



CENTRO DE INVESTIGACIONES BIOLÓGICAS
DEL NOROESTE, S.C.

Programa de Estudios de Posgrado

ESTRATEGIA BIONANOTECNOLÓGICA PARA EL
COMBATE DEL SÍNDROME DE LA MANCHA
BLANCA BASADA EN LA TÉCNICA DE PHAGE
DISPLAY

TESIS

Que para obtener el grado de

Doctor en Ciencias

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

Presenta

MERCEDES GORETTE SOLIS LUCERO

La Paz, Baja California Sur, Septiembre de 2016

ACTA DE LIBERACIÓN DE TESIS

En la Ciudad de La Paz, B. C. S., siendo las 12 horas del día 23 del Mes de junio del 2016, 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:

"ESTRATEGIA BIONANOTECNOLÓGICA PARA EL COMBATE DEL VIRUS DEL SÍNDROME DE LA MANCHA BLANCA BASADA EN LA TÉCNICA DE PHAGE DISPLAY"

Presentada por el alumno:


Mercedes Gorette Solís Lucero


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

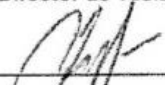
Después de intercambiar opiniones los miembros de la Comisión manifestaron su **APROBACIÓN DE LA TESIS**, en virtud de que satisface los requisitos señalados por las disposiciones reglamentarias vigentes.

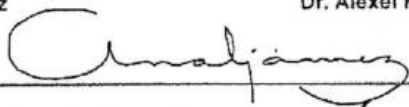
LA COMISIÓN REVISORA

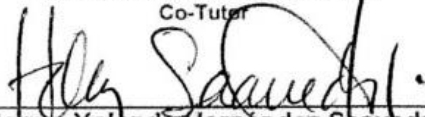

Dr. Felipe de Jesús Ascencio Valle
Co-Director de Tesis


Dr. Karen Manoutcharian Airapetian
Co-Director de Tesis


Dr. Jorge Hernández López
Co-Tutor


Dr. Alexei Fedorovitch Licea Navarro
Co-Tutor


Dra. Idalia Anali Gámez Escobedo
Co-Tutor


Dra. Norma Yolanda Hernández Saavedra,
Directora de Estudios de Posgrado y
Formación de Recursos Humanos

COMITÉ TUTORAL Y REVISOR DE TESIS

Dr. Felipe de Jesús Ascencio Valle, Co-Director de Tesis
Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste (CIBNOR)

Dr. Karen Manoutcharian Airapetian, Co-Director de Tesis
Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM)

Dr. Jorge Hernández López, Asesor, Asesor
Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste (CIBNOR)

Dr. Alexei Fedorovich Licea Navarro, Asesor
Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada
(CICESE)

Dra. Idalia Analí Gámez Escobedo, Asesora
Universidad Autónoma de Coahuila (UAdeC)

JURADO DE EXAMEN DE GRADO

Dr. Felipe de Jesús Ascencio Valle

Dr. Karen Manoutcharian Airepetian

Dr. Jorge Hernández López

Dr. Alexei Fedorovich Licea Navarro

Dra. Idalia Analí Gámez Escobedo

SUPLENTE

Dr. Ricardo Vázquez Juárez

Dr. Ángel Isidro Campa Córdoba

RESUMEN

El virus del síndrome de la mancha blanca (WSSV) es el patógeno viral más importante del camarón en cultivo y el responsable de mortalidades masivas con grandes pérdidas económicas. La proteína VP28 del WSSV, una de las más abundantes en el virión, es capaz de proteger a los organismos contra la infección. Los fagos modificados por ingeniería genética sirven como vehículos de proteínas o péptidos antigénicos de forma que estas nanopartículas virales son utilizadas como bionanovacunas con numerosas ventajas. El objetivo de este trabajo fue desarrollar y evaluar una bionanovacuna contra el WSSV, usando al fago filamentoso M13 como acarreador de la proteína vacunal VP28. Para ello, el gen completo que codifica para VP28 fue clonado en el vector pG8SAET que permite el despliegue de proteínas en fusión a la proteína estructural pVIII del M13. Con la ayuda del fago ayudador M13K07, la partícula viral fue rescatada de células TG1 transformadas con el vector VP28-pG8SAET y el vector vacío pG8SAET, respectivamente. La vacuna VP28 fue expresada y desplegada en múltiples copias sobre la superficie del virión. La proteína VP28 fusionada al M13 (VP28-M13) fue capaz de unirse a las membranas de hemocitos en un ensayo de ELISA. La bionanovacuna VP28-M13 o el M13 fueron administrados intramuscularmente a camarones *L. vannamei* (2×10^{10} ufc/camarón) y 48 h después fueron retados con WSSV. El porcentaje de sobrevivencia relativa del (PSR) del grupo vacunado fue de 44.99% respecto al grupo sin vacunar. Se midió la actividad de la fenoloxidasa y superóxido dismutasa (SOD) a las 8 y 48 h post-vacunación (h_{pv}) sin que se encontraran diferencias significativas entre grupos en los tiempos evaluados. Se realizó un segundo bioensayo con la administración oral forzada de una dosis única de VP28-M13 (4×10^{10} ufc/camarón), M13 (4×10^{10} ufc/camarón) y TBS. Los grupos fueron subdivididos en dos subgrupos. El primer conjunto de subgrupos fue retado 3 dpv y el segundo 14 dpv. Para el reto 3 dpv, se observaron PSR de 28.57% y 20.83%, comparados con el control positivo (100% mortalidad), en los grupos VP28-M13 y M13 respectivamente. La evaluación de la expresión relativa de genes del sistema inmune previo al reto mostró un incremento en la expresión de factor anti-lipopolisacáridos (ALF1) y SOD 3 dpv para los grupos VP28-M13 y M13. No se observó diferencia significativa entre VP28-M13 y M13 en las curvas de sobrevivencia ni en la expresión relativa de genes. Luego del reto 14 dpv, las curvas de sobrevivencia de los grupos M13 y control positivo no fueron significativamente diferentes. Los valores de PSR de VP28-M13 fueron de 33.4% y 42.8% comparados con el grupo M13 y el control positivo respectivamente (mortalidad 100%) 5 d post-reto y un día después de 17.14% cuando el grupo M13 alcanzó el 100% de mortalidad. Los resultados sugieren que el despliegue en fago puede ser usado para obtener la biovacuna VP28 desplegada en la superficie del fago M13 representando una alternativa potencial para la vacunación de camarones en cultivo.

Palabras clave: WSSV, vacuna, despliegue en fago

Vo.Bo. Felipe Ascencio Valle

ABSTRACT

The white spot syndrome virus (WSSV) is the most important viral pathogen for farmed shrimp and responsible of mass mortalities with huge economic losses. The WSSV VP28 protein, one of the most abundant in virions, is able to protect organisms against infection. Genetically engineered phages serve as antigenic protein or peptide vehicles, so these viral nanoparticles are used as bionanovaccine with numerous advantages. The aim of this study was to develop and evaluate a bionanovaccine against WSSV, using the filamentous phage M13 as carrier of the vaccine protein VP28. To achieve this objective, the full-length gene encoding VP28 protein was cloned into pG8SAET vector allowing protein display in fusion with M13 pVIII structural protein. With helper phage M13K07 aid the viral particle was rescued from TG1 cells transformed with VP28-pG8SAET and empty pG8SAET vectors, respectively. The VP28 vaccine was expressed and displayed in multiple copies on virion surface. The M13-fused VP28 protein (VP28-M13) was capable to bind to hemocyte membranes in an ELISA assay. The bionanovaccine VP28-M13 or M13 were intramuscularly administrated to *L. vannamei* shrimps (2×10^{10} cfu/shrimp) and challenged with WSSV 48 h later. The relative percentage survival (RPS) of the vaccinated group was 44.99% with respect to the unvaccinated group. Phenoloxidase and superoxide dismutase activity was measured at eight and 48 h post-vaccination with no significant difference between groups in times evaluated. A second bioassay was performed with forced oral administration of a single dose of VP28-M13 (4×10^{10} cfu/shrimp), M13 (4×10^{10} cfu/shrimp) and TBS. The groups were divided into two subgroups. The first set of subgroups was challenged 3 dpv and the second one 14 dpv. For 3 dpv challenge, PSR values of 28.57% and 20.83% were observed, compared with the positive control group (100% mortality) in VP28-M13 and M13, respectively. The relative expression evaluation of the immune system genes prior to challenge showed an increase in anti-lipopolysaccharide factor (ALF1) and SOD expression 3 dpv for VP28-M13 and M13 groups. No significant difference between VP28-M13 and M13 groups were observed in survival curves or the relative gene expression. After 14 dpv challenge, survival curves of M13 and positive control groups were not significantly different. The RPS values of VP28-M13 were 33.4% and 42.8%, respectively, compared with the M13 and positive control (100% mortality) groups at 5 d post-challenge, and one day later 17.14% when the M13 group reached 100% mortality. The results suggest that phage display can be used to obtain the VP28 biovaccine displayed on the surface of M13 phage representing a potential alternative for vaccination of farmed shrimp.

Keywords: WSSV, vaccine, phage display

Vo.Bo. Felipe Ascencio Valle

DEDICATORIA

A mi familia y amigos

AGRADECIMIENTOS

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por la beca no. 224239 otorgada. Al Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste en especial al laboratorio de Patología Microbiana, al Programa de Posgrado y Formación de Recursos Humanos y al financiamiento recibido por el fondo institucional AC03. A los miembros del comité de tesis Dres. Jorge Hernández, Idalia Gámez y Alexei Licea por su apoyo, buena disponibilidad y comprensión, especialmente a los Dres. Felipe Ascencio y Karen Manoutcharian por aceptar ser mis guías durante toda mi formación en el posgrado, por su apoyo, confianza y aprecio. A los Dres. Karen Manoutcharian (Instituto de Investigaciones Biomédicas, IIB-UNAM), Jorge Hernández López (CIBNOR, Unidad Sonora, Campus Hermosillo) y Antonio Luna González (Centro Interdisciplinario de Investigación para el Desarrollo Integral Regional, CIIDIR- Sinaloa) por recibirme en sus instituciones y brindarme todas las facilidades para la realización del trabajo. De igual forma quiero hacer extensivo el agradecimiento al personal técnico, especialmente a la M. en C. María Elena Munguía (IIB-UNAM) por su valioso apoyo en la técnica de despliegue en fagos y por su amistad; a los técnicos adscritos al CIBNOR Ing. Mayra Vargas Mendieta, M. en C. Pablo Monsalvo Spencer, Biol. Gabriel Robles Villegas, M. en C. Delia Irene Rojas Posadas, Biol. Francisco Javier Encarnación Ramírez y Ernesto Goytortua Bores por su buena disponibilidad, apoyo y capacitación brindada; a los técnicos del Lab. de Referencia, Análisis y Diagnóstico en Sanidad Acuícola (LADARSA, Sonora) y la Dra. Viridiana Peraza Gómez (Depto. de Acuicultura, CIIDIR-Sinaloa)

por su valiosa ayuda en la realización de los retos experimentales y la colecta de muestras así como a la I.B.Q. Ylenia Murillo Arce por hacer posible esta tesis con su valiosa ayuda en el trabajo experimental. A la M. en C. Diana Dorantes Salas por la edición del resumen en inglés. A los Dres. Ricardo Vázquez Juárez, Ángel Campa Córdova, Fabiola Arcos Ortega, Patricia Hernández Cortés, Danitzia Tortolero y Rafael Campos por siempre estar dispuestos a brindarme su apoyo. A mis compañeros de los laboratorios de Patología Microbiana (CIBNOR) e Inmunología y Biotecnología 3 (IIB-UNAM) por su amistad, por compartir su tiempo y experiencias. A mi familia y amigos Ma. Olga, Juan José, Neri, Perla, Fulvia, Raúl Alfonso, Alberto, Alejandra y Christopher por su amor, apoyo y por siempre creer en mí.

CONTENIDO

Resumen en español.....	i
Resumen en inglés.....	ii
Dedicatoria.....	iii
Agradecimientos.....	iv
Contenido.....	vi
Lista de figuras.....	ix
Lista de tablas.....	xii
1. INTRODUCCIÓN.....	1
2. ANTECEDENTES.....	5
2.1 Virus del síndrome de la mancha blanca.....	5
2.1.1 Morfología y morfogénesis.....	5
2.1.2 Hospederos y acarreadores.....	7
2.1.3 Órganos y tejidos blanco.....	7
2.1.4 Signos de la infección.....	8
2.1.5 Genoma del WSSV.....	8
2.1.6 Proteínas Estructurales.....	10
2.1.7 Uso de proteínas protectoras contra el WSSV.....	11
2.1.7.1 Proteína VP28 como agente vacunal.....	11
2.2 Nanovacunas basadas en fagos filamentosos.....	12
2.2.1 Bacteriófagos.....	13
2.2.2 Biología y estructura de los fagos filamentosos.....	13
2.2.3 Despliegue en fagos.....	16
3. JUSTIFICACIÓN.....	18
4. HIPÓTESIS.....	19
5. OBJETIVOS.....	19
5.1 Objetivo general.....	19
5.2 Objetivos particulares.....	19
6. MATERIALES Y MÉTODOS.....	20
6.1 Construcción de la bionanovacuna.....	20
6.1.1 Extracción de ADN genómico de WSSV.....	20
6.1.2 Amplificación del gen VP28.....	21
6.1.3 Amplificación del fagémido.....	22
6.1.4 Digestión con enzimas de restricción.....	23
6.1.5 Ligación.....	24
6.1.6 Transformación.....	24
6.1.6.1 Células electrocompetentes.....	24
6.1.6.2 Transformación por electroporación.....	25
6.1.7 PCR de colonia.....	25
6.1.8 Secuenciación.....	27
6.1.9 Análisis bioinformático.....	27
6.1.10 Rescate del fago recombinante.....	27
6.1.11 Titulación de los fagos.....	28

6.1.12 Expresión de VP28.....	28
6.1.13 ELISA.....	30
6.2 Vacunación intramuscular.....	30
6.2.1 Organismos experimentales.....	30
6.2.2 Extracción de ADN con matriz de sílice.....	31
6.2.3 Inóculo viral.....	31
6.2.4 Determinación de la dosis experimental.....	32
6.2.5 Vacunación.....	32
6.2.6 Parámetros inmunológicos.....	33
6.2.6.1 Actividad de la fenoloxidasa.....	33
6.2.6.2 Actividad de la superóxido dismutasa.....	33
6.2.6.3 Cuantificación de proteínas totales.....	34
6.2.7 Reto experimental.....	34
6.2.8 Análisis estadístico.....	34
6.3 Vacunación oral.....	34
6.3.1 Organismos experimentales.....	34
6.3.2 Inóculo viral.....	35
6.3.3 Vacunación.....	35
6.3.4 Parámetros inmunológicos.....	36
6.3.5 Reto experimental.....	37
6.3.6 Análisis estadísticos.....	38
7. RESULTADOS.....	39
7.1 Construcción de la bionanovacuna VP28-M13.....	40
7.2 Interacción de VP28 con hemocitos de camarón.....	43
7.3 Vacunación intramuscular y reto experimental.....	44
7.4 Respuesta inmune ante vacunación intramuscular.....	46
7.5 Vacunación oral y reto experimental.....	48
7.6 Respuesta inmune ante vacunación oral.....	50
8. DISCUSIÓN.....	52
9. CONCLUSIONES.....	60
10. LITERATURA CITADA.....	61
11. ANEXOS.....	67

Lista de figuras

Figura 1. Electromicrografía del virión intacto de WSSV y sus nucleocápsides. Fuente: Comité Internacional en Taxonomía de virus (ICTV por sus siglas en inglés).	6
Figura 2. Representación circular del genoma del WSSV. Las flechas muestran las posiciones (fuera del anillo) de los 181 ORFs (rojo y azul indican las diferentes direcciones de transcripción) y los rectángulos verdes los sitios de restricción BamHI (anillo interior; sus posiciones están en paréntesis).	9
Figura 3. Principales proteínas estructurales del WSSV que participan en la infección mediante el acoplamiento, penetración o el tráfico de la nucleocápside al interior del núcleo de la célula hospedera. Basado en Chang et al. 2010, Li et al. 2005, Tsai et al. 2004, Wu et al. 2005, Xie et al. 2006 y Yi et al. 2003.	10
Figura 4. Ciclo de vida de los bacteriófagos filamentosos Ff. Se inicia con la adsorción del virus a la punta del pilus F+ de E. coli. La estructura compuesta por las cinco copias de pIII se ancla al F pilus con los dominios N2 y al periplasma con la unión del dominio N1 al dominio III de TolA. Luego el ADN es desnudado y liberado al citoplasma mediante la asociación de pVIII a la membrana interior de la célula. El ADN circular de cadena sencilla (ADNccs) es convertido a doble cadena y replicado mediante el mecanismo de círculo rodante. La transcripción y traducción de los genes virales producen una variedad de proteínas intracelulares las cuales contienen ADNccs unido con subunidades de la proteína pV excepto en un bucle de 30 nucleotidos. La proteína pVIII es sintetizada con una secuencia de péptido señal que facilita su transporte e inserción en la membrana bacteriana que luego es removida por una señal peptidasa. Se inicia el ensamblaje de la progenie cuando cinco subunidades de pVII y pIX se unen al bucle de ADNccs y las subunidades de pV son reemplazadas por subunidades de pVIII hasta que todo el ADN esté empacado. Finalmente se añaden cinco subunidades de pVI y pIII y el virión maduro es liberado al medio sin lisar la célula. (Modificado de Gagic et al. 2016)	15

Figura 5. Estructura de bacteriófago filamentoso y proteínas del virión comúnmente más usadas en despliegue en fago. (A) Virion visualizado por microscopio de fuerza atómica. (B) Diagrama esquemático del bacteriófago. (C) Representación de listón (vista superior y de lado) de la proteína de cubierta pVIII arreglada alrededor del ADN de cadena sencilla del bacteriófago. (D) Representación de listón de los dominios N1 y N2 de pIII (Gagic et al. 2016).	17
Figura 6. Camarón <i>L. vannamei</i> moribundo infectado con WSSV El animal muestra una coloración rojiza, por la expansión de cromatóforos, signo clínico de la infección	20
Figura 7. Vector fagémido pG8SAET basado en el gen VIII	23
Figura 8. Amplificación y clonación del gen <i>VP28</i> (615 bp). Los geles de agarosa muestran los productos de PCR de: (A) la amplificación de <i>VP28</i> usando ADN genómico de camarón <i>L. vannamei</i> infectado por WSSV como templado y (B) cinco clonas de <i>E. coli</i> transformadas con el gen <i>VP28</i> amplificado insertado en el fagémido pG8SAET basado en el fago M13 (<i>VP28</i> -pG8SAET) y el vector vacío.	39
Figura 9. Esquema general de la metodología y de los resultados obtenidos. El gen completo que codifica a la proteína antigénica <i>VP28</i> del WSSV fue clonado en el fagémido pG8SAET para el despliegue de múltiples copias de la proteína recombinante sobre la superficie del fago M13. La bionanovacuna producida fue administrada por vía intramuscular y oral a camarones <i>L. vannamei</i> , en dos bioensayos separados, y posteriormente retados experimentalmente con WSSV. Hubo una reducción de la mortalidad acumulada en los grupos tratados comparados con los grupos sin tratar.	40
Figura 10. Secuencia parcial de nucleótidos del fagémido <i>VP28</i> -pG8SAET y su traducción a aminoácidos. Se muestra la secuencia de nucleótidos correspondiente al gen completo <i>VP28</i> (615 pb) y su	41

traducción a aminoácidos en código de una letra (subrayado).

- Figura 11.** Fagos VP28-M13 y M13 purificados. Los fagos fueron purificados mediante doble precipitación con PEG/NaCl. Las flechas indican el botón que contiene los fagos recombinantes y silvestres. 42
- Figura 12.** Transcripción de VP28. El gel de agarosa muestra los productos de PCR de la amplificación de VP28 usando como templado ADNc proveniente del cultivo de *E. coli* transformada con el vector VP28-pG8SAET. 43
- Figura 13.** Detección de la unión de VP28 a la membrana de hemocitos de *L. vannamei* mediante ELISA. Los hemocitos fueron fijados e inmovilizados en una microplaca de 96 pozos. La unión entre la VP28 desplegada en la superficie del fago M13 y la membrana de los hemocitos fue detectada con un anticuerpo anti-M13 conjugado a HRP. El vehículo vacío M13 sirvió como control negativo. Los resultados se muestran como el promedio aritmético y las barras de error representan la desviación estándar. 44
- Figura 14.** Supervivencia del grupo inyectado intramuscularmente con la vacuna VP28 desplegada en el fago M13 (2×10^{10} cfu shrimp⁻¹) y retada 48 h después con WSSV. Los grupos M13 y TBS sirvieron como control positivo y negativo respectivamente. Las barras de error representan la desviación estándar. Las diferencias en la mortalidad entre los grupos VP28-M13 y M13 fueron analizados con la prueba Kaplan–Meier log-rank χ^2 45
- Figura 15.** Variación en la actividad de PO y SOD en la hemolinfa de *L. vannamei* vacunados con VP28 desplegada en fago y sus respectivos controles. Los resultados se muestran como el promedio aritmético y las barras de error la desviación estándar. No se encontraron diferencias significativas en estos parámetros inmunológicos entre los grupos en ninguno de los tiempos evaluados. 47
- Figura 16.** Vacunación oral forzada. Una punta de pipeta flexible y muy delgada fue introducida en la cavidad oral 48

para administrar el tratamiento y asegurar que todos los organismos recibieran el mismo volumen. Se utilizó un colorante vegetal rojo para visualizar la administración oral correcta. En la figura se puede observar el estómago coloreado sin derrames.

- Figura 17.** Supervivencia de los camarones tratados con la vacuna VP28 desplegada en fago y con el vehículo M13 (4×10^{10} ufc camarón⁻¹) y retados 3 días después con WSSV. Los grupos inyectados con TBS y que posteriormente fueron retados y no retados sirvieron como control positivo y negativo respectivamente. No se observó mortalidad en el control negativo 49
- Figura 18.** Supervivencia de los camarones tratados con la vacuna VP28 desplegada en fago y con el vehículo M13 (4×10^{10} ufc camarón⁻¹) y retados 14 días después con WSSV. Los grupos inyectados con TBS y que posteriormente fueron retados y no retados sirvieron como control positivo y negativo respectivamente. No se observó mortalidad en el control negativo. 50
- Figura 19.** Nivel de expresión relativa de los genes MnSOD y ALF en la hemolinfa de *L. vannamei* luego de 3 días de ser inyectados con la vacuna VP28 desplegada en fago y el M13. Los resultados se muestran como el promedio aritmético y las barras de error la desviación estándar. No se encontraron diferencias significativas en estos parámetros inmunológicos entre estos grupos. 51

Lista de tablas

Tabla I. Programa de PCR de colonia	22
Tabla II. Programa de PCR de colonia	26
Tabla III. Esquema de vacunación oral y reto experimental	30
Tabla IV. Porcentaje de mortalidad acumulada y porcentaje de sobrevivencia relativa (PSR) de <i>L. vannamei</i> inyectados con una dosis única de la vacuna VP28 desplegada en el fago (VP28-M13), M13 o TBS seguido de un reto intramuscular con WSSV	46

1. INTRODUCCIÓN

Durante los últimos 20 años, el virus del síndrome de la mancha blanca (WSSV por sus siglas en inglés) ha sido considerado el patógeno viral más importante para la industria del camarón en cultivo (Dutta *et al.*, 2013). El peligro de este patógeno radica en su alta virulencia, el amplio rango de hospederos y acarreadores que tiene, que se encuentra presente en todos los principales países productores y que puede provocar mortalidades acumuladas de hasta el 100% dentro de 3 a 7 días luego de que aparecen los primeros signos de la infección (Zhang *et al.*, 2010)

De dentro hacia afuera el virión contiene un genoma circular de doble cadena de alrededor de 300 kb (No. de acceso del GeneBank AF332093), una nucleocápside proteica, una delgada capa lipídica llamada tegumento y una envoltura lipídica que en conjunto forman una partícula viral elipsoide a baciliforme con un apéndice tipo cola en uno de sus extremos (Natividad *et al.*, 2007; Gracia– Valenzuela *et al.*, 2009; Sánchez-Paz, 2010).

Para defenderse de la infección, los camarones carecen de un sistema inmune adaptativo pero cuentan con una amplia variedad de mecanismos de respuesta inmune innata (Flegel y Sritunyalucksana, 2011). De hecho, numerosos estudios reportan la existencia de una respuesta inmune específica contra inmunógenos derivados de patógenos, lo que ha hecho pensar que es posible llevar a cabo una vacunación de estos organismos (Venegas *et al.*, 2000; Namikoshi *et al.* 2004; Ha *et al.*, 2008; Ng *et al.*, 2015). Las proteínas estructurales mayores del virión son las proteínas VP28, VP19, VP26 y VP15 (Chang *et al.*, 2010). Las proteínas estructurales son una rica fuente de inmunógenos protectores. La proteína VP28 es una de las proteínas más abundantes y expuestas en la envoltura del WSSV. Esta proteína es crucial en las primeras etapas de la infección ya que es capaz de unirse a los receptores presentes en la superficie de las células del huésped permitiendo la entrada del virus al citoplasma para iniciar el proceso infeccioso (Yi *et al.*, 2004). Se ha demostrado que la proteína VP28 puede ser una potencial vacuna de

subunidad al brindar una protección significativa a camarones y cangrejos contra la infección del WSSV (Ning *et al.*, 2009).

La producción de proteínas vacunales de bajo costo es de gran importancia. Regularmente las proteínas purificadas del patógeno tiene muy bajos rendimientos por lo que se han desarrollado muchos métodos para obtenerlas de manera recombinante, sin embargo, muchos de ellos pueden ser difíciles de realizar y su proceso de producción y purificación son caros y consume mucho tiempo. Diversos sistemas de expresión han sido usados para producir vacunas basadas en VP28 tales como bacterias Gram-negativas (Jha *et al.*, 2006; Namikoshi *et al.*, 2004) y Gram-positivas (Caipang *et al.*, 2008; Fu *et al.*, 2010), levaduras (Jha *et al.*, 2007; Yi *et al.*, 2014), células de insectos y gusanos de la seda (Wei y Xu, 2005; Xu *et al.*, 2006) con diferentes grados de éxito.

La nanotecnología está expandiéndose rápidamente en todos los campos de la ciencia, incluyendo el desarrollo de vacunas más efectivas (Zaman *et al.*, 2013). Los virus que infectan bacterias, llamados bacteriófagos o simplemente fagos, son considerados bionanopartículas dada su naturaleza, tamaño y forma cuya superficie puede ser funcionalizada por métodos biológicos o químicos con propósitos biomédicos como el desarrollo de vacunas (Kaur *et al.*, 2012; Bazan *et al.*, 2012). El despliegue en fagos (phage display) es una herramienta tecnológica muy poderosa que usa el material genético del fago o plásmidos llamados fagémidos para dirigir la síntesis de péptidos foráneos en fusión con las proteínas de cubierta del fago durante la infección bacteriana que finalmente son desplegadas en la superficie del virión cuando ocurre el ensamblaje (Arap, 2005). Las bionanovacunas compuestas por fagos que despliegan péptidos inmunogénicos son capaces de brindar protección contra patógenos (Houmiel y Degalli, 2009; Cen *et al.*, 2013). El uso del despliegue en fagos como un sistema de expresión de proteínas inmunogénicas recombinantes y como bionanopartícula acarreadora de estas proteínas aún no ha sido explorado en contra del WSSV. Algunas de las ventajas

para la utilización de los fagos (Grabowska *et al.*, 2000; Arap, 2005; Samaylova *et al.*, 2012) con este fin son:

1. Alta capacidad para aceptar ADN exógeno para propósitos de clonación,
2. Producción fácil, rápida y más económica comparada con otras tecnologías,
3. Purificación simple con alto grado de pureza,
4. Resistencia a estresores abióticos,
5. Alta biodegradabilidad que evita su acumulación en tejidos
6. Seguridad de uso demostrada por años de pruebas en humanos y animales sin efectos secundarios aparentes.
7. Propiedades de partícula tipo adyuvante
8. Respuesta inmune específica contra el péptido desplegado.

El fago comúnmente más usado en esta técnica es el M13. Este es una partícula viral filamentosa formada por cerca de 2700 subunidades de la proteína pVIII cerrada en un extremo por 3 a 5 subunidades de pVII y pIX y por el otro lado por 3 a 5 subunidades de pIII y pVI codificadas por los genes *gVIII*, *gVII*, *gIX*, *gIII* y *gVI* respectivamente. Los péptidos foráneos son introducidos dentro del genoma del fago, usualmente insertados en *gIII* o *gVIII*, consiguiendo que el producto del ADN foráneo sea expresado en fusión a las proteínas de cubierta del fago. El número de péptido exógenos por partícula viral depende de la proteína del fago seleccionada pudiendo variar entre 1 y miles de copias (Arap, 2005; Samaylova *et al.*, 2012).

Los fagos filamentosos han sido utilizados como partículas acarreadoras de péptidos contra cáncer (Eriksson *et al.*, 2009; Dominguez-Romero *et al.*, 2014), desórdenes neurológicos (Frenkel *et al.*, 2003) y enfermedades infecciosas. Los fagos que despliegan péptidos inmunogénicos de patógenos como el virus del herpes simple 2 (Grabowska *et al.*, 2000), virus de la rabia (Houimiel y Dellagi, 2009), VIH (De Berardinis *et al.*, 2003), *Candida albicans* (Yang *et al.*, 2005) y *Taenia solium* (Morales *et al.*, 2011), y otros más, fueron exitosamente usados para la inmunización de animales.

En acuicultura, el uso de fagos recombinantes como acarreadores de péptidos está limitado a unas pocas publicaciones (Yi *et al.*, 2003; Xia *et al.*, 2005; Cen *et al.*, 2013). En esta tesis, el fago filamentoso M13 fue usado para expresar múltiples copias de la proteína de envoltura VP28 del WSSV sobre su superficie. La capacidad de la proteína VP28 desplegada en el fago para unirse a la membrana de hemocitos de camarón y la eficacia de esta bionanovacuna para proteger a camarones *Litopenaeus vannamei* contra la infección por WSSV, así como la respuesta inmune del camarón contra la misma fue evaluada *in vivo*. Los resultados mostraron que la proteína VP28 puede ser expresada funcionalmente en el fago M13 y ser usada para reducir la mortalidad de camarones en una infección viral experimental.

2. ANTECEDENTES

2.1 Virus del síndrome de la mancha blanca

El virus del síndrome de la mancha blanca es uno de los principales patógenos en las granjas camaronícolas (Dutta *et al.*, 2013). Se trata de un patógeno muy virulento, con una amplia gama de hospederos y acarreadores, cuya infección es altamente contagiosa, alcanzando mortalidades acumuladas de hasta el 100% en 3 a 10 días posteriores a la aparición de los primeros signos clínicos (Zhang *et al.*, 2010). El primer brote de WSSV se registró en Taiwán en 1992 y rápidamente esta enfermedad se presentó en los principales países productores de Asia, América y Europa (Ligthner y Redman, 1998), donde se tuvieron altas mortalidades con pérdida total o parcial de la producción, merma en los parámetros productivos o disminución en la calidad del producto (Smith *et al.*, 2003). Esto ha sido tan grave que no solo ha disminuido las ganancias sino que ha acarreado pérdida de empleos, restricciones a la exportación y la disminución de la confianza del consumidor hacia el producto (Moser *et al.*, 2012). Las pérdidas económicas causadas se estiman en 1000 millones de dólares anuales. La necesidad de disminuir estas pérdidas han estimulado la investigación del virus y su interacción con el hospedero contribuyendo con ello a la escasa información disponible de virus marinos y de la respuesta del camarón a patógenos virales (Flegel, 2011).

2.1.1 Morfología y morfogénesis

Morfológicamente este es un gran virus envuelto, de 210 – 420 nm de longitud y de 70 – 167 nm de diámetro, con forma ovoide o elipsoide a baciliforme que presenta en uno de sus extremos un apéndice tipo cola formado por lípidos de la envoltura cuya función y estructura se desconoce (Figura 1). El virión está compuesto de exterior a interior de cuatro elementos: envoltura (grosor 6 – 7 nm), tegumento (bicapa lipídica de 2 – 7.5 nm), nucleocápside con forma de rodillo (longitud 180 –

420 nm, diámetro 54 – 85 nm y grosor 6 nm) y material genético (dsDNA 300 Kbp) (Gracia– Valenzuela *et al.*, 2009; Natividad *et al.*, 2007; Sánchez-Paz, 2010).

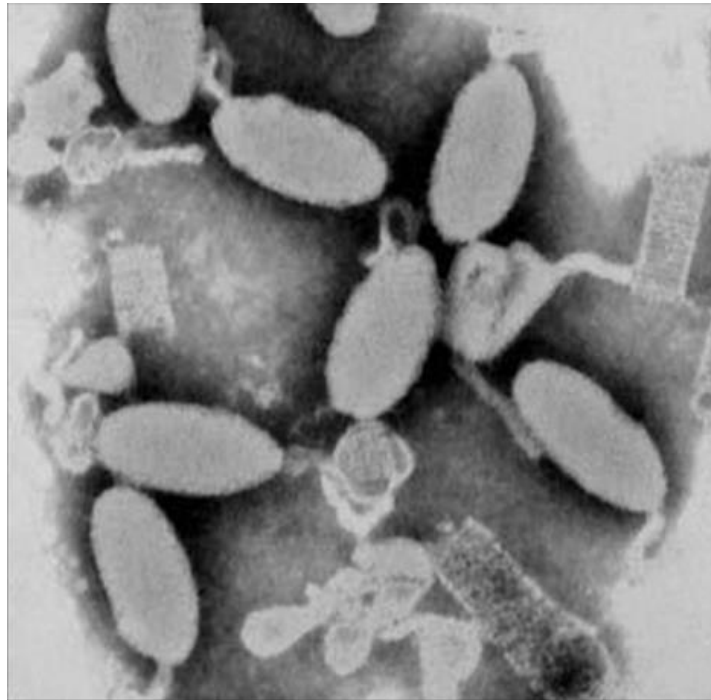


Figura 1. Electromicrografía del virión intacto de WSSV y sus nucleocápsides. Fuente: Comité Internacional en Taxonomía de virus (ICTV por sus siglas en inglés).

La replicación del WSSV se lleva a cabo en el núcleo donde se puede apreciar la marginación de la cromatina y la hipertrofia del núcleo. La morfogénesis inicia por la formación de la membrana *de novo* en el nucleoplasma y por la formación de largos túbulos segmentados vacíos. Estos túbulos se rompen en fragmentos para formar las nucleocápsides vacías. Posteriormente las membranas envuelven las cápsides dejando un extremo abierto por el que a continuación entran las nucleoproteínas. Cuando este proceso finaliza la envoltura se cierra originando la cola presente en el virión maduro (Durand *et al.*, 1997).

2.1.2 Hospederos y acarreadores

La principal vía de infección del WSSV es el consumo de organismos infectados. Debido a que los camarones practican el canibalismo de organismos débiles, moribundos o muertos, el virus se disemina rápida y efectivamente (Zhang *et al.*, 2010). Se conocen más de 93 especies de artrópodos hospederos o acarreadores mecánicos del WSSV (Escobedo-Bonilla *et al.*, 2008). Se han reportado infecciones naturales y experimentales en diversos peneidos de interés comercial tales como *Litopenaeus vannamei*, *Penaeus monodon*, *Litopenaeus stylirostris*, *Marsopenaeus japonicus* y *Ferfenpenaeus chinensis* (Reddy *et al.*, 2013). Los poliquetos son vectores pasivos del WSSV capaces de transmitir la enfermedad al usarse como alimento vivo para *P. monodon* (Vijayan *et al.*, 2005). Los rotíferos son vectores potenciales del virus para el cangrejo de río y otros crustáceos de interés comercial. Otro peligro potencial son las aguas de efluentes que pueden diseminar al patógeno (Esparza-Leal *et al.*, 2010).

2.1.3 Órganos y tejidos blanco

Existe una estrecha relación entre el WSSV y la hemolinfa (Wang *et al.*, 2002). Los hemocitos son las únicas células en la hemolinfa y son uno de las células blanco para la infección (Tang y Lightner, 2000). El virus ha sido detectado en los hemocitos semigranulares (SGC) y en los granulares (GC) pero no en los hialinos (HC). Aparentemente los SGC son más susceptibles a la infección y presentan mayores cargas virales y más rápido progreso de la infección (Wang *et al.*, 2002; Jiravanichpaisal *et al.*, 2006). Otros órganos susceptibles son epidermis, branquias, intestino anterior, ciego, glándula antenal, órgano linfoide, músculo, tallo del ojo, corazón, gónadas, epitelio cuticular del cuerpo, células hematopoyéticas y células asociadas al sistema nervioso, pleopodos, pereopodos, testículos y ovarios. Los análisis de carga viral sugieren que los mayores órganos diana para la replicación

son las branquias, el estómago y el epitelio cuticular del cuerpo, tejido hematopoyético, órgano linfoide y glándula antenal.

2.1.4 Signos de la infección

El síndrome de la mancha blanca recibe ese nombre debido a la acumulación de carbonato de calcio en la cutícula que da lugar a la aparición de manchas blancas de 0.5 a 3 mm de diámetro en el exoesqueleto, apéndices y en el interior de la epidermis (Lightner y Pantoja, 2003). Este no es un signo que se encuentra presente en todos los casos y no es patognomónico de la enfermedad pues puede presentarse en infecciones bacterianas, y condiciones de alta alcalinidad y estrés. Otros signos de la enfermedad que se también se presentan en la fase aguda de la enfermedad son la coloración rojiza del cuerpo y apéndices, anorexia, letargo, nado errático, acumulación de fluidos en las branquias, agrandamiento y coloración amarillenta del hepatopáncreas, adelgazamiento de la hemolinfa y pérdida de cutícula entre otros (Escobedo-Bonilla *et al.*, 2008).

2.1.5 Genoma del WSSV

El genoma del WSSV está compuesto de ADN circular de doble cadena de aproximadamente 305 kb (Figura 2). Fue el primer genoma completo de un virus que infecta invertebrados marinos en ser secuenciado en su totalidad (Yang *et al.*, 2001) y es uno de los genomas virales más grandes que se han secuenciado (<http://www.giantvirus.org/2014-04-14top.html>). Contiene entre 531 y 684 marcos de lectura abiertos (ORFs) con el codón de inicio ATG de los cuales se estima que 180 codifican para proteínas funcionales. Se calcula que entre el 70 y 80% de las proteínas codificadas no comparten identidad con las reportadas en las bases de datos (Chen *et al.* 2010, Yang *et al.*, 2001) y se desconoce su función. Debido a la baja homología con otros virus de DNA conocidos (Mayo, 2002; van Hulten *et al.*,

2001) es el único miembro de la nueva familia Nimaviridae y ha sido colocado en el género Whispovirus (www.ncbi.nih.gov/ICTVdb/Ictv/index.htm).

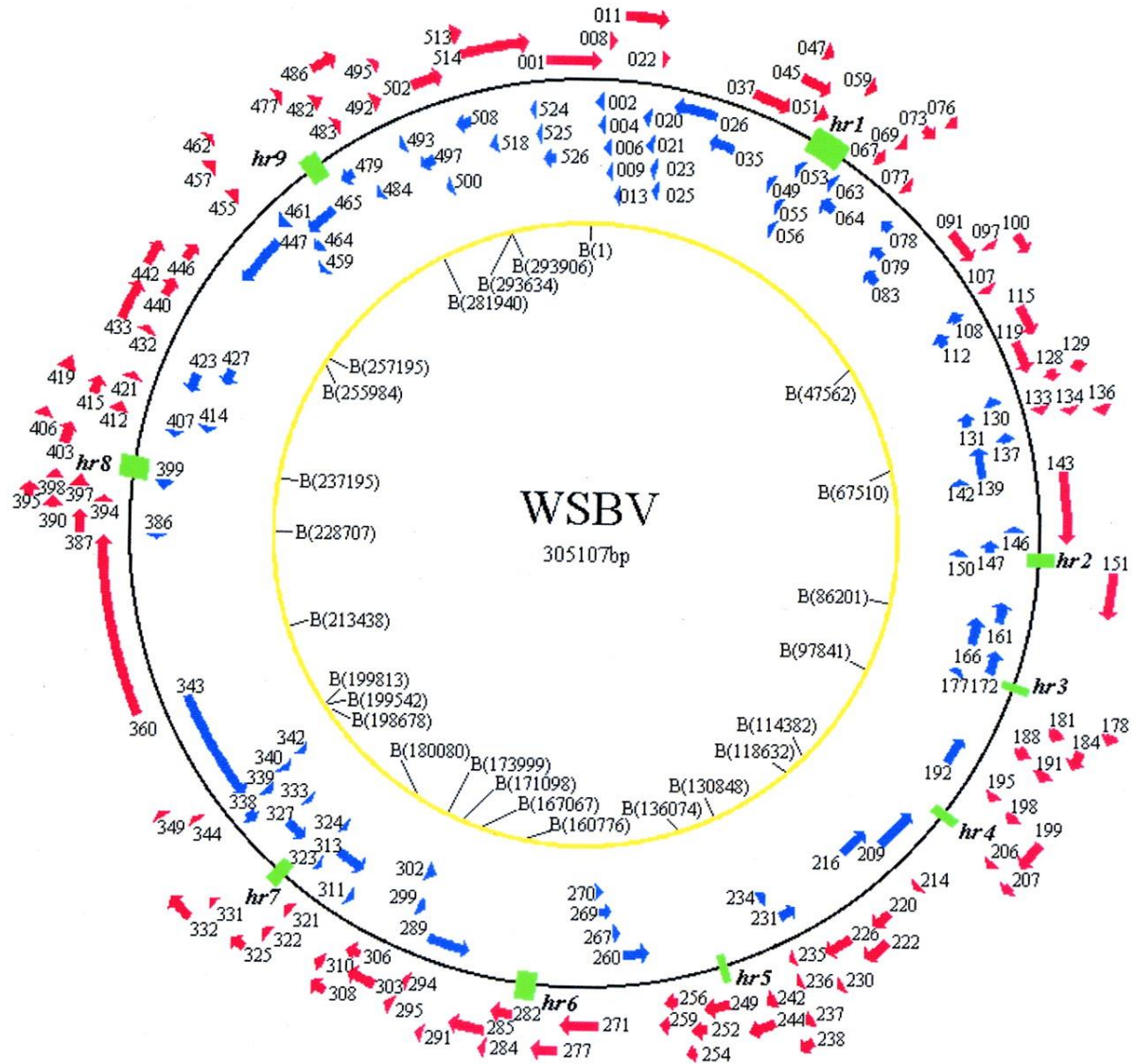


Figura 2 Representación circular del genoma del WSSV. Las flechas muestran las posiciones (fuera del anillo) de los 181 ORFs (rojo y azul indican las diferentes direcciones de transcripción) y los rectángulos verdes los sitios de restricción BamHI (anillo interior; sus posiciones están en paréntesis). Fuente: Yang *et al.*, 2001.

2.1.6 Proteínas estructurales

Las proteínas estructurales son importantes para el virus pues resguardan el material genético y sus dominios son los primeros en interactuar con el hospedero iniciando el proceso infeccioso. Por lo anterior se les considera los primeros blancos en las estrategias de neutralización o las candidatas más probables para el desarrollo de vacunas. Se conocen 58 proteínas estructurales del WSSV de las cuales al menos 30 se encuentran en la envoltura (Chang *et al.*, 2010). Se les ha asignado nombre de acuerdo a su peso molecular aparente estimado por SDS-PAGE o por el número de residuos de aminoácidos que las conforman (Bustillos-Ruiz *et al.*, 2009). La proteína VP28 (la más estudiada) y la VP19 se consideran las proteínas más abundantes de la envoltura mientras que VP24 y VP26 lo son en el tegumento (Yi *et al.*, 2003; Flegel y Sritunylucksana, 2010).

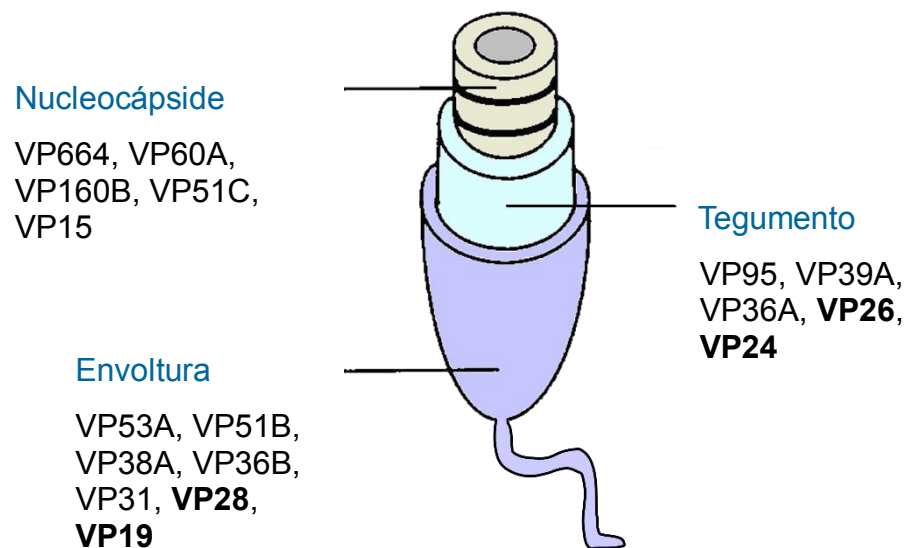


Figura 3. Principales proteínas estructurales del WSSV que participan en la infección mediante el acoplamiento, penetración o el tráfico de la nucleocápside al interior del núcleo de la célula hospedera. Basado en Chang *et al.* 2010, Li *et al.* 2005, Tsai *et al.* 2004, Wu *et al.* 2005, Xie *et al.* 2006 y Yi *et al.* 2003.

2.1.7 Uso de proteínas protectoras contra el WSSV

Como una nueva estrategia para disminuir la mortalidad por WSSV se han administrado proteínas virales o los genes que las codifican a crustáceos. Se han usado partículas virales inactivadas (Namikoshi *et al.*, 2004; Zhu *et al.*, 2009), proteínas aisladas y recombinantes (Du *et al.*, 2006; Caipang *et al.*, 2008; Satoh *et al.* 2008) demostrando que esta medida es efectiva para lograr proteger a los camarones del WSSV. Mediante una aproximación diferente, se ha propuesto la implementación de una inmunización pasiva donde el virus es neutralizando *in vitro* e *in vivo* usando anticuerpos monoclonales y policlonales (Kim *et al.*, 2004; Jiang *et al.*, 2007; Natividad *et al.*, 2007; Ha *et al.* 2008; Lu *et al.* 2008, 2009). Con la misma idea en mente se logró identificar un péptido que se une al virión y es capaz de neutralizarlo (Yi *et al.* 2003). En todos los casos se ha conseguido una reducción de la proliferación viral y un incremento de la sobrevivencia a nivel experimental. Además del control de la enfermedad, los anticuerpos anti-WSSV han sido utilizados para el mapeo de epítopes, el estudio del virus permitiendo relacionar a las proteínas VP24, VP28, VP31, VP33, VP36, VP68, VP281 y VP466 al proceso infectivo y su detección en inmunoensayos (Takahashi *et al.*, 2003; Yi *et al.*, 2004; Wu *et al.*, 2005; Li *et al.*, 2006; Xie y Yang, 2006; Escobedo-Bonilla *et al.*, 2008,).

2.1.7.1 Proteína VP28 como agente vacunal

La proteína VP28 ha sido expresada en múltiples sistemas de expresión y usada a manera de vacuna para incrementar la sobrevivencia de crustáceos ante infecciones experimentales del WSSV. Algunos de los sistemas utilizados son bacterias Gram-negativas (Namikoshi *et al.*, 2004; Jha *et al.*, 2006) y Gram-positivas (Caipang *et al.*, 2008; Fu *et al.*, 2010), levaduras (Jha *et al.*, 2007; Yi *et al.*, 2014), células de insectos y gusanos de la seda (Wei y Xu, 2005; Xu *et al.*, 2006) con diferentes grados de éxito. Du *et al.* (2006) compararon el uso de VP28 expresada en *E. coli* y en células de insecto observando que la expresada en un sistema

eucarionte obtuvo el porcentaje de sobrevivencia relativa más alto probablemente gracias a modificaciones pos-transcriptacionales que el sistema procarionte no puede realizar. Sin embargo, Namikoshi *et al.* (2004) demostró que el uso de *E. coli* como biorreactor para la producción de la proteína recombinante VP28 puede proteger efectivamente con PSR de 95% incrementando la dosis utilizada. Este agente vacunal ha probado ser efectivo al ser administrado por vía intramuscular y oral (Jha *et al.*, 2006b). La vía intramuscular no es una forma de vacunación práctica en la camaronicultura por lo que Witteveldt *et al.* (2004) reportan un incremento en la sobrevivencia de camarones luego de haber incorporado la proteína VP28 recombinante al alimento comercial pelletizado. El efecto protector de VP28 no va más allá de tres semanas luego de la vacunación.

2.2 Nanovacunas basadas en fagos filamentosos

La nanotecnología está expandiéndose rápidamente en todos los campos de la ciencia, incluyendo el desarrollo de vacunas más efectivas (Zaman *et al.*, 2013). Los virus que infectan bacterias, llamados bacteriófagos o simplemente fagos, son considerados bionanopartículas dada su naturaleza, tamaño y forma cuya superficie puede ser funcionalizada por métodos biológicos o químicos con propósitos biomédicos como el desarrollo de vacunas (Bazan *et al.*, 2012; Kaur *et al.*, 2012). Las bionanovacunas basadas en fagos están compuestas por el fago que actúa como una nanopartícula y por al menos una copia de un péptido antigénico.

Algunas de las ventajas para la utilización de los fagos como nanopartículas son que están hechas por la naturaleza, se autoensamblan, son muy estables y se encuentran monodispersos en solución (Kaur *et al.*, 2012). Los fagos pueden ser producidos de forma fácil y económica con procesos de purificación sencillos que permiten la recuperación de las partículas virales con alto grado de pureza. Además, a diferencia de algunas nanopartículas metálicas no se acumulan en los tejidos pues son biodegradables (Tothova *et al.*, 2012; García-Alonso *et al.*, 2014).

2.2.1 Bacteriófagos

Los bacteriófagos o simplemente fagos son virus que infectan bacterias y están presentes en todos los ecosistemas del mundo dentro de sus huéspedes o en forma libre bajo un rango de condiciones ambientales jugando un rol primordial en la evolución de los microorganismos al movilizar ADN entre ellos (Arap, 2005).

La contribución de los fagos a la ciencia es enorme. Luego de su descubrimiento se empezaron a utilizar para combatir infecciones bacterianas en la llamada terapia fágica, misma que ante la fármacorresistencia de nuestros días se encuentra emergiendo como una alternativa de control de enfermedades. Más tarde fueron usados para desarrollar vectores de clonación y plataformas de expresión sentando la base de la biología molecular. Posteriormente, fueron la base para la producción de las llamadas partículas tipo virus (VLPs por sus siglas en inglés) que consisten en una nucleocápside viral que carece de material genético y que fue desarrollada para crear nuevas vacunas contra enfermedades virales y más adelante para combatir enfermedades no infecciosas como el cáncer.

2.2.1 Biología y estructura de los fagos filamentosos

Los fagos filamentosos tienen forma de cilindro delgado y flexible y contienen genomas de ADN de cadena sencilla. Se clasifican dentro del género *Inovirus* en la familia *Inoviridae* que agrupa a 36 especies que infectan a bacterias Gram-

negativas. Otras 27 especies más se encuentran en espera de aprobación para pertenecer a esta familia entre las cuales se encuentran dos que infectan bacterias Gram-positivas (Day, 2011). Los bacteriófagos filamentosos o simplemente fagos filamentosos no son líticos, son ensamblados en la membrana del huésped (Figura 4), donde las subunidades de la proteína mayor de la cápside pVIII reemplazan a la proteína de unión a ADN de cadena sencilla pV para ser constantemente extruidos al medio sin matar a la célula infectada por lo que al dividirse continua la replicación viral indefinidamente. Los viriones presentan diámetros de 7 ± 1 nm y longitudes cercanas a los 1000 nm. Cada virión está compuesto por miles de copias de la proteína mayor pVIII (5.2 kDa), que forma un cilindro alrededor del ADN cuya longitud dependerá del tamaño del genoma, y solo cinco copias de cada una de las cuatro proteínas menores pIII (43 kDa), pVI (12 kDa), pVII (3.5 kDa) y pIX (3.3 kDa) en los extremos; las dos primeras permiten el acoplamiento y estabilización durante la infección mientras que las otras dos son responsables del inicio del proceso de ensamblaje en la membrana celular del huésped (Gagig *et al.*, 2016).

Los fagos filamentosos Ff compuestos por los virus fd, f1 y M13 son los fagos más estudiados y explotados. Estos tres fagos tienen estructuras idénticas y su genoma de 6.4 kb solo difiere en aproximadamente el 1% en la posición de sus nucleótidos. Su genoma está compuesto por 11 genes donde g2, g5 y g10 intervienen en la replicación, g7, g9, g8, g3 y g6 codifican para proteínas estructurales y g1, g4 y g11 participan en la morfogénesis. El virión está compuesto por 2700 subunidades de pVIII. Esta es una proteína de 50 residuos de aminoácidos con forma de α -hélice extendida (Figura 5). El dominio N-terminal mantiene la solubilidad del virión, mientras que el dominio central hidrofóbico estabiliza la interacción entre las subunidades y el extremo C-terminal interactúa con el ADNccs.

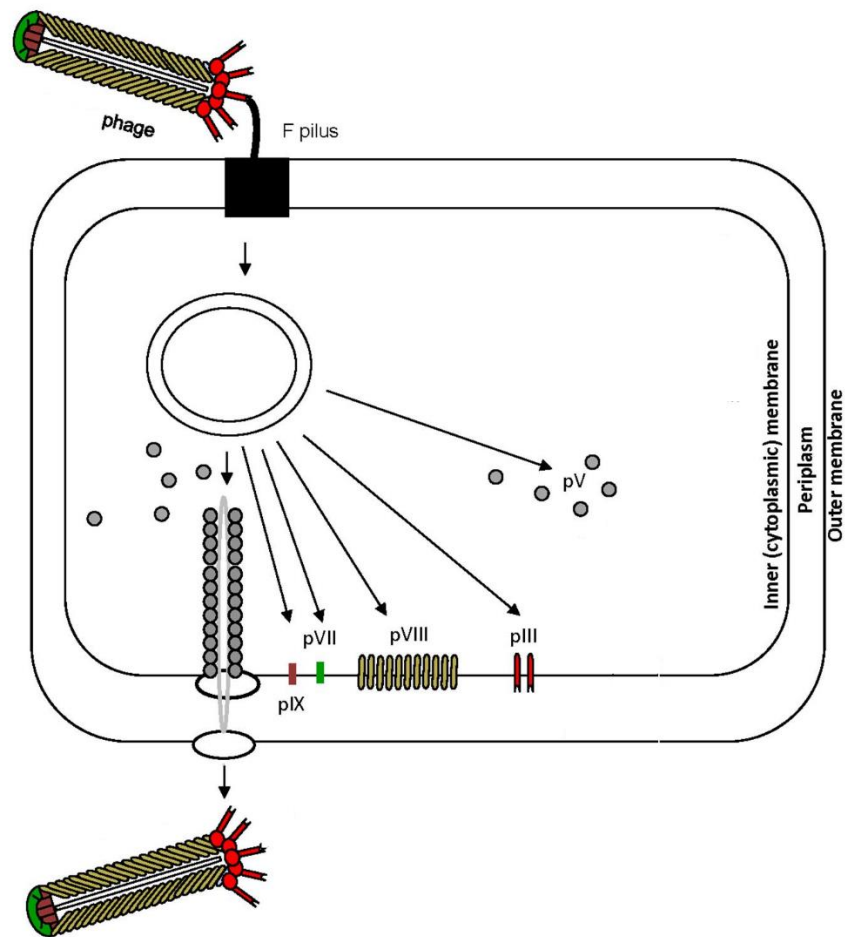


Figura 4. Ciclo de vida de los bacteriófagos filamentosos Ff. Se inicia con la adsorción del virus a la punta del pilus F+ de *E. coli*. La estructura compuesta por las cinco copias de pIII se ancla al F pilus con los dominios N2 y al periplasma con la unión del dominio N1 al dominio III de TolA. Luego el ADN es desnudo y liberado al citoplasma mediante la asociación de pVIII a la membrana interior de la célula. El ADN circular de cadena sencilla (ADNccs) es convertido a doble cadena y replicado mediante el mecanismo de círculo rodante. La transcripción y traducción de los genes virales producen una variedad de proteínas intracelulares las cuales contienen ADNccs unido con subunidades de la proteína pV excepto en un bucle de 30 nucleótidos. La proteína pVIII es sintetizada con una secuencia de péptido señal que facilita su transporte e inserción en la membrana bacteriana que luego es removida por una señal peptidasa. Se inicia el ensamblaje de la progenie cuando cinco subunidades de pVII y pIX se unen al bucle de ADNccs y las subunidades de pV son reemplazadas por subunidades de pVIII hasta que todo el ADN esté empaquetado. Finalmente se añaden cinco subunidades de pVI y pIII y el virión maduro es liberado al medio sin lizar la célula. (Modificado de Gagic *et al.*, 2016)

2.2.3 Despliegue en fagos

Los bacteriófagos filamentosos pueden ser fácilmente manipulados genéticamente. El phage display o despliegue en fagos es una biotecnología a escala nanométrica líder en la selección de péptidos con afinidad por dianas específicas. Consiste en la modificación de la superficie del virión mediante ingeniería genética para conseguir decorar al fago con péptidos o proteínas foráneas de interés en fusión con las proteínas estructurales del virus silvestre que pueden ser tamizados dada su afinidad por una molécula específica. El M13 fue el primer fago utilizado en esta técnica y continúa siendo el más usado alrededor del mundo (Schirrmann *et al.* 2011).

Entre una amplia variedad de aplicaciones, el despliegue en fagos logra encontrar interacciones entre proteína-proteína que permite el estudio de patógenos y sus hospederos, el descubrimiento de antígenos y epítopes protectores, péptidos antimicrobiales/virales, así como la selección de anticuerpos capaces de detectar o neutralizar patógenos. Además se ha demostrado que puede ser un ventajoso vehículo de administración de péptidos antigénicos (Xiao *et al.*, 2006; González *et al.*, 2010; Youtong *et al.*, 2011; Delhalle *et al.*, 2012).

La arquitectura de los fagos filamentosos hace que las cinco proteínas de la cápside sean accesibles al exterior del virión y por tanto todas ellas pueden ser usadas para el despliegue en fagos, sin embargo, pIII y pVIII son por mucho las proteínas más utilizadas con este fin. Solo pIII y pVIII son sintetizadas como precursores conteniendo una secuencia señal en el extremo N-terminal que permite su traslocación desde el citosol hasta el periplasma de *E. coli*, esta característica es importante para el despliegue en fago. El péptido o proteína foránea puede ser insertada en el genoma del fago o en un plásmido llamado fagémido en cuyo caso requerirá el uso de un fago auxiliador para producir un virión (Arap, 2005).

En el despliegue en fusión a pVIII se prefiere el uso de péptidos pequeños mientras que la proteína pIII permite desplegar péptidos de mayor tamaño (Iannolo *et al.*, 1995; Malik *et al.*, 1996,). Esta característica permite que péptidos antigénicos

foráneos sean desplegados en la superficie exterior del virión en fusión a sus proteínas estructurales para ser explotados en la creación de bibliotecas de anticuerpos o péptidos desplegadas en fagos, diseño de fármacos y el desarrollo de vacunas contra enfermedades infecciosas y no infecciosas. Como acarreadores de vacunas, los bacteriófagos han demostrado provocar una respuesta celular y humoral contra varios agentes patógenos a través del despliegue de anticuerpos en sus proteínas de cubierta (van Houten *et al.*, 2010; Samoylova *et al.*, 2012).

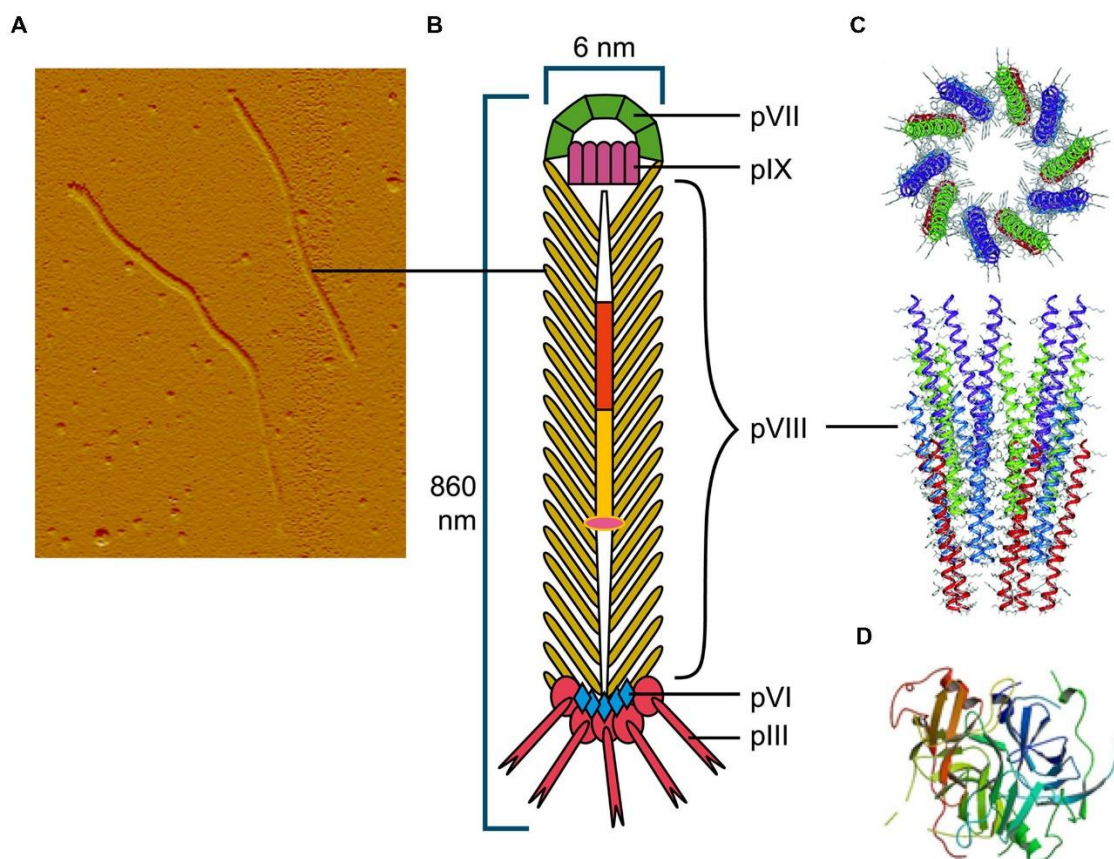


Figura 5. Estructura de bacteriófago filamentoso y proteínas del virión comúnmente más usadas en despliegue en fago. (A) Virion visualizado por microscopio de fuerza atómica. (B) Diagrama esquemático del bacteriófago. (C) Representación de listón (vista superior y de lado) de la proteína de cubierta pVIII arreglada alrededor del ADN de cadena sencilla del bacteriófago. (D) Representación de listón de los dominios N1 y N2 de pIII (Gagic *et al.*, 2016).

3. JUSTIFICACIÓN

Durante décadas, por su alta demanda y gran valor económico, el camarón fue el producto alimenticio de origen marino más importante en el comercio mundial, ocupando en la actualidad el segundo lugar. El aporte de la acuicultura a la producción global es cada vez mayor gracias a que esta actividad se ha extendido, intensificado y avanzado tecnológicamente. En el 2015 el camarón cultivado representó el 56% de la producción total con un valor de \$23,583 millones de dólares. Ese año México produjo 194,230 t con un valor de \$667, 415 millones de dólares (FAO, 2016).

La camaronicultura es una industria en crecimiento cuyo futuro y estabilidad se encuentra amenazada por los estragos causados por patógenos. Tan es así que la Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura (FAO) considera dentro de sus estatus y tendencias al desarrollo de vacunas contra los virus de camarón como un área prioritaria de investigación. A pesar de la incidencia de otras enfermedades y el decremento en los casos en los países en desarrollo, el WSSV continúa siendo un problema de salud muy importante en las granjas. La vacunación es crítica para el combate de la infección por WSSV. La adopción de nuevas tecnologías que permitan contribuir a la búsqueda de vacunas efectivas y de menor costo contra el virus deben ser abordadas. El aprovechamiento de los fagos filamentosos como nanopartículas acarreadoras de agentes vacunales es un trabajo pionero en la aplicación de la nanotecnología para el desarrollo de vacunas destinadas a proteger a los camarones en cultivo.

4. HIPÓTESIS

Si la proteína de envoltura VP28 del WSSV, usada como vacuna, protege a camarones contra la infección y los fagos filamentosos han sido utilizados como nanovehículos para expresar y acarrear proteínas vacunales reteniendo sus propiedades, entonces, múltiples copias de la proteína VP28 desplegada en la superficie del fago M13 reducirá la mortalidad de camarones *Litopenaeus vannamei* por infección con WSSV.

5. OBJETIVOS

5.1 Objetivo general

Desarrollar y evaluar una bionanovacuna contra el virus del síndrome de la mancha blanca usando al fago filamentosos M13 como acarreador para la proteína vacunal VP28.

5.2 Objetivos particulares

1. Desplegar la proteína vacunal VP28 en la superficie del fago M13 en fusión a la proteína de la cápside pVIII
2. Demostrar la funcionalidad de la proteína VP28 desplegada
3. Evaluar la eficiencia de la vacuna VP28-M13 administrada por vía intramuscular y oral para proteger camarones *L. vannamei* mediante un reto con WSSV.
4. Evaluar la respuesta inmune del camarón frente a la vacuna VP28-M13

6. MATERIALES Y MÉTODOS

6.1 Construcción de la bionanovacuna

6.1.1 Extracción de ADN genómico de WSSV

Camarones *Litopenaeus vannamei* de aproximadamente 4 g de peso fueron recibidos de una granja local en Sinaloa, México donde había ocurrido una mortalidad asociada al WSSV (Figura 6).



Figura 6 Camarón *L. vannamei* moribundo infectado con WSSV El animal muestra una coloración rojiza, por la expansión de cromatóforos, signo clínico de la infección

L x g Los organismos presentaban una marcada coloración rojiza por expansión de cromatóforos y fueron analizados en pool de tres organismos habían resultado positivos a la infección por WSSV mediante análisis de PCR. Se extrajo ADN total a partir de una muestra de 25 mg de tejido al que se añadieron 400 μ L de buffer de lisis (Tris 50 mM, EDTA 100 mM, NaCl 100 mM, SDS 1%) y 10 μ L de proteinasa K (20 mg mL⁻¹). Luego de una incubación en baño maría en termoblock a 60° C por 40 min se procedió a macerar con pistilo estéril. El homogenizado se incubó a

60 °C por 30 min. Se añadieron 200 μ L de NaCl 5 M y se agitó vigorosamente. Se incubó en hielo por 10 min y se centrifugó a 12,000 g por 10 min a temperatura ambiente. Aproximadamente 500 μ L de sobrenadante fueron transferidos a un tubo estéril donde se le añadió 1 mL de etanol absoluto frío. El ADN se dejó precipitando toda la noche a -20° C. Se centrifugó a 12,000 g por 10 min a temperatura ambiente. Se retiró el sobrenadante y los restos de etanol fueron evaporados al aire. El ADN fue resuspendido en 50 μ L de agua libre de nucleasas.

6.1.2 Amplificación del gen VP28

El gen VP28 (GenBank No. de acceso DQ681069) fue amplificado a partir de ADN total extraído de músculo de camarón infectado con el WSSV. Se diseñaron los primers *VP28-FW* 5'-CGCGGATCCGATGGATCTTTCTTTCCTTTC-3' y *VP28-RV* 5'-CCGGAATTCTTACTCGGTCTCAGTGCCAG-3' para la amplificación de la secuencia completa del gen (615 bp) que codifica para la proteína VP28 del WSSV añadiendo sitios de restricción para las enzimas Nco I y SnaB I.

Las reacciones de PCR se realizaron utilizando una mezcla con la siguiente composición:

Buffer GoTaq Flexi 5X	2.5 μ L
MgCl ₂ (25 mM)	1.0 μ L
Primer VP28-FW (25 pM)	0.5 μ L
Primer VP28-RV (25 pM)	0.5 μ L
Polimerasa GoTaq	0.063 μ L
Templado (50 ng μ L ⁻¹)	1.0 μ L
dNTPs (10 mM c/u)	0.25 μ L
<u>H₂O</u>	<u>6.687 μL</u>
Vol. total de reacción	12.5 μL

Se realizó un PCR de gradiente a partir del cual se estableció el programa para la realización de PCR utilizando el termociclador Peltier Thermal Cycler de BioRad que se describe en la tabla I.

Tabla I. Programa de PCR para la amplificación del gen VP28

Paso	Temperatura	Tiempo	No. de Ciclos
Desnaturalización Inicial	94 °C	3 min	1 ciclo
Desnaturalización	94 °C	10 seg	
Alineamiento	60 °C	45 seg	30 ciclos
Elongación	72 °C	1 min	
Elongación Final	72 °C	5 min	1 ciclo
Final	25 °C	∞	Indefinido

Los productos de PCR se analizaron mediante electroforesis en gel de agarosa al 0.8% en buffer TAE 1X adicionado con Syber Green.

6.1.3 Amplificación del fagémido

El fagémido fue amplificado en células de *E. coli* transformadas con el vector pG8SAET (Figura 7). Estas se cultivaron en medio LB conteniendo 50 µg mL⁻¹ de carbamicilina por 18 h con agitación a 250 rpm. El fagémido fue aislado utilizando el Zippy Plasmid Miniprep Kit (Zymo Research) siguiendo las instrucciones del proveedor. Brevemente, 3 mL de cultivo fueron centrifugados a máxima velocidad por 30 seg. El sedimento fue resuspendido en 600 µL de agua MQ. Se añadieron 100 µL de buffer de lisis 7X y se homogenizó por inversión. Se adicionaron 350 µL de buffer de neutralización frío y se mezcló vigorosamente. Se centrifugó a 13,000 g por 4 min. Cerca de 900 µL de sobrenadante se colocaron en una microcolumna dentro de tubo colector y se centrifugó por 15 seg. Se lavó la columna con 200 µL de buffer de lavado. Después de centrifugar por 30 seg se añadieron 400 µL de

buffer de lavado. Se centrifugó por 1 min y se añadieron 30 μ L de buffer de elusión. Luego de esperar un minuto, el ADN plasmídico se eluyó centrifugando 30 seg. Se corrió un gel de agarosa al 0.8% en buffer TAE 1X en presencia de bromuro de etidio para comprobar la integridad del fagémido.

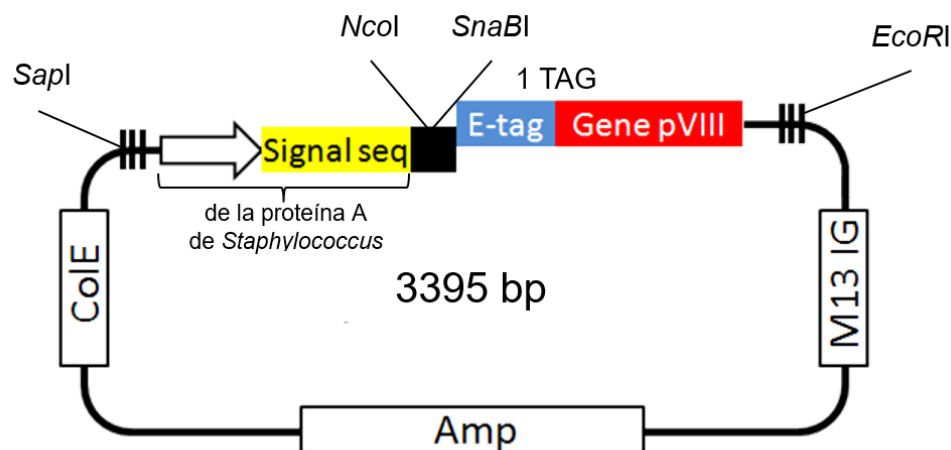


Figura 7. Vector fagémido pG8SAET basado en el gen VIII.

6.1.4 Digestión con enzimas de restricción

Tanto el producto de PCR de la amplificación del gen *VP28* como el fagémido pG8SAET fueron digeridos con las enzimas de restricción SnaBI y NcoI (New England). Se inició la digestión con SnaBI utilizando 12.5 U de enzima en un volumen de reacción de 25 μ L. Luego de una hora y media de incubación a 37 °C se tomó una alícuota y se corrió en gel de agarosa al 0.8% para verificar la digestión del plásmido superenrollado. La actividad de la enzima SnaBI fue detenida incubando la mezcla a 80 °C por 20 min. Se realizó una purificación usando el kit Wizard SV Gel and PCR Clean-Up System (Promega). La digestión con la enzima NcoI se realizó en un volumen de reacción de 50 μ L usando 25 U de enzima. Luego de una hora de incubación a 37 °C se tomó una alícuota y se corrió en gel de

agarosa al 1.5%. La actividad de la enzima Nco I fue detenida incubando la mezcla a 65 °C por 20 min. Se realizó una purificación usando el kit Wizard SV Gel and PCR Clean-Up System (Promega). Finalmente, en ambos casos, se realizó la desfosforilación del extremo 5' del ADN incubando a 37 °C por 45 min con fosfatasa alcalina de intestino de ternero (New England) en un volumen de reacción de 10 µL. Se realizó una purificación de los productos digeridos usando el kit Wizard SV Gel and PCR Clean-Up System (Promega).

6.1.5 Ligación

El gen que codifica por la proteína VP28 fue insertado en el fagémido pG8SAET mediante el uso de la enzima ADN ligasa de T4 (Invitrogen). Se utilizó una relación molar de 1:10 de vector respecto a inserto en un volumen de reacción de 10 µL. La ligación se realizó a 16 °C durante toda la noche. La reacción fue detenida inactivando la enzima a 70 °C por 10 min. Se realizó una purificación de los productos ligados usando el kit Wizard SV Gel and PCR Clean-Up System (Promega).

6.1.6 Transformación

Células de *E. coli* fueron transformadas con el fagémido pG8SAET conteniendo el gen exógeno VP28 del WSSV (VP28-pG8SAET) y el vector vacío (pG8SAET) mediante electroporación.

6.1.6.1 Células electrocompetentes

Se prepararon células de *E. coli* cepa TG1 electrocompetentes de la siguiente manera. Se cultivaron células de TG1 en medio LB durante toda la noche a 37 °C con agitación a 250 rpm. Se realizó un subcultivo en medio SOB de las células

cultivadas la noche anterior. El cultivo se mantuvo a 37 °C con agitación a 250 rpm hasta alcanzar una densidad óptica a 550 nm (OD550) de 0.7. Las células se cosecharon por centrifugación a 8000 x g por 10 min a 4 °C y se resuspendieron en agua conteniendo glicerol al 10% (v/v). Las bacterias fueron centrifugadas y lavadas en las mismas condiciones en dos ocasiones más. Las células electrocompetentes fueron alicuotadas y almacenadas a -80 °C.

6.1.6.2 Transformación por electroporación

Las células electrocompetentes fueron transformadas por electroporación. Se mezclaron 45 µL de células electrocompetentes con 100 ng de VP28-pG8SAET y se colocaron en una cubeta de electroporación. Se realizó una electroporación a 2.5 volts, 25 µFD de capacitancia y 200 Ω de resistencia en electroporador Biorad Gene Pulser™. Enseguida se agregó 1 mL de medio SOC con el propósito de recuperar las células de la cubeta. Las células se incubaron por 45 min a 37 °C. Posteriormente, usando un asa de Digrafsky, fueron esparcidas en la superficie de placas LB-Cab e incubadas a 37 °C por toda la noche para seleccionar células transformadas. Se utilizaron pG8SAET y PUC19 como controles de la transformación.

6.1.7 PCR de colonia

Se seleccionaron 45 unidades formadoras de colonia al azar y se sometieron a PCR de colonia. Una porción de cada colonia seleccionada fue colocada en una caja maestra para su conservación usando un palillo estéril y el resto se depositó en un microtubo que contenía 20 µL de agua libre de nucleasas. La mezcla fue sometida a lisis por alta temperatura a 85 °C por 5 min y centrifugada a 3,000 x g por 3 min para obtener los ácidos nucleicos y retirar los restos celulares.

Las reacciones de PCR de colonia se realizaron utilizando una premezcla con la siguiente composición:

Buffer 10X	2.5 μ L
MgCl ₂ (25 mM)	0.75 μ L
Primer F8 (25 pM)	1.0 μ L
Primer PYSAET (25 pM)	1.0 μ L
Polimerasa Alta Enzima (NEB)	0.3 μ L
dNTPs (10 mM c/u)	1.0 μ L
H ₂ O	13.45 μ L
Vol. total de premezcla	20.0 μL
<u>Templado</u>	<u>5.0 μL</u>
Vol. total de reacción	25.0 μL

Se realizó una PCR en el termociclador Peltier Thermal Cycler de BioRad como se detalla en la tabla II.

Tabla II. Programa de PCR de colonia

Paso	Temperatura	Tiempo	No. de Ciclos
Desnaturalización Inicial	95 °C	3 min	1 ciclo
Desnaturalización	95 °C	10 seg	30 ciclos
Alineamiento	56 °C	1 min	
Elongación	72 °C	1 min	
Elongación Final	72 °C	7 min	1 ciclo
Final	4 °C	∞	Indefinido

Los productos de PCR se analizaron en gel de agarosa al 1.5 % en presencia de bromuro de etidio.

6.1.8 Secuenciación

Se seleccionaron cinco clonas positivas que mostraron un producto amplificado y una negativa en la prueba de PCR de colonia para ser cultivadas individualmente en 5 mL de medio 2YT a 37 °C con agitación a 250 rpm. Se conservó una alícuota del cultivo añadiendo glicerol al 30% y almacenando a -80 °C. El resto del células se utilizó para la extracción de ADN usando el kit Wizard SV Gel and PCR Clean-Up System (Promega). Se realizó una segunda prueba de PCR confirmatoria. El ADN purificado se mandó secuenciar a la Unidad de Síntesis y Secuenciación de DNA (USSDNA) perteneciente a la Universidad Nacional Autónoma de México.

6.1.9 Análisis bioinformático

Las secuencias obtenidas se analizaron en el programa Chromas versión 2.5.1. Se realizó un blast con las bases de datos del National Center for Biotechnology Information (NCBI). La secuencia de aminoácidos fue deducida basada en la secuencia de nucleótidos a través del programa de traducción Expasy (<http://web.expasy.org/translate/>).

6.1.10 Rescate del fago recombinante

Para producir la proteína recombinante VP28 desplegada en la superficie del fago M13 (VP28-M13) y el fago M13 control (M13), los fagémidos VP28-pG8SAET y pG8SAET fueron rescatados de células TG1 transformadas mediante superinfección con el fago ayudador M13K07. Brevemente, las clonas seleccionadas luego de la secuenciación se cultivaron en medio LB conteniendo 100 µg/mL ampicilina hasta llegar a la fase de crecimiento exponencial. Se añadió fago ayudador M13K07 (MOI=5), y se permitió la superinfección por 1 h a 37 °C. Posteriormente las células fueron cultivadas durante toda la noche a 37°C con agitación a 200 rpm en medio LB conteniendo 100 µg/mL ampicilina y 50 µg/mL

kanamicina. Los fagos extruidos a través de la membrana bacterial fueron separados de las células de TG1 mediante centrifugación a $8,000 \times g$ por 20 min a 4°C . Los fagos presentes en el medio de cultivo fueron precipitados añadiendo 0.2 volúmenes de una solución conteniendo 20% PEG 6000 y NaCl 2.5 M. La mezcla permaneció en hielo durante 1 h y posteriormente fue centrifugada a $10,000 \times g$ por 20 min a 4°C . Se retiró el sobrenadante y los fagos fueron resuspendidos en TBS pH 7.2. Luego de una centrifugación a $2,000 \times g$ por 5 min a 4°C el sobrenadante fue nuevamente precipitado con PEG/NaCl durante toda la noche a 4°C . Finalmente, los fagos VP28-M13 y M13 fueron recuperados mediante centrifugación a $12,000 \times g$ por 20 min a 4°C , resuspendidos en TBS pH 7.2 y almacenados a 4°C hasta su uso.

2.1.11 Titulación de los fagos

Para obtener el título de fagos recombinantes se utilizaron las células susceptibles de infección *E. coli* TG1. Brevemente, se cultivaron células TG1 en medio LB a 37°C con agitación a 200 rpm. Por otro lado se realizaron diluciones seriadas de la suspensión de fagos en LB. Las diluciones se usaron para infectar 200 μL de células TG1. Se permitió que la infección ocurriera a 37°C . Posteriormente las células fueron esparcidas en la superficie de placas LB-Amp usando un asa de Digralsky e incubadas a 37°C durante toda la noche. El título fue expresado en unidades formadoras de colonia por mililitro (ufc mL^{-1}).

2.1.12 Expresión de VP28

Para evaluar la expresión de VP28, se tomó una muestra de 1 mL del cultivo de células transformadas antes y después de la superinfección. Las células fueron sedimentadas por centrifugación a $2,000 \times g$ por 10 min a 4°C . Se retiró el sobrenadante y se añadió 1 mL de TRIZOL. Posteriormente se realizó una homogenización en aparato por 4 seg usando perlas de vidrio estériles. El

homogenizado fue centrifugado a 12,000 x g por 10 min a 4 °C. Se separó el sobrenadante y se añadieron 200 µL de cloroformo incubando a temperatura ambiente por 5 min. Luego de una centrifugación a 12,000 x g por 15 min a 4 °C, se tomaron aproximadamente 400 µL de la fase superior y se añadió 1 mL de isopropanol. Se precipitó el ARN por 15 min a -20 °C. Se centrifugó por 15 min a 4 °C. Se lavó el botón dos veces con 1 mL de etanol al 75% en agua tratada con DEPC. Luego de una centrifugación a 6,000 x g por 5 min se retiró el sobrenadante y se dejó evaporar el resto del etanol. El ARN fue resuspendido en agua libre de nucleasas y fue tratado con DNAsa. Se comprobó la integridad del ARN mediante electroforesis en gel de agarosa al 1% en presencia de SyberSafe.

Un microgramo de ARN tratado fue utilizado para sintetizar ADNc usando el kit SuperScript II Reverse Transcriptase (Invitrogen) en un volumen de reacción de 20 µL conteniendo:

Oligo dT18	1 µL
Buffer 5X	10 µL
Ribolock inhibitor RNase	1 µL
dNTPs (10 mM)	2 µL
RNA secure 10 X	1 µL
Transcriptase reverse	1 µL
H2O	10 µL
RNA (500 ng µL ⁻¹)	2 µL

La mezcla fue mantenida por 1 h a 42 °C seguida de 5 min a 70 °C y finalmente por 5 min a 4 °C en termociclador Peltier de BioRad. El ADNc sintetizado fue utilizado como templado para la amplificación del gen VP28 tal como se describe en el apartado 6.1.2.

6.1.13 ELISA

La hemolinfa fue colectada directamente del corazón de tres camarones *L. vannamei* con solución isotónica de camarón (450 mM NaCl, 10 mM KCl, 10 mM HEPES) conteniendo 20 mM ácido etilendiaminotetraacético (SIC-EDTA) como describió Vargas Albores en una proporción 1:2 y centrifugada a 800 g a 4 °C por 10 min. El botón fue resuspendido con SIC y centrifugado de nuevo en tres ocasiones. Se colocaron 100 µL de la suspensión de hemocitos en pozos de microplaca de 96 pocillos. Se permitió la adhesión celular por 6 h a temperatura ambiente y se agregaron 25 µL de acetona. Después de la fijación de las células a -20 °C por 10 min, los pozos fueron lavados tres veces con PBS pH 7.2. Se bloqueó cada pozo con la adición de ASB al 3% en PBS por 1 h a 37 °C. Después de tres lavados con PBS-Tween 20 al 0.2% se añadieron 10^{11} ufc de VP28-M13 o M13 por pozo. Luego de una incubación a 4 °C durante toda la noche se realizaron extensos lavados con PBS-T para eliminar los fagos no unidos. Se agregaron 100 µL de anticuerpo anti-M13 conjugado a HRP (1:2000) y se incubó por 1 h a 37 °C. Posteriormente se realizaron extensos lavados con PBS-T. La reacción de la peroxidasa fue desarrollada usando el sustrato OPD, y los valores de absorbancia fueron medidos a 450 nm. Algunos pozos en la placa fueron incubados con ABS como control negativo. Las muestras fueron analizadas por triplicado.

6.2 Vacunación intramuscular

6.2.1 Organismos experimentales

Se recibieron 120 camarones *Litopenaeus vannamei* de aproximadamente 12 g donados por una granja local en Sonora, México. Los organismos se mantuvieron tanques con agua marina filtrada a 35 UPS y a 25 °C. Se extrajeron 50 µL de hemolinfa del seno ventral de cada uno de los organismos usando una jeringa conteniendo SIC-EDTA en proporción 1:5 (v/v). Se realizaron pools de 5 organismos para extraer el ADN de los hemocitos utilizando una matriz de sílica (Glass milk, MP

Biomedicals) como se describe en la sección 2.4.1. Los hemocitos fueron utilizados en una prueba de PCR para certificar que los organismos estuvieran libres de WSSV bajo las condiciones de la sección 2.4.2. Los animales fueron alimentados dos veces al día *ad libitum* con alimento comercial pelletizado.

6.2.2 Extracción de ADN con matriz de sílice

Las muestras se centrifugaron a 600 g por 10 min, se descartó el sobrenadante y se añadieron 600 μ L de buffer GT (Tris-HCl 50mM, hidrocloreuro de guanidina 6 M). Luego de homogenizar con un pistilo estéril se centrifugó a 12,000 g por 3 min y se recuperaron 300 μ L de sobrenadante al que se añadieron 20 μ L de suspensión de sílica. La mezcla se homogenizó usando un vortex y posteriormente se centrifugó a 12,000 g por 15 seg. Se desechó el sobrenadante y se agregaron 500 μ L de buffer GT. Luego de homogenizar se centrifugó de nuevo a 12,000 g por 15 seg y se desechó el sobrenadante. Se agregó 1 mL de etanol al 70% para lavar la matriz. Se centrifugó a 12,000 g y se desechó el sobrenadante. Se agregaron 100 μ L de agua tratada con DEPC y se homogenizó la mezcla. Finalmente se centrifugó a 12,000 g por 2 min, el ADN se recuperó en el sobrenadante y se almacenó a -20 °C.

6.2.3 Inóculo viral

EL WSSV fue obtenido del músculo de un camarón infectado. Para la replicación viral, 50 μ l de un inóculo previamente preparado en el laboratorio fue inyectado en camarones *L. vannamei* sanos. Se extrajeron, del seno ventral, 100 μ l de hemolinfa con una jeringa conteniendo 400 μ l de SIC-EDTA cuando se observaron los primeros signos clínicos de la infección, antes de que ocurriera la mortalidad. Los hemocitos fueron separados del plasma por centrifugación a 800 g a 4 °C por 5 min y usados para la extracción de ADN. Los camarones positivos en la prueba de PCR fueron sacrificados y usados para la preparación del inóculo viral. El músculo

abdominal fue homogenizado en licuadora con seis partes de PBS (1:6 p/v) y centrifugado a 3000 g a 4 °C durante 20 min. El sobrenadante recuperado fue centrifugado de nuevo a 13,000 g por 20 min a 4 °C. El sobrenadante fue filtrado a través de una membrana de 0.2 µm Acrodisc (Millipore, USA) y almacenado a -80 °C hasta su utilización.

6.2.4 Determinación de la dosis viral experimental

Para la determinación de la dosis de WSSV para el reto experimental, se diluyó la suspensión viral desde 1×10^2 hasta 1×10^4 en PBS, y 50 µl de cada dilución fue inoculada en el lateral del cuarto segmento abdominal de 10 camarones sanos respectivamente. Los organismos fueron cultivados a 29 °C hasta que ocurrió el 100% de mortalidad. La mortalidad de los camarones fue registrada dos veces al día. Los camarones muertos fueron almacenados a -80 °C. El ADN de la hemolinfa de los camarones moribundos o de las branquias de camarones muertos fue analizado por PCR para confirmar la infección. La relación entre tiempo y mortalidad fue usada para determinar la dosis de WSSV a administrarse en la infección experimental de los organismos vacunados.

6.2.5 Vacunación

Los camarones fueron separados en tanques plásticos cubiertos, conteniendo agua marina filtrada (35 UPS), piedras de aireación y calentadores eléctricos. La temperatura se elevó gradualmente hasta alcanzar los 29 °C. Cada uno de los grupos recibió una inyección, en el lateral del cuarto segmento abdominal, de VP28-M13, M13 y TBS respectivamente. Los primeros dos grupos (n=30) fueron inyectados con 50 µl de TBS conteniendo 2×10^{10} ufc camarón⁻¹ de VP28-M13 o M13, respectivamente. El tercer grupo (n=30) recibió 50 µl de TBS y sirvió como control negativo. Después de la inyección, todos los grupos continuaron recibiendo

alimento pelletizado comercial. Cincuenta microlitros de hemolinfa fueron extraídos con SIC (1:10 v/v) del seno ventral a las 8 y 48 h después de la vacunación para el análisis de parámetros inmunológicos.

6.2.6 Parámetros inmunológicos

6.2.6.1 Actividad de la fenoloxidasa

El protocolo propuesto por Hernández-López fue usado para evaluar la actividad de la fenoloxidasa (PO) por el registro de la formación de dopacromo producido por L-3,4-dihidroxyfenilalanina (L-DOPA). Brevemente, una muestra de 10 μ l de hemolinfa fue incubada con 250 μ l L-DOPA (Sigma, 3 mg mL⁻¹ disuelta en agua destilada comercial) a temperatura ambiente (25-28°C) por 20 min. Se midió la densidad óptica a 490 nm. La actividad específica de fenoloxidasa fue calculada usando una curva estándar de tirosinasa (1 mg mL⁻¹).

6.2.6.2 Actividad de la Superóxido dismutasa

La actividad de la superóxido dismutasa (SOD) fue determinada usando el Kit Superóxido Dismutasa (RANSOD, USA) siguiendo las instrucciones del proveedor adaptada para microplaca. La actividad de SOD se calcula por el grado de inhibición de la reacción entre los radicales superóxido, generados por la xantina y la xantina oxidasa (XOD), y el cloruro de 2-(4-yodofenil)-3-(4-nitrofenol)-5-fenil tetrazolio (INT). Brevemente, se colocaron 20 μ l de la muestra en una placa de 96 pozillos y se añadieron 200 μ l de xantina y 80 μ l de XOD. Se midió la densidad óptica a 505 nm, y de nuevo después de 5 min a 37 °C. La actividad SOD fue calculada usando una curva estándar con el calibrador provisto.

6.2.6.3 Cuantificación de proteínas totales

La cantidad de proteínas totales fue cuantificada usando un kit comercial (RANDOX TP, USA) siguiendo las instrucciones del proveedor. Se colocaron 10 μ L de la muestra de hemolinfa en la microplaca y se adicionaron 250 μ L del reactivo. Luego de una incubación de 10 min a temperatura ambiente se midió la absorbancia a 550 nm.

6.2.7 Reto experimental

Los camarones previamente vacunados fueron retados intramuscularmente con WSSV. Un volumen constante (50 μ l) fue usado para inyectar WSSV (dilución 3×10^4). El grupo TBS fue inyectado con PBS como control negativo. Los camarones fueron revisados diariamente y se registró la tasa de mortalidad. El ADN de las branquias o los pleópodos de los camarones muertos fueron analizados por PCR.

6.3 Vacunación oral

6.3.1 Organismos experimentales

Se recibieron camarones *Litopenaeus vannamei* de aproximadamente 10-12 g donados por una granja local. Los organismos se mantuvieron tanques con agua marina filtrada a 35 UPS y a 25 °C. Se extrajeron 50 μ L de hemolinfa del seno ventral de cada uno de los organismos usando una jeringa conteniendo SIC-EDTA en proporción 1:5 (v/v). Se realizaron pools de 5 organismos para extraer el ADN de los hemocitos utilizando una matriz de sílica (Glass milk, MP Biomedicals) como se describe en la sección 2.4.1. Los hemocitos fueron utilizados en una prueba de PCR para certificar que los organismos estuvieran libres de WSSV bajo las condiciones de la sección 2.4.2. Los animales fueron alimentados dos veces al día *ad libitum* con alimento comercial pelletizado.

6.3.2 Inóculo viral

EL WSSV fue obtenido del músculo de un camarón infectado. Para la replicación viral, 50 μ l de un inóculo previamente preparado en el laboratorio fue inyectado en camarones *L. vannamei* sanos. Se extrajeron, del seno ventral, 100 μ l de hemolinfa con una jeringa conteniendo 400 μ l de SIC-EDTA cuando se observaron los primeros signos clínicos de la infección, antes de que ocurriera la mortalidad. Los hemocitos fueron separados del plasma por centrifugación a 800 g a 4 °C por 5 min y usados para la extracción de ADN. Los camarones positivos en la prueba de PCR fueron sacrificados y usados para la preparación del inóculo viral. El músculo abdominal fue homogenizado en licuadora con seis partes de PBS (1:6 p/v) y centrifugado a 3000 g a 4 °C durante 20 min. El sobrenadante recuperado fue centrifugado de nuevo a 13,000 g por 20 min a 4 °C. El sobrenadante fue filtrado a través de una membrana de 0.2 μ m Acrodisc (Millipore, USA) y almacenado a -80 °C hasta su utilización.

6.3.3 Vacunación

Camarones *L. vannamei* de 12-15 g de peso fueron trasladados desde una granja cercana al departamento de acuicultura del Centro Interdisciplinario de Investigación y Desarrollo Regional, Unidad Sinaloa (Guasave, México) donde se llevó a cabo el reto bajo condiciones de bioseguridad. Los camarones fueron aclimatados a las condiciones experimentales durante 72 h siendo alimentados *ad libitum* dos veces al día. Veinticuatro horas previas a la vacunación, los animales fueron privados de alimento. Para la vacunación, los camarones fueron colocados con el vientre hacia arriba y usando una punta de pipeta delgada y flexible introducida en la cavidad oral, se administró el tratamiento directo en el estómago. El tratamiento se administró en TBS al que se añadió colorante vegetal para visualizar la correcta administración de un volumen constante de 20 μ L en cada camarón. Los camarones fueron divididos en cuatro lotes de 60 organismos cada

uno. Los dos primeros grupos recibieron 4×10^{10} ufc camarón⁻¹ de VP28-M13 y M13 respectivamente. El tercer y cuarto grupo recibió TBS. Después de la vacunación los camarones continuaron recibiendo alimento pelletizado comercial.

6.3.4 Parámetros inmunológicos

Los camarones fueron muestreados a las 3 y 14 d después de la vacunación. Cien microlitros de hemolinfa fueron extraídos con SIC-EDTA (1:5 v/v) del seno ventral de cada uno de los organismos. Los hemocitos fueron sedimentados por centrifugación a $10,000 \times g$ por 10 min a 4 °C. Se retiró el sobrenadante y se añadió 1 mL de TRIZOL. Posteriormente se realizó una homogenización en aparato por 4 seg usando perlas de vidrio estériles. El homogenizado fue centrifugado a $12,000 \times g$ por 10 min a 4 °C. Se separó el sobrenadante y se añadieron 200 μ L de cloroformo incubando a temperatura ambiente por 5 min. Luego de una centrifugación a $12,000 \times g$ por 15 min a 4 °C, se tomaron aproximadamente 400 μ L de la fase superior y se añadió 1 mL de isopropanol. Se precipitó el ARN por 15 min a -20 °C. Se centrifugó por 15 min a 4 °C. Se lavó el botón dos veces con 1 mL de etanol al 75% en agua tratada con DEPC. Luego de una centrifugación a $7,500 \times g$ por 5 min se retiró el sobrenadante y se dejó evaporar el resto del etanol. El ARN fue resuspendido en agua libre de nucleasas y fue tratado con DNAsa. Se comprobó la integridad del ARN mediante electroforesis en gel de agarosa al 1% en presencia de SyberSafe. Se utilizó el equipo C1000 CFX 96 Real time system (BioRad) para la realización del PCR cuantitativo en tiempo real (qPCR) para determinar la abundancia relativa de transcritos de ARNm de los genes mnSOD y el factor anti-lipopolisacárido (ALF por sus siglas en inglés). Brevemente, 1 μ g de ARN total tratado con DNAsa fue usado para sintetizar ADNc en un volumen de reacción de 20 μ L usando oligo-dT y MMLV transcriptase inversa (Promega) siguiendo las instrucciones del fabricante. El ADNc fue diluido 1:50 en agua libre de nucleasas y almacenado a -20°C. Las reacciones de qPCR fueron realizadas en triplicado conteniendo cada una 15 μ L del ADNc diluido, Ssofast Evagreen Supermix (BioRad) y primers (10 nm) en un

volumen de reacción de 25 μ L. La amplificación consistió en un paso de desnaturalización inicial a 95 °C por 15 min seguido de 40 ciclos de 95 °C por 10 seg, 60 °C por 30 seg y 72 °C por 30 seg. La eficiencia de los primers fue determinada de acuerdo con y la especificidad de la amplificación a partir de la curva de fusión. Cada corrida incluyó ADNc control, control negativo (ARN total tratado con DNAsa I) y control blanco (agua libre de nucleasas). Los niveles de expresión relativa del ARNm fue determinada usando curvas estándar con proteína ribosomal L7 (RPL7), proteína ribosomal L8 (RPL8) y factor de elongación 1 alfa (FE1A). El FE1A fue usado como control endógeno para normalizar el ARNm. Para el análisis de expresión relativa se utilizó el método $2^{-\Delta\Delta CT}$ (Livak et al. 2001). Los primers específicos para mnSOD y ALF, respectivamente se detallan en la tabla.

6.3.5 Reto experimental

Los camarones vacunados de cada lote fueron divididos en dos grupos (Tabla III). Los grupos fueron retados a los 3 y 14 dpv. Los camarones previamente vacunados fueron retados intramuscularmente con WSSV. Un volumen constante (50 μ l) fue usado para inyectar WSSV (dilución 1×10^3). Un grupo que previamente fue inyectado con TBS no fue inoculado con WSSV y recibió 50 μ l de PBS como control negativo. Los camarones fueron revisados diariamente y la tasa de mortalidad fue registrada. El reto experimental fue repetido con el resto de los grupos a los 14 dpv.

Tabla III. Esquema de vacunación oral y reto experimental

Días post-vacunación	Vacunación	Reto	No. de camarones
3	VP28-M13 (4x10 ¹⁰ fcu)	WSSV	30
	M13 (4x10 ¹⁰ fcu)	WSSV	30
	TBS	WSSV	20
	TBS	PBS	10
14	VP28-M13 (4x10 ¹⁰ fcu)	WSSV	15
	M13 (4x10 ¹⁰ fcu)	WSSV	15
	TBS	WSSV	15
	TBS	PBS	10

6.3.6 Análisis estadísticos

Todos los datos fueron representados como el promedio \pm error estándar. Las diferencias fueron consideradas significativas con $P < 0.05$. Las diferencias en los niveles de mortalidad entre los tratamientos fueron analizados usando la prueba Kaplan-Meier log-rank χ^2 del programa GraphPad Prism 7.0. La protección contra el WSSV después de la vacunación fue calculada como el porcentaje de sobrevivencia relativa. Se utilizó un análisis de varianza de una vía (ANOVA) en el programa Excel para el análisis de la expresión relativa de ARNm y el programa BestKeeper para la elección del gen de referencia.

7. RESULTADOS

7.1 Construcción de la bionanovacuna VP28-M13

El ADN proveniente de una muestra de músculo de camarón positivo a la infección por WSSV obtenido en una granja del estado de Sinaloa, México se utilizó para la amplificación del gen completo que codifica para VP28. Se obtuvo un producto de PCR de 615 bp correspondiente al tamaño anotado en el GenBank del National Center for Biotechnology Information al que se añadieron sitios de restricción para las enzimas NcoI y SnaBI y que fue clonado en el vector fagémido pG8SAET (Figura 9) para el despliegue de múltiples copias del inserto sobre la superficie del fago M13. El fagémido VP28-pG8SAET fue usado para transformar células de *E. coli* cepa TG1 mediante electroporación.

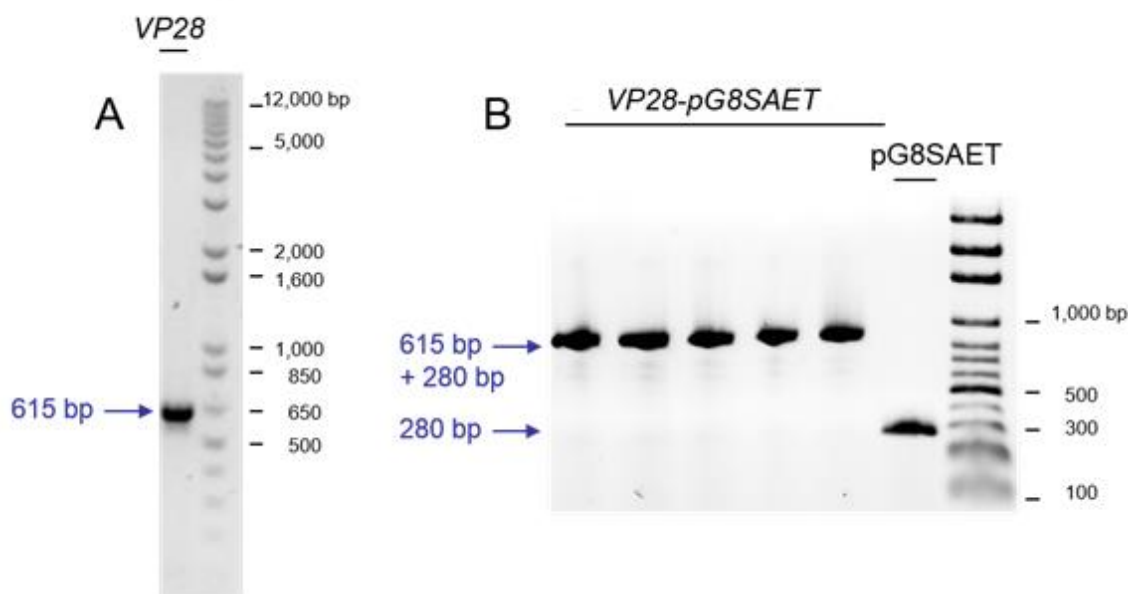


Figura 8. Amplificación y clonación del gen *VP28* (615 bp). Los geles de agarosa muestran los productos de PCR de: (A) la amplificación de *VP28* usando ADN genómico de camarón *L. vannamei* infectado por WSSV como templado y (B) cinco clones de *E. coli* transformadas con el gen *VP28* amplificado insertado en el fagémido pG8SAET basado en el fago M13 (*VP28-pG8SAET*) y el vector vacío.

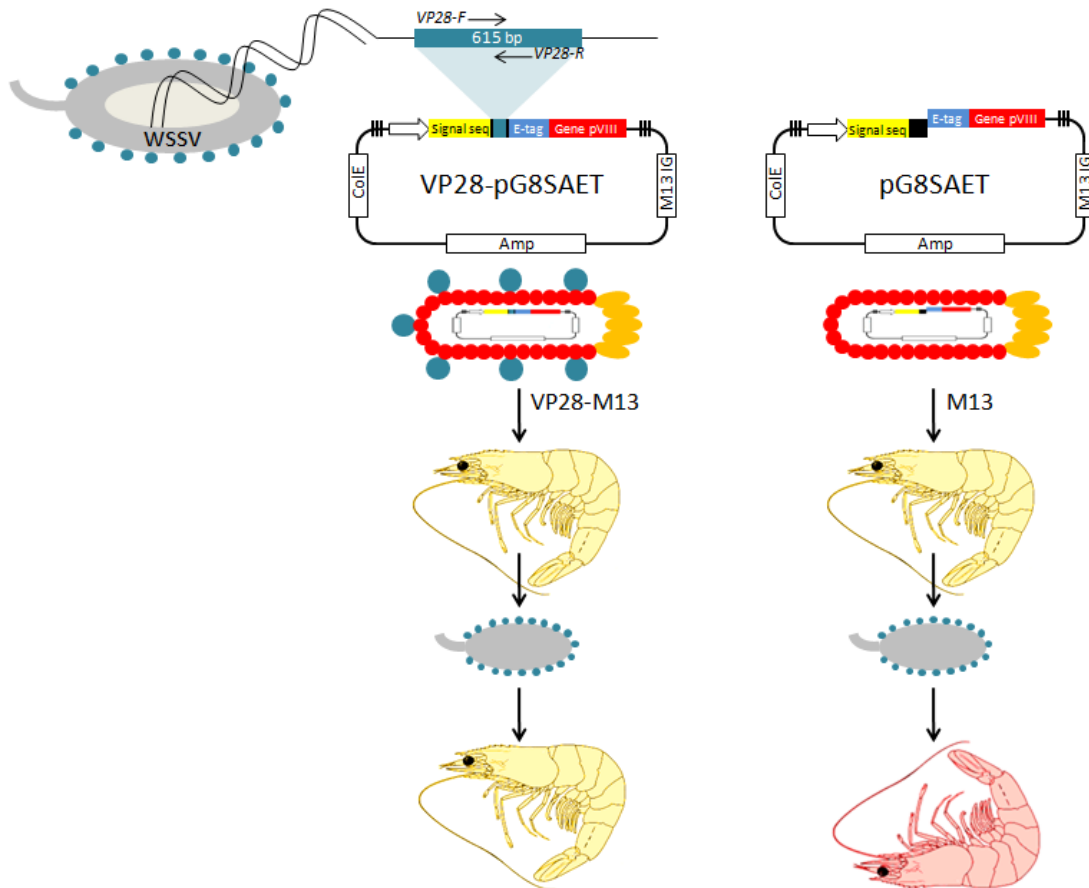


Figura 9. Esquema general de la metodología y de los resultados obtenidos. El gen completo que codifica a la proteína antigénica VP28 del WSSV fue clonado en el fagémido pG8SAET para el despliegue de múltiples copias de la proteína recombinante sobre la superficie del fago M13. La bionovacuna producida fue administrada por vía intramuscular y oral a camarones *L. vannamei*, en dos bioensayos separados, y posteriormente retados experimentalmente con WSSV. Hubo una reducción de la mortalidad acumulada en los grupos tratados comparados con los grupos sin tratar.

Se seleccionaron clonas capaces de crecer en medio selectivo con antibiótico. La prueba de PCR de colonia y la secuenciación del ADN de los cultivos seleccionados confirmaron que el gen VP28 fue insertado en el sitio de clonación en el marco de lectura abierto correcto (Figura 10).

```

Actttaggtacattactttatatctggtggcgtaacacctgctgcaaagtctgcgcaacac
  T L G T L L I S G G V T P A A N A A Q H
gatgaccatgggatggatctttctttcactctttcggtcgctgctcgccatcctcgccatc
  D D H G M D L S F T L S V V S A I L A I
actgctgtgattgctgtatatttattgtgatttttaggtatcacaacactgtgaccaagacc
  T A V I A V F I V I F R Y H N T V T K T
atcgaaaacccacacagacaatatcgagacaaacatgggatgaaaacctccgcattcctgtg
  I E T H T D N I E T N M D E N L R I P V
actgctgaggttggatcaggctacttcaagatgactgatgtgtcctttgacagcgacacc
  T A E V G S G Y F K M T D V S F D S D T
ttgggcaaaatcaagatccgcaatggaaagtctgatgcacagatgaaggaagaagatgcg
  L G K I K I R N G K S D A Q M K E E D A
gatcttgtcatcactcccgtggagggccgagcactcgaagtgactgtggggcagaatctc
  D L V I T P V E G R A L E V T V G Q N L
acctttgagggaaacattcaaggtgtggaacaacacatcaagaaagatcaacatcactggt
  T F E G T F K V W N N T S R K I N I T G
atgcagatgggtgccaaagattaacccatcaaaggcctttgtcggtagctccaacacctcc
  M Q M V P K I N P S K A F V G S S N T S
tccttcacccccgtctctattgatgaggatgaagttggcacctttgtgtgtgtaccacc
  S F T P V S I D E D E V G T F V C G T T
tttggcgaccaattgcagctaccgcccgtggaaatcttttcgacatgtacgtgcacgtc
  F G A P I A A T A G G N L F D M Y V H V
acctactctggcactgagaccgagtagctt
  T Y S G T E T E Y V

```

Figura 10. Secuencia parcial de nucleótidos del fagémido VP28-pG8SAET y su traducción a aminoácidos. Se muestra la secuencia de nucleótidos correspondiente al gen completo *VP28* (615 pb) y su traducción a aminoácidos en código de una letra (subrayado).

El alineamiento de la secuencia realizado con la herramienta BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) mostró un 100% de identidad con el gen que codifica para VP28 de la cepa MEX2008 aislada al sur de Sonora, México (No. de acceso KU216744.1), así como aislados de India, Japón, Estados Unidos e Indonesia.

Se seleccionó una clona y fue cultivada para expresar la proteína VP28, posteriormente la célula fue superinfectada con el fago ayudador M13K07 cuyo genoma codifica las proteínas necesarias para permitir incorporación de la proteína recombinante a la superficie del virión en el proceso llamado rescate. La progenie liberada en el medio fue purificada mediante una doble precipitación con PEG/NaCl donde se pudo observar un precipitado de color blanco uniforme (Figura 11), compuesto por los fagos recombinantes, obteniendo en promedio 1.6×10^{11} ufc por mililitro cultivado. Estas partículas virales fueron usadas para infectar células de *E. coli* naïve en las que se demostró la presencia del fagémido mediante PCR de colonia.

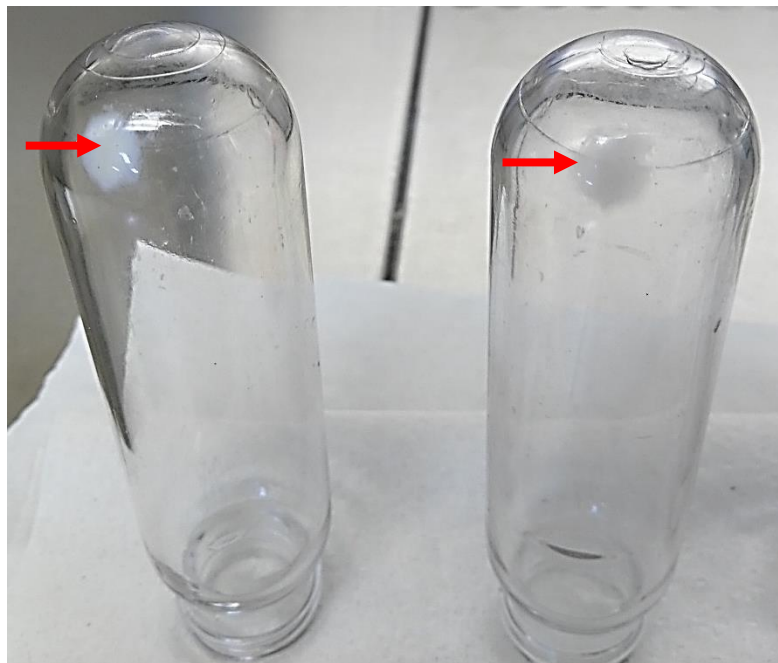


Figura 11. Fagos VP28-M13 y M13 purificados. Los fagos fueron purificados mediante doble precipitación con PEG/NaCl. Las flechas indican el botón que contiene los fagos recombinantes y silvestres.

La expresión de VP28 en *E.coli* durante el rescate de VP28-M13 fue detectado a través de una banda específica del producto de RT-PCR de 615 bp (Figura 12).

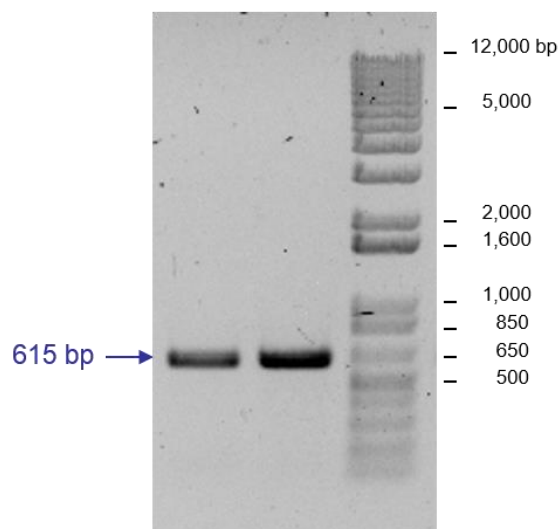


Figura 12. Transcripción de VP28. El gel de agarosa muestra los productos de PCR de la amplificación de *VP28* usando como templado ADNc proveniente del cultivo de *E. coli* transformada con el vector *VP28-pG8SAET*.

7.2 Interacción de VP28 con hemocitos de camarón

Para identificar si la proteína VP28 desplegada en el fago M13 es capaz de unirse a la membrana de hemocitos de camarón se fijaron hemocitos y se inmovilizaron en nueve pozos de una microplaca de 96 pozos para realizar un ensayo de ELISA. Se utilizó un anticuerpo anti-M13 conjugado a peroxidasa para detectar la interacción. La mayor densidad óptica observada muestra que VP28-M13 se unió a la membrana de hemocitos.

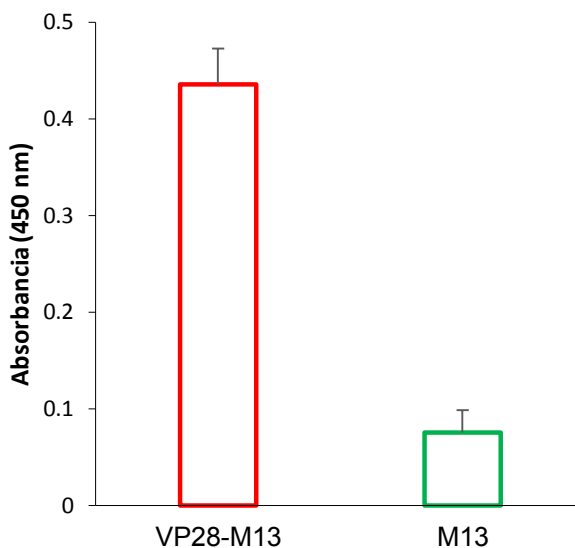


Figura 13. Detección de la unión de VP28 a la membrana de hemocitos de *L. vannamei* mediante ELISA. Los hemocitos fueron fijados e inmobilizados en una microplaca de 96 pozos. La unión entre la VP28 desplegada en la superficie del fago M13 y la membrana de los hemocitos fue detectada con un anticuerpo anti-M13 conjugado a HRP. El vehículo vacío M13 sirvió como control negativo. Los resultados se muestran como el promedio aritmético y las barras de error representan la desviación estándar.

7.3 Vacunación intramuscular y reto experimental

Los camarones recibieron una única dosis de VP28-M13, M13 o TBS y 48 h después fueron inyectados con PBS estéril o WSSV 48 h después de la vacunación para probar la actividad anti-WSSV de la vacuna VP28-M13. El reto experimental duró 120 h en las que la mortalidad fue monitoreada dos veces al día. La primera mortalidad se observó a las 12 h después de la infección. Todos los camarones muertos fueron positivos a la infección por WSSV mediante prueba de PCR. Durante todo el experimento los organismos tratados con VP28-M13 presentaron un comportamiento normal mientras que el grupo inyectado con M13 presentaron signos de estrés y posteriormente disminuyeron su respuesta al estímulo mecánico. La comparación de las curvas de sobrevivencia del grupo vacunado con VP28-M13 y el grupo tratado con el vehículo M13 vacío (Figura 14) resultó ser

significativamente diferente (Kaplan-Meier log-rank χ^2 : 5.05, $p < 0.05$). Una mortalidad acumulada significativamente menor (36.66%) fue observada en el grupo tratado con VP28 comparado con el grupo sin tratar (66.67%). Se observó un organismo muerto en el grupo control negativo al inicio del reto experimental, lo cual puede ser atribuido al estrés de mudar y a la manipulación. El valor del porcentaje de sobrevivencia relativa del grupo VP28-M13 fue calculado respecto al grupo control M13 (considerado como control positivo) con un valor de 44.99% (Tabla IV).

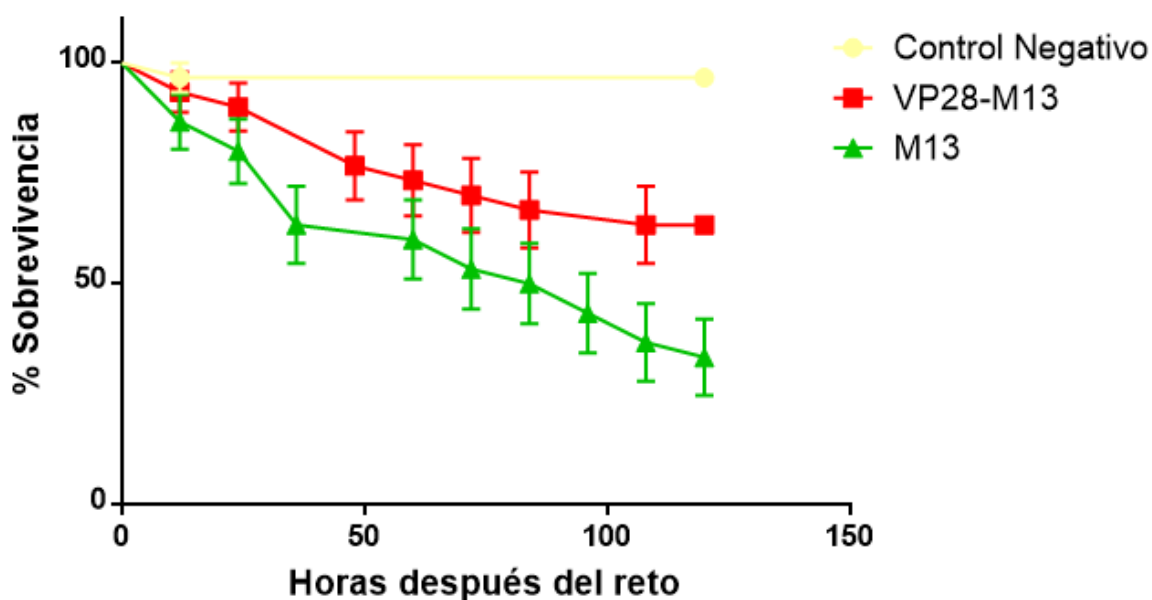


Figura 14. Sobrevivencia del grupo inyectado intramuscularmente con la vacuna VP28 desplegada en el fago M13 (2×10^{10} cfu shrimp⁻¹) y retada 48 h después con WSSV. Los grupos M13 y TBS sirvieron como control positivo y negativo respectivamente. Las barras de error representan la desviación estándar. Las diferencias en la mortalidad entre los grupos VP28-M13 y M13 fueron analizadas con la prueba Kaplan–Meier log-rank χ^2

Tabla IV. Porcentaje de mortalidad acumulada y porcentaje de sobrevivencia relativa (PSR) de *L. vannamei* inyectados con una dosis única de la vacuna VP28 desplegada en el fago (VP28-M13), M13 o TBS seguido de un reto intramuscular con WSSV.

Grupo	Camarones muertos/ total de camarones	% Mortalidad acumulada	PSR
VP28-M13	11/30	36.67	44.99%
M13	20/30	66.67	-
TBS	1/30	03.33	-

7.4 Respuesta inmune ante vacunación intramuscular

La actividad de la fenoloxidasa y la superoxido dismutasa en las muestras de hemolinfa de los camarones vacunados fue evaluada para conocer la respuesta inmune producida por la proteína VP28 descartando el efecto del fago M13. No se encontraron diferencias significativas en estos parámetros inmunológicos entre los grupos, incluso contra el grupo control negativo, en ninguno de los tiempos evaluados (Figura 15).

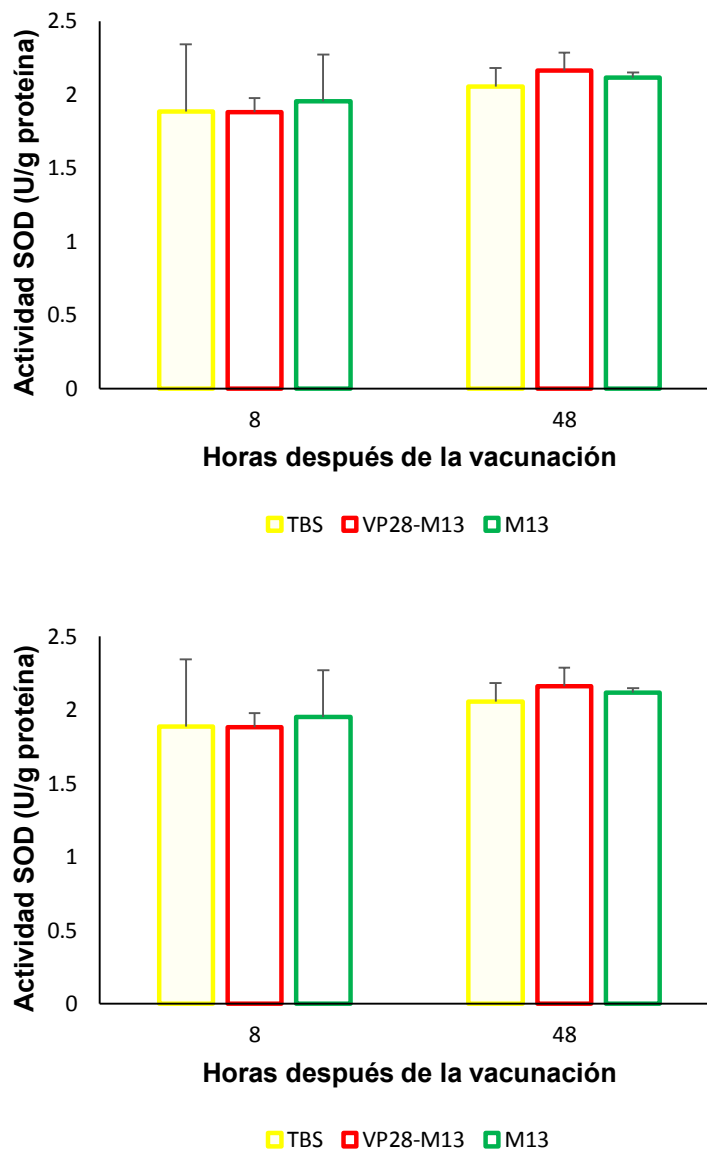


Figura 15. Variación en la actividad de PO y SOD en la hemolinfa de *L. vannamei* vacunados con VP28 desplegada en fago y sus respectivos controles. Los resultados se muestran como el promedio aritmético y las barras de error la desviación estándar. No se encontraron diferencias significativas en estos parámetros inmunológicos entre los grupos en ninguno de los tiempos evaluados.

7.5 Vacunación oral y reto experimental

Con el fin de evaluar el efecto protector de VP28-M13 administrado por vía oral se realizó un reto experimental con camarones *L. vannamei* luego de 3 y 14 días de haber recibido una vacunación oral forzada (Figura 17). Luego del procedimiento de intubación los organismos continuaron alimentándose con normalidad. La relación de tiempo-sobrevivencia a los 3 dpv se muestra en la figura 15. Se observó una diferencia significativa en las curvas de sobrevivencia para VP28-M13 y M13 respecto al control positivo (Log-rank test X^2 9.1, $p < 0.05$). Se observó una mortalidad acumulada significativamente menor para los grupos VP28-M13 y M13 con valores de PSR de 28.6% y 20.8% respectivamente, contra el control positivo en el día 5 después del reto (mortalidad del 100%), sin embargo, no se encontró diferencia significativa entre el grupo vacunado y el vehículo. No se observó mortalidad en el grupo control negativo.



Figura 16. Vacunación oral forzada. Una punta de pipeta flexible y muy delgada fue introducida en la cavidad oral para administrar el tratamiento y asegurar que todos los organismos recibieran el mismo volumen. Se utilizó un colorante vegetal rojo para visualizar la administración oral correcta. En la figura se puede observar el estómago coloreado sin derrames.

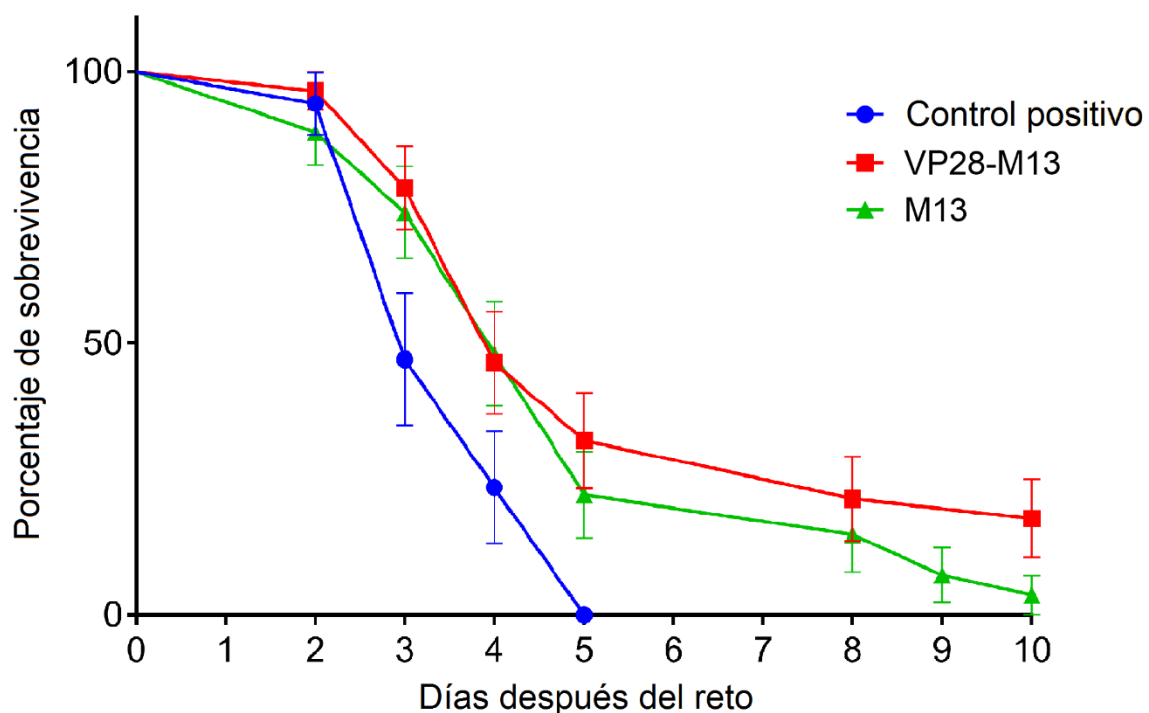


Figura 17. Supervivencia de los camarones tratados con la vacuna VP28 desplegada en fago y con el vehículo M13 (4×10^{10} ufc camarón⁻¹) y retados 3 días después con WSSV. Los grupos inyectados con TBS y que posteriormente fueron retados y no retados sirvieron como control positivo y negativo respectivamente. No se observó mortalidad en el control negativo.

La duración del efecto protector fue evaluada mediante un reto con WSSV después de 14 días de la administración oral de una sola dosis de vacuna VP28-M13. La relación de tiempo-supervivencia a los 14 dpv se muestra en la figura 18. Se observó una diferencia significativa en las curvas de supervivencia para VP28-M13 respecto a los grupos de vehículo M13 y el control positivo (Log-rank test X^2 6.31, $p < 0.05$). Se alcanzó una mortalidad acumulada del 100% a los 4 y 5 días después del reto en el grupo control positivo y M13 respectivamente. No se observó mortalidad en el grupo control negativo. Luego de 4 días después del reto, el grupo VP28-M13 mostró valores de PSR de 33.3% y 42.8% comparados con los grupos M13 y control

positivo respectivamente. Luego de 5 días del inicio del reto, se observó un valor de PSR del 17.14% comparado con el grupo M13.

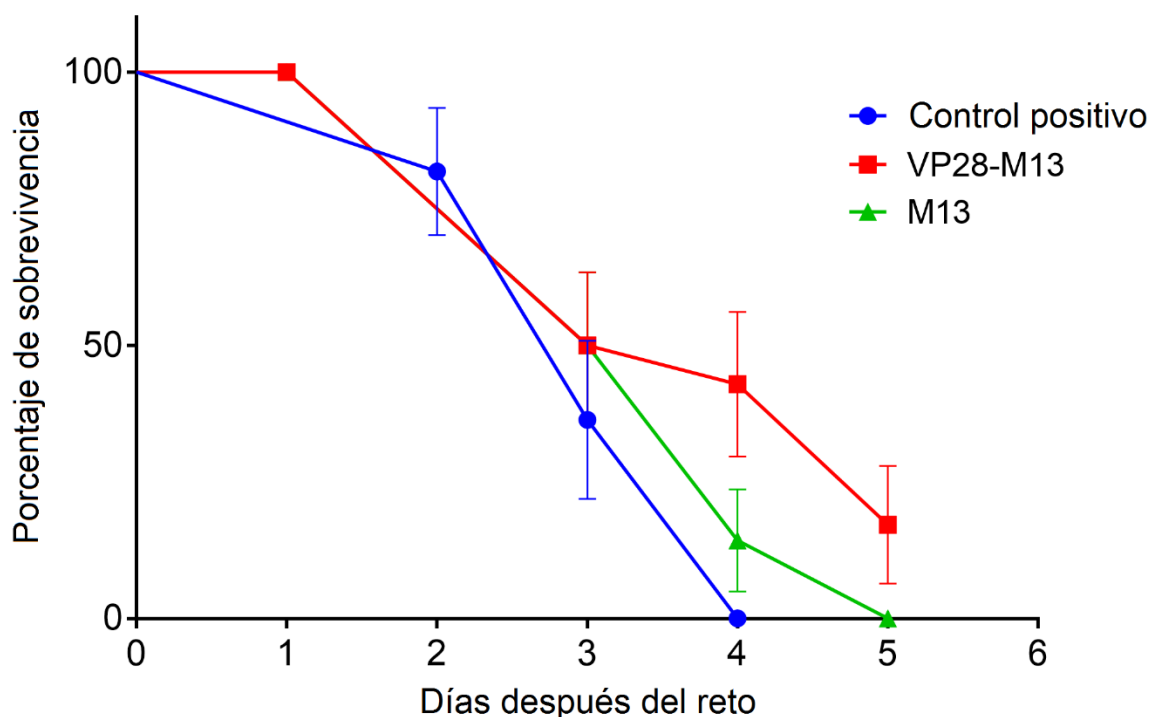


Figura 18. Sobrevivencia de los camarones tratados con la vacuna VP28 desplegada en fago y con el vehículo M13 (4×10^{10} ufc camarón⁻¹) y retados 14 días después con WSSV. Los grupos inyectados con TBS y que posteriormente fueron retados y no retados sirvieron como control positivo y negativo respectivamente. No se observó mortalidad en el control negativo.

7.6 Respuesta inmune ante vacunación oral

El qPCR de los genes MnSOD y ALF mostró que los camarones tratados con VP28-M13 y M13 incrementaron los niveles de expresión de estos genes respecto al grupo control luego de 3 días de ser inyectados. El análisis de expresión del gen MnSOD para VP28-M13 y M13 fue de 4.06 y 7.51 respectivamente mientras que para ALF fue de 2.49 y 5.06. No observó una diferencia significativa en la expresión relativa de ambos genes entre los grupos tratados con la vacuna y el fago (Figura 19).

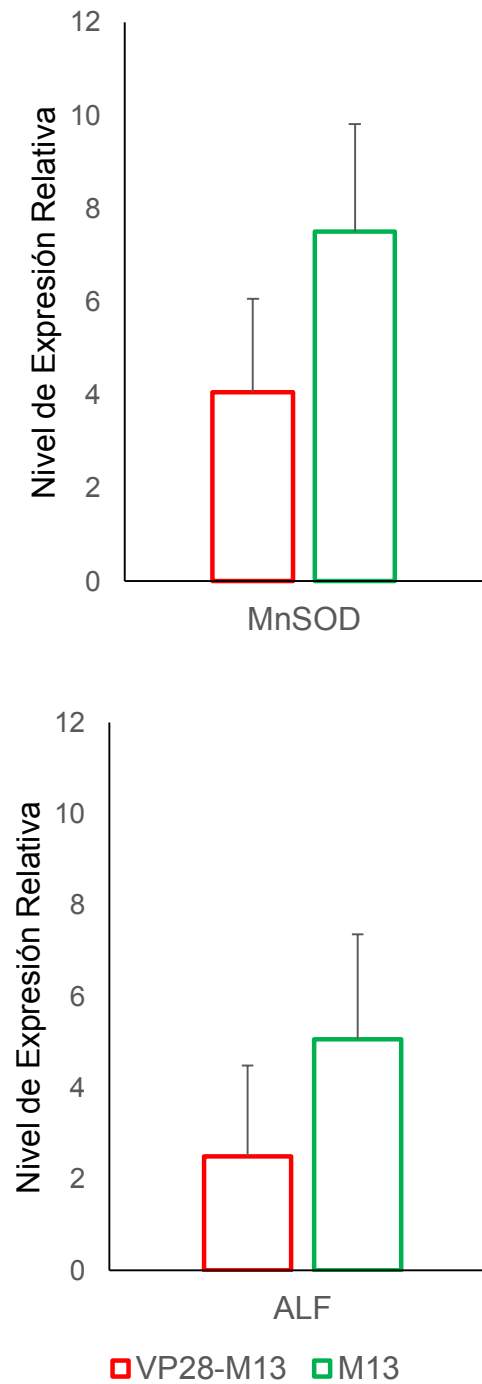


Figura 19. Nivel de expresión relativa de los genes MnSOD y ALF en la hemolinfa de *L. vannamei* luego de 3 días de ser inyectados con la vacuna VP28 desplegada en fago y el M13. Los resultados se muestran como el promedio aritmético y las barras de error la desviación estándar. No se encontraron diferencias significativas en estos parámetros inmunológicos entre estos grupos.

8. DISCUSIÓN

En este trabajo, se utilizó la tecnología de despliegue en fago para conseguir expresar la proteína estructural VP28 del virus del síndrome de la mancha blanca en múltiples copias sobre la superficie del fago filamentoso M13. Así, el fago M13 se usó como una bionanopartícula acarreadora de la vacuna de subunidad VP28, aprovechando las ventajas de este sistema. La capacidad de la proteína recombinante VP28, desplegada en el fago, para unirse a membranas de hemocitos y la eficacia para proteger intramuscular y oralmente a camarones *L. vannamei* contra la infección por WSSV fue evaluada *in vivo*. Este trabajo demostró que la vacunación con la proteína recombinante VP28 desplegada en el fago M13 reduce la mortalidad comparada con el grupo control en *L. vannamei*.

El fago M13 es un virus con forma de cilindro largo y delgado de aproximadamente 1 μm de largo y 7 nm de diámetro que infecta a *E. coli* para su propagación. Este fago es una nanopartícula natural, autoensamblada y altamente estable. Ha sido utilizado mundialmente en la tecnología llamada *phage display* que permite la funcionalización de la superficie de la partícula viral a través de la manipulación de la información genética del propio fago o con el uso de vectores. Los péptidos foráneos desplegados en la superficie del virión en fusión con proteínas de la cápside, son usados como herramientas de selección para el descubrimiento de vacunas y fármacos (Arap, 2005). Más allá de esta primera aplicación, esta tecnología ha evolucionado siendo explotada como un sistema efectivo para la presentación de péptidos antigénicos contra enfermedades infecciosas brindando protección contra patógenos y provocando una fuerte respuesta inmune humoral y celular (Bastien *et al.*, 1997; Yang *et al.* 2005; Houmiel y Degalli, 2009). El uso de fagos recombinantes es un método atractivo para combatir patógenos debido a que la partícula viral no interfiere con la respuesta inmune contra el péptido desplegado, el virión actúa como una partícula tipo adyuvante y es una alternativa de bajo costo a la síntesis de péptidos o la producción de proteínas recombinantes purificadas (Samoylova *et al.* 2012). Además, las preparaciones de fagos se consideran

seguras ya que estos virus son incapaces de infectar a humanos, animales o plantas. No se han encontrado efectos negativos durante casi un siglo de pruebas en humanos al ser administrados en la llamada terapia fágica. Adicionalmente, su naturaleza los convierte en nanopartículas biodegradables por lo que no hay reportes de toxicidad asociada a su acumulación en tejidos en contraste con algunas nanopartículas metálicas (Tothova *et al.* 2012, García-Alonso *et al.* 2014).

En acuicultura, estas propiedades han sido pobremente exploradas en peces y no hay reportes en crustáceos. En peces, Xie *et al.* (2005) reportaron el uso de un fago que despliega un fragmento de anticuerpo monoclonal anti-idiotipo capaz de proteger al pez *Paralichthys olivaceus* contra la infección de *Vibrio anguillarum*; mientras que Cen *et al.* (2013) siguiendo una estrategia diferente al usar un mimotopo de la proteína OmpU del *Vibrio mimicus* desplegado en fago, como una vacuna basada en un epítipo, redujeron a cero la mortalidad en un reto experimental y además consiguieron inducir una respuesta de anticuerpos específica. En el caso de crustáceos, solo hay un reporte de un péptido neutralizante del WSSV desplegado en un fago. Dicho péptido interactúa con el patógeno bloqueando el acceso a sus antígenos o bien cambiando la morfología del virión, impidiendo de esta forma la infección, contrario al mecanismo de acción de una vacuna donde la protección otorgada depende de la respuesta inmune del hospedero. Yi *et al.* (2003) seleccionaron un péptido fusionado a una sola copia de la proteína pIII del fago M13 con un posible motivo crítico VAVNNSY a partir de una biblioteca de decapeptidos desplegados en fagos, capaces de unirse al WSSV inhibiendo la infección in vitro en camarones e in vivo en cangrejo consiguiendo un valor de PSR de 66.62%.

En nuestra investigación, el gen completo que codifica a la proteína VP28 del WSSV, con una longitud reportada de 615 bp, fue amplificado y exitosamente insertado en la orientación correcta dentro del fagémido pG8SAET como se demostró mediante PCR de colonia y secuenciación del fagémido (Figura 9). Los resultados indicaron la presencia de un producto de PCR correspondiente al tamaño

esperado y la secuencia confirmó un 100% de identidad con un aislado mexicano. Además, la inserción del ADN foráneo en el sitio de clonación restauró el marco de lectura requerido para la expresión de proteína recombinante-E-tag-pVIII (Figura 10).

El vector fagémido pG8SAET permite la expresión de péptidos foráneos en fusión a la proteína mayor de la cápside del fago M13, pVIII, logrando que se desplieguen múltiples copias del péptido por virión. En este caso, se seleccionó este formato ya que el péptido desplegado es un antígeno vacunal y siguiendo esta estrategia se pretendió imitar el arreglo repetitivo de antígenos que presenta una vacuna con un organismo completo. Esta táctica ha demostrado ser más efectiva comparado con la administración de proteínas recombinantes aisladas; por ejemplo, el uso de partículas tipo virus con la proteína antigénica HBsAg, presente en la envoltura del virus de la hepatitis B, resultaron ser 1000 veces más inmunogénicas que la proteína libre (Karch y Burkhard, 2016).

La expresión de VP28 fusionada a la proteína pVIII fue detectada por RT-PCR (Figura 12) en las células de *E. coli* transformadas. Con el auxilio del fago ayudador M13K07, el resto de las proteínas necesarias para la construcción del virión fueron expresadas, consiguiendo que el fago VP28-M13 fuera ensamblado en el citoplasma de la bacteria y liberado al medio de cultivo. Los fagos filamentosos no lisan las células huésped durante su propagación (Arap, 2005) permitiendo una purificación fácil, simple y con alto grado de pureza, mediante doble precipitación con PEG/NaCl. Durante la amplificación del fago VP28-M13 se recuperaron 10^{11} ufc por mililitro cultivado, este es un rendimiento consistente con el reportado por diversos autores. La transformación con el fagémido pG8SAET fue estable ya que después de varios subcultivos no se perdió el inserto, incluso la progenie fue utilizada para infectar células TG1 naive pudiendo detectar el inserto en las células infectadas.

La proteína VP28 juega un rol clave en los primeros pasos de la infección sistémica del WSSV en crustáceos (Yi *et al.*, 2004). Al pertenecer al complejo de proteínas

presentes en la envoltura viral, esta proteína es de las primeras en interactuar con los receptores de las células del hospedero. Los hemocitos, uno de los principales sistemas de defensa del camarón, son susceptibles a la infección por WSSV. La proteína VP28 interactúa directamente con la membrana de los hemocitos a través del receptor celular Rab7 (Srituyalucksana *et al.*, 2006). La unión específica de VP28 recombinante desplegada en el fago a la membrana de hemocitos fue probada mediante ELISA (Figura 13), lo cual es evidencia de la funcionalidad de la proteína desplegada.

Existen numerosos reportes describiendo el uso de proteínas estructurales del WSSV a manera de vacunas de subunidad con diferentes grados de éxito (Namikoshi *et al.*, 2004; Witteveldt *et al.*, 2004a,b). La proteína VP28 ha sido la más estudiada y la que mejores resultados ha brindado. Diversos sistemas de expresión han sido utilizados para producir la proteína recombinante. Todo parece indicar que la proteína producida en sistemas eucariontes induce un mayor grado de protección comparado con sistemas procariontes, se cree que debido a cambios postraduccionales que se llevan a cabo correctamente en ellos. Sin embargo, la proteína VP28 expresada en *E. coli* ha sido exitosamente utilizada como vacuna contra el WSSV (Namikoshi *et al.*, 2004; Witteveldt *et al.*, 2004a,b) logrando valores de PSR de entre 30 y 90%. La expresión de proteínas recombinantes en *E. coli*, muchas veces se da en cuerpos de inclusión que deben ser solubilizados y renaturalizados para que se vuelvan biológicamente activos. A pesar de que el fago M13 utiliza a *E. coli* como un bioreactor para la producción de sus proteínas, y en el caso del phage display también para la expresión de proteínas exógenas, estas son enviadas a la membrana citoplasmática y son recuperadas funcionalmente al integrarse a la superficie del virión por lo que no se requieren tratamientos posteriores.

El fago recombinante acarreando la vacuna VP28 fue usado para inmunizar camarones *L. vannamei* con una sola dosis intramuscular de 2×10^{10} ufc por individuo. Después del reto con WSSV se observó una menor mortalidad acumulada

(36.66%) en el grupo tratado con VP28-M13 comprada con el grupo tratado con M13 (66.67%). La vacuna VP28-M13 redujo la mortalidad de los camarones, lo que fue consistente con otros estudios que han mostrado proteger o al menos incrementar la sobrevivencia de camarones tratados con la proteína VP28 expresada en sistemas procariontes (Namikoshi *et al.*, 2004, Witteveldt *et al.* 2004; Jha *et al.*, 2006; Caipang *et al.*, 2008). Fu *et al.* (2010) usaron *E. coli* como un vehículo para la administración oral de VP28 obteniendo valores de PSR del 65%. Estos resultados no son comparables porque existe una correlación entre la protección y la cantidad de proteína recibida así como la ruta de administración (Namikoshi *et al.*, 2004; Jha *et al.* 2007; Caipang *et al.*, 2008) además de la diferencia en el patrón de mortalidad luego de un reto (Escobedo-Bonilla *et al.*, 2006).

Para defenderse de la infección, los camarones carecen de un sistema inmune adaptativo pero cuentan con una amplia variedad de mecanismos de respuesta inmune innata (Flegel y Sritunyalucksana, 2011). De hecho, numerosos estudios reportan la existencia de una respuesta inmune específica contra inmunógenos derivados de patógenos, lo que ha hecho pensar que existe una especie de inmunidad adaptativa en la respuesta inmune innata por lo que sería posible llevar a cabo una vacunación de estos organismos (Venegas *et al.*, 2000; Namikoshi *et al.*, 2004; Ha *et al.*, 2008; Ng *et al.*, 2015). Cabe aclarar que el término vacunación en camarones no es una vacunación tal como la que ocurre en vertebrados. En orden de analizar el efecto de VP28 y del M13 en la respuesta inmune durante la vacunación intramuscular, se evaluó la actividad de la superóxido dismutasa y la fenoloxidasa ya que un incremento en estos parámetros se relaciona con una respuesta inmune positiva. La melanización es la principal defensa del sistema innato en camarones, la fenoloxidasa cataliza la oxidación de difenoles a quinonas iniciando la ruta de la producción de melanina. En esta ruta y durante el proceso de defensa mediante fagocitosis se forman aniones superóxido, la superóxido dismutasa cataliza su conversión a oxígeno molecular y peróxido de hidrógeno que

son menos tóxicos previniendo su acumulación en el organismo (Cerenius *et al.*, 2004), sin embargo, no se encontraron diferencias significativas en los valores de estas enzimas entre los grupos. Fu *et al.* (2010) no encontraron diferencias en estos parámetros entre VP28 y el vehículo utilizado sugiriendo que estos efectores del sistema inmune de camarón juegan un rol menor en la defensa antiviral tal como Wang y Zhang reportaron (2008). Además, Cárcamo-Arechiga *et al.* (2014) encontraron que el efecto en la respuesta inmune humoral puede ser igual o mayor causado por estrés térmico que el causado por el WSSV. Los camarones fueron mantenidos a 29 °C para favorecer una rápida progresión de la enfermedad debido a que a esa temperatura se incrementa la susceptibilidad a la infección por WSSV, lo que pudo enmascarar diferencias entre los grupos. De cualquier forma, la alta sobrevivencia de *L. vannamei* retados con WSSV comparada con el grupo control solo puede ser atribuida a la vacuna desplegada ya que la inyección intramuscular del patógeno aseguró una presión de reto igual. Diversos reportes han demostrado un patrón dosis-dependiente para nivel y la duración de la protección por VP28, especulando que el mecanismo de acción para la protección por vacunación puede estar dada por el bloqueo de receptores celulares del hospedero evitando futuros acoplamiento de los viriones de WSSV (Mu *et al.*, 2012) o estimulando una respuesta celular (Fu *et al.*, 2011). Debido a la demostrada funcionalidad de la proteína VP28 desplegada en M13, ambos fenómenos pudieran explicar la protección lograda en el reto. Más allá, la alta sobrevivencia (PSR 44.9%) de los organismos indica que después de la inyección, la vacuna VP28-M13 circuló en el organismo y actuó como un antígeno por lo que se asumió la actividad inmunogénica de VP28.

La vacunación intramuscular es una buena forma de probar la eficacia de vacunas en desarrollo, incluso seleccionadas usando la misma tecnología de despliegue en fagos, haciendo de esta plataforma una estrategia atractiva para el tamizado y prueba de péptidos para la prevención de enfermedades en acuicultura. Sin embargo, la administración por inyección no es práctica en condiciones de campo,

por lo que se evaluó la factibilidad de usar la bionanovacuna VP28-M13 administrada vía oral para saber si se puede conseguir la protección de los organismos de forma que pueda ser aplicada masivamente en los estanques de cultivo. La vacunación oral se realizó forzando el consumo para asegurar, al igual que por medio de inyección, la aplicación de la misma dosis por camarón (Figura 3).

La vacunación oral de los camarones mostró que una sola dosis de VP28 desplegada en el fago M13 confiere un efecto positivo en la sobrevivencia de los camarones después de un reto con mancha blanca hasta 14 días después de la vacunación. La diferencia en los días en que el grupo tratado sobrevivió respecto a los controles positivos que alcanzaron el 100% de mortalidad sugiere una respuesta cuasi-inmune específica capaz de reducir la mortalidad (Figuras 17 y 18). Kulkarni *et al* (2013) demostraron que la proteína recombinante VP28 administrada oralmente es transportada al espacio intracelular, escapando exitosamente de la degradación y dejando el intestino. Entonces, tal vez encuentre la hemolinfa que rodea la parte externa del intestino. Los hemocitos son los principales efectores de la respuesta inmune y uno de los principales blancos para la replicación del WSSV (Escobedo-Bonilla *et al.* 2008, Johansson *et al.* 2000). La proteína VP28 está localizada en la superficie del WSSV y se une a los receptores celulares del camarón permitiendo que se inicie el proceso infectivo (Yi *et al.* 2004). Probablemente una degradación parcial de la proteína VP28 en el tracto digestivo hizo que el antígeno se presentara a las defensas del sistema inmune del hospedero pobremente reduciendo la inmunogenicidad del preparado y la eficacia de la protección (Wei y Xu, 2009). Diversos estudios han reportado una protección dosis dependiente (Yang *et al.* 2012, Caipang *et al.* 2008). En conjunto, se recomienda un incremento en la dosis de vacuna o efectuar refuerzos para obtener mejores resultados.

Después de tres días de la vacunación oral, los camarones retados del grupo vacunado y el tratado con el vehículo vacío mostraron diferencia significativa en la

sobrevivencia respecto al control positivo, por lo que se deduce que el fago M13 tuvo cierto efecto protector contra el WSSV. Sin embargo, este fenómeno no fue observado en el grupo M13 retado 14 días después de la vacunación donde no se observó diferencia significativa entre este y el control positivo.

Las preparaciones de fagos contienen lipopolisacáridos derivados de la pared de *E. coli* asociadas al virión (Grabowska *et al.* 2010) y al igual que las bacterias presentan genomas de ADN de cadena sencilla con motivos CpG (Iizuka *et al.*, 1994). Ambos componentes son capaces de inmunoestimular a los camarones e incluso protegerlos contra la infección del WSSV (Zhang *et al.*, 2010). De hecho, el análisis de la expresión relativa para el factor antilipopolisacárido mostró una sobreexpresión de este gen en los grupos tratados con VP28-M13 y M13 sin encontrar diferencia significativa entre ambos (Figura 19). En invertebrados, 12 residuos del extremo N-terminal de la superficie expuesta de PVIII y los dominios externos N1 y N2 de pIII pueden estimular tanto a células B y T produciendo una fuerte respuesta inmune específica (van Houten *et al.* 2010). En ratones, los altos títulos de anticuerpos contra el fago son mantenidos por al menos un año después de la inmunización (Frenkel *et al.* 2000). Por lo anterior, el fago M13 es una partícula ampliamente conocida como altamente inmunogénica. Esto puede explicar la respuesta no específica observada en el reto 3 días post-vacunación que no se prolongó por dos semanas. El efecto positivo inducido por la proteína VP28 desplegada en la superficie del fago pudo ser observado en los retos realizados tres y 14 días después de la vacunación, lo que sugiere una respuesta específica del grupo de camarones vacunados con VP28-M13 contra la infección del WSSV.

Estudios posteriores deben enfocarse en la optimización de la dosis de VP28-M13, la inclusión de la bionanovacuna en alimento comercial para una administración oral realista, la duración de la alimentación y el inicio del reto viral, así como en una evaluación más profunda de la respuesta inmune ante la vacuna. Hay un largo camino que recorrer para encontrar un esquema de vacunación óptimo para la protección de camarones contra el WSSV.

9. CONCLUSIONES

1. La proteína VP28 puede ser desplegada funcionalmente en la superficie del fago M13.
2. La vacuna VP28-M13 administrada intramuscularmente es capaz de reducir la mortalidad causada por el WSSV y al ser administrada oralmente puede al menos provocar un efecto positivo en la supervivencia.
3. Los resultados sugieren que el sistema inmune del camarón es capaz de reconocer específicamente a la proteína VP28 desplegada en el fago.
4. El fago M13 puede ser utilizado como un sistema de expresión, un acarreador de vacunas y una partícula tipo adyuvante que debería ser considerado para el diseño de bionovacunas para la prevención del WSSV.
5. Las vacunas desplegadas en fagos pueden ser fácilmente intercambiadas para usar este sistema contra otros patógenos que afecten a los camarones en cultivo.

10. LITERATURA CITADA

- Chen, J.Y., K. Anbarasu, C. Y. Chen, Y. C. Lee, F. H. Nan, C. M. Kuo. 2010. Passive immunity to white spot syndrome virus (wssv) in *penaeus monodon* treated with monoclonal antibodies of the heterologously produced VP28 viral envelope protein. *J. Mar. Sci. Technol.* 18(1): 145–152.
- Arap, M. 2005. Phage display technology – Applications and innovations. *Genet Mol Biol*, 28(1): 1-9
- Bastien, N., M. Trudel, C. Simard. 1997. Protective immune response induced by the immunization of mice with recombinant bacteriophage displaying an epitope of the human respiratory syncytial virus. *Virology*. 234: 118-122.
- Bazan, J., I. Calkosinski, A. Gamian. 2012. Phage display-A powerful technique for immunotherapy. *Hum Vaccin Immunother* 8: 1829-1835
- Caipang, C.M.A., N. Verjan, E.L. Ooi, H. Kondo, I. Hirono, T. Aoki, H. Kiyono, Y. Yuki. 2008. Enhanced survival of shrimp, *Penaeus (Marsopenaeus) japonicus* from White spot syndrome disease after oral administration of recombinant VP28 expressed in *Brevibacillus brevis*. *Fish Shell Immunol*; 25:315-320.
- Campa-Córdova, A. I., N. Y. Hernández-Saavedra, R. De Philippis, F. Ascencio. 2002. Generation of superoxide anion and SOD activity in haemocytes and muscle of American white shrimp (*Litopenaeus vannamei*) as a response to β -glucan and sulphated polysaccharide. *Fish Shell. Immunol*; 12:353-366.
- Cárcamo-Arechiga, N., J. Hernández-López, J. Grijalva-Chon, A. Varela-Romero, M. López-Torres, L. Medina-Juárez. 2014. Efecto de la temperatura sobre la actividad de los mecanismos del sistema inmune en *Litopenaeus vannamei* inoculados con WSSV. *Revista Iberoamericana de Ciencias*; 1(5): 152-164.
- Cen, J., X. Liu, M. Zhang, W. Wang. 2013. Identification and immunogenicity of immunodominant mimotopes of outer membrane protein U (OmpU) of *Vibrio mimicus* from phage display peptide library. *Fish Shell. Immunol*; 34(1):291-295.
- Cerenius, L., K. Söderhäll. 2004. The prophenoloxidase-activating system in invertebrates. *Immunol Rev.* 198: 116–126
- Chang, Y.S., W.J. Liu., C.C. Lee, T.L. Chou, Y.T. Lee, T.S. Wu, J.Y. Huang, W.T. Huang, T.L. Lee, G.H. Kou, A.H.J. Wang, C.F. Lo. 2010. A 3D Model of the Membrane Protein Complex Formed by the White Spot Syndrome Virus Structural Proteins. *Plos one*; 5(5):e10718.
- Chen, J.Y., K. Anbarasu, C. Y. Chen, Y. C. Lee, F. H. Nan, C. M. Kuo. 2010. Passive immunity to white spot syndrome virus (wssv) in *penaeus monodon* treated with

- monoclonal antibodies of the heterologously produced VP28 viral envelope protein. *J. Mar. Sci. Technol.* 18(1): 145–152.
- De Berardinis, P., R. Sartorius, A. Caivano, D. Mascolo, G.J. Domingo, G. Del Pozzo, M. Gaubin, R.N. Perham, D. Piatier-Tonneau, J. Guardiola. 2003. Use of fusion proteins and prokaryotic display systems for delivery of HIV-1 antigens: development of novel vaccines for HIV-1 infection. *Curr HIV Res.* 1: 441-446.
- de la Cruz, V.F., A.A. Lal, T.F. McCutchan. 1988. Immunogenicity and epitope mapping of foreign sequences via genetically engineered filamentous phage. *J Biol Chem.* 263: 4318-4322.
- Dominguez-Romero, A.N., R. Zamora-Alvarado, R. Servin-Blanco, E.G. Perez-Hernandez, L.E. Castrillon-Rivera, M.E. Munguia, G. Acero, T. Govezensky, G. Gevorkian, K. Manoutcharian. 2014. Variable epitope library carrying heavily mutated survivin-derived CTL epitope variants as a new class of efficient vaccine immunogen tested in mouse model of breast cancer. *Hum Vaccin Immunother*; 10(11): 3201-3213.
- Du, H., C. Hou, X. Wu, R. Xie, Y. Wang. 2013. Antigenic and immunogenic properties of truncated VP28 protein of white spot syndrome virus in *Procambarus clarkii*. *Fish Shell. Immunol.* 34: 332-338.
- Du, H., Z. Xu, X. Wu, W. Li, W. Dai. 2006. Increased resistance to white spot syndrome virus in *Procambarus clarkii* by injection of envelope protein VP28 expressed using recombinant baculovirus. *Aquaculture.* 260: 39-43.
- Eriksson, F., P. Tsagozis, K. Lunderberg, R. Parsa, S.M. Mangsbo, M.A. Persson, R.A. Harris, P. Pisa. 2009. Tumor-specific bacteriophages induce tumor destruction through activation of tumor-associated macrophages. *J Immunol.* 182:3105-3111.
- Escobedo-Bonilla, C.M., V. Alday-Sanz, M. Wille, P. Sorgeloos, M.B. Pensaert, H.J. Nauwynck. 2008. A review on the morphology, molecular characterization, morphogenesis and pathogenesis of white spot syndrome virus, *J Fish Dis.* 31: 1-18
- Escobedo-Bonilla, C.M., L. Audoorn, M. Wille, V. Alday-Sanz, P. Sorgeloos, M.B. Pensaert, H.J. Nauwynck. 2006. Standardized white spot syndrome virus (WSSV) inoculation procedures for intramuscular or oral routes. *Dis Aquat Org.* 68: 181-188.
- FAO. 2016. Fisheries Topics: Research. El estado mundial de la pesca y la acuicultura (SOFIA). Topics Fact Sheets. Texto de Jean- Francois Pulvenis. In: Departamento de Pesca y Acuicultura de la FAO [en línea]. Roma. Actualizado 7 July 2016. [Citado 6 junio 2016] <http://www.fao.org/fishery/sofia/es>

- Flegel, T.W., K. Sritunyalucksana. 2011. Shrimp Molecular response to viral pathogens. *Mar Biotechnol.* 13(4):587-607.
- Frenkel, D., I. Dewachter, F. Van Leuven, B. Solomon. 2003. Reduction of beta-amyloid plaques in brain of transgenic mouse model of Alzheimer's disease by EFRH-phage immunization. *Vaccine.* 21:1060-1065.
- Fu, L., J. Shuai, Z. Xu, J. Li, W. Li. 2010. Immune responses of *Fenneropenaeus chinensis* against white spot syndrome virus after oral delivery of VP28 using *Bacillus subtilis* as vehicles. *Fish Shell. Immunol;* 28:49-55.
- Fu, L., Y. Wang, Z. Wu, W. Li. 2011. In vivo assessment for oral delivery of *Bacillus subtilis* harboring a viral protein (VP28) against white spot syndrome virus in *Litopenaeus vannamei*. *Aquaculture.* 322-323: 33-38.
- García-Alonso, J., N. Rodríguez-Sánchez, S.K. Misra, E. Valsami-Jones, M.N. Croteau, P.S. Rainbow. 2014. Toxicity and accumulation of silver nanoparticles during development of the marine polychaete *Platynereis dumerilli*. *Sci Total Environ.* 476-477: 688-695.
- Grabowska, A.M., R. Jennings, P. Laing, M. Darsley, C.L. Jameson, L. Swift, W.L. Irving. 2000. Immunisation with phage displaying peptides representing single epitopes of the glycoprotein G can give rise to partial protective immunity to HSV-2. *Virology.* 269: 47-53.
- Ha, Y.M., S.J. Gong, T.H. Nguyen, C.H. Ra, K.H. Kim, Y.K. Nam, S.K. Kim. 2008. Vaccination of Shrimp (*Penaeus chinensis*) against White Spot Syndrome Virus (WSSV). *J Microbiol Biotechnol.* 18, 964-967.
- Hernández-López, J. 2001. Diseño de técnicas para la cuantificación de moléculas plasmáticas de camarón. PhD Thesis. Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo A. C. Sinaloa, México. pp. 105
- Houimel, M., K. Dellagi. 2009. Peptide mimotopes of rabies virus glycoprotein with immunogenic activity. *Vaccine;* 27:4648-4655.
- Iizuka, A., T. Watanabe, T. Kubo, M. Yamamoto, K. Ogawa, T. Ohkuma, A. Kaji. 1994. M13 bacteriophage DNA inhibits duck hepatitis B virus during acute infection. *Hepatology.* 19: 1079-1087
- Jha, R., Z. Xu, S. Bai, J. Sun, W. Li, J. Shen. 2007. Protection of *Procambarus clarkii* against white spot syndrome virus using recombinant oral vaccine expressed in *Pichia pastoris*. *Fish Shell. Immunol.* 22:295-307.
- Jha, R.K., Z.R. Xu, J. Shen, S.J. Bai, J.Y. Sun, W.F. Li. 2006. The efficacy of recombinant vaccines against white spot syndrome virus in *Procambarus clarkii*. *Immunol Lett.* 105: 68-76.

- Kaur, T., N. Nafissi, O. Wasfi, K. Sheldon, S. Wettig, R. Slavcev. 2012. Immunocompatibility of Bacteriophages as Nanomedicines. *Journal of Nanotechnology*, 13
- Kulkarni A., J.H.W.M Rombout, I.S.B. Singh, N.S. Sudheer, J.M. Vlak, C.M.A. Caipang, M.F.Brinchmann, V. Kiron. 2013. Truncated VP28 as oral vaccine candidate against WSSV infection in shrimp: An uptake and processing study in the midgut of *Penaeus monodon*. *Fish Shell. Immunol.*34: 159-166
- Mayo, M. A. 2002. A summary of taxonomic changes recently approved by ICTV. *Arch. Virol.* 147:1655–1663.
- Morales, J., A.S. de Aluja, J.J. Martinez, M. Hernandez, G. Rosas, N. Villalobos, B. Hernandez, A. Blancas, K. Manoutcharian, G. Gevorkian, J. Cervantes, A. Fleury, G. Fragoso, C. Larralde, E. Sciutto. 2011. Recombinant S3Pvac-phage anticysticercosis vaccine: simultaneous protection against cysticercosis and hydatid disease in rural pigs. *Vet parasitol*; 176:53-58.
- Moser, J.R., D.A. Galván Álvarez, F. Mendoza Cano, T. Encinas García, D. E. Coronado Molina, G. Portillo Clark, M.R.F. Marques, F.J. Magallón Barajas, J. Hernández López. 2012. Water temperatura influences viral load and detection of White spot síndrome virus (WSSV) in *Litopenaeus vannamei* and wild crustaceans. *Aquaculture*; 326-329:9-14.
- Namikoshi, A., J. Wu, T. Yamahita, T. Nishizawa, T. Nishioka, M. Arimoto, K. Muroga. 2004. Vaccination trials with *Penaeus japonicus* to induce resistance to white spot syndrome virus. *Aquaculture*; 229:25-35.
- Ng, T.H., Y.A. Chiang, Y.C. Yeh, H.C. Wang. 2015. Reprint of “Review of Dscam-mediated immunity in shrimp and other arthropods”. *Dev Comp immunol.* 48: 306-314
- Ning, J.F., W. Zhu, J.P. Xu, C.Y. Zheng, X.L. Meng. 2009. Oral delivery of DNA vaccine encoding VP28 against white spot syndrome virus in crayfish by attenuated *Salmonella typhimurium*. *Vaccine*; 27:1127-1135.
- Samoylova, T.I., M.D. Norris, A.M. Samoylov, A.M. Cochran, K.G. Wolfe, V. Petrenko, N.R. Cox. 2012. Infective and inactivated filamentous phage as carriers for immunogenic peptides. *J Virol Methods*; 183:63-68.
- Tothova, L., J. Babicková, P. Celec. 2012. Phage survival: the biodegradability of M13 phage display library in vitro. *Biotechnol Appl Biochem.* 59: 490-4
- van Houten, N.E., K.A. Henry, G.P. Smith, J.K. Scott. 2010. Engineering filamentous phage carriers to improve focusing of antibody responses against peptides. *Vaccine* 28: 2174–2185

- van Hulten, M. C., J. Witteveldt, S. Peters, N. Kloosterboer, R. Tarchini, M. Fiers, H. Sandbrink, R. K. Lankhorst, and J. M. Vlak. 2001. The white spot syndrome virus DNA genome sequence. *Virology* 286:7–22
- Vargas-Albores, F., M.A. Guzmán-Murillo, J.L. Ochoa. 1993. An anticoagulant solution for haemolymph extraction and prophenoloxidase studies of penaeid shrimp (*Penaeus californiensis*). *Comp Biochem Physiol*; 106A:299-303.
- Venegas C.A., L. Nonaka, K. Mushiake, T. Nishizawa, K. Muroga. 2000. Quasi-immune response of *Penaeus japonicus* to penaeid rod-shaped DNA virus (PRDV). *Dis Aquat Organ*. 42: 83-89
- Wang, W., X. Zhang. 2008. Comparison of antiviral efficiency of immune response in shrimp. *Fish Shell. Immunol*; 25:522-527.
- Witteveldt, J., J.M. Vlak, M.C.W. 2004. Protection of *Penaeus monodon* against white spot syndrome virus using a WSSV subunit vaccine. *Fish Shell. Immunol*; 16(5): 571-579.
- Xia, Y.J., W.H. Wen, W.Q. Huang, B.C. Huang. 2005. Development of a phage displayed disulfide-stabilized FV fragment vaccine against *Vibrio anguillarum*. *Vaccine*; 23(24):3174-3180.
- Xu, Z., H. Du, Y. Xu, J. Sun, J. Shen. 2006. Crayfish *Procambarus clarkii* protected against white spot syndrome virus by oral administration of viral proteins expressed in silkworms. *Aquaculture*; 253:179-183.
- Yang, J.Y., C.I. Chang, K.F. Liu, J.R. Hseu, L.H. Chen, J.M. Tsai. 2012. Viral resistance and immune response of the shrimp *Litopenaeus vannamei* vaccinated by two WSSV structural proteins. *Immunol Lett*. 148: 41-48
- Yang, Q., L. Wang, D.N. Lu, R.J. Gao, J.N. Song, P.Y. Hua, D.W. Yuan. 2005. Prophylactic vaccination with phage-displayed epitope of *C. albicans* elicits protective immune response against systemic candidiasis in C57BL/6 mice. *Vaccine*. 23(31): 4088-4096.
- Yang, Q., L. Wang, D.N. Lu, R.J. Gao, J.N. Song, P.Y. Hua, D.W. Yuan. 2005. Prophylactic vaccination with phage-displayed epitope of *C. albicans* elicits protective immune response against systemic candidiasis in C57BL/6 mice, *Vaccine* 23: 4088-4096.
- Yi, G., J. Qian, Z. Wang, Y. Qi. 2003. A phage-displayed peptide can inhibit infection by white spot syndrome virus of shrimp. *J Gen Virol*. 84: 2545-2553.
- Yi, G.H., Z.M. Wang, Y.P. Qi, L.G. Yao, J. Qian, L.B. Hu. 2004. VP28 of shrimp white spot syndrome virus is involved in the attachment and penetration into shrimp cells. *J Biochem Mol Biol*; 37(6): 726-734.
- Zaman M., M.F. Good, I. Toth. 2013. Nanovaccines and their mode of action. *Methods* 60, 226-231.

Zhang, Y., L. Song, J. Zhao, L. Wang, P. Kong, L. Liu, M. Wang, L. Qiu. 2010. Protective immunity induced by CpG ODNs against white spot syndrome virus replication indirectly in *Litopenaeus vannamei*. *Development Comparative Immunology* 34: 418-24.