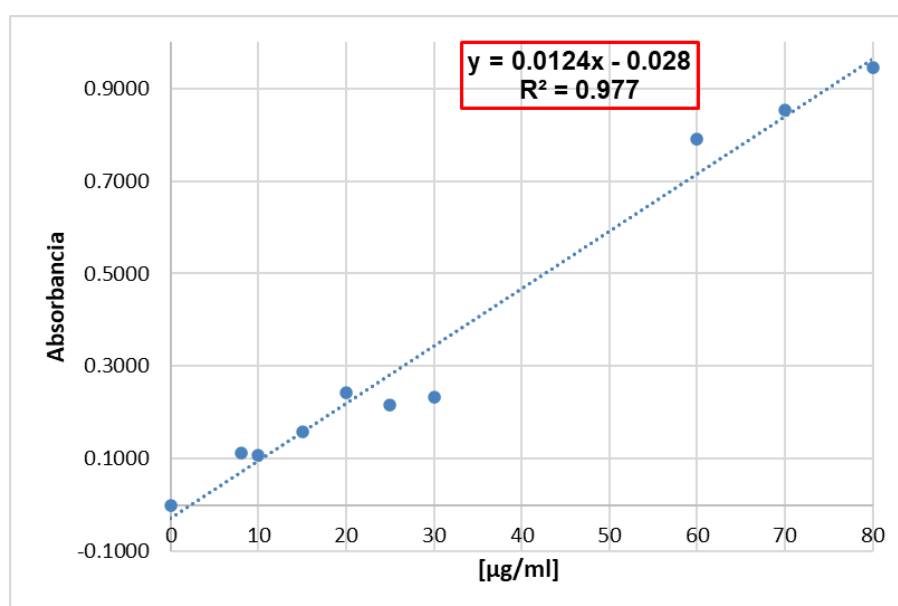


Figura 5. Curva estándar mediante el método de Bradford, con una $R^2 = 0.977$.

Tabla 3. Cuantificación de proteínas totales de las líneas GIV-AC1, GIV-AC2, y WT mediante el método de Bradford, expresado en $\mu\text{g/mL}$.

	1	2	3	4	5	Prom	$\mu\text{g/mL}$
Blanco	0.27	0.261	0.2648	0.2599	0.2564	0.2634	
WT	0.3116	0.2905	0.2740	0.2719	0.2808	0.2858	4.0581
GIV-AC1	0.3207	0.3166	0.3052	0.3114	0.3062	0.3120	6.1758
GIV-AC2	0.2818	0.2872	0.26690	0.2655	0.2674	0.2738	3.0903

En la Fig. 6 se muestra el resultado de la electroforesis SDS-PAGE en gel de poliacrilamida al 12%, en el cual se observa un patrón de bandeo definido para las muestras de extractos proteicos. En este sentido, el ajuste a 400 μg proteína total/mL permitió obtener bandas de la misma intensidad.

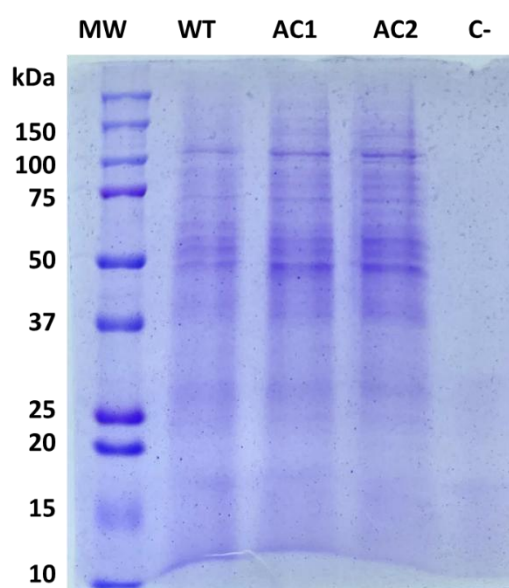


Figura 6. Electroforesis SDS-PAGE de los extractos proteicos obtenidos de las líneas WT, y transformadas de *Schizochytrium* sp. con GIV-AC1 y GIV-AC2. Gel de poliacrilamida al 12% para los extractos proteicos ajustados a 400 μg PT/mL.

7.5 Detección y cuantificación de las proteínas recombinantes GIV-AC1 y GIV-AC2 de *Schizochytrium* sp.

Después de las 48 h post-inducción de la expresión de GIV-AC1 y GIV-AC2, se confirmó la presencia de las proteínas recombinantes GIV-AC1 y GIV-AC2 mediante Western Blot en gel. Las bandas identificadas en el gel tenían el peso esperado; para GIV-AC1 ~ 30 kDa y GIV-AC2 ~ 13 kDa (Fig. 7).

Los niveles de expresión de la proteína GIV-AC1 en *Schizochytrium* sp. alcanzaron 591.4 $\mu\text{g/g}$ de células de algas liofilizadas. Del mismo modo, la línea WT presentó una respuesta inespecífica al suero hiperinmune, obteniéndose una diferencia significativa con GIV-AC1. En el caso de la cuantificación de GIV-AC2, se obtuvieron niveles de producción de proteína recombinante de 215.35 $\mu\text{g/g}$ de células de microalga liofilizadas (Fig. 8).

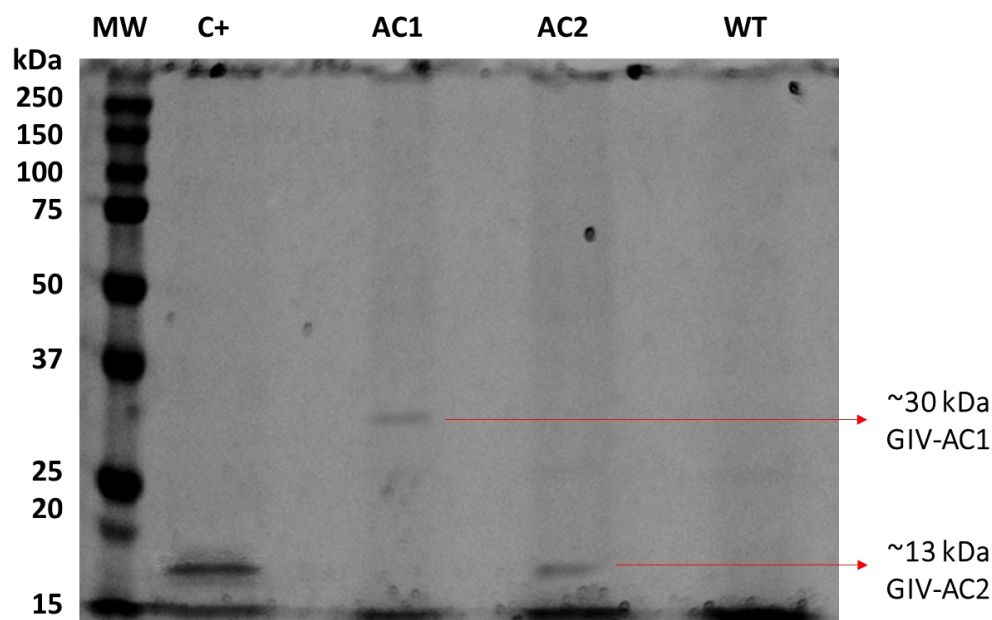


Figura. 7. Detección de la inmunorreactividad de GIV-AC1 y GIV-AC2 producidas en *Schizochytrium* sp. determinada por análisis Western blot con anticuerpos anti-AC1 y anti-AC2. Las muestras se tomaron a las 48 h postinducción. La banda esperada de ~ 29 kDa corresponde a la proteína recombinante GIV-AC1 y la de $\sim 12,6$ kDa a GIV-AC2. El control negativo consistió en la microalga WT, mientras que el control positivo fue el extracto de proteína con toxina de tipo PirA (ToxA) (~ 13 kDa). Se indica el peso molecular (MW) en kDa.

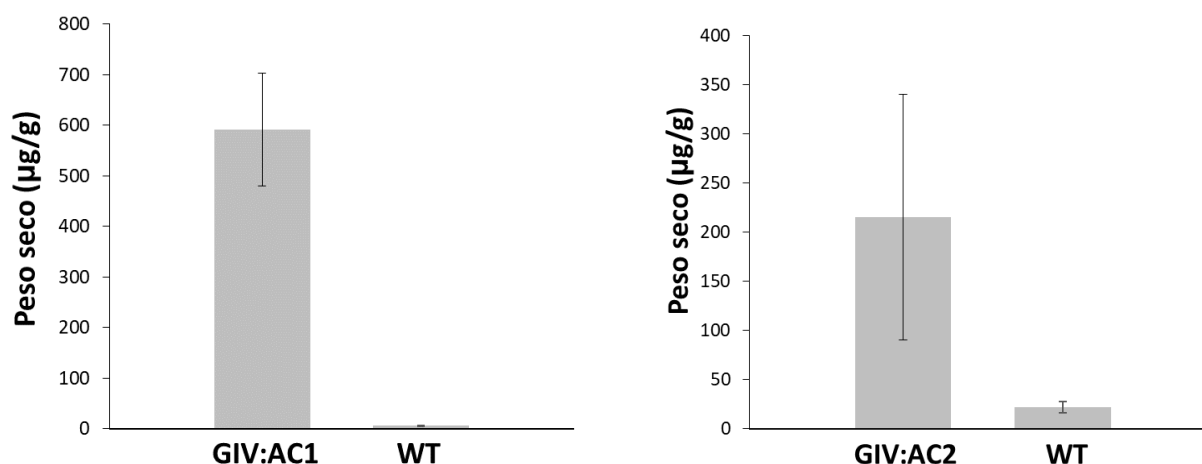


Figura 8. Producción de las proteínas recombinantes GIV-AC1 y GIV-AC2 en *Schizochytrium* sp. ELISA cuantitativo se realizó para determinar los niveles de la proteína recombinante a las 48-h.

Se realizó el etiquetado con sueros hiperinmunes anti-AC1 y -AC2. Se utilizaron el péptido de GIV-AC1 y extracto proteico de GIV-AC2 para construir las curvas estándar para cuantificación. Los valores son la media $\pm$ desviación estándar.

7.6 Evaluación de inmunogenicidad

Se detectaron anticuerpos IgA (Fig. 9) e IgG (Fig. 10) específicos en heces y suero, respectivamente, de ratones inmunizados por vía oral con la adición de los adyuvantes recombinantes: GIV-AC1 y GIV-AC2 expresados por *Schizochytrium* sp., encontrándose un aumento de nivel en los animales que recibieron los adyuvantes. En la producción de IgA, no se detectaron anticuerpos específicos en los respectivos grupos de control (PBS y línea WT). En contraste, la generación de IgG no presentó diferencia significativa entre los grupos control y GIV-AC1 y GIV-AC2 (Fig. 11).

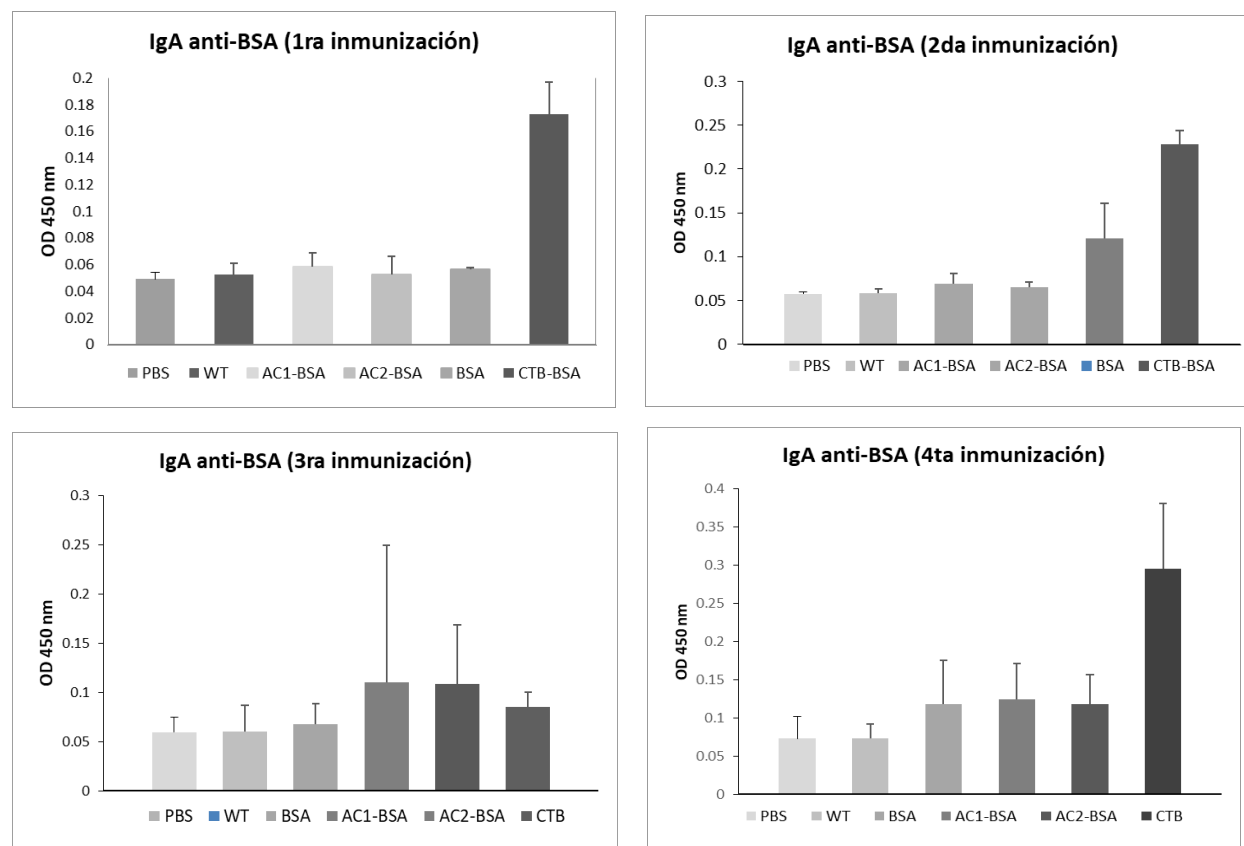


Figura 9. Determinación de anticuerpos IgA anti-BSA en heces de ratones inmunizados. Los grupos corresponden a los ratones a los que se administró control negativo (PBS), *Schizochytrium* sp. WT: WT (25 μ g); *Schizochytrium* sp.-AC1-BSA (~10 μ g *Schi*, 100 μ g BSA); *Schizochytrium* sp.-AC2-BSA (~10 μ g *Schi*, 100 μ g BSA); BSA (~100 μ g); CTB-BSA (~100 μ g BSA, 5 μ g CTB). Los datos se presentan como la media + desviación estándar.

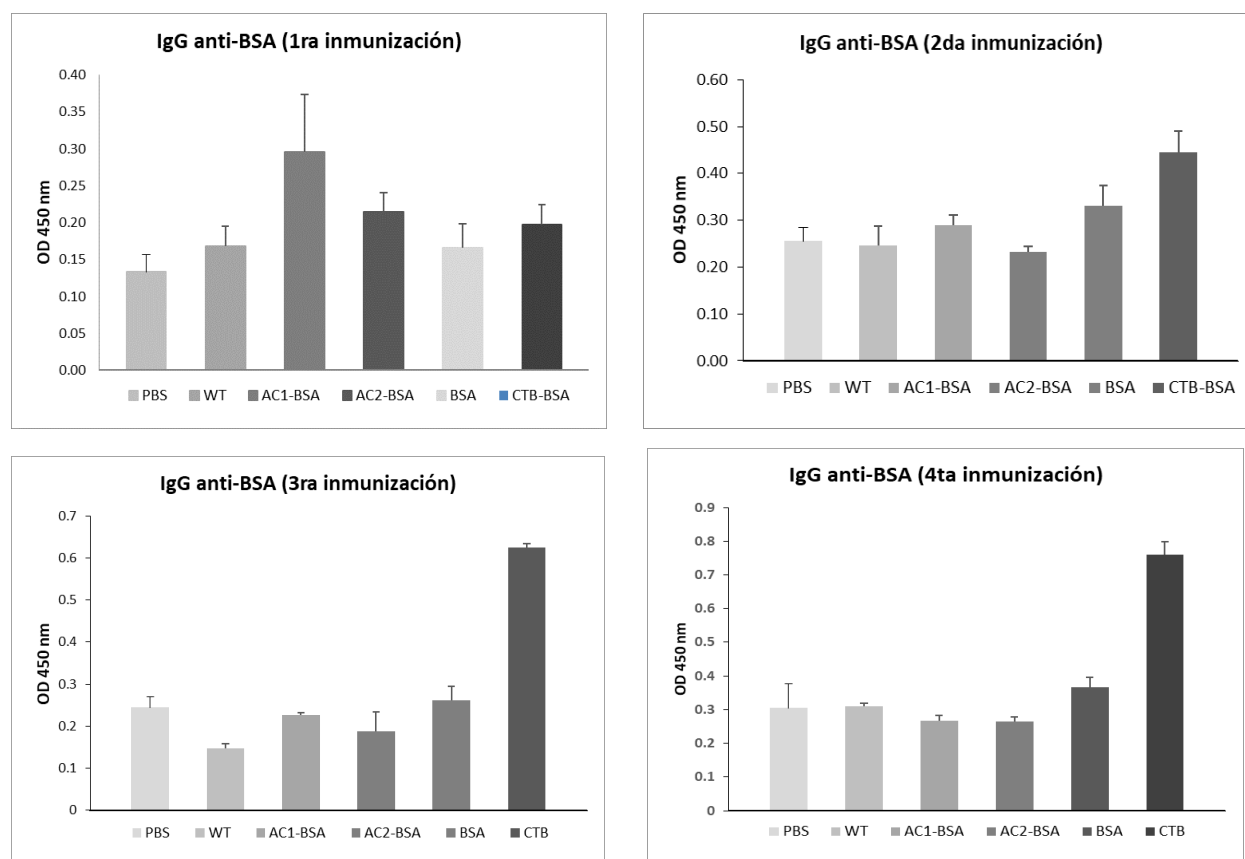


Figura 10. Determinación de anticuerpos IgG anti-BSA de suero sanguíneo de ratones inmunizados. Los grupos corresponden a los ratones a los que se administró control negativo (PBS), *Schizochytrium* sp. WT: WT (25 μ g); *Schizochytrium* sp.-AC1-BSA (~10 μ g *Schi*, 100 μ g BSA); *Schizochytrium* sp.-AC2-BSA (~10 μ g *Schi*, 100 μ g BSA); BSA (~100 μ g); CTB-BSA (~100 μ g BSA, 5 μ g CTB). Los datos se presentan como la media + desviación estándar.

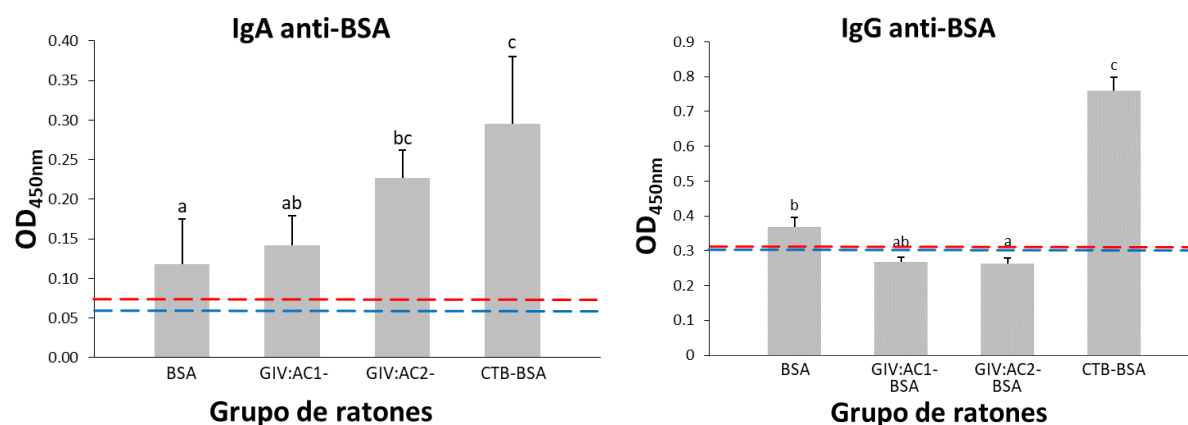


Figura 11. Respuesta de anticuerpos en ratones inmunizados con *Schizochytrium* sp.-GIV:AC1 y GIV:AC2 posterior a la cuarta inmunización. Líneas punteadas azules-grupo WT, rojas-grupo PBS.

7.7 Adyuvantes recombinantes bajo el enfoque de Una Salud

La salud se define como “el estado de completo bienestar físico, mental y social” (OPS, 2024). El concepto Una Salud (One Health) se definió durante los años 2000 como la interdependencia de la salud animal, humana y ambiental (Castro, 2022). El objetivo principal es prevenir y atender las enfermedades zoonóticas, las cuales son aquellas que se transmiten de animales a humanos. Este enfoque surge de la necesidad de generar alternativas que promuevan la interacción sostenible entre los animales, plantas, personas y ambiente (Angulo *et al.*, 2025). En este sentido, los adyuvantes son potenciadores de vacunas, las cuales a su vez procuran prevenir enfermedades, en las que destacan las de origen zoonótico. Como un ejemplo, se describe el dengue y cómo el mosquito vector se interrelaciona con la salud humana, animal y ambiental, y las posibles soluciones para abordar dicha problemática de manera integral.

7.7.1 Dengue

El dengue es una enfermedad que se transmite a humanos por picadura de mosquito (en América, el principal vector de transmisión es *Aedes aegypti*) infectado con uno de los cuatro serotipos del virus del dengue. Este es un mosquito doméstico que vive en y cerca de las casas, donde se reproduce en cualquier recipiente artificial o natural que contenga agua (PHAO, 2025).

7.7.1.1 Salud humana

Los humanos resultan los más afectados por este problema, puesto que los síntomas son conocidos como “trancazo” o “fiebre quebrantahuesos”, que se presentan en un periodo de 4 a 7 días. A pesar de que la mayoría de los casos son reportados como no graves, sí pueden resultar incapacitantes, y en los casos graves pueden causar convulsiones por fiebre o hemorragias (UNICEF, 2023). Actualmente, en México no se cuenta con una vacuna contra el dengue (IMSS, 2025). No obstante, en algunos países como Argentina, se aprobó la vacuna Qdenga (ATC: J07BX04), una vacuna tetravalente elaborada con virus vivos atenuados, y la cual puede aplicarse a personas a partir de los 4 años de edad (Takeda Pharmaceuticals, 2023).

7.7.1.2 Salud animal

El mosquito vector puede picar a otros animales y estos actúan como huéspedes del virus del dengue (Vicente *et al.*, 2017). Adicionalmente, algunos animales sirven de indicadores de presencia de larvas de mosquitos, por ejemplo, los bebederos de ganado son posibles criaderos, incrementando la propagación de la enfermedad al humano (Diéguez *et al.*, 2009). Con ello, la alta densidad de población animal infectada aumenta la disponibilidad de sangre para estos insectos, y con ello se aumenta su población y el riesgo de transmisión a los humanos (Angulo *et al.*, 2025).

7.7.1.3 Salud ambiental

El dengue está íntimamente relacionado con factores ambientales y sociales. Por ejemplo, un mal manejo de residuos o agua almacenada o estancada aumenta los reservorios de criaderos de mosquitos. Además, el cambio climático trae consigo una variación constante de temperatura, humedad y lluvias, lo que ocasiona la proliferación de mosquitos y su rango geográfico (Peña *et al.*; 2021).

7.7.1.4 Prevención

Dentro de las medidas de prevención, se encuentran: eliminar posibles criaderos, evitar estancamiento de agua, o bien, en contenedores donde se almacene lavarlos constantemente (tinacos y cisternas), no exponerse a picaduras de mosquitos, o en su defecto, usar ropa que cubra la mayor parte del cuerpo (IMSS, 2025). Además, como se mencionó anteriormente, actualmente en México no hay una vacuna para combatir el dengue, sin embargo, miembros de la PHAO y la OMS fortalecieron capacidades técnicas para el diagnóstico oportuno (Red de Laboratorios del Dengue en las Américas, RELDA).

8. DISCUSIÓN

8.1 Transformación transitoria de *Schizochytrium* sp.

Recientemente, se ha reportado que *Schizochytrium* sp, ha sido una plataforma promisoría para la producción de candidatos vacunales, usando vectores de expresión virales, que permiten transformar de manera transitoria microalgas y producir biofármacos en pocas horas sin complejidad metodológica. Hasta el momento, se han utilizado en la producción de antígenos recombinantes de administración oral, por ejemplo: Ebola, Vibriosis, Alzheimer y enfermedad de Chagas (Bañuelos-Hernández et al., 2017; Ramos Vega et al., 2024; Trujillo et al., 2024). Por otra parte, la presencia de un vector de expresión genera una presión negativa sobre el metabolismo del microorganismo transformado transitoriamente, puesto que se incrementan las necesidades de precursores metabólicos. En el presente estudio, *Schizochytrium* sp. fue transformada transitoriamente con el co-cultivo de *A. tumefaciens* para la producción de los adyuvantes GIV-AC1 y GIV-AC2, donde la recolección de biomasa fue mayor en la línea WT que su contraparte transformada.

8.2 Detección y cuantificación de proteínas recombinantes GIV-AC1 y GIV-AC2 de *Schizochytrium* sp.

La detección y cuantificación de la expresión de proteínas recombinantes se han analizado a través de técnicas moleculares como Western blot y ensayos de ELISA, respectivamente. De esta manera, se considera como transformación exitosa de *Schizochytrium* sp. cuando, a través de estas técnicas, es posible detectar la integridad y expresión de la proteína de interés. La presencia e integridad de GIV-AC1 y GIV-AC2 fueron evidenciadas mediante Western blot después de las 48 horas de post-inducción. Este análisis permitió observar las bandas correspondientes a las proteínas recombinantes (~30 kDa para GIV-AC1 y ~13 kDa para GIV-AC2). Diversos estudios identifican proteínas recombinantes por medio de la técnica de Western blot, Trujillo y colaboradores (2023) detectaron, mediante análisis de Western blot, la proteína recombinante *ToxA-entero* en plantas de tabaco transformadas.

Por otro lado, el ensayo inmunoabsorbente ligado a Enzimas (ELISA) indirecto es un ensayo específico y sencillo para detectar y cuantificar biomoléculas. En el caso de los adyuvantes GIV-

AC1 y GIV-AC2, se expresaron de forma funcional y en niveles suficientes a las 48 h de post-inducción (591.4 µg/g y 215.35 µg/g de peso seco, respectivamente). Los niveles de expresión obtenidos son comparables con otros sistemas. Recientemente, diversos investigadores han explorado a *Schizochytrium* sp. como plataforma de producción de antígenos recombinantes, y han obtenido buenos rendimientos de producción de los mismos. Castro-Cosío (2023) obtuvo rendimientos superiores a los 370 µg ToxA/g de biomasa seca a las 48 h post-inducción; mientras que Ramos-Vega expresó la proteína Tc24:Co1 alcanzando los 300 µg/g de células liofilizadas en este mismo lapso. Finalmente, los rendimientos obtenidos fueron distintos entre los sistemas GIV-AC1 y GIV-AC2, teniendo una mayor producción de GIV-AC1, y menor producción de GIV-AC2.

8.3 Evaluación de inmunogenicidad

Algunos antígenos pueden resultar poco inmunogénicos, ya que cuando se procesan a través de las superficies mucosas no estimulan la producción de anticuerpos específicos, inmunoglobulina en suero (IgG) o IgA en mucosa intestinal, o lo hacen de forma débil. En este sentido, la respuesta inmunitaria de las mucosas puede obtenerse con éxito mediante el uso de adyuvantes. Hasta el momento, no hay adyuvantes recombinantes para vacunas orales producidos en la microalga *Schizochytrium* sp., por lo que el presente estudio propone esta plataforma de producción. La dosis (10 µg) de las proteínas producidas en *Schizochytrium* sp.-GIV:AC1 y GIV:AC2 desencadenó la producción de anticuerpos anti-BSA IgA específicos en la mucosa intestinal, y no hubo producción de anticuerpos IgG en suero. En algunos estudios, se han desarrollado diferentes tipos de adyuvantes inmunológicos para vacunas orales utilizando la albúmina sérica bovina (BSA) como antígeno modelo en el modelo BALB/c de ratón. Wang *et al.* (2012) informaron que la formulación (sílice/BSA) produjo una respuesta humoral y mucosa estimulada (IgA). Además, Berner *et al.* (2008) inmunizaron ratones por vía intradérmica y oral (MG/BSA), determinando que la primera dosis no generó niveles séricos elevados de anticuerpos anti-BSA. Sin embargo, una vacuna de refuerzo generó una producción significativa de IgG. Estos resultados sugieren que los adyuvantes GIV:AC1 y GIV:AC2 aumentan la producción de anticuerpos IgA en las mucosas. Además, se proponen dosis de refuerzo para estimular la producción de anticuerpos y potencialmente generar inmunización sistémica. Así, en primera instancia, el uso de adyuvantes

permite generar una respuesta de mayor potencia y sostenida durante un mayor tiempo, lo que pretende que se generen mayor producción de anticuerpos específicos contra un antígeno.

8.4 Adyuvantes y Una Salud

En el aspecto de salud humana, la vacunación ayuda a prevenir enfermedades o en su defecto, que los síntomas de la enfermedad no sean graves. Para ello, se requieren vacunas eficaces y el adicionar adyuvantes resulta ideal para aumentar la potencia de los antígenos; sin perder su seguridad en la administración en humanos o animales (Coffman et al. 2010). Aunado a esto, se podrían plantear otras ventajas a considerar en el marco de salud humana, por ejemplo, el ámbito económico. Los adyuvantes recombinantes dentro de un análisis de costo, reduce significativamente la cantidad de antígeno necesario para poder desencadenar una respuesta inmune, reduciendo costos y tiempos de producción (Cárdenas et al.; 2016).

En la salud animal, como se mencionó previamente, la administración de vacunas con adyuvantes también previene infecciones zoonóticas (como rabia o gripe aviar), contribuyendo a la salud humana. Sin embargo, las vacunas veterinarias pueden llegar a mejorar el bienestar animal (Pereda et al., 2020). Al desarrollar vacunas más eficientes e inmunogénicas, se puede prevenir enfermedades que afecten especies de importancia económica, previniendo el sacrificio masivo y reduciendo pérdidas financieras (Angulo et al., 2025).

Finalmente, el cambio climático y su impacto en la salud ambiental es de relevancia, puesto que trae consigo variaciones en el clima y factores como la temperatura y humedad que afectan o favorecen los ciclos de infección (Peña et al.; 2021). Además, dentro de las ventajas de producción de adyuvantes recombinantes, son una alternativa de producción sostenible al utilizar organismos biológicos como biorreactores (plantas, microalgas), siendo bioprocesos con bajo impacto energético y de agua. Por ello, los adyuvantes recombinantes son una oportunidad de reducción de impacto ecológico frente a adyuvantes químicos tradicionales.

La aplicación del enfoque de Una salud brinda estrategias flexibles y soluciones viables y sostenibles desde la prevención, detección y tratamiento, que afectan la salud humana, animal y del medio ambiente. La vacunación tanto humana como veterinaria son clave para la prevención

de enfermedades de origen zoonótico. Sin embargo, las vacunas de subunidades, que son más seguras que otro tipo de vacunas, son poco inmunogénicas por lo que requieren potenciadores seguros y eficaces.

9. CONCLUSIONES

Los adyuvantes GIV-AC1 y GIV-AC2 se expresaron en *Schizochytrium* sp. de forma funcional en niveles suficientes, siendo GIV-AC1 la línea con mayor nivel de producción. Su administración vía oral en ratones Balb/c potenció una respuesta inmunogénica mediante la producción de títulos de anticuerpos IgA, para los adyuvantes GIV-AC1 y GIV-AC2. Sin embargo, en la producción de anticuerpos IgG, no se observaron diferencias significativas con respecto a los controles. Estos resultados indican perspectivas prometedoras para su uso como potenciadores de la respuesta inmune de mucosas en una vacuna oral.

10. LITERATURA CITADA

- Ahn, J., Yu, J. E., Kim, H., Sung, J., Han, G., Sohn, M. H. y Seong, B. L. (2023). AB5-Type toxin as a pentameric scaffold in recombinant vaccines against the Japanese Encephalitis virus. *Toxins (Basel)*, 15(7): 425. doi: 10.3390/toxins15070425.
- Allison, A. C. y Gregoriadis, G. (1974). Liposomes as immunological adjuvants. *Nature*, 252: 252.
- Angulo, C., Racotta, I., Lluch-Cota, S., Monreal-Escalante, E., Murillo-Cisneros, D., Castro, C. y Zenteno-Savín, T. (2025). One Health Approach at the Northwest Biological Research Center (CIBNOR), S.C. Proceedings of the First One Health Forum: Dialogue, Debate, and Awareness. *Recursos Naturales y Sociedad*, 11(1): 21-30. doi: 10.18846/renaysoc.2025.11.11.01.0001.
- Ascarateil, S., Puget, A. y Koziol, M. E. (2015). Safety data of Montanide ISA 51 VG and Montanide ISA 720 VG, two adjuvants dedicated to human therapeutic vaccines. *Journal for Immunotherapy of Cancer*, 3(Suppl 2): P428.
- Baca-Estrada, M. E., Foldvari, M. y Snider, M. (1999). Induction of mucosal immune responses by administration of liposome-antigen formulations and interleukin-12. *Journal of Interferon & Cytokine Research*, 19: 455–462. doi: 10.1089/107999099313893.
- Bajoria, S., Kaur, K., Kumru, O.S., Van Slyke, G., Doering, J., Novak, H., Rodriguez Aponte, S. A., Dalvie, N. C., Naranjo, C. A., Johnston, R. S., Silverman, J. M., Kleanthous, H., Love, J. C., Mantis, N. J., Joshi, S. B. y Volkin, D. B. (2022). Antigen-adjuvant interactions, stability, and immunogenicity profiles of a SARS-CoV-2 receptor-binding domain (RBD) antigen formulated with aluminum salt and CpG adjuvants. *Human Vaccines & Immunotherapeutics*, 18(5): 2079346. doi: 10.1080/21645515.2022.2079346.
- Bañuelos-Hernández, B., Monreal-Escalante, E., González-Ortega, O., Angulo, C. y Rosales-Mendoza, S. (2017). Algevir: an expression system for microalgae based on viral vectors. *Frontiers in Microbiology*, 8: 1100. doi: 10.3389/fmicb.2017.01100.
- Biehl, J. P. y Vilter, R. W. (1982). Effect of isoniazid on Vitamin B6 metabolism; its possible significance in producing isoniazid neuritis. *Nutrition Reviews*, 40: 183–186. doi: 10.1111/j.1753-4887.1982.tb05303.x.
- Bode, C., Zhao, G., Steinhagen, F., Kinjo, T. y Klinman, D.M. (2011). CpG DNA as a vaccine adjuvant. *Expert Review of Vaccines*, 10: 499–511. doi: 10.1586/erv.10.174.
- Bonam, S. R., Partidos, C. D., Halmuthur, S. K. M. y Muller, S. (2017). An overview of novel adjuvants designed for improving vaccine efficacy. *Trends in Pharmacological Sciences*, 38(9): 771-793. doi: 10.1016/j.tips.2017.06.002.
- Bonam, S.R., Partidos, C.D., Halmuthur, S.K.M. y Muller, S. (2017). An overview of novel adjuvants designed for improving vaccine efficacy. *Trends in Pharmacological Sciences*, 38(9): 771-793. doi: 10.1016/j.tips.2017.06.002.
- Cárdenas-Vargas, A., Pedroza-Roldán, C. y Elizondo-Quiroga, D. (2016). Adyuvantes para vacunas: tipos, aplicaciones y modos de acción. *Revista Mexicana de Ciencias Farmacéuticas*, 47(3): 29-47.
- Cioncada, R., Maddaluno, M., Vo, H. T. M., Woodruff, M., Tavarini, S., y Sammiceli, C. (2017). Vaccine adjuvant MF59 promotes the intranodal differentiation of antigen-loaded and activated monocyte-derived dendritic cells. *PLoS ONE*, 12(10): e0185843. doi: 10.1371/journal.pone.0185843.

- Clegg, C.H., Roque, R., Perrone, L.A., Rininger, J.A., Bowen, R. y Reed, S.G. (2014). GLA-AF, an emulsion-free vaccine adjuvant for pandemic influenza. *PLoS ONE*, 9(2): e88979. doi: 10.1371/journal.pone.0088979.
- Coffman, R.L., Sher, A. y Seder, R.A. (2010). Vaccine adjuvants: putting innate immunity to work. *Immunity*, 33(4): 492-503. doi: 10.1016/j.immuni.2010.10.002.
- de Pinho Favaro, M.T., Atienza-Garriga, J., Martínez-Torró, C. y colaboradores. (2022). Recombinant vaccines in 2022: a perspective from the cell factory. *Microbial Cell Factories*, 21: 203. doi: 10.1186/s12934-022-01929-8.
- Dénes, B., Fuller, R.N., Kelin, W., Levin, T.R., Gil, J., Harewood, A., Lőrincz, M., Wall, N.R., Firek, A.F. y Langridge, W.H.R. (2023). A CTB-SARS-CoV-2-ACE-2 RBD mucosal vaccine protects against coronavirus infection. *Vaccines (Basel)*, 11(12): 1865. doi: 10.3390/vaccines11121865.
- Department of the Army (2021). Phase 1 Clinical Trial With Controlled Human Malaria Infection (CHMI) to Evaluate the Safety and Efficacy of the Plasmodium Falciparum Vaccine Candidate FMP012 Administered Intramuscularly With AS01B Adjuvant System in Healthy Malaria-Naïve Adults. Walter Reed Army Institute of Research. Silver Spring, MD.
- Di Sabatino, A., Calarota, S.A., Vidali, F., MacDonald, T.T. y Corazza, G.R. (2011). Role of IL-15 in immune-mediated and infectious diseases. *Cytokine & Growth Factor Reviews*, 22(1): 19–33. doi: 10.1016/j.cytogfr.2010.10.001.
- Didierlaurent, A.M., Laupèze, B., Di Pasquale, A., Hergli, N., Collignon, C. y Garçon, N. (2017). Adjuvant system AS01: helping to overcome the challenges of modern vaccines. *Expert Review of Vaccines*, 16(1): 55–63. doi: 10.1080/14760584.2016.1213632.
- Diéguez-Fernández, L., Cabrera Fernández, S. y Rodríguez de la Vega, R. (2009). Infestación de *Aedes (St.) aegypti* en bebederos de animales en el área de la salud. *Revista Cubana de Medicina Tropical*, 61(1): 82-87.
- Disis, M.L., Bernhard, H., Shiota, F.M., Hand, S.L., Gralow, J.R., Huseby, E.S. y Cheever, M. A. (1996). Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor: an effective adjuvant for protein and peptide-based vaccines. *Blood*, 88(1): 202-210. doi: 10.1182/blood.V88.1.202.202.
- Evans, D.E., Coleman, J.O.D. y Kearns, A. (2003). Plant Cell Culture. Taylor & Francis Group. London.
- Fang, J.H. y Hora, M. (2000). The adjuvant MF59: A 10-year perspective. In: O'Hagan, D.T. (ed.), *Vaccine adjuvants: preparation methods and research protocols*. Humana Press, Totowa, NJ, pp. 211–228.
- Firdaus, F.Z., Skwarczynski, M. y Toth, I. (2022). Developments in vaccine adjuvants. *Methods in Molecular Biology*. 2412: 145–178. doi: 10.1007/978-1-0716-1892-9_8.
- Franklin, S., Ngo, B., Efuet, E. y Mayfield, S.P. (2002). Development of a GFP reporter gene for *Chlamydomonas reinhardtii* chloroplast. *The Plant Journal*. 30 (6): 733-744. doi: 10.1046/j.1365-3113X.2002.01319.x.
- Freund, J. y McDermott, K. (1942). Sensitization to horse serum by means of adjuvants. *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine*, 49: 548–553.
- Galli, G., Medini, D., Borgogni, E., Zedda, L., Bardelli, M., Malzone, C., et al. (2009). H5N1 vaccine induces early CD4⁺ T cell response that predicts long-term persistence of protective antibody levels. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*, 106: 3877–3882. doi: 10.1073/pnas.0813390106.

- Garçon, N., Chomez, P. y Van Mechelen, M. (2007). GlaxoSmithKline adjuvant systems in vaccines: concepts, achievements and perspectives. *Expert Review of Vaccines*, 6: 723–739. doi: 10.1586/14760584.6.5.723.
- Garçon, N., Vaughn, D.W. y Didierlaurent, A.M. (2012). Development and evaluation of AS03, an adjuvant system containing α -tocopherol and squalene in an oil-in-water emulsion. *Expert Review of Vaccines*, 11: 349–366. doi: 10.1586/erv.11.192.
- Glenny, A., Pope, C., Waddington, H. y Wallace, U. (1926). Immunological notes XVII–XXIV. *Journal of Pathology and Bacteriology*, 29: 31–40. doi: 10.1002/path.1700290106.
- Gupta, R.K. y Siber, G.R. (1995). Adjuvants for human vaccines—current status, problems and future prospects. *Vaccine*, 13: 1263–1276. doi: 10.1016/0264-410X(95)00011-O.
- He, Y., Barker, S.J., MacDonald, A.J., Yu, Y., Cao, L., Li, J., Parhar, R., Heck, S., Hartmann, S., Golenbock, D.T., Jiang, S., Libri, N.A., Semper, A.E., Rosenberg, W.M. y Lustigman, S. (2009). Recombinant Ov-ASP-1, a Th1-biased protein adjuvant derived from the helminth *Onchocerca volvulus*, can directly bind and activate antigen-presenting cells. *Journal of Immunology*, 182(7): 4005–4016. doi: 10.4049/jimmunol.0800531.
- Heffner, K.M., Wang, Q., Hizal, D.B., Can, Ö. y Betenbaugh, M.J. (2021). Glycoengineering of mammalian expression systems on a cellular level. *Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology*, 175: 37–69. doi: 10.1007/10_2017_57.
- Hernández-Ramírez, J., Wong-Arce, A., González-Ortega, O. y Rosales-Mendoza, S. (2020). Expression in algae of a chimeric protein carrying several epitopes from tumor-associated antigens. *International Journal of Biological Macromolecules*, 147: 46–52. doi: 10.1016/j.ijbiomac.2019.12.250.
- Hogenesch, H. (2012). Mechanism of immunopotentiality and safety of aluminum adjuvants. *Frontiers in Immunology*, 3: 406. doi: 10.3389/fimmu.2012.00406.
- Honda-Okubo, Y., Bart Tarbet, E., Hurst, B.L. y Petrovsky, N. (2023). An Advax-CpG adjuvanted recombinant H5 hemagglutinin vaccine protects mice against lethal influenza infection. *Vaccine*, 41(39): 5730–5741. doi: 10.1016/j.vaccine.2023.08.009.
- Huleatt, J.W., Jacobs, A.R., Tang, J., Desai, P., Kopp, E.B., Huang, Y., Song, L., Nakaar, V. y Powell, T.J. (2007). Vaccination with recombinant fusion proteins incorporating Toll-like receptor ligands induces rapid cellular and humoral immunity. *Vaccine*, 25(4): 763–775. doi: 10.1016/j.vaccine.2006.08.013.
- Iwasaki, A. y Omer, S.B. (2020). Why and how vaccines work. *Cell*, 183(2): 290–295. doi: 10.1016/j.cell.2020.09.040.
- Jin, B., Sun, T., Yu, X.H., Liu, C.Q., Yang, Y.X., Lu, P., et al. (2010). Immunomodulatory effects of dsRNA and its potential as vaccine adjuvant. *Journal of Biomedicine and Biotechnology*, 2010: 1–11. doi: 10.1155/2010/690438.
- Kalams, S.A., Parker, S., Jin, X., Elizaga, M., Metch, B., Wang, M., et al. (2012). Safety and immunogenicity of an HIV-1 Gag DNA vaccine with or without IL-12 and/or IL-15 plasmid cytokine adjuvant in healthy, HIV-1 uninfected adults. *PLoS ONE*, 7(2): e29231. doi: 10.1371/journal.pone.0029231.
- Kang, Y., Shin, Y.K., Park, S.W., et al. (2016). Effect of nitrogen deficiency on recombinant protein production and dimerization and growth in transgenic plants. *Horticulture, Environment, and Biotechnology*, 57: 299–307. doi: 10.1007/s13580-016-0045-5.

- Karch, C.P. y Burkhard, P. (2016). Vaccine technologies: From whole organisms to rationally designed protein assemblies. *Biochemical Pharmacology*, 120: 1-14. doi: 10.1016/j.bcp.2016.05.001.
- Klinman, D.M. (2004). Immunotherapeutic uses of CpG oligodeoxynucleotides. *Nature Reviews Immunology*, 4: 249-259. doi: 10.1038/nri1329.
- Kruger, N.J. (2009). The Bradford method for protein quantitation. *Methods in Molecular Biology*, 32: 9-15. doi: 10.1007/978-1-59745-198-7_4.
- Li, Q., Li, Z., Deng, N., Ding, F., Li, Y. y Cai, H. (2022). Built-in adjuvants for use in vaccines. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 227: 113917. doi: 10.1016/j.ejmech.2021.113917.
- Lin, R., Tarr, P.E. y Jones, T.C. (1995). Present status of the use of cytokines as adjuvants with vaccines to protect against infectious diseases. *Clinical Infectious Diseases*, 21(6): 1439-1449. doi: 10.1093/clinids/21.6.1439.
- Márquez-Escobar, V.A., Bañuelos-Hernández, B. y Rosales-Mendoza, S. (2018). Expression of a Zika virus antigen in microalgae: Towards mucosal vaccine development. *Journal of Biotechnology*, 282: 86-91. doi: 10.1016/j.jbiotec.2018.07.025.
- Masihi, K.N., Lange, W., Brehmer, W. y Ribi, E. (1986). Immunobiological activities of nontoxic lipid A: Enhancement of nonspecific resistance in combination with trehalose dimycolate against viral infection and adjuvant effects. *International Journal of Immunopharmacology*, 8: 339-345. doi: 10.1016/0192-0561(86)90114-3.
- Moris, P., van der Most, R., Leroux-Roels, I., Clement, F., Dramé, M., Hanon, E., et al. (2011). H5N1 influenza vaccine formulated with AS03A induces strong cross-reactive and polyfunctional CD4 T-cell responses. *Journal of Clinical Immunology*, 31: 443-454. doi: 10.1007/s10875-010-9490-6.
- Nadeau, I. e Kamen, A. (2003). Production of adenovirus vector for gene therapy. *Biotechnology Advances*, 20(7-8): 475-489. doi: 10.1016/S0734-9750(02)00030-7.
- O'Hagan, D.T., Ott, G.S., De Gregorio, E. y Seubert, A. (2012). The mechanism of action of MF59 – an innately attractive adjuvant formulation. *Vaccine*, 30: 4341-4348. doi: 10.1016/j.vaccine.2011.09.061.
- Ortega-Berlanga, B., Bañuelos-Hernández, B. y Rosales-Mendoza, S. (2018). Efficient expression of an Alzheimer's disease vaccine candidate in the microalga *Schizochytrium* sp. using the Algevir system. *Molecular Biotechnology*, 0123456789: 1-7. doi: 10.1007/s12033-018-0077-4.
- Ou, B., Yang, Y., Lv, H., Lin, X. y Zhang, M. (2023). Current progress and challenges in the study of adjuvants for oral vaccines. *BioDrugs*, 37(2): 143-180, doi: 10.1007/s40259-022-00575-1.
- Pasquale, A.D., Preiss, S., Silva, F.T., et al. (2015). Vaccine adjuvants: from 1920 to 2015 and beyond. *Vaccines (Basel)*, 3: 320-343. doi: 10.3390/vaccines3020320.
- Peña León, Y., Herrera López, M. y García Orta, E. (2021). Factores socioambientales que facilitan la propagación del dengue. *Revista Cubana de Higiene y Epidemiología*, 58.
- Pereda, N.R., Santiago, C.R., Sánchez, J.J.C., Cortés, O.R. y González, P. (2020). Vacunas, adyuvantes y bacteriófagos como vectores vacunales. *Revista Biomédica*, 31(3): 159-172. doi: 10.32776/revbiomed.v31i3.875.
- Phatarpkekar, A., Vidyadhar Reddy, G.E.C., Gokhale, A., Karanam, G., Kuchroo, P., Shinde, K., Masand, G., Pagare, S., Khadpe, N., Pai, S.S., Vijayan, V., Ramnath, R.L., Pratap Reddy, K., Rao, P., Harinarayana Rao, S. y Ramana, V. (2022). RelCoVax®, a two antigen subunit protein

- vaccine candidate against SARS-CoV-2 induces strong immune responses in mice. *Vaccine*, 40(32): 4522-4530. doi: 10.1016/j.vaccine.2022.06.026.
- Pillet, S., Aubin, É., Trépanier, S., Poulin, J.-F., Yassine-Diab, B., ter Meulen, J., et al. (2018). Humoral and cell-mediated immune responses to H5N1 plant-made viruslike particle vaccine are differentially impacted by alum and GLA-SE adjuvants in a Phase 2 clinical trial. *Vaccines*, 3: 3. doi: 10.1038/s41541-017-0042-1.
- Podolak, I., Galanty, A. y Sobolewska, D. (2010). Saponins as cytotoxic agents: A review. *Phytochemistry Reviews*, 9: 425-474. doi: 10.1007/s11101-010-9183-z.
- Pollet, J., Chen, W.H. y Strych, U. (2021). Recombinant protein vaccines, a proven approach against coronavirus pandemics. *Advanced Drug Delivery Reviews*. 170: 71-82. doi: 10.1016/j.addr.2021.01.001.
- Pulendran, B., Arunachalam, P.S. y O'Hagan, D.T. (2021). Emerging concepts in the science of vaccine adjuvants. *Nature Reviews Drug Discovery*, 20: 454-475. doi: 10.1038/s41573-021-00163-y.
- Puri, M., Gupta, A. y Sahni, S. (2023). *Schizochytrium* sp. *Trends in Microbiology*, 31(8): 872-873. doi: 10.1016/j.tim.2023.01.010.
- Raghavan, S., Hjulström, M., Holmgren, J. y Svennerholm, A.M. (2002). Protection against experimental *Helicobacter pylori* infection after immunization with inactivated *H. pylori* whole-cell vaccines. *Infection and Immunity*, 70(11): 6383-6388. doi: 10.1128/IAI.70.11.6383-6388.2002.
- Ramos Vega, A., Rosales-Mendoza, S., Bañuelos-Hernández, B. y Angulo, C. (2018). Prospects on the use of *Schizochytrium* sp. to develop oral vaccines. *Frontiers in Microbiology*, 9: 2506. doi: 10.3389/fmicb.2018.02506.
- Ramos-Vega, A., Monreal-Escalante, E., Rosales-Mendoza, S., Bañuelos-Hernández, B., Dumonteil, E. y Angulo, C. (2024). Trypanosoma cruzi Tc24 antigen expressed and orally delivered by *Schizochytrium* sp. microalga is immunogenic in mice. *Molecular Biotechnology*, 66(6): 1376-1388. doi: 10.1007/s12033-023-00763-6.
- Reimer, J.M., Karlsson, K.H., Lövgren-Bengtsson, K., Magnusson, S.E., Fuentes, A. y Stertman, L. (2012). Matrix-M™ adjuvant induces local recruitment, activation and maturation of central immune cells in absence of antigen. *PLoS ONE*, 7: e41451. doi: 10.1371/journal.pone.0041451.
- Rosa, D. S., Tzelepis, F., Cunha, M. G., Soares, I. S. y Rodrigues, M. M. (2004). The pan HLA DR-binding epitope improves adjuvant-assisted immunization with a recombinant protein containing a malaria vaccine candidate. *Immunology Letters*, 92(3): 259-268. doi: 10.1016/j.imlet.2004.01.006.
- Rosales-Mendoza, S., Angulo, C. y Meza, B. (2016). Food-grade organisms as vaccine biofactories and oral delivery vehicles. *Trends in Biotechnology*. doi: 10.1016/j.tibtech.2015.11.007.
- Scheiermann, J. y Klinman, D.M. (2014). Clinical evaluation of CpG oligonucleotides as adjuvants for vaccines targeting infectious diseases and cancer. *Vaccine*, 32: 6377-6389. doi: 10.1016/j.vaccine.2014.06.065.
- Segura-Velázquez, R., Cervantes, J., Acosta, E., Sánchez-Betancourt, I., Villalobos, N., Rodarte, L.F., Restelli, M., et al. (2013). Influenza vaccine: development of a novel intranasal and subcutaneous recombinant adjuvant. *Vaccine*, 31(37): 4009-4016. doi: 10.1016/j.vaccine.2013.05.044.

- Seid, C.A., Curti, E., Jones, R.M., Hudspeth, E., Rezende, W., Pollet, J., et al. (2015). Expression, purification, and characterization of the *Necator americanus* aspartic protease-1 (Na-APR-1 (M74)) antigen, a component of the bivalent human hookworm vaccine. *Human Vaccines & Immunotherapeutics*, 11(6): 1474-1488. doi: 10.1080/21645515.2015.1036207.
- Seubert, A., Monaci, E., Pizza, M., O'Hagan, D.T. y Wack, A. (2008). The adjuvants aluminum hydroxide and MF59 induce monocyte and granulocyte chemoattractants and enhance monocyte differentiation toward dendritic cells. *Journal of Immunology*, 180: 5402-5412. doi: 10.4049/jimmunol.180.8.5402.
- Shaaltiel, Y., Bartfeld, D., Hashmueli, S., Baum, G., Brill-Almon, E., Galili, G., Dym, O., Boldin-Adamsky, S.A., Silman, I., Sussman, J.L., Futerman, A.H. y Aviezer, D. (2007). Production of glucocerebrosidase with terminal mannose glycans for enzyme replacement therapy of Gaucher's disease using a plant cell system. *Plant Biotechnology Journal*, 5: 579-590. doi: 10.1111/j.1467-7652.2007.00263.x.
- Shi, S., Zhu, H., Xia, X., Liang, Z., Ma, X. y Sun, B. (2019). Vaccine adjuvants: Understanding the structure and mechanism of adjuvanticity. *Vaccine*, 37(24): 3167-3178. doi: 10.1016/j.vaccine.2019.04.055.
- Smith, M.L., Mason, H.S. y Shuler, M.L. (2002). Hepatitis B surface antigen (HBsAg) expression in plant cell culture: Kinetics of antigen accumulation in batch culture and its intracellular form. *Biotechnology and Bioengineering*, 80: 812-822. doi: 10.1002/bit.10444.
- Trujillo, E., Villegas-Zagal, R., Ramos-Vega, A., Bañuelos-Hernández, B., Angulo, C. y Monreal-Escalante, E. (2024). Genetic-engineered *Schizochytrium* sp. expressing a multiepitopic protein based on *Vibrio parahaemolyticus* toxins triggers immune responses in mice. *Algal Research*, 79: 103440.
- Van der Ley, P. A., Zariri, A., van Riet, E., Oosterhoff, D. y Kruiswijk, C. P. (2021). An intranasal OMV-based vaccine induces high mucosal and systemic protecting immunity against a SARS-CoV-2 infection. *Frontiers in Immunology*, 12: 781280. doi: 10.3389/fimmu.2021.781280.
- Van Doorn, E., Liu, H., Huckriede, A. y Hak, E. (2016). Safety and tolerability evaluation of the use of Montanide ISA™51 as vaccine adjuvant: a systematic review. *Human Vaccines & Immunotherapeutics*, 12: 159-169. doi: 10.1080/21645515.2015.1071455.
- Van Oers, M. M., Pijlman, G. P. y Vlak, J. M. (2015). Thirty years of baculovirus-insect cell protein expression: from dark horse to mainstream technology. *Journal of General Virology*, 96: 6-23. doi: 10.1099/vir.0.067108-0.
- Vela Ramírez, J. E., Sharpe, L. A. y Peppas, N. A. (2017). Current status and challenges in the development of oral vaccines. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 114: 116-131. doi: 10.1016/j.addr.2017.04.008.
- Vicente-Santos, A., Moreira-Soto, A., Soto-Garita, C., Chaverri, L., Chavez, A., Drexler, J., Morales, J., Alfaro, A., Rodríguez-Herrera, B. y Corrales-Aguilar, E. (2017). Neotropic bats that co-habit with humans function as dead-end hosts for dengue virus. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 11(5): e0005537. doi: 10.1371/journal.pntd.0005537.
- Warfield, K.L., Bosio, C.M., Welcher, B.C., Deal, E.M., Mohamadzadeh, M., Schmaljohn, A., Aman, M.J. y Bavari, S. (2003). Ebola virus-like particles protect from lethal Ebola virus infection. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, 100(26): 15889-15894. doi: 10.1073/pnas.2237038100.

- Xu, B., Zhang, W., Chen, Y., Xu, Y., Wang, B. y Zong, L. (2018). Eudragit® L100-coated mannosylated chitosan nanoparticles for oral protein vaccine delivery. *International Journal of Biological Macromolecules*, 113: 534-542. doi: 10.1016/j.ijbiomac.2018.02.016.
- Yamshchikov, G.V., Barnd, D.L., Eastham, S., Galavotti, H., Patterson, J.W., Deacon, D.H. y colaboradores. (2001). Evaluation of peptide vaccine immunogenicity in draining lymph nodes and peripheral blood of melanoma patients. *International Journal of Cancer*, 92: 703-711. doi: 10.1002/1097-0215(20010601)92:5<703::aid-ijc1250>3.0.co;2-5.
- Yin, J., Wu, H., Li, W., Wang, Y., Li, Y., Mo, X., Li, S., Ren, Y., Pan, H., Jiang, P. y Wang, Q. (2024). *Escherichia coli* heat-labile enterotoxin B subunit as an adjuvant of mucosal immune combined with GCRV-II VP6 triggers innate immunity and enhances adaptive immune responses following oral vaccination of grass carp (*Ctenopharyngodon idella*). *Fish & Shellfish Immunology*, 154: 109969. doi: 10.1016/j.fsi.2024.109969.
- Zahmanova, G., Takova, K., Valkova, R., Toneva, V., Minkov, I., Andonov, A. y Lukov, G. (2022). Plant-derived recombinant vaccines against zoonotic viruses. *Life*, 12(156): 1-32. doi: 10.3390/life12020156.
- Zhang, Y., Li, J., Pu, H., Jin, J., Zhang, X., Chen, M., Wang, B., Han, C., Yu, J. y Li, D. (2010). Development of Tobacco necrosis virus A as a vector for efficient and stable expression of FMDV VP1 peptides. *Plant Biotechnology Journal*, 8: 506-523. doi: 10.1111/j.1467-7652.2010.00500.x.
- Zhu, D. y Tuo, W. (2016). QS-21: a potent vaccine adjuvant. *Natural Products Chemistry Research*, 3: e113. doi: 10.4172/2329-6836.1000e113.

11. ANEXOS

Anexo A. Ensayo de estabilidad térmica

Material y método

Las biomásas liofilizadas de *Schizochytrium* sp.-GIV:AC1, GIV:AC2 y la línea WT se conservaron a 4°C y 25°C respectivamente. Pasados tres meses, se realizó extracción de proteínas de acuerdo con Franklin y col. (2002) de la siguiente manera: 50 mg de biomasa de cada muestra se resuspendió en 1 mL de buffer de extracción (750 mM Tris-HCl, pH 8; 15% de sacarosa; 100 mM β -mercaptoetanol, y 1 mM PMSF [fluoruro de fenilmetilsulfonilo]) y sonicado (4 pulsos de 4 s de duración, con intervalos de 4 s cada uno) a 24% de amplitud, 5 veces. Las muestras se mantuvieron en hielo durante 15 min, se sonicaron y posteriormente centrifugaron a 8000 rpm; luego, el sobrenadante fue transferido a nuevos tubos de 1.5 mL. La concentración total de proteína soluble (TSP) se determinó por el método de Bradford (Kruger, 2009). Posteriormente, se mezcló un volumen correspondiente a 800 μ g de proteína soluble total (TSP) con el mismo volumen de 5X reduciendo el buffer de carga (32 μ L de muestra más 8 μ L de tampón), sometiendo las muestras a desnaturalización en un termobloque a 95 °C durante 5 min. Las muestras se analizaron por Electroforesis SDS-PAGE, utilizando 20 μ L de cada una. Después de la electroforesis, se incubó el gel en una solución fijadora de agua ultrapura que contiene 50% de isopropanol + 5% de ácido acético, durante 15 minutos. Luego, se incubó con agua ultrapura durante 15 min y posteriormente se dejó en una solución de bloqueo con BSA al 5% y el anticuerpo primario antiHIS 6X (ABCAM Ms mAb tag®), en dilución 1:3000 toda la noche a 4°C. Al día siguiente se lavó el gel 3 veces durante 10 minutos con una solución de PBS + Tween 20 al 0.1% con agitación suave. Después, se incubó por 1 hora, con el anticuerpo secundario anti-IgG Alexa Fluor 488 (ab150117, Lot: GR3443841-1), en una dilución 1:3000 en PBS-T, y agitación suave a temperatura ambiente, en ausencia de luz. Transcurrido el tiempo, se lavó el gel 3 veces durante 10 minutos en PBS + Tween 20 al 0.1% con agitación suave, usando una cantidad generosa de solución de lavado. Finalmente, el gel se mantuvo en una solución de PBS 1X hasta su análisis. La presencia de la proteína de interés se visualizó en el equipo Imaging System ChemiDoc™ MP (BIORAD) utilizando el filtro de fluorescencia Alexa Fluor 488.

Resultados

El análisis de Western Blot mostró que las proteínas GIV:AC1 y GIV:AC2 expresadas en *Schizochytrium* sp. fueron estables a 4 y 25 °C a los primeros tres meses (Fig. 12). En contraste, después de seis meses, las proteínas conservaron su funcionalidad solo a 4°C (Fig. 13).

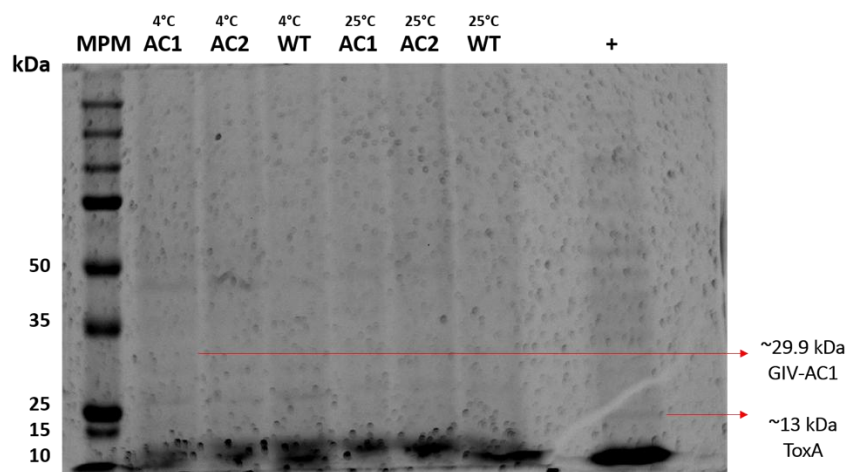


Figura 12. Análisis de la termoestabilidad del liofilizado de *Schizochytrium* sp.-GIV:AC1 y -AC2 a los tres meses. Se realizó la extracción de proteínas de las muestras liofilizadas de *Schizochytrium* sp.- GIV:AC1, -AC2 previamente almacenadas a 4 y 25 °C durante tres meses. Las flechas indican las bandas de proteínas. El control negativo consistió en la microalga WT, mientras que el control positivo fue el extracto de proteína con toxina de tipo PirA (ToxA). Se indica el peso molecular (MPM) en kDa.

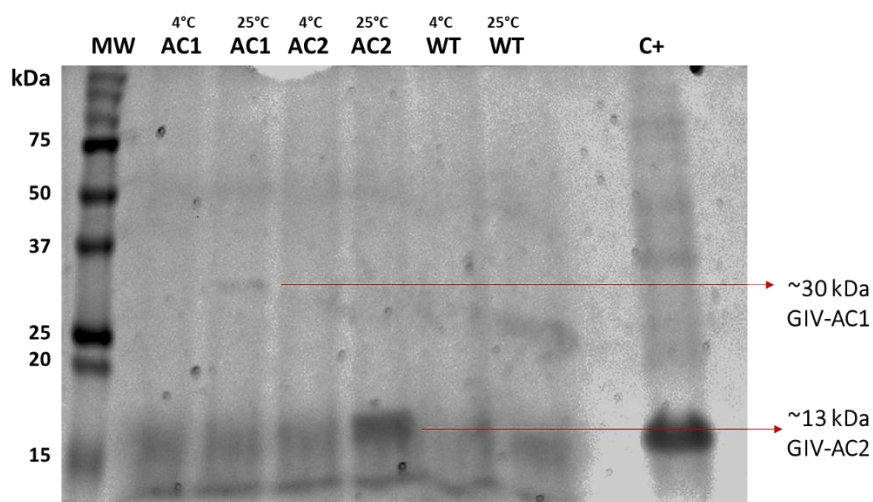


Figura 13. Análisis de la termoestabilidad del liofilizado de *Schizochytrium* sp.-GIV:AC1 y -AC2 a los seis meses. Se realizó la extracción de proteínas de las muestras liofilizadas de *Schizochytrium* sp.- GIV:AC1, -AC2 previamente almacenadas a 4 y 25 °C durante seis meses. Las flechas indican las bandas de proteínas. El control negativo consistió en la microalga WT, mientras que el control

positivo fue el extracto de proteína con toxina de tipo PirA (ToxA). Se indica el peso molecular (MPM) en kDa.

Discusión

Las ventajas de las vacunas orales termoestables es que tienen un bajo costo para evitar los requerimientos de almacenamiento, como la cadena de frío y el transporte (Kumru et al., 2014). Específicamente, las microalgas como *Chlamydomonas reinhardtii* se identifican para la producción de potencias biofarmacéuticas, ya que pueden alcanzar altas tasas de crecimiento en cultivos de bajo costo (Bañuelos et al., 2015). Por lo tanto, las proteínas GIV-AC1 y -GIV-AC2 conservaron su integridad a 4°C y 25°C durante tres meses, mientras que a los seis meses se conservó su funcionalidad solo en refrigeración (4°C). Estos resultados son similares a la termoestabilidad a 4°C durante un máximo de seis meses y a 25 °C durante tres meses de la proteína quimérica Tc24:Co1 producida en *Schizochytrium* sp. (Ramos et al., 2024). Esta es una mejor opción en comparación con mantener otras proteínas a -20 °C y -80 °C durante el almacenamiento en la cadena de frío.

Anexo B. Cuantificación de citocinas

Materiales y métodos

Dos semanas después de la última inmunización, los ratones fueron autanasiados siguiendo los estándares del comité ético de investigación para uso animal para cuantificar las citocinas interferón-gamma (IFN- γ), interleucina-2 (IL-2), IL-4 e IL-10 por ELISA kit Th1/Th2 (Rogen, 88-7711-44, Viena, Austria).

Resultados

Los ratones inmunizados con *Schizochytrium* sp.-GIV:AC1 presentó niveles significativamente elevados de IL-4, IL-10 y citocinas séricas en comparación con el PBS y WT *Schizochytrium* sp. controles (Fig. 14 b y c). Por el contrario, no se obtuvo señal para IFN- γ y no se produjo IL-2 para ninguno de los dos grupos adyuvantes (Fig. 14 a).

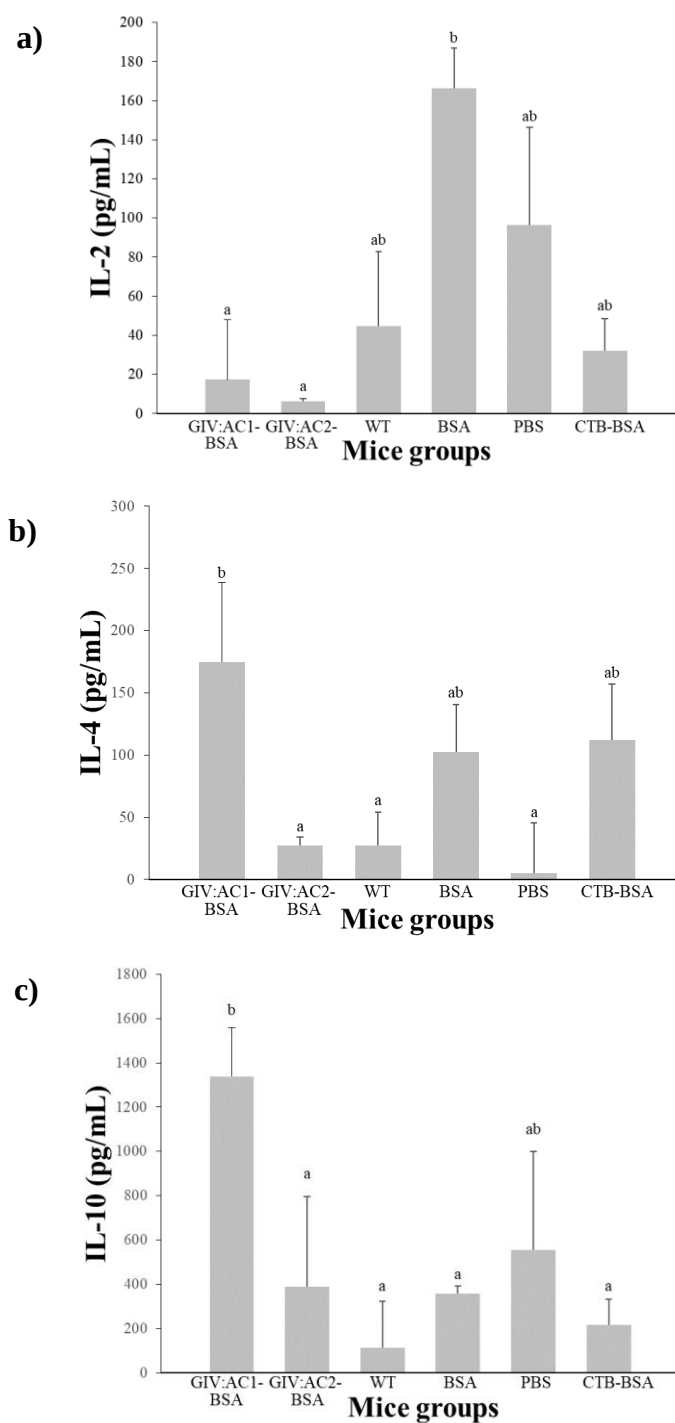


Figura 14. Niveles séricos de citocinas en ratones inmunizados. Los niveles séricos de A) IL-2, B) IL-4 y C) IL-10 se determinaron por ELISA. Las concentraciones de citocinas se establecieron comparando los datos de la muestra con una curva estándar. Los datos se presentan con el error estándar. Las diferentes letras denotan una diferencia significativa entre los tratamientos ($P < 0.05$).

Anexo C. Actividades de divulgación

1) 23° Semana de Posgrado en Baja California Sur



2) Seminario de Protocolo de tesis



3) Curso Teórico: Cultivo Celular

**CONAHCYT**CONSEJO NACIONAL DE HUMANIDADES
CIENCIAS Y TECNOLOGÍASCentro de
Investigaciones
Biológicas
del Noroeste

La Dirección de Estudios de Posgrado y Formación de Recursos
Humanos, del Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, a través
de su Programa de Educación Continua, otorga la presente

CONSTANCIA

a

Cisneros Geraldo, María Alejandra

Por haber aprobado el Curso:

Curso Teórico-Práctico de cultivo celular

Impartido del 16 al 18 de octubre de 2024 con una duración total de 12 horas

La Paz, B.C.S. a 18 de octubre de 2024

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

Dr. Hamlet Avilés Amaut
Coordinador del Curso
UANL

Dra. Martha Candelaria Reyes Becerra
Coordinadora del Curso
CIBNOR

CIB-DEFRH-PEC-125-022-18102024

4) Primer Foro: Una Salud, diálogos, debate y conciencia



CONAHCYT
CONSEJO NACIONAL DE HUMANIDADES
CIENCIAS Y TECNOLOGÍAS



Centro de
Investigaciones
Biológicas
del Noroeste

COVITECS

Coordinación de Vinculación,
Innovación y Transferencia de
Conocimiento a la Sociedad.



**EL CENTRO DE INVESTIGACIONES BIOLÓGICAS DEL NOROESTE S.C.
EN EL MARCO DE SU XLIX ANIVERSARIO**

OTORGA LA PRESENTE

CONSTANCIA

A:

**MARÍA ALEJANDRA
CISNEROS GERALDO**

POR SU PARTICIPACIÓN EN EL PRIMER FORO:
UNA SALUD, DIÁLOGOS, DEBATE Y CONCIENCIA
CON UNA DURACIÓN DE 4 HORAS

Dr. Alfredo Ortega Rubio
Director General del CIBNOR



La Paz, Baja California Sur, 24 de octubre de 2024



5) 11° Encuentro Internacional de Ciencia Animal en Zonas Áridas Costeras



6) Avance de artículo científico

Evaluation of *Schizochytrium* sp.-made recombinant oral adjuvants in a mouse model

Cisneros-Geraldo, A.,^{1,3} Monreal-Escalante, E.,^{1,2,3*} Gaxiola, R.,⁴ Angulo, C.^{1,3*}

¹ Immunology & Vaccinology Group, Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, S.C. Instituto Politécnico Nacional 195, Playa Palo de Santa Rita Sur, La Paz, B.C. S. C.P. 23096, México

² CONAHCYT-Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, S.C. Instituto Politécnico Nacional 195, Playa Palo de Santa Rita Sur, La Paz, B.C. S. C.P. 23096, México

³ Laboratorio Nacional CONAHCYT de Generación de Vacunas Veterinarias y Servicios de Diagnóstico (LNC-GVD). Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, S.C., Instituto Politécnico Nacional 195, Playa Palo de Santa Rita Sur, La Paz, B.C. S. C.P. 23096, México

⁴ Hospital General de Zona No.1. Instituto Mexicano del Seguro Social (IMSS). La Paz. Baja California Sur. México.

Corresponding authors:

Monreal-Escalante, E. (emonreal@cibnor.mx) and Angulo, C. (eangulo@cibnor.mx)

Resumen

Oral vaccines are a natural and practical vaccination route. However, they usually require an adjuvant to potentiate immunogenicity. Several platforms have been used to

7) Avance artículo de divulgación

Vacunas y adyuvantes: conceptos y beneficios

Cisneros Geraldo, María Alejandra¹, Angulo, Carlos¹, Monreal Escalante, Elizabeth^{1,2}.

¹ Grupo de Inmunología y Vacunología. Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, S.C. Carretera a San Juan de La Costa "El Comitán" km 1, La Paz, Baja California Sur. CP23205.

² CONAHCYT-Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste S.C. Carretera a San Juan de La Costa "El Comitán" km 1 La Paz, Baja California Sur. CP23205.