



CENTRO DE INVESTIGACIONES BIOLÓGICAS
DEL NOROESTE, S.C.

Programa de Estudios de Posgrado

**PRODUCCIÓN DEL ANTÍGENO MAP 1609c DE
Mycobacterium avium subsp. *paratuberculosis* EN
Schizochytrium sp. Y EVALUACIÓN DEL EFECTO
INMUNOESTIMULANTE DE LA MICROALGA EN
MODELO DE RATÓN.**

TESIS

Que para obtener el grado de

Maestro en Ciencias

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

P r e s e n t a

Abel Antonio Ramos Vega

La Paz, Baja California Sur, diciembre del 2016.

ACTA DE LIBERACIÓN DE TESIS

En la Ciudad de La Paz, B. C. S., siendo las 10:00 horas del día 24 del Mes de Noviembre 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:

PRODUCCIÓN DEL ANTÍGENO MAP 1609c DE *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* EN *Schizochytrium* sp. Y EVALUACIÓN DEL EFECTO INMUNOESTIMULANTE DE LA MICROALGA EN MODELO DE RATÓN.

Presentada por el alumno:

Abel Antonio Ramos Vega

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

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

LA COMISIÓN REVISORA



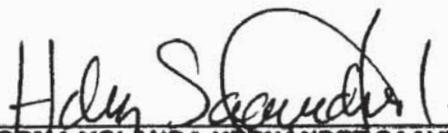
Dr. Carlos Eliud Angulo Valadez
Director de Tesis



Dr. Sergio Rosales Mendoza
Co-Director de Tesis



Dr. Juan Manuel Pacheco Vega
Co-Tutor



DRA. NORMA YOLANDA HERNÁNDEZ SAAVEDRA,
DIRECTORA DE ESTUDIOS DE POSGRADO Y FORMACIÓN DE RECURSOS HUMANOS

Comité tutorial de tesis

Dr. Carlos Eliud Angulo Valadez

Director de Tesis

Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste S.C., La Paz, B.C.S.

Dr. Sergio Rosales Mendoza

Co-Director de Tesis

Universidad Autónoma de San Luis Potosí.

Dr. Juan Manuel Pacheco Vega

Cotutor

Universidad Autónoma de Nayarit.

Comité revisor de tesis

Dr. Carlos Eliud Angulo Valadez

Dr. Sergio Rosales Mendoza

Dr. Juan Manuel Pacheco Vega

Jurado de examen de grado

Dr. Carlos Eliud Angulo Valadez

Dr. Sergio Rosales Mendoza

Dr. Juan Manuel Pacheco Vega

Suplente

Dra. Norma Yolanda Hernández Saavedra

Resumen

Mycobacterium avium subsp. *paratuberculosis* (MAP) es el agente etiológico de la enfermedad de Johne's, que es prevalente en todo el mundo y por lo tanto es necesario el desarrollo de vacunas más eficaces, de bajo costo de producción y con altos rendimientos. Las microalgas son utilizadas como plataforma de producción de antígenos vacunales. Particularmente, *Schizochytrium* sp. produce compuestos benéficos para la salud humana y animal; algunos de esas biomoléculas tienen propiedades inmunogénicas naturales que la hacen interesante para la producción y entrega de vacunas recombinantes. El objetivo de esta investigación fue determinar la producción de un antígeno de MAP en *Schizochytrium* sp. y evaluar la actividad inmunoestimulante de la microalga al ser co-administrada vía oral con el Ag85b recombinante purificado en modelo de ratón. Para ello se realizó la transformación genética de la microalga mediante *Agrobacterium tumefaciens* con la construcción pH7m24GW,3-35SCaMV::MAP85B y se evaluó la expresión transitoria del antígeno mediante inmunoblots. Posteriormente, se evaluó la inmunogenicidad de la microalga en modelo de ratón BALB/c a través de su co-administración vía oral con el Ag85b recombinante purificado. Se establecieron grupos de ratones (n = 5) que recibieron los siguientes tratamientos: Grupo 1, Control (100 µL PBS); grupo 2, 10 µg de antígeno 85b purificado/100 µL PBS; grupo 3, 100 mg de *Schizochytrium* sp. ATCC 20888/100 µL PBS; grupo 4, 100 mg *Schizochytrium* sp. ATCC 20888 más 10 µg de antígeno 85b purificado/100µL PBS; grupo 5, 100 mg *Schizochytrium* sp. comercial más 10 µg de antígeno 85b purificado. Los resultados de la expresión transitoria mostraron una producción del rAg85b por parte de la microalga a las 48 y 72 horas después del cocultivo. La coadministración de *Schizochytrium* sp. con el Ag85b aumenta la producción de IgA total en mucosas, además, reduce el número de células apoptóticas en etapa temprana y una mayor producción de radicales libres por parte de leucocitos de bazo de ratón. De manera relevante, todos los tratamientos tuvieron una reducción de células apoptóticas en etapa tardía en comparación con el control. Los resultados de expresión de genes indicaron una posible activación pro-inflamatoria cuando se co-administra el rAg85b con la microalga; y una respuesta anti-inflamatoria cuando se administra la microalga sola. En conclusión, *Schizochytrium* sp. expresa de forma transitoria la proteína MAP1609 (Ag85b) en un tiempo corto (48 horas). Además, la co-administración del Ag85b recombinante con *Schizochytrium* sp. genera respuestas inmunoestimulantes e inmunomoduladoras. Los resultados de esta investigación indican que esta microalga posee un gran potencial para la producción y entrega de vacunas orales.

Palabras clave:

Schizochytrium sp., *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*, expresión transitoria, vacunas orales, inmunoestimulantes.

Vo.Bo.

Dr. Carlos Eliud Angulo Valadez
Director de Tesis

Dr. Sergio Rosales Mendoza
Co-Director de Tesis

Summary

Mycobacterium avium subsp. *paratuberculosis* (MAP) is the etiological agent of Johne's disease, which is common all over the world and therefore is necessary the development of more effective vaccines, low cost of production and with high yields. Microalgae are used as a platform for the production of antigens vaccine. In particular, *Schizochytrium* sp. produces beneficial compounds for human and animal health; some of these biomolecules have natural immunogenic properties that make them interesting for the production and delivery of recombinant vaccines. The objective of this investigation was to determine the production of a MAP antigen in *Schizochytrium* sp.; additionally, to evaluate the immunostimulatory activity of the microalgae when co-administered orally with recombinant Ag85b purified in mouse model. For this, the genetic transformation of the microalga was carried out using *Agrobacterium tumefaciens* with the construction pH7m24GW,3-35SCaMV::MAP85B and the transient expression of the antigen was evaluated by immunoblots. Subsequently, the immunogenicity of *Schizochytrium* sp. in the BALB/c mouse model was evaluated via oral co-administration with the purified recombinant Ag85b. Groups of mice (n = 5) were established that received the following treatments: group 1, control (100 µL PBS); group 2, 10 µg of purified Ag85b/100 µl PBS; group 3, 100 mg of *Schizochytrium* sp. ATCC 20888/100 µl PBS; group 4, 100 mg *Schizochytrium* sp. ATCC 20888 plus 10 µg of purified Ag85b/100 µl PBS; group 5, 100 mg *Schizochytrium* sp. commercial plus 10 µg of purified Ag85b. The results of transient expression showed a production of Ag85b by the microalga at 48 and 72 hours after co-culture. The co-administration of *Schizochytrium* sp. with Ag85b increases the total IgA production in the mucosa; in addition, it reduces the number of early apoptotic cells and a greater production of free radicals by leukocytes isolates of mouse spleen. Significantly, all treatments had a reduction in a late apoptotic cell stage compared to the control. The results of the gene expression indicated a possible pro-inflammatory activation when rAg85b is co-administered with the microalga; moreover, the response was anti-inflammatory when the microalga was administered only. In conclusion, *Schizochytrium* sp. expresses transiently the MAP1609 protein (Ag85b) in a short time (48 hours). In addition, co-administration of recombinant Ag85b with *Schizochytrium* sp. generates immunostimulatory and immunomodulatory responses. The results of this research indicate that this microalga has great potential for the production and delivery of oral vaccines.

Keywords:

Schizochytrium sp., *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*, transient expression, oral vaccines, immunostimulants.

Vo.Bo.

Dr. Carlos Eliud Angulo Valadez
Director de Tesis

Dr. Sergio Rosales Mendoza
Co-Director de Tesis

Agradecimientos

A CONACYT por la beca de maestría No. 633760 y el financiamiento de los proyectos SEP-CONACYT 151818, INFR-2014-01 No. 225924 y PDCPN2014-01/248033 (CIBNOR), y los proyectos INFR-2016-271182 y CB-256063 (UASLP) para realizar la investigación.

Al CIBNOR, S. C. por las instalaciones prestadas para los cursos tomados y para la realización de los experimentos. A cada una de las personas que laboran en las distintas áreas, en especial a Posgrado (Dra. Norma, Lic. Osvelia, Lic. Tania y Horacio) y a todo el personal del edificio A.

A mi comité tutorial:

Al Dr. Carlos, que más que mi director de tesis, es un buen amigo y consejero. Siempre paciente para con sus estudiantes y es meritorio a seguir sus pasos.

Al Dr. Sergio, quien siempre me apoya con comentarios puntuales y acertados sobre el trabajo de tesis; además, no se sorprende de mis ocurrencias ni se asusta, haciendo nuestras pláticas muy amenas.

Al Dr. Juan Manuel, quien me ha ayudado con sus comentarios objetivos sobre mi trabajo y es ejemplo de humildad y sencillez.

A la Dra. Martha Reyes por todo su apoyo en el laboratorio de Patogénesis Microbiana del CIBNOR y en el análisis de datos, quien con su paciencia me ayudó a realizar muchos de los experimentos presentes en este trabajo. Además, se convirtió en una gran amiga que siempre nos quiere dar de comer.

Al Dr. Felipe Ascencio, por las facilidades otorgadas para utilizar el equipo y reactivos del laboratorio de patogénesis microbiana.

A los técnicos M.C. Julio Hernández (Lab. Biología Molecular de Plantas), M. C. Margarito Rodríguez y M.C. Mario Arce (Lab. Biotecnología Vegetal), QFB. Marte

Virgen (Lab. Cepario de Microalgas), y al Dr. Amaury Cordero y Tec. Guadalupe Sánchez (Bioterio) por el apoyo y las facilidades otorgadas.

Elizabeth Monreal, Bernardo Bañuelos y a todos los miembros del Laboratorio de Biofarmacéuticos Recombinantes de la UASLP, quienes me brindaron una mano amiga para realizar el trabajo que realicé en mi estancia de investigación.

Al M.C. Mario Rojas, por su apoyo y consejo constante en el trabajo.

A la IBQ. Érika Alamillo y M.C. Esteban Velázquez por su apoyo técnico.

A Crystal e Iván por su amistad y apoyo a lo largo de estos dos años. Con ellos confirmo que existen personas de buen corazón y que ofrecen su amistad de manera sincera e incondicional.

A mi amigo Issac por los todos los momentos de descanso y largas pláticas tan divertidas.

A mis compañeros del laboratorio de patogénesis microbiana y al Grupo de Inmunología y Vacunología por su apoyo en el trabajo de tesis y por los buenos momentos de convivencia.

A Roberto Carlos, por todo su apoyo incondicional y por estar conmigo en cada momento.

A mis amigos de la maestría, en especial a Rigel (mi primer compa de la maestría), Ricardo y a Sergio.

A todos mis compañeros de maestría, de quienes guardaré siempre buenos recuerdos, porque con ellos empecé este camino hacia la ciencia. Les deseo grandes éxitos en su vida como estudiantes y profesionales.

A mi familia por ser mi motivo para querer salir adelante.

A Dios, Mi Soporte Invisible.

Contenido

Comité tutorial de tesis.....	i
Resumen.....	ii
Summary.....	iv
Agradecimientos.....	vi
Contenido.....	viii
Lista de figuras.....	x
Lista de tablas.....	xi
1. INTRODUCCIÓN.....	12
2. ANTECEDENTES.....	15
2.1. Vacunas contra <i>Mycobacterium avium</i> subsp. <i>paratuberculosis</i>	15
2.2. Vacunas orales de subunidades producidas en microalgas.....	16
2.3. <i>Schizochytrium</i> sp.....	18
2.4. Vacuna contra la influenza producida en <i>Schizochytrium</i> sp. ATCC 20888.....	19
2.5. Compuestos inmunoestimulantes.....	20
3. JUSTIFICACIÓN.....	23
4. HIPÓTESIS.....	24
5. OBJETIVOS.....	25
6. MATERIAL Y MÉTODOS.....	26
6.1. Cepa y cultivo.....	26
6.2. Transformación transitoria.....	26
6.3. Ratones.....	27
6.4. Inmunización oral.....	27
6.5. Detección de inmunoglobulinas G (IgG) específica para Ag85b por ensayo ELISA.....	28
6.6. Detección de inmunoglobulinas G (IgG) totales en suero e IgA en mucus y heces.....	29
6.7. Actividades de superóxido dismutasa y catalasa.....	29
6.8. Análisis de fagocitosis, apoptosis y explosión respiratoria en leucocitos de bazo por citometría de flujo.....	30
6.8.1. Aislamiento de leucocitos de bazo.....	30
6.8.2. Fagocitosis.....	30
6.8.3. Apoptosis.....	31

6.8.4. Explosión respiratoria (DHR-123).....	32
6.9. Expresión de genes por tiempo real (RT-qPCR).....	32
6.9.1. Diseño de primers.....	32
6.9.2. Extracción de ARN y síntesis de ADNc	33
6.10. Análisis estadísticos.....	33
7. RESULTADOS.....	34
7.1. Transformación transitoria	34
7.2. Efecto inmunoestimulante de la microalga <i>Schizochytrium</i> sp. en la coadministración oral con el antígeno MAP1609c recombinante (rAg85b).....	34
7.3. Detección de inmunoglobulinas G (IgG) específicas contra rAg85b.....	35
7.4. Detección de IgA totales	35
7.4.1. Detección de IgA totales en mucus	35
7.4.2. Detección de IgA totales en heces	36
7.5. Detección de IgG totales en suero	37
7.6.1. Actividad SOD en hígado	38
7.6.2. Actividad catalasa en hígado.....	39
7.7. Fagocitosis, explosión respiratoria y apoptosis.....	39
7.7.1. Fagocitosis	39
7.7.2. Explosión respiratoria	40
7.7.3. Apoptosis temprana.....	41
7.7.4. Apoptosis tardía.....	41
7.8. Expresión de genes en bazo e intestino	42
7.8.1. Expresión de genes en bazo	42
7.8.2. Expresión de genes en intestino.....	43
7.9. Análisis de cortes histológicos de hígado e intestino	44
8. DISCUSIÓN	46
10. CONCLUSIONES	54
11. RECOMENDACIONES	55
12. LITERATURA CITADA.....	56

Lista de figuras

Figura 1. Western blot para detectar la proteína recombinante rAg85b expresada en <i>Schizochytrium</i> sp.	34
Figura 2. Niveles de anticuerpos IgG anti-Ag85b detectados mediante ELISA en muestras de sueros.....	35
Figura 3. Niveles de anticuerpos IgA totales en mucus intestinal.....	36
Figura 4. Niveles de anticuerpos IgA totales en heces.....	37
Figura 5. Niveles de anticuerpos IgG totales en suero.....	37
Figura 6. Actividad de superóxido dismutasa (SOD) en hígado	38
Figura 7. Proporción de células fagocíticas en leucocitos de bazo	40
Figura 8. Porcentaje de producción de radicales en leucocitos de bazo	40
Figura 9. Porcentaje de células apoptóticas medido con la utilización de Anexina V en leucocitos de bazo	41
Figura 10. Apoptosis tardía por la activación de caspasa3 en leucocitos de bazo.....	42
Figura 11. Expresión relativa de genes asociados a la respuesta inmune en bazo de ratones	43
Figura 12. Expresión relativa de genes asociados a la respuesta inmune en intestino de ratones.....	44
Figura 13. Cortes histológicos de hígado de ratones	45
Figura 14. Cortes histológicos de intestino de ratones.....	45

Lista de tablas

Tabla I. Grupos y tratamientos del bioensayo en modelo de ratón.	28
Tabla II. Esquema de inmunización, toma de muestra y día de sacrificio de los ratones..	28
Tabla III. Primers utilizados para evaluar la expresión de genes asociados a la respuesta inmune.....	33

1. INTRODUCCIÓN

Mycobacterium avium spp. *paratuberculosis* (MAP) es un bacilo alcohol ácido resistente que presenta un tamaño que va de 0.5 a 1.5 μm . Esta micobacteria es el agente etiológico de la enfermedad de Johne's, la cual consiste en diarrea intermitente, emaciación e inflamación intestinal crónica en rumiantes; provocando pérdidas millonarias para el sector ganadero (Chiodini, 1993; Losinger, 2005). En rumiantes infectados, MAP es excretada en las heces y la leche, en los cuales la cloración y la pasteurización no mata al microorganismo. Por lo anterior, el patógeno puede estar presente en productos lácteos, por lo que la enfermedad de Crohn en humanos (una inflamación intestinal crónica) se ha vinculado con este patógeno (Cocito *et al.*, 1994; Ellingson *et al.*, 2005; Naser *et al.*, 2004).

La detección de la enfermedad se dificulta debido a que el período de incubación del bacilo en las vacas es generalmente 2 a 4 años, lo que incrementa el riesgo de contagio a otros animales derivado de la liberación intermitente de la bacteria (Brady *et al.*, 2008). Además, las vacunas contra MAP consisten en formulaciones atenuadas de bacterias enteras que no ofrecen una protección adecuada, cuya mayor desventaja es el hecho de que puede interferir con pruebas de diagnóstico por reacción cruzada con *Mycobacterium bovis* (Hines *et al.*, 2014; Rosseels y Huygen, 2008; Roupie *et al.*, 2012).

Actualmente se están desarrollando vacunas de subunidades, algunas de ellas basadas en el antígeno 85b (Ag85b) que está relacionado con la fase exponencial de infección, induce la producción de citocinas como interferón γ (IFN- γ) e interleucina 2 y 12 (IL2, IL12) y además puede proporcionar inmunoprotección contra *Mycobacterium tuberculosis* en organismos inmunizados (Bannantine *et al.*, 2014; Mullerad *et al.*, 2002; Pepponi *et al.*, 2014). Ag85b pertenece al complejo de antígenos 85 denominados A, B y C; los cuales tienen actividad micolil transferasa (relevante en la formación de la pared bacteriana), están involucradas en la

capacidad de unión a la matriz extracelular de las células del huésped y participan en la supervivencia dentro del macrófago (Johnston *et al.*, 2010).

En este contexto, la producción de proteínas recombinantes implicadas en vacunación puede llevarse a cabo en bacterias, levaduras, plantas, células de mamíferos y en microalgas. Estas últimas presentan amplias ventajas respecto a otros organismos, tales como bajos costos de producción, una rápida obtención de biomasa, bajos riesgos de contaminación, así como una capacidad de plegar, glicosilar y ensamblar proteínas multiméricas adecuadamente. Además, se puede evitar la cadena de frío en el transporte por la bioencapsulación que ofrece la misma célula productora del antígeno y por la posibilidad de liofilizar directamente la biomasa sin realizar procesos de purificación (Goldstein y Thomas, 2004; Specht y Mayfield, 2014).

De manera particular, se han desarrollado vacunas experimentales en la plataforma de microalgas dirigidas contra enfermedades como la malaria (Dauvillée *et al.*, 2010; Gregory *et al.*, 2012), hepatitis B (Hempel *et al.*, 2011), influenza (Bayne *et al.*, 2013), entre otras. De manera específica, en el caso de las vacunas producidas en microalgas y administradas vía oral (vacunas orales) se ha observado que, a pesar de obtener rendimientos relativamente bajos en la expresión del antígeno recombinante de interés, poseen la capacidad de bioencapsular hasta por 20 meses (Dreesen *et al.*, 2010), pueden proteger de infecciones parasitarias (Dauvillée *et al.*, 2010) e inducir respuestas inmunogénicas eficientes en distintos modelos animales (Feng *et al.*, 2014; Gregory *et al.*, 2013).

En este trabajo se produjo el antígeno 85b (MAP1609c) recombinante (rAg85b) en la microalga marina *Schizochytrium* sp. mediante un método de expresión transitoria basado en *Agrobacterium tumefaciens*. *Schizochytrium* sp. ha sido transformada genéticamente y se reconoce que posee componentes inmunoestimulantes que la hacen una plataforma atractiva en la producción de vacunas recombinantes (Bayne *et al.*, 2013; Chen *et al.*, 2012; Hoang *et al.*, 2014).

Además, se evaluó la capacidad inmunogénica de la microalga mediante la co-administración vía oral con el antígeno 85b recombinante purificado vía oral en modelo de ratón BALB/c. Los resultados obtenidos demuestran que *Schizochytrium* sp. posee capacidad inmunoestimulante por sí sola y al ser coadministrada con el rAg85b.

2. ANTECEDENTES

2.1. Vacunas contra *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*

La primer vacuna desarrollada contra MAP fue desarrollada por Vallée y Rinjard (1926). Esta vacuna consistía en células vivas atenuadas de una cepa no virulenta de MAP con una mezcla adyuvante de aceite de oliva, parafina líquida y polvo de piedra pómez. Actualmente, en Estados Unidos está a la venta la vacuna Mycopar que consiste en células muertas de la cepa 18 de MAP (Mycopar®; Fort Dodge Animal Health Company, Fort Dodge, IA, USA). Otro ejemplo de vacuna disponible es Gudair™ que es producida en España y consiste en células de la cepa 316F de MAP en combinación con aceite mineral como adyuvante (Chiodini *et al.*, 1993; Reddacliff *et al.*, 2006).

En este contexto, existe la necesidad de contras con vacunas que superen las limitantes de las vacunas disponibles para MAP. Tal es el caso de aquellas basadas en cepas mutantes atenuadas como la desarrollada por Settles y colaboradores (2014), estudio en el que se evaluaron las mutaciones fabG2 2 y umaA1 en los genes pgs1360 y pgs3965, respectivamente. Se utilizó un modelo murino para la inmunización, en el que se observó una disminución considerable en la colonización bacteriana después de un reto con una cepa virulenta de MAP (Settles *et al.*, 2014). Otra estrategia de vacunación es el uso de vacunas de ADN, que se formulan con plásmidos que permiten la expresión en el huésped de proteínas altamente inmunogénicas. Un ejemplo de este enfoque es el realizado por Roupie y colaboradores (2012), quienes reportaron el uso de una vacuna de ADN que codificaba ocho antígenos específicos de MAP. Los ratones inmunizados presentaron una fuerte respuesta de interferón γ (IFN γ) contra cuatro de los antígenos administrados. Sin embargo, ninguna de las vacunas de ADN proporcionó protección ante un reto con MAP virulento (Roupie *et al.*, 2012).

La identificación de proteínas inmunodominantes capaces de inducir respuestas inmunes robustas es crucial para el desarrollo de vacunas de subunidades que reemplacen el uso de células completas, lo que podría evitar los efectos secundarios asociados a la aplicación de este tipo de vacunas (p.ej. una alta reactogenicidad que genere abscesos en el sitio de aplicación). Tal es el caso del complejo Ag85, que es una familia de tres proteínas (Ag85A, Ag85B, y Ag85C) de 30-32 KDa que poseen actividad enzimática de micolil-transferasa que está implicada en el acoplamiento de los ácidos micólicos al arabinogalactano presente en la pared celular de MAP. Estas proteínas también presentan la capacidad de unirse a proteínas de la matriz extracelular de células del huésped tales como la fibronectina y elastina (Belisle *et al.*, 1997; Kuo *et al.*, 2013; Naito *et al.*, 1998).

Es relevante mencionar que los miembros de la familia Ag85 se encuentran en todas las micobacterias. En particular, la proteína 85b (MAP1609c) de MAP provoca fuertes respuestas inmunes robustas en ratones cuando se administra, ya sea como antígeno recombinante o como una vacuna de ADN (Mullerad *et al.*, 2002). Además, el Ag85b confiere inmunoprotección contra la tuberculosis en distintos modelos animales y es por ello que algunas vacunas basadas en este antígeno se están evaluando en ensayos clínicos (Rosales-Mendoza *et al.*, 2015).

2.2. Vacunas orales de subunidades producidas en microalgas

En el ámbito de la producción de vacunas de subunidades, las formulaciones termoestables y de administración oral podrían superar los mayores obstáculos que impiden que la vacunación sea generalizada y de amplia distribución. La termoestabilidad eliminaría la necesidad de almacenamiento en cadena de frío y la administración oral resulta en formulaciones más seguras, más fáciles de administrar y más económicas que las vacunas inyectables (Chen *et al.*, 2011; Gregory *et al.*, 2013).

En contraparte, la vacunación oral presenta la limitante de la tolerancia inmunológica local y sistémica, conocida como tolerancia oral (Wilkhu *et al.*, 2011).

Otro desafío es la degradación del antígeno por las bacterias comensales, proteasas y por el pH ácido del estómago. Estos obstáculos pueden ser superados por la encapsulación de antígenos y la adición de adyuvantes para mejorar las propiedades inmunogénicas de la vacuna, con la finalidad de aumentar la biodisponibilidad antígeno y asegurar su reconocimiento por parte de los componentes de los tejidos linfoides asociados al intestino (GALT, por sus siglas en inglés) (Hernández *et al.*, 2014).

Algunas vacunas han sido producidas en microalgas, utilizando métodos de transformación tales como biobalística, electroporación y por el sistema de vector binario con *A. tumefaciens*. Entre estas vacunas, son de gran interés aquellas que son de administración oral, ya que muestran inmunogenicidad a nivel de mucosas y sistémico. Por ejemplo, se desarrolló una vacuna contra *S. aureus* en la microalga *Chlamydomonas reinhardtii*, presentando rendimientos del antígeno hasta de 0.7% de la proteína soluble total (PST). Esta vacuna fue estable a temperatura ambiente por 20 meses. Además, la respuesta en la producción de inmunoglobulina A (IgA) en mucosa y de inmunoglobulina G (IgG) sistémicas se observó en ratones inmunizados por vía oral sometidos a un esquema que consistió en 4 dosis administradas semanalmente. De manera interesante, se alcanzó una tasa de supervivencia del 80% después de un desafío letal con *S. aureus* (Dreesen *et al.*, 2010). En la misma especie de microalga, se desarrolló una vacuna contra la malaria. La administración de la vacuna fue capaz de inducir respuestas de IgG sistémicas que proporcionaron protección contra *Plasmodium berghei* en términos de reducción en la carga parasitaria en eritrocitos de ratones inmunizados con una sola dosis de la vacuna (Dauville'e *et al.*, 2010).

Otro caso de una vacuna oral producida en microalgas contra la malaria consistió en una proteína de fusión que comprende la subunidad B de la toxina del cólera (CTB) como adyuvante y el antígeno Pfs25 de *Plasmodium falciparum*. En esta investigación, la vacunación oral con CTB-Pfs25 en ratones BALB/c indujo

anticuerpos específicos anti-CTB IgG en suero e IgA en heces, así como la producción de anticuerpos IgA Pfs25 específicos (Gregory *et al.*, 2013).

También existe un reporte sobre la evaluación del potencial de la microalga marina *Dunaliella salina* para la producción y entrega oral de vacunas recombinantes, que consistió en expresión de la proteína viral 28 (VP28) del virus de la mancha blanca en *D. salina* con rendimientos de hasta 780 µg de VP28 por litro de cultivo. La administración oral de esta vacuna fue capaz de inducir una reducción del 41% en la mortalidad de camarones después de un desafío letal con el virus (Feng *et al.*, 2014).

2.3. *Schizochytrium* sp.

Schizochytrium sp. es una microalga marina que representa una alternativa interesante para la producción y entrega de vacunas. Esta microalga pertenece a la familia *Thraustochytriaceae*, su metabolismo es heterotrófico y presenta un diámetro celular aproximado de 9 a 14 micras (Yokoyama *et al.*, 2007). Los lípidos representan hasta el 56% del peso seco total en *Schizochytrium* sp., contiene hasta 10% de proteínas y un 25% de carbohidratos (Qu *et al.*, 2013; Yao *et al.*, 2015).

Es de gran interés el hecho de que el ácido docosahexaenoico (DHA, por sus siglas en inglés) producido en esta microalga es reconocido como generalmente seguro (GRAS, por sus siglas en inglés) por la Administración de Alimentos y Medicamentos de los Estados Unidos (FDA, por sus siglas en inglés); además, esta microalga no contiene ninguna sustancia tóxica ni perjudicial, lo cual favorece su uso en la bioencapsulación de antígenos (FDA, 2004; Mioso *et al.*, 2014). Además, esta microalga tiene la capacidad de producir compuestos inmunoestimulantes y de expresar proteínas recombinantes de uso vacunal. Como un organismo eucariota, es capaz de realizar modificaciones postraduccionales de manera eficiente, lo cual representa una gran ventaja sobre las plataformas bacterianas. Por último, *Schizochytrium* sp. puede exportar las proteínas

recombinantes hacia el compartimiento extracelular, permitiendo que el antígeno pueda purificarse fácilmente (Bayne *et al.*, 2013; Gurzell *et al.*, 2013; Sahdev *et al.*, 2008).

2.4. Vacuna contra la influenza producida en *Schizochytrium* sp. ATCC 20888

Bayne y colaboradores (2013) desarrollaron la primera vacuna recombinante usando como plataforma a la microalga *Schizochytrium* sp. ATCC 20888. La cepa fue modificada para expresar la proteína hemaglutinina (HA) del virus de la influenza A/Puerto Rico/8/34 (H1N1) (Bayne *et al.*, 2013). El método de transformación utilizado fue bombardeo de partículas y la expresión fue regulada por el promotor EF-1 y el terminador PFA3. El marcador de selección empleado fue un gen de resistencia a paromomicina (*genaphH*). El antígeno HA se purificó a partir del sobrenadante del medio de cultivo de fermentación, observándose rendimientos promedio de 5 a 20 mg de HA por litro de cultivo. Si este rendimiento de secreción se compara con el máximo alcanzado en la plataforma de *Chlamydomonas reinhardtii*, que es de hasta 10,5% de la proteína soluble total, el observado en *Schizochytrium* sp. ATCC 20888 es mayor y llega a ser comparable con algunos sistemas de expresión de plantas (Mardanov *et al.*, 2015).

Para evaluar la inmunogenicidad del antígeno, los autores utilizaron dos esquemas de vacunación en ratones BALB/c. Uno que comprendió dosis de 1.7, 5 y 15 μg de HA sola o coadministrada con el adyuvante AddaVaxTM; y otro esquema que consistió en un refuerzo administrado tres semanas después de la última inmunización. Al evaluar la inmunidad protectora contra un reto letal con un virus homólogo, se observó que todos los ratones fueron protegidos después de dos vacunaciones independientemente de la dosis administrada. En cuanto a los títulos de virus presentes en los ratones, aquellos que recibieron dosis de antígeno mezclado con AddaVaxTM mostraron títulos menores del virus observados en los animales tratados con la vacuna sin el adyuvante (Bayne *et al.*, 2013). Estos

resultados confirman que *Schizochytrium* sp. puede emplearse para la producción de vacunas recombinantes, aunque no se ha evaluado su potencial como vehículo de entrega o la co-administración de vacunas recombinantes.

2.5. Compuestos inmunoestimulantes

La actividad inmunogénica observada en las vacunas orales producidas en microalgas, en los regímenes de inmunización que se han probado hasta el momento, es atribuida a la bioencapsulación ejercida por misma célula microalgal. Además, se sugiere que la presencia de compuestos inmunoestimulantes puede estar aumentando la inmunogenicidad y mejorando el reconocimiento de la vacuna en las mucosas (Gregory *et al.*, 2013).

Los compuestos adyuvantes e inmunoestimulantes pueden mejorar la eficacia de las vacunas, ya que favorecen la inducción de respuestas inmunes más amplias a través de varios mecanismos del sistema inmune (Reed *et al.*, 2013). Los beneficios del uso de dichos compuestos incluyen una inmunogenicidad aumentada, una disminución de la cantidad de antígeno necesaria por dosis y una protección inmunológica que puede tener una duración más larga que otros esquemas de vacunación (Petrovsky *et al.*, 2004). El uso de organismos que contienen compuestos inmunoestimulantes y que pueden utilizarse como plataforma de producción y entrega oral constituye el caso ideal para la producción de vacunas recombinantes (Rosales-Mendoza *et al.*, 2014).

En este contexto, los organismos marinos son utilizados actualmente para producir compuestos con aplicaciones diversas para la salud humana y animal (Mayer *et al.*, 2011). En particular, el género *Schizochytrium* contiene varios compuestos bioactivos, tales como los flavonoides, β -glucanos, β -caroteno, polisacáridos, entre otros; siendo algunos de ellos considerados como inmunoestimulantes e inmunomoduladores que pueden mejorar la función inmune. Es de interés que no se han observado signos de toxicidad derivados del uso de *Schizochytrium* sp. en

humanos o animales, ni se ha identificado algún metabolito intermediario involucrado con la síntesis de compuestos tóxicos (Mioso *et al.*, 2014).

Entre los compuestos bioquímicos que se encuentran en concentraciones importantes en *Schizochytrium* sp. se están los lípidos. Dichos compuestos son componentes importantes de medicamentos inyectables, vacunas y de suplementos nutricionales (Strickley, 2004). Particularmente, *Schizochytrium* sp. tiene la capacidad de sintetizar cantidades importantes de ácido docosahexaenoico (DHA), eicosapentaenoico (EPA), escualeno, ácido palmítico (AP) y otros compuestos lipídicos (Huang *et al.*, 2010; Taparia *et al.*, 2015).

Se ha reportado que el DHA aumenta la activación de linfocitos B, mejorando la respuesta de la mucosa y la producción de IgA (Gurzell *et al.*, 2013). De forma paralela, se ha observado que la suplementación con ácidos grasos omega-3 (DHA) en regímenes de vacunación influyen positivamente en la respuesta de IgG (Furuhjelm *et al.*, 2011).

En la actualidad, algunos lípidos son usados en la formulación de adyuvantes y de vacunas. Por ejemplo, el MF59 es un adyuvante que contiene escualeno y es usado en la vacuna contra la gripe llamada Fludax® (Frey *et al.*, 2014). El escualeno se obtiene mayormente de fuentes animales; sin embargo se prevé su sustitución por aquel derivado de plantas y microalgas, tales como *Schizochytrium* sp. que es un organismo rico en este compuesto (Hoang *et al.*, 2014).

Otro hecho que favorece el uso de *Schizochytrium* sp. como potencial inmunoestimulante oral es su alto contenido de ácido palmítico (AP). La administración de AP en la dieta aumentó la producción de IgA intestinal, respecto al control, en ratones inmunizados por vía oral con el antígeno ovalbúmina y la toxina del cólera; lo que sugiere que la presencia de AP tiene efectos adyuvantes en la mucosa intestinal (Kunisawa *et al.*, 2014).

Otros compuestos ampliamente encontrados en microorganismos marinos son los polisacáridos, los cuales son de gran interés en aplicaciones como vehículos de

vacunas y adyuvantes (Petrovsky y Cooper, 2011). Un caso notable es el adyuvante ADVAX™ que contiene el polisacárido pectina y que mejora las respuestas humorales y celulares en vacunas contra la influenza y la hepatitis (Saade *et al.*, 2013). Particularmente, *Schizochytrium* sp. produce altos niveles de exopolisacáridos en rendimientos de hasta 300 mg por litro de cultivo, los cuales pueden ser fácilmente colectados y purificados (Chang *et al.*, 2014).

3. JUSTIFICACIÓN

Las vacunas de subunidades son clave importante en el combate hacia muchas de las enfermedades humanas y animales, sin embargo, los altos costos de producción y los bajos rendimientos son grandes obstáculos que se deben solucionar. Las microalgas tienen un gran potencial como plataformas para la producción de proteínas recombinantes que pueden ser usadas como antígenos vacunales. Además, se podrían obtener altos rendimientos y bajo riesgo de contaminación, si los comparamos con plataformas bacterianas o células de mamíferos e insectos. En particular, *Schizochytrium* sp. posee ácidos grasos benéficos para la salud humana y animal, además de poseer componentes inmunoestimulantes que son de gran interés para mejorar la inmunogenicidad de las vacunas. Hasta el momento no existe un estudio en el que se evalúe el potencial de *Schizochytrium* sp. en la producción del Ag85b y de cualquier antígeno recombinante de forma transitoria en microalgas; desconociéndose además el efecto de la administración oral de *Schizochytrium* sp. sola o en combinación con el rAg85b sobre el sistema inmune en animales. Derivado de lo anterior, se plantearon las siguientes preguntas:

¿Tendrá *Schizochytrium* sp. la capacidad de expresar la proteína 85b de MAP en un ensayo de expresión transitoria? ¿Tendrán los componentes de *Schizochytrium* sp. capacidad inmunoestimulante al ser co-administrada con el Ag85b purificado vía oral en modelo de ratón?

4. HIPÓTESIS

Si se ha usado la microalga *Schizochytrium* sp. para la producción de proteínas recombinantes con altos rendimientos y esta microalga posee por sí misma componentes inmunoestimulantes, entonces, será capaz de expresar la proteína recombinante MAP1609c (Ag85b), y además presentará actividad inmunoestimulante al ser co-administrada con el Ag85b purificado vía oral.

5. OBJETIVOS

5.1. Objetivo general

Expresar la proteína recombinante MAP 1609c de *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* en *Schizochytrium* sp. y evaluar el efecto inmunoestimulante de la microalga en modelo de ratón.

5.2. Objetivos particulares

5.2.1 Determinar la producción del antígeno MAP1609c (Ag85b) mediante expresión transitoria en *Schizochytrium* sp.

5.2.2 Determinar el potencial inmunoestimulante de *Schizochytrium* sp. al ser co-administrada con el rAg85b purificado vía oral en modelo de ratón, evaluando parámetros inmunológicos.

6. MATERIAL Y MÉTODOS

6.1. Cepa y cultivo

Se empleó la cepa de *Schizochytrium* sp. ATCC 20888.

La cepa de *Schizochytrium* sp. fue mantenida en medio sólido y líquido enriquecido con medio a base de peptona, dextrosa y extracto de levadura (medio YPD, por sus siglas en inglés) (Y1375, SIGMA) con agua marina como base a 35 unidades prácticas de salinidad (UPS), a una temperatura de cultivo de 27 °C (+/- 1° C).

Para el ensayo de inmunización se utilizó además la microalga comercial *Schizochytrium* sp. (Algamac-2000™).

6.2. Transformación transitoria

Se cultivó la cepa GV2260 de *A. tumefaciens* en medio Luria Bertani (LB) (L3022, SIGMA) con los antibióticos correspondientes (25 mg/L rifampicina, 100 mg/L carbenicilina y 50 mg/L espectinomicina). A un matraz conteniendo 100 mL de YPD se le añadió 1 mL de *A. tumefaciens* cepa GV2260 transformada con la construcción pH7m24GW-35SCaMV::MAP85B (generada por el M.C. Mario Rojas) procedente del medio de inducción (LB, 200 µM acetosiringona, 4 horas previas al co-cultivo). Se añadió el surfactante Silwet L-77 al 0.005% (v/v; 5 µL) al medio de co-cultivo (YPD, 10 UPS). Después de un co-cultivo de 12 horas, se realizaron 3 lavados con YPD (35 UPS) a 1000 rpm por 5 minutos para disminuir la carga bacteriana. Las células de *Schizochytrium* sp. se pasaron a medio de cultivo YPD (35 UPS) nuevo y se añadió 250 µg/mL de cefotaxima para detener el crecimiento de *A. tumefaciens*. A partir de ese momento se tomaron alícuotas de 30 mL a las 24, 48 y 72 h. Cuando se tuvieron las muestras se procedió a la extracción de proteínas según Franklin *et al.* (2002).

Se corrieron 20 μ L del extracto de proteínas de cada muestra por electroforesis SDS-PAGE (Laemmli, 1970) a una concentración del 12% (acrilamida 30% y bis-acrilamida 0.8%) a 100 V. Un gel se tiñó con azul de Coomassie, mientras que una réplica se transfirió a una membrana de difluoruro de polivinilideno (PVDF, por sus siglas en inglés) (1620177, Bio-Rad). Se bloqueó la membrana con leche al 5% disuelta en solución amortiguadora de fosfatos (PBS, por sus siglas en inglés) pH 7.4, durante toda la noche a 4°C. Posteriormente, se realizaron tres lavados de 10 minutos cada uno con PBS Tween (Tween 20 al 0.05%), colocándola en agitación durante este tiempo. Se incubó la membrana con antisuero anti-Ag85b por cinco horas a temperatura ambiente (25 °C) y se realizaron los lavados con PBS. Se incubó con el anticuerpo secundario anti-IgG de ratón por dos horas a T.A. y se realizaron lavados. Para el revelado se disolvieron 2.5 mg de diaminobencidina mas 2.5 μ L de H₂O₂ en 10 mL de acetato de sodio al 50 mM. Para detener la reacción se utilizó molibdato de sodio al 1 M.

6.3. Ratones

Se utilizaron ratones hembras BALB/c AnNHsdde 6 a 8 semanas de edad. Se adquirieron en la empresa Envigo RMS, S.A. de C.V. Se les proporcionó acceso libre de agua y alimento en jaulas que fueron asignadas aleatoriamente a un tratamiento específico (5 ratones por jaula).

6.4. Inmunización oral

El rAg85b recombinante (rAg85b9 utilizado para la inmunización y los ensayos ELISA) fue producido en *E. coli* BL21 por el M.C. Cristhian Sáñez Robledo y la M.C. Amalia F. León Gallo. Los ratones fueron divididos en 5 grupos (n = 5) de tratamientos que se describen a continuación. Grupo 1: Control (100 μ L PBS); grupo 2: 10 μ g de rAg85b/100 μ L PBS; grupo 3: 100 mg de *Schizochytrium* sp. ATCC 20888/100 μ L PBS; grupo 4: 100 mg *Schizochytrium* sp. ATCC 20888 mas

10 µg de antígeno rAg85b/100µL PBS; grupo 5: 100 mg *Schizochytrium* sp. comercial mas 10 µg de rAg85b. En la tabla I se presenta el diseño del experimento y en la tabla II el protocolo de inmunización y colecta de muestras. En este bioensayo se analizó la producción de anticuerpos IgG totales y específicos del Ag85b en suero, y de IgA total en mucus y heces; la expresión génica de citocinas pro-inflamatorias en bazo, intestino e hígado; la actividad SOD y catalasa en hígado; y finalmente se analizaron el intestino e hígado mediante histología para evaluar posibles efectos benéficos o dañinos.

Tabla I. Grupos y tratamientos del bioensayo en modelo de ratón.

Grupo*	Tratamiento	Concentración	Cantidad
Control	Búfer de fosfatos (PBS)	-	100 µL
rAg85b	Antígeno 85b purificado mas PBS	10 µg	100 µL
<i>Schizochytrium</i> sp. ATCC 20888	<i>Schizochytrium</i> sp. colectada de cultivo fresco	100 mg	100 mL
<i>Schizochytrium</i> sp. ATCC 20888 – rAg85b	<i>Schizochytrium</i> sp. colectada de cultivo fresco con Antígeno 85b purificado	100 mg/10 µg	100 µL
<i>Schizochytrium</i> sp. comercial – rAg85b	<i>Schizochytrium</i> sp. liofilizada con Antígeno 85b purificado	100 mg/10 µg	100 µL

*n = 5 ratones por grupo.

Tabla II. Esquema de inmunización, toma de muestra y día de sacrificio de los ratones.

Toma de muestra	Inmunización
Día 0	Día 1
Día 7	Día 8
Día 14	Día 15
Día 22 (Sacrificio)	

6.5. Detección de inmunoglobulinas G (IgG) específica para Ag85b por ensayo ELISA.

Para la sensibilización de la placa, se añadió 1 µg de rAg85b en 50 µL de búfer de carbonatos (50 mM) en cada pocillo. Se dejó en incubación toda la noche a 4 °C. Posteriormente se realizaron tres lavados con PBS Tween20 (0.5%, PBST). Se

realizó el bloqueo con 200 μ L de leche descremada 5% disuelta en PBST, por 2 hrs a temperatura ambiente (25 °C). Se realizaron tres lavados con PBST. Se agregaron 100 μ L del suero de los ratones tratamiento en una dilución de 1/10 y como control positivo se utilizó suero de ratón hiperinmune anti- rAg85b. Se incubó la placa por una hora y media a 37 °C. Se realizaron tres lavados con PBST. Se añadieron 100 μ L de anticuerpo secundario anti-ratón conjugado con peroxidasa (A9044 SIGMA), a una dilución 1/1000 y se incubó una hora y media a 37 °C. Se realizaron tres lavados con PBST. Finalmente, se reveló la reacción con *o*-fenilendiamina en presencia de H₂O₂ (30 minutos en oscuridad). Se registró la absorbancia a 450 nm.

6.6. Detección de inmunoglobulinas G (IgG) totales en suero e IgA en mucus y heces

Se sensibilizó la placa con 100 μ L de suero (1/10 en PBS), mucus o heces (1/1 en PBS) de cada tratamiento y se incubó a 4 °C toda la noche. Se realizaron tres lavados con 200 μ L de PBST (Tween20 al 0.5%) a cada pocillo. Se realizó el bloqueo con 200 μ L de leche descremada 5% (0.5 g de leche en 10 mL de PBST) por 2 hrs a temperatura ambiente. Se realizaron tres lavados con PBST. Se agregaron 100 μ L del anticuerpo anti-IgG (A9044 SIGMA) o anti-IgA (A4789 SIGMA) de ratón conjugado con peroxidasa a una dilución 1/1000. Se incubó la placa por una hora y media a 37°C en oscuridad. Se realizaron tres lavados con PBST. La reacción se reveló al adicionar *o*-fenilendiamina en presencia de H₂O₂ (30 minutos en oscuridad). Se midió la absorbancia a 450 nm.

6.7. Actividades de superóxido dismutasa y catalasa

La actividad de la superóxido dismutasa (SOD) se midió en hígado por el porcentaje de inhibición de reacción de la enzima con WST-1 (colorante de tetrazolio soluble en agua) como sustrato y la xantina oxidasa. Para ello se utilizó el kit de SOD (Sigma, 19160) siguiendo las instrucciones del fabricante. La

reacción fue leída a 450 nm, que es la longitud de onda de absorbancia para el producto coloreado de la reacción de WST-1 con superóxido. Las lecturas se llevaron a cabo 20 minutos después de iniciada la reacción (37 °C). El porcentaje de inhibición se normalizó por mg de proteína y es presentado como unidades de actividad SOD. La actividad SOD fue calculada con la siguiente fórmula:

$$(\% \text{ de inhibición de SOD}) = \frac{(\text{Abs blanco 1} - \text{Abs blanco 3}) - (\text{Abs muestra} - \text{Abs blanco 2})}{(\text{Abs blanco 1} - \text{Abs blanco 3})} * 100 \text{ (1)}$$

La actividad catalasa (CAT) se midió según el método de Clairborne (1985). La lectura de absorbancia de H₂O₂ fue a 240 nm. Una unidad de actividad de la enzima se define como la cantidad de enzima requerida para degradar 1 mmol de H₂O₂ en 1 min y se expresa como U/mg de proteína.

6.8. Análisis de fagocitosis, apoptosis y explosión respiratoria en leucocitos de bazo por citometría de flujo

6.8.1. Aislamiento de leucocitos de bazo

Se extrajo el bazo de los ratones de los diferentes tratamientos y se procedió a realizar la separación de las células. Se maceraron los bazos en filtros de 100 micras con medio Instituto del Parque Memorial Roswell (RPMI, por sus siglas en inglés) con suero fetal bovino (SFB). Para ello se utilizó el émbolo de una jeringa, agregando poco a poco el medio hasta llevar a un volumen de 5 mL. Se centrifugó a 200 xg, a 23 °C durante 10 minutos. Posterior a esto se hicieron 3 lavados con medio RPMI-heparina (5 µg/mL).

6.8.2. Fagocitosis

Se cultivó *Saccharomyces cerevisiae* en medio líquido (YPD) e incubó toda la noche (30 °C, 100 rpm). Posteriormente, se cosecharon las células mediante centrifugación (3000 xg / 10 min a T.A.) y se ajustó la concentración a 1 x 10⁸ células/mL. Se añadió diclorotriazinilamino fluoresceína (1 mg/mL, DTAF) a las levaduras y se incubó a 25 °C a 40 rpm/ min durante 15 minutos. Luego se

centrifugó a 350 xg por 5 min y desechó el sobrenadante. La pastilla celular se resuspendió en 40 mL de PBS y se centrifugó a 350 xg por 5 min. Se repitieron 5 lavados. Finalmente se resuspendió en 20 mL de PBS y almacenó a -80 °C hasta su uso.

Para el ensayo de fagocitosis, las células de bazo se ajustaron a una concentración de 1×10^6 cél/mL. Se adicionaron 100 μ L de levaduras marcadas con DTAF. Se centrifugó a 1500 rpm por 5 min a 25 °C y nuevamente se resuspendieron las células. Se incubó por 30 min a 25 °C. Se agregaron 400 μ L de PBS frío (para detener la fagocitosis). Por último se agregaron 50 μ L de azul de Tripano. Se incluyeron dos controles, uno de leucocitos sin levadura y otro de levadura sola (500 μ L de leucocitos y 100 μ L de levadura en PBS). Posteriormente se midió en el rango de excitación (495 nm) y emisión (516 nm) del DTAF en un citómetro de flujo (CellSorter S3, BioRad). Los resultados se expresaron como:

Habilidad fagocítica= % de células fluorescentes en la población.

Capacidad fagocítica= intensidad media de fluorescencia.

6.8.3. Apoptosis

Para la determinación de apoptosis se colocaron 500 μ L con leucocitos de bazo (1×10^6 cél/mL) en tubos de 1.5 mL y se centrifugó (1500 rpm/10min a 25 °C). El sobrenadante se desechó y se resuspendieron las células en búfer de unión (0.01M de HEPES (pH 7.4); 0.14 M NaCl; 2.5 mM; 2.5 mM CaCl_2) ajustando la concentración a 1×10^6 cél/mL. Posteriormente, se tomaron 100 μ L con leucocitos y se agregaron 5 μ L de anexina V (APC Annexin V, biolegend, Catálogo No. 640920). Se mezcló en vórtex e incubó por 15 min a 25 °C en oscuridad. Se utilizaron leucocitos de bazo sin marcar como control. Finalmente se midió en el rango de excitación (645 nm) y emisión (660 nm) de la anexina en un citómetro de flujo (CellSorter S3, BioRad).

6.8.4. Explosión respiratoria (DHR-123)

Para determinar la explosión respiratoria en leucocitos se preparó una solución stock con 2 mg de dihidrorodamina (DHR-123) disueltos en 1 mL de DMSO (5 mM). Posteriormente, se tomaron 5 μ L del stock DHR-123 y se disolvieron en 4.995 mL de PBS (DHR-123-PBS). Se añadieron 200 μ L de DHR-123-PBS a una suspensión de 300 μ L con leucocitos (1×10^6 cél/mL) y se incubó 30 minutos a 25°C. Finalmente, se midió la actividad por citometría de flujo (CellSorter S3, BioRad) con un láser de iones de argón a 488 nm. Se utilizó fluorescencia verde (FL1) y fluorescencia roja (FL2). La producción de leucocitos de ROS se indicó por el porcentaje de leucocitos fluorescentes verdes y la intensidad media para cada tratamiento.

6.9. Expresión de genes por tiempo real (RT-qPCR)

6.9.1. Diseño de primers

Para el diseño de primers se utilizaron las secuencias de cada gen seleccionado (ver tabla III) y se evaluaron con los programas RNAFold, OligoEvaluatorTM y Primer-Blast.

Tabla III. Primers utilizados para evaluar la expresión de genes asociados a la respuesta inmune.

Nombre del gen	Secuencia de 5' a 3'	Tamaño del producto
IL-17 α	ACGCGCAAACATGAGTC TCCTTGGCCTCAGTGTTT	135
IL-1 β	AATGAAAGACGGCACACC CTTGTGCTCTGCTTGTGA	175
IL-10	TGACATCTTCATCAACTGCATAG CGGAGAGAGGTACAAACGAG	179
TNF- α	ATTCGAGTGACAAGCCTGT TTGAGATCCATGCCGTT	112
IL4	GCATTTTGAACGAGGTCAC TCTCTGTGGTGTTCCTTCGTT	90
IL2	GAGCAGGATGGAGAATTACAG CTGATATTGCTGATGAAATTCTC	198
IFN γ	TCCTCAACTATTTCTCTTTGACC TGGTCAGTGAAGTAAAGGTACAAG	146
GAPDH	AGTGGCAAAGTGGAGATTG GATGACAAGCTTCCCATTG	135

6.9.2. Extracción de ARN y síntesis de DNAc.

Se colocaron de 50 a 100 mg de tejido y se le añadió 1 mL de Trizol (Invitrogen™ TRIzol™. Cat. 10296010) en un tubo eppendorf y se realizó la extracción. Se cuantificó la concentración $\lambda = 260\text{nm}$ y $\lambda = 280\text{ nm}$ en espectrofotómetro (Nanodrop N-1000 Spectrophotometer). Posteriormente, se realizó la síntesis de ADNc a partir de 1 μg de ARN utilizando para ello el kit de ImProm-II™ Reverse Transcription (Promega, A3800).

6.10. Análisis estadísticos

Todos los bioensayos y mediciones se realizaron por triplicado. Se realizó un análisis de varianza (ANOVA) de una vía. Se realizó comparación de medias mediante una prueba de Tukey. Las diferencias se consideraron significativas a $P < 0.05$. Se utilizó el software IBM SPSS Statistics 19.

7. RESULTADOS

7.1. Transformación transitoria

Los resultados del western blot se muestran en la figura 1. Se aprecia una banda en la muestra tomada a las 48 h del mismo tamaño que el control positivo (rAg85b). Esta banda no se apreció en la muestra tomada a las 24 h o en el control negativo (microalga sin transformar = WT), por lo que consideramos que corresponde a la proteína de MAP recombinante MAP1609c.

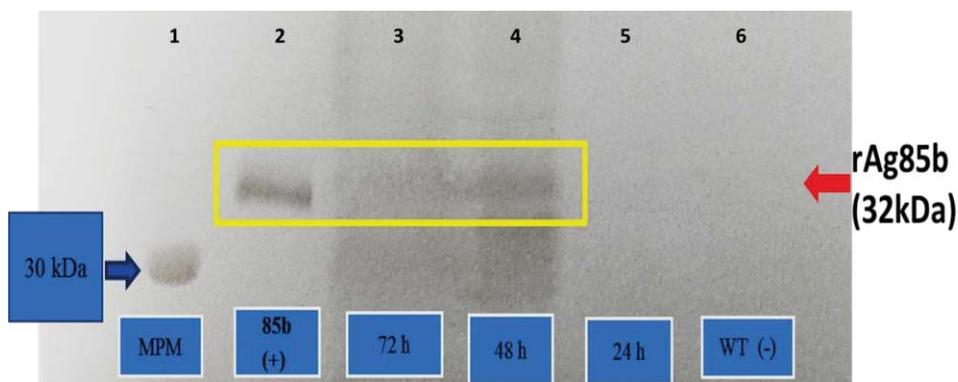


Figura 1. Western blot para detectar la proteína recombinante rAg85b expresada en *Schizochytrium* sp. Se emplearon extractos de proteínas totales que fueron sometidas a inmunodetección con un anti-suero contra rAg85b. Líneas: 1) marcador de peso molecular (banda de 30 KDa); 2) rAg85b (control positivo); 3) muestra a las 72 h; 4) muestra a las 48 h, se observa una banda que a la altura del rAg85b (control positivo); 5) muestra a las 24 h; 6) control negativo (WT).

7.2. Efecto inmunoestimulante de la microalga *Schizochytrium* sp. en la coadministración oral con el antígeno MAP1609c recombinante (rAg85b)

Tras una semana de aclimatación para los ratones, se procedió con el inicio de las inmunizaciones. Cumplidas las tres dosis de los diferentes tratamientos, se procedió al sacrificio y toma de las muestras correspondientes. Además se realizó muestreo sanguíneo antes de cada inmunización para dar seguimiento a la curva de anticuerpos específicos.

7.3. Detección de inmunoglobulinas G (IgG) específicas contra rAg85b

En la semana 1 no hubo diferencias significativas ($P < 0.05$) entre los grupos tratamiento. En la figura 2 se puede observar que en la segunda semana de inmunización hubo una tendencia de incremento en la producción de anticuerpos IgG específicos anti-Ag85b, sin embargo no hubo diferencias significativas ($P < 0.05$). En la tercera semana se observaron diferencias significativas solamente en el tratamiento de la microalga *Schizochytrium* sp. comercial co-administrada con el rAg85b respecto al suero control del ratón que solo se le administró PBS.

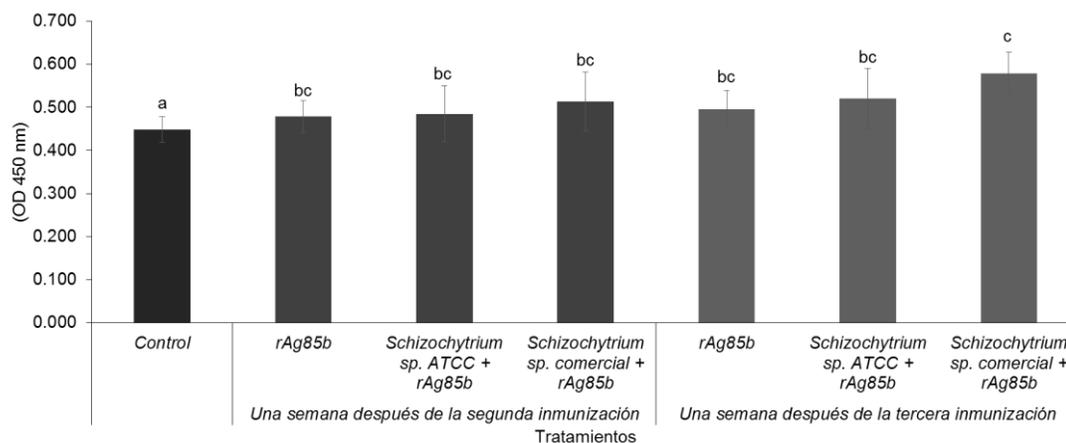


Figura 2. Niveles de anticuerpos IgG anti-Ag85b detectados mediante ELISA en muestras de sueros de animales sometidos a los distintos tratamientos. Letras distintas muestran diferencias significativas respecto al control ($P < 0.05$, $a < b$).

7.4. Detección de IgA totales

7.4.1. Detección de IgA totales en mucus

La cantidad de IgA presente en los distintos tratamientos se normalizó respecto a la concentración de proteína. En la figura 3 se observa un aumento significativo ($P < 0.05$) en la cantidad de IgA total en los tratamientos en los que se administró *Schizochytrium* sp. con o sin Ag85b, esto respecto al control y al tratamiento con el rAg85b sin microalga. El tratamiento de *Schizochytrium* sp. comercial co-

administrada con el rAg85b fue la que presentó los mayores niveles de IgA total respecto al control y a los demás tratamientos.

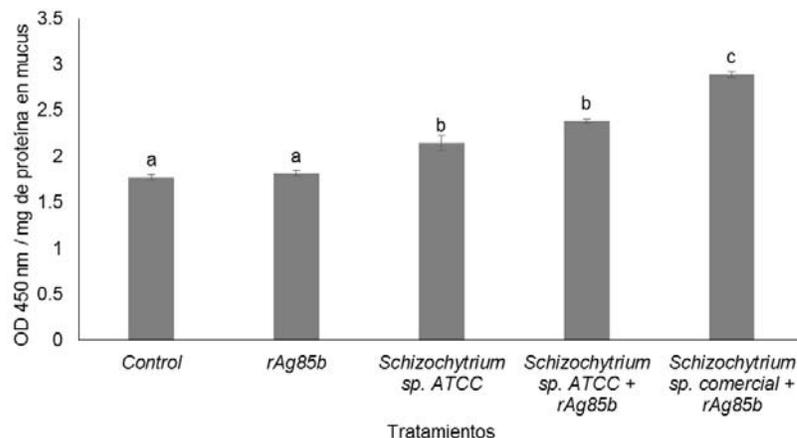


Figura 3. Niveles de anticuerpos IgA totales en mucus intestinal de ratones inmunizados bajo distintos esquemas de inmunización. Letras distintas muestran diferencias significativas respecto al control ($P < 0.05$, $a < b < c$).

7.4.2. Detección de IgA totales en heces

En el grupo al que se le administró *Schizochytrium* sp. ATCC 20888 sin el antígeno se observó un aumento significativo ($P < 0.05$) en la cantidad de IgA total respecto al control y los demás tratamientos (Fig. 4). No obstante, cuando se administró el antígeno solo o co-administrado con la microalga *Schizochytrium* sp. ATCC 20888 se observó una reducción significativa ($P < 0.05$) en la cantidad de IgA respecto al control. En contraste, no se observaron diferencias significativas respecto al control o los tratamientos con el antígeno por la co-administración del rAg85b con la microalga *Schizochytrium* sp. comercial.

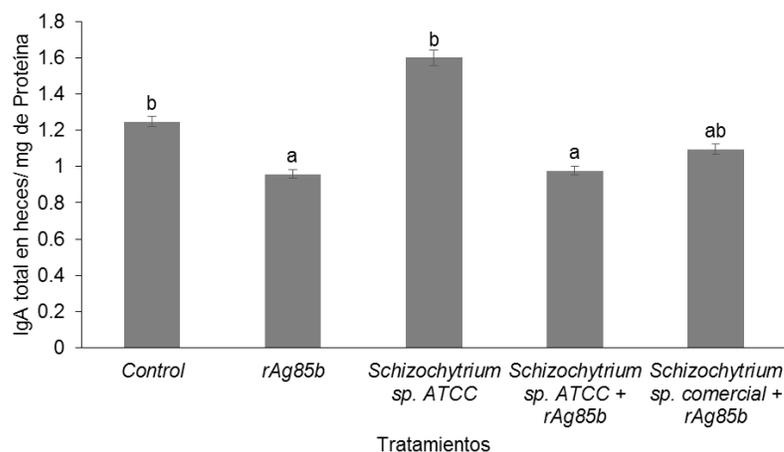


Figura 4. Niveles de anticuerpos IgA totales en heces extraídas del intestino grueso de ratones inmunizados bajo distintos esquemas de inmunización. Letras distintas muestran diferencias significativas respecto al control ($P < 0.05$, $a < b < c$).

7.5. Detección de IgG totales en suero

Los tratamientos en los cuales se co-administró el antígeno y *Schizochytrium* sp. ATCC 20888 y comercial tuvieron un aumento significativo ($P < 0.05$) en la producción de IgG totales respecto al control, al tratamiento solo con el Ag85b y solo con la microalga por separado (Fig. 5).

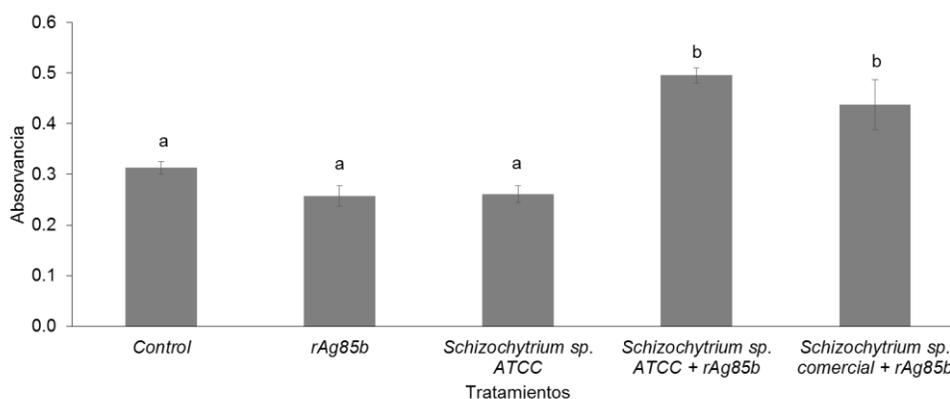


Figura 5. Niveles de anticuerpos IgG totales en suero de ratones inmunizados bajo distintos esquemas de inmunización. Los niveles de anticuerpos están representados con base a la densidad óptica (OD 450nm). Letras distintas muestran diferencias significativas respecto al control ($P < 0.05$, $a < b$).

7.6. Actividad SOD y catalasa en hígado

7.6.1. Actividad SOD en hígado

Como puede observarse en la figura 6 hubo un aumento significativo ($P < 0.05$) en la actividad de SOD en el hígado de los ratones a los que se les co-administró *Schizochytrium* sp. comercial más rAg85b respecto al control y a los demás tratamientos. Cuando se administró la microalga por sí sola se observó una disminución significativa ($P < 0.05$) respecto al control y los demás tratamientos. También se aprecia una mayor actividad de SOD en el hígado de ratones a los cuales se les co-administró *Schizochytrium* sp. ATCC junto con el rAg85b, aunque esta diferencia no fue estadísticamente significativa ($P > 0.05$).

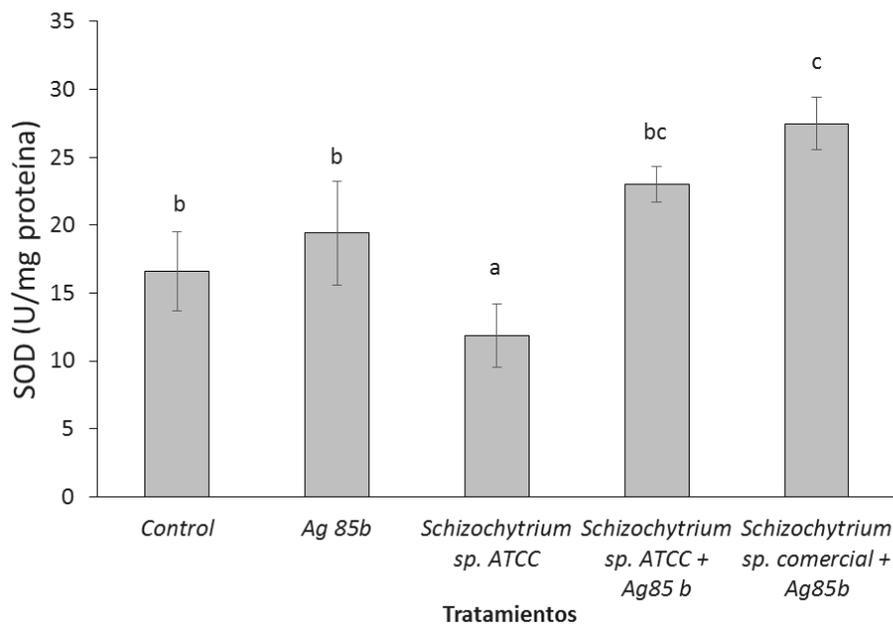


Figura 6. Actividad superóxido dismutasa (SOD) en hígado de ratones sometidos a distintos tratamientos. Letras distintas muestran diferencias significativas respecto al control ($P < 0.05$, $a < b < c$).

7.6.2. Actividad catalasa en hígado

No se observó ningún cambio significativo ($P < 0.05$) en la actividad catalasa respecto al control o entre los grupos. Se puede observar solamente una tendencia al incremento en la actividad de catalasa en los ratones a los que se les administró solamente el rAg85b.

7.7. Fagocitosis, explosión respiratoria y **apoptosis**

Transcurridas las inmunizaciones, se procedió al sacrificio de los ratones y al aislamiento de los leucocitos de bazo. Una vez aislados se les realizaron distintos tratamientos a las células que fueron llevadas a una concentración final de 1×10^6 células/mL.

7.7.1. Fagocitosis

En la figura 7 se muestra un aumento significativo ($P < 0.05$) en la cantidad de células fagocíticas en el tratamiento al que se le administró Ag85b respecto a los demás tratamientos pero estadísticamente similar al grupo control. En el caso del tratamiento de co-administración de *Schizochytrium* sp. comercial más rAg85b se observó una disminución significativa ($P < 0.05$) en la cantidad de células fagocíticas. Los tratamientos a los que se les administró la microalga *Schizochytrium* sp. ATCC con o sin Ag85b no mostraron diferencias significativas respecto al control.

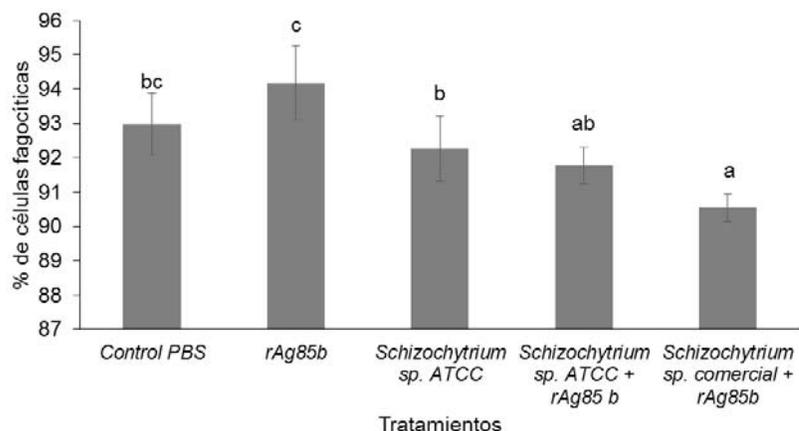


Figura 7. Proporción de células fagocíticas medida por citometría de flujo en leucocitos de bazo de ratones sometidos a distintos tratamientos. Letras distintas muestran diferencias significativas respecto al control ($P < 0.05$, $a < b < c$).

7.7.2. Explosión respiratoria

En la figura 8 se muestra un aumento significativo ($P < 0.05$) en la producción de radicales en leucocitos del bazo de ratón. El tratamiento con *Schizochytrium* sp. comercial mas el rAg85b presentó mayor proporción respecto al control y el resto de los tratamientos. En el resto de los tratamientos no se observaron cambios significativos entre ellos o respecto al control.

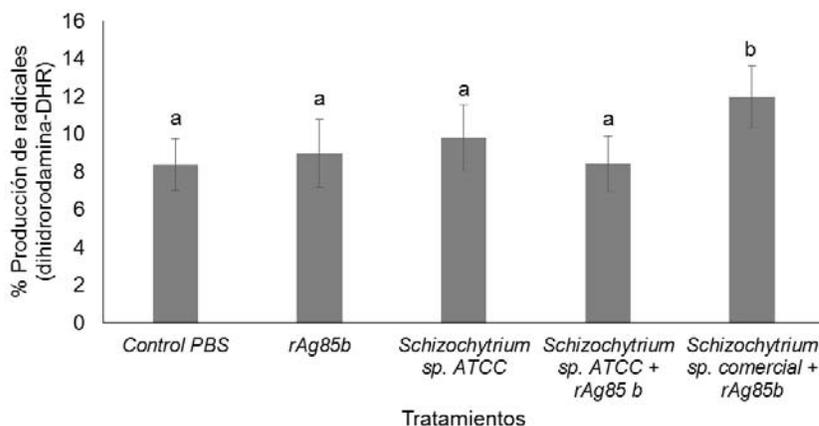


Figura 8. Porcentaje de producción de radicales medido por citometría de flujo en leucocitos de bazo de ratones sometidos a distintos tratamientos. Letras distintas muestran diferencias significativas respecto al control ($P < 0.05$, $a < b$).

7.7.3. Apoptosis temprana

La apoptosis temprana se determinó utilizando anexina V, la cual se une a residuos de fosfatidilserina presente en las membranas de las células que se encuentran en vía apoptótica. En la figura 9, se muestra que hubo una disminución significativa ($P < 0.05$) en el porcentaje de células apoptóticas en el grupo de co-administración *Schizochytrium* sp. comercial más rAg85b respecto al control y a los demás tratamientos. De manera interesante, la vía apoptótica medida por anexina V no se observó modificada en los demás tratamientos.

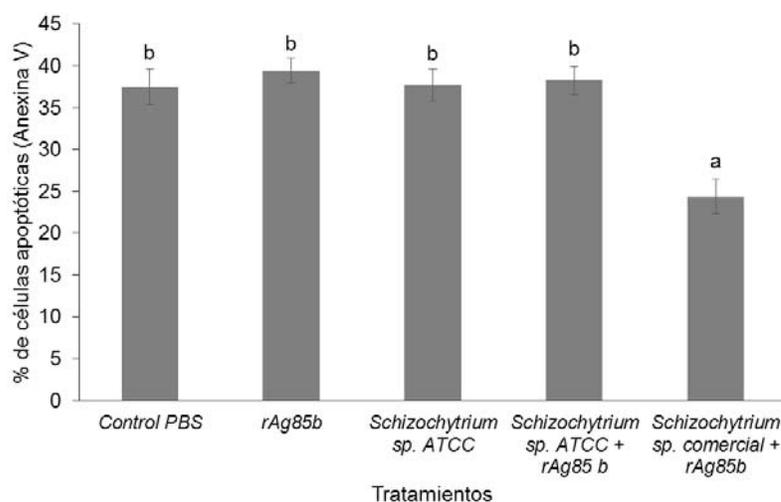


Figura 9. Porcentaje de células apoptóticas medido con la utilización de anexina V y citometría de flujo en leucocitos de bazo de ratones sometidos a distintos tratamientos. Letras distintas muestran diferencias significativas respecto al control ($P < 0.05$, $a < b$).

7.7.4. Apoptosis tardía

La apoptosis tardía se midió por la activación de la proteína Caspasa3, la cual está presente en las células que ya están por terminar el proceso apoptótico. En la figura 10 observamos que los tratamientos de microalga y antígeno, solos o en combinación, disminuyeron de manera significativa ($P < 0.05$) la apoptosis tardía mediada por la vía de la caspasa3 respecto al control.

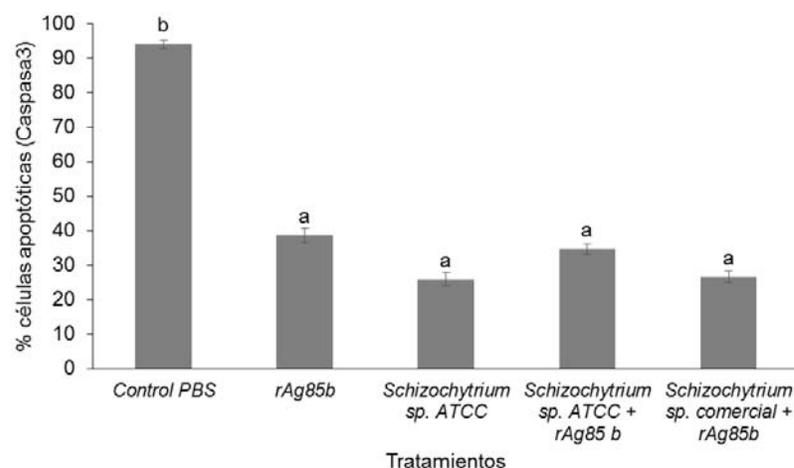


Figura 10. Apoptosis tardía por la activación de caspasa3 medido por citometría de flujo en leucocitos de bazo de ratones sometidos a distintos tratamientos. Letras distintas muestran diferencias significativas respecto al control ($P < 0.05$, $a < b$).

7.8. Expresión de genes en bazo e intestino

Para investigar el perfil de citocinas relacionadas al proceso inmune pro-inflamatorio y anti-inflamatorio se llevó a cabo la cuantificación por RT-PCR tiempo real.

7.8.1. Expresión de genes en bazo

De manera interesante, la mayoría de los tratamientos lograron provocar la sobreexpresión de las citocinas que fueron evaluadas en bazo siendo suficiente, en algunos casos, la administración de la microalga sola o el antígeno solo para desencadenar la expresión (Fig. 11).

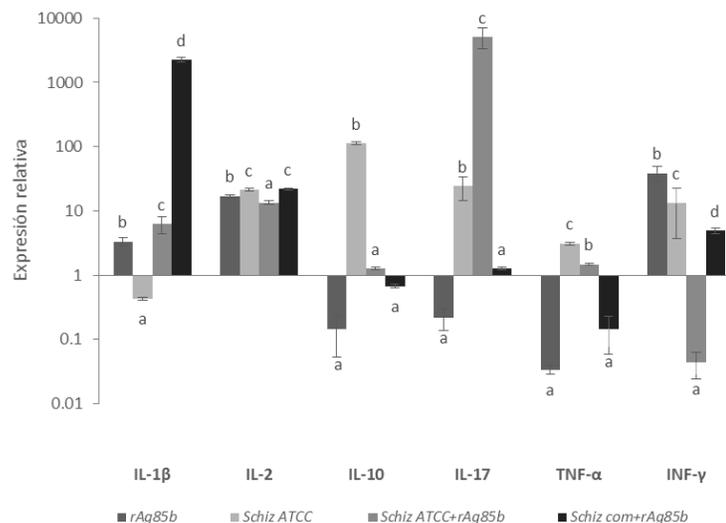


Figura 11. Expresión relativa de genes asociados a la respuesta inmune en bazo de ratones sometidos a distintos tratamientos. En la gráfica se muestra que todos aquellos genes que se encuentran por arriba de 1 están sobreexpresados respecto al control. En cambio, la expresión de los genes que se encuentran por debajo de 1 está suprimida respecto al control. Letras distintas muestran diferencias significativas respecto al control ($P < 0.05$, $a < b < c < d$).

7.8.2. Expresión de genes en intestino

En la expresión de citocinas en intestino, sólo la administración de la microalga por sí sola fue capaz de inducir una sobreexpresión en IL-1 β , sin embargo, todos los tratamientos (a excepción de la coadministración en IL-17) fueron capaces de favorecer el aumento de los genes de las citocinas evaluadas (Fig. 12).

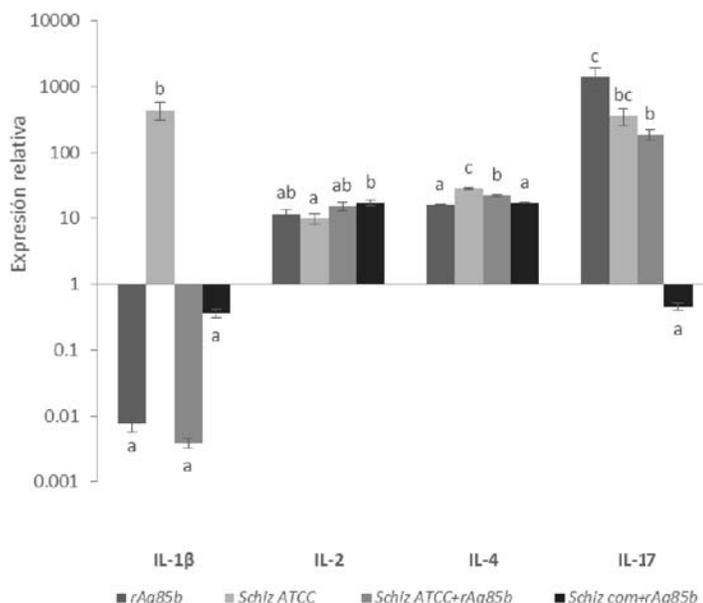


Figura 12. Expresión relativa de genes asociados a la respuesta inmune en intestino de ratones sometidos a distintos tratamientos. En la gráfica se muestra que todos aquellos genes que se encuentran por arriba de 1 están sobreexpresados respecto al control. En cambio, la expresión de los genes que se encuentran por debajo de 1 está suprimida respecto al control. Letras distintas muestran diferencias significativas respecto al control ($P < 0.05$, $a < b < c < d$).

7.9. Análisis de cortes histológicos de hígado e intestino.

Los cortes histológicos fueron teñidos con hematoxilina-eosina para corroborar que la administración del antígeno y de *Schizochytrium* sp. fuera segura y que no causara daño a los ratones. En las figuras 13 y 14 se muestran algunas de las fotografías a 40x de los cortes de hígado e intestino, respectivamente. En hígado se buscó intensivamente la presencia de cuerpos grasos, degeneración del tejido o de algún indicio de daño al hígado que hayan sido provocados por la administración de la microalga y el antígeno, no encontrándose ningún caso mencionado. En intestino no se observaron diferencias significativas en la diferencias significativas entre los tratamientos y el control en la cantidad de células Globet (G), en el lumen (L), en leucocitos intraepiteliales (IL) ni en la altura

de microvellosidades (MV) entre los tratamientos ni el control. Así mismo, no se observó daño al tejido ni en la estructura de las microvellosidades.

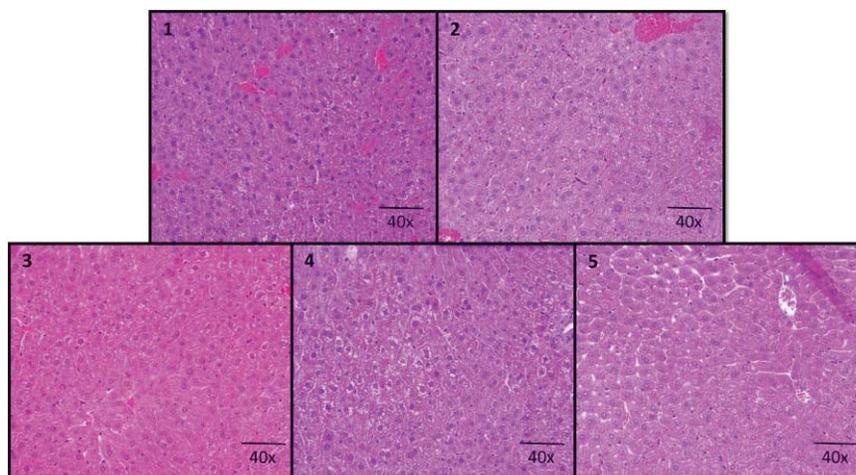


Figura 13. Cortes histológicos de hígado de ratones sometidos a distintos tratamientos. Fotografías tomadas con el objetivo 40x. 1) Control; 2) rAg85b; 3) *Schizochytrium* sp. ATCC 20888; 4) *Schizochytrium* sp. ATCC 20888 mas rAg85b; 5) *Schizochytrium* sp. comercial mas rAg85b.

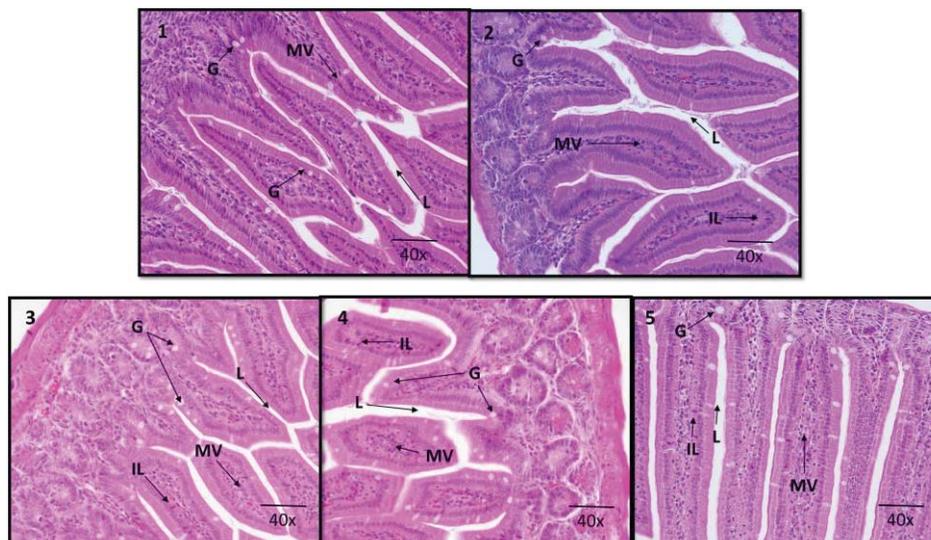


Figura 14. Cortes histológicos de intestino de ratones sometidos a distintos tratamientos. Fotografías tomadas con el objetivo 40x. 1) Control; 2) rAg85b; 3) *Schizochytrium* sp. ATCC 20888; 4) *Schizochytrium* sp. ATCC 20888 mas rAg85b; 5) *Schizochytrium* sp. comercial mas rAg85b. No hubo diferencias significativas entre los tratamientos y el control en cuanto a células Globet (G), lumen (L), leucocitos intraepiteliales (IL) ni en la altura de microvellosidades (MV).

8. DISCUSIÓN

La capacidad inmunogénica del Ag85b en distintos modelos animales se ha reportado anteriormente (Kathaperumal *et al.*, 2009; Park *et al.*, 2008; Pepponi *et al.*, 2014), en donde se describe que favorece producción de citocinas como interferón γ (IFN- γ), interleucina 2 y 12 (IL2, IL12). Esta proteína tiene la gran ventaja de ser un antígeno conservado en todas las micobacterias, por lo que es candidata a ser utilizada en la vacunación contra diversas especies de *Mycobacterium* (Mullerad *et al.*, 2002; Pepponi *et al.*, 2014). Por estas razones en este trabajo se analizó la capacidad de *Schizochytrium* sp. ATCC 20888 para producir de manera transitoria la proteína recombinante MAP1609c (rAg85b), y su capacidad inmunoestimulante mediante la co-administración con el rAg85b purificado y producido en *E. coli*.

La expresión transitoria de proteínas es una alternativa que reduce los tiempos de espera largos en comparación con la transformación estable. De hecho, la producción de líneas transgénicas estables de microalgas puede representar una limitante debido a la baja cantidad de transformantes, bajos rendimientos del antígeno recombinante y los costos que pueden elevarse si se desea purificar la proteína. Sin embargo, los antígenos de uso vacunal expresados en microalgas de manera transitoria podría proporcionar la cantidad suficiente de proteína recombinante para realizar pruebas de tamizaje inmunológico en modelo de ratón. En este sentido, la expresión transitoria de proteínas ya se ha llevado a cabo en la microalga *Chlorella* (Jarvis y Brown, 1991; Maruyama *et al.*, 1994). Hawkins y Nakamura (1999) realizaron la transformación transitoria de *Chlorella* para expresar la hormona del crecimiento humano (HGH) recombinante. Cabe resaltar que la transformación requirió de la preparación complicada protoplastos y el uso de polietilenglicol y dimetil sulfóxido para favorecer transferencia del ADN a la microalga. Los autores citados lograron de 200 a 600 ng de proteína secretada/ml en el medio de cultivo. En el presente trabajo desarrollado en *Schizochytrium* sp. no fue necesario la utilización de procesos enzimáticos para reducir el grosor de la

pared celular, siendo de interés que la simple utilización del surfactante Silwet L-77 puede emplearse para la transformación transitoria. El análisis por Western blot demostró que *Schizochytrium* sp. produjo el rAg85b a las 48 h. En este caso, el uso del promotor 35SCaMV demostró ser eficiente en la producción del rAg85b en *Schizochytrium* sp. En otro trabajo, Cheng y colaboradores (2012) realizaron la transformación genética de *Schizochytrium* sp. por el método de *A. tumefaciens* utilizando el mismo promotor para expresar el gen GUS y obtuvieron hasta 150 transformantes con actividad GUS. Nuestros resultados proporcionan un panorama interesante acerca del potencial de *Schizochytrium* sp. para expresar de manera eficiente y rápida el rAg85b u otro antígeno, aún con la utilización de un promotor heterólogo (35sCaMV) y sin la necesidad de optimización de codones. No obstante, es necesario la comparación de la eficiencia de producción de antígenos por parte de *Schizochytrium* sp. mediante la optimización de codones, el uso de distintos métodos de transformación y promotores, cepas de *A. tumefaciens*, entre otros.

El ensayo en modelo de ratón realizado en este trabajo demuestra que *Schizochytrium* sp. tiene la habilidad de mejorar el reconocimiento de rAg85b induciendo una respuesta mayor a nivel sistémico, favoreciendo la producción de anticuerpos IgG específicos anti-Ag85b después de la tercera inmunización. También, se demostró que la co-administración oral de *Schizochytrium* sp. con el rAg85b aumentó la producción de IgA total en mucosas. Además, se observó que la administración oral de la microalga por sí sola aumentó la cantidad de IgA total en heces. En el sistema inmune de mucosas, los tejidos linfoides asociados al intestino (GALT, por sus siglas en inglés) juegan un papel crítico en la inducción de respuestas inmunes específicas ya que es en donde se lleva a cabo la interacción con los fagocitos y linfocitos para la producción de anticuerpos. En este sitio las citocinas IL-4, IL-2, IL-10, entre otras, juegan un papel importante en la respuesta de los linfocitos B para la producción de anticuerpos, los cuales son de gran importancia en la respuesta inmune humoral contra agentes infecciosos

(Parra *et al.*, 2016). La inmunoglobulina A (IgA) es el principal anticuerpo secretado en las mucosas que se requiere a lo largo del intestino para el combate de patógenos (Peterson *et al.*, 2007). Por otro lado, la inmunoglobulina G es el anticuerpo más abundante en la sangre, siendo también responsable de la identificación y eliminación de agentes patógenos (Kaneko *et al.*, 2006). En este contexto, se ha reportado el uso de la cianobacteria *Spirulina* sp. para mejorar la respuesta hacia una vacuna a base del toxoide tetánico (Chu *et al.*, 2013). En el mencionado experimento se observó un aumento significativo en la cantidad de IgG total en suero después de la segunda inmunización. Sin embargo, no se observaron anticuerpos específicos anti-toxoide tetánico. De forma similar, Hayashi y colaboradores (1998) observaron un aumento en la producción de IgG total en suero y de IgA total en el intestino, pero no detectaron la producción de anticuerpos específicos anti-antígeno utilizando *Spirulina* y ratones para el ensayo de inmunogenicidad. Las inmunizaciones se llevaron a cabo vía oral e intraperitoneal en distintos tratamientos.

Las algas contienen una gran cantidad de componentes inflamatorios y anti inflamatorios. En particular, *Schizochytrium* sp. posee polisacáridos (PS) que pueden ejercer actividad inmunoestimulante y es posible que tengan actividad adyuvante (Hsu *et al.*, 2009). Un caso de evaluación del efecto adyuvante de los polisacáridos de algas es el realizado por Surayot y colaboradores (2015), donde estimularon macrófagos de ratón con polisacáridos de *Spirogyra neglecta*. Los hallazgos muestran mayor producción de óxido nítrico y la sobreexpresión de citocinas. Los polisacáridos provenientes de algunas algas pueden tener efectos adyuvantes (Song *et al.*, 2015). Sin embargo, en el presente trabajo se observó una baja respuesta inmunológica que puede deberse a varias razones. Una de ellas es que suministramos el antígeno sin encapsulación alguna, por lo que se pudo ir degradando de forma importante por las enzimas y condiciones químicas presentes en el tracto gastrointestinal y la cantidad capturada por las células presentadoras de antígenos fue considerablemente baja para inducir una fuerte

respuesta humoral. La otra posibilidad es que la inducción de respuestas fuera de tipo celular (Th1) en lugar del tipo humoral Th2, la cual favorece la producción de anticuerpos, esto porque el Ag85B induce respuestas de Th1 (Shimizu *et al.*, 20080; Takatsu y Kariyone, 2003; Takamura *et al.*, 2005).

Por otra parte, dentro de la respuesta inmune se encuentra la defensa antioxidante, donde se involucra la actividad de la superóxido dismutasa (SOD). La SOD es una enzima antioxidante dentro y fuera de las células que cataliza la conversión de iones superóxido en peróxido de hidrógeno y oxígeno (Knight, 2000). En este trabajo, la actividad SOD en hígado disminuyó significativamente respecto al control en el tratamiento al que se le administró *Schizochytrium* sp. ATCC sola. Sin embargo, la disminución en la actividad de SOD se revirtió cuando se administró la microalga en combinación con el rAg85b. Esto indica que la actividad de SOD se ve beneficiada por la interacción antígeno-microalga, demostrando la capacidad de estimular este sistema antioxidante aún con pequeñas dosis entregadas vía oral. El aumento de la actividad SOD puede asociarse a un aumento en la capacidad bactericida, lo cual es de gran interés para su uso como inmunoestimulante y en la generación de vacunas de entrega oral. Schwartz y colaboradores (1990) reportaron un aumento en la actividad de citocromo oxidasa y peroxidasa en macrófagos incubados con carotenoides que se asocia con un aumento en la capacidad fagocítica. Lo anterior es relevante ya que *Schizochytrium* sp. posee carotenoides que pudieran estar involucrados en la respuesta inmune que se desarrolló. Curiosamente, la actividad de catalasa no se vio afectada. Al respecto, el catabolismo del peróxido de hidrógeno es el sustrato de otras peroxidases como la mieloperoxidasa que compite por el mismo sustrato con la catalasa. De esta manera, es probable que otras peroxidases estén degradando el peróxido de hidrógeno generado por la conversión del anión superóxido por la SOD. Este proceso se realiza en las células y es particularmente importante en los fagocitos como macrófagos y células dendríticas para llevar a

cabo la degradación de patógenos y mantener la homeostasis del sistema óxido reducción (Redox) (Kohen y Nyska, 2002).

En este trabajo también se evaluó el efecto de la inmunización oral de *Schizochytrium* sp., el rAg85b, y la combinación de ambos, sobre la fagocitosis, explosión respiratoria y en la apoptosis temprana y tardía en leucocitos de bazo. La fagocitosis es un proceso fundamental en el sistema inmune, siendo reconocida como un proceso en el que se absorben partículas mayores a 5 μm (Maderna y Godson, 2003). Este proceso puede desembocar en la liberación de citocinas que median la inflamación, tales como el IFN γ , TNF α e IL-1 β , entre otras. Para evaluar la capacidad fagocítica de los diferentes tratamientos empleó a la levadura *Saccharomyces cerevisiae* marcada con DTAF. Esto permitió observar que el grupo de ratones al cual se le administró el rAg85b por sí solo, tuvo un aumento significativo en el número de células fagocíticas respecto a los demás tratamientos. Los glucanos son conocidos por estimular la fagocitosis (Konopski *et al.*, 1991). *Schizochytrium* sp. produce una alta cantidad de estos compuestos, sin embargo, la dosis que se les administró a los ratones no parece ser lo suficientemente alta para promover el aumento en la capacidad fagocítica de los leucocitos aislados de ratón. En este contexto, la explosión respiratoria es uno de los procesos subsecuentes de la fagocitosis, por lo que su activación en la evaluación de inmunoestimulantes es relevante. Se utilizó el colorante oxidativo DHR 123 como un indicador sensible directo de la cantidad de H $_2$ O $_2$ en los leucocitos aislados de bazo. Los resultados muestran un aumento significativo (respecto al control y los demás tratamientos) cuando a los ratones se les administró *Schizochytrium* sp. comercial combinada con el antígeno rAg85b, lo cual podría indicar una interacción entre el antígeno y la microalga para favorecer un aumento en la eficiencia fagocítica de los leucocitos de bazo. Esto se podría deberse a que los componentes inmunoestimulantes de la microalga activan el sistema inmune por la vía de la fagocitosis, llegando el antígeno a potenciar la respuesta en este sentido. Actualmente no existen reportes que pongan de

manifiesto la interacción de una microalga con un antígeno para aumentar la fagocitosis, es así que nuestro trabajo aporta las bases para tener un panorama del beneficio de la co-administración de un antígeno conservado de micobacterias con *Schizochytrium* sp.

La apoptosis, también conocida como muerte programada, es un proceso de vital importancia en la homeóstasis del tejido debido a que permite la remoción de las células en proceso de muerte por distintos factores. En este proceso también se ven involucradas citocinas que activan la acción fagocítica de macrófagos para eliminar las células apoptóticas (Henson *et al.*, 2001). En el aislamiento de células de distintos tejidos con fines de investigación, la muerte celular se puede llevar a cabo por apoptosis o necrosis (Phelan y May, 2007). Una de las vías de señalización reportadas para la activación de la apoptosis es la vía extrínseca, de la cual depende el factor de necrosis tumoral (TNF) (Elmore, 2007). Durante el proceso apoptótico se activan enzimas efectoras, tales como la caspasa 3 con la finalidad de degradar proteínas del citoesqueleto y de la membrana plasmática, así como otros componentes celulares (Elmore, 2007). En este trabajo se evaluó la apoptosis temprana por la activación de la caspasa 3 para registrar la apoptosis tardía en leucocitos aislados de bazo de ratones inmunizados. Los resultados demuestran una reducción significativa en todos los tratamientos respecto al control en la señalización de apoptosis temprana, lo cual indica que la inmunización aumenta la resistencia de los leucocitos de bazo ante el aislamiento. De la misma manera, se evaluó la apoptosis tardía por anexina V. Esta proteína se une a residuos de fosfatidilserina, los cuales se encuentran en las membranas de células en proceso de apoptosis, por lo que son de gran importancia como biomarcadores de la apoptosis. Los resultados muestran una reducción significativa respecto al control y los demás tratamientos cuando a los ratones se les administró *Schizochytrium* sp. comercial combinada con el antígeno, lo que puede indicar un efecto potencial protector en estas células.

En el proceso inmunogénico, la inducción de la IL-4 favorece la respuesta Th2 (humoral) y el IFN γ la Th1 (celular) (Lamichhane *et al.*, 2014). Las vacunas orales deben desencadenar una respuesta lo suficientemente fuerte, ya sea humoral, celular o ambas, para promover un estado de alerta en mucosas y a nivel sistémico. Una respuesta inmune eficaz ante un reto inmunológico provocado por algún patógeno depende de la interacción de respuestas anti-inflamatorias y pro-inflamatorias. Es así que la producción de algunas citocinas regula la expresión de otras. Por ejemplo, la IL-10 puede inhibir la producción de INF- γ , TNF- α , IL-1 e IL-2 (Cyktor y Turner, 2011). Al inicio de la respuesta inmune adaptativa, los linfocitos CD4+ pueden diferenciarse a T cooperadores 1 (Th1) por la secreción de citocinas proinflamatorias como el INF- γ y TNF- α ; o bien se pueden diferenciar a Th2 por la secreción de citocinas anti-inflamatorias como la IL-4 o IL-10 (Esser *et al.*, 2003). La respuesta Th1 está involucrada en la defensa contra patógenos intracelulares por el aumento en la capacidad fagocítica de macrófagos y el reclutamiento de células citotóxicas. Por otro lado, los Th2 promueven la producción de anticuerpos IgA e IgG por los linfocitos B, que es crucial para el combate de patógenos extracelulares (Koets *et al.*, 2002).

El INF- γ induce una mayor activación de macrófagos, por lo que aumenta la protección ante infecciones. En nuestro experimento se observó un aumento significativo en la expresión de esta citocina en el bazo de ratones tratados con el rAg85b solo o combinado con *Schizochytrium* sp. así como en el tratamiento de la microalga sola, respecto al control. El Ag85b ya se ha reportado como un inductor de la producción del INF- γ (Sohal *et al.*, 2008); sin embargo, este es el primer reporte de que *Schizochytrium* sp. aumenta los niveles de esta citocina pro-inflamatoria, esto a pesar de que la IL-10 también se ve sobre-expresada de manera significativa en el mismo tejido en el tratamiento al que se le administró la microalga sola. Otro dato relevante es que la expresión de TNF- α no se incrementó en el bazo de ratones únicamente con el tratamiento de rAg85b únicamente, sino solo cuando se le administró en combinación con la microalga o

cuando se administró *Schizochytrium* sp. sin el antígeno. La expresión de las citocinas pro-inflamatorias IL-2 e IL-1 β se vio aumentada significativamente en todos los tratamientos respecto al control, lo cual indica que la combinación de antígeno y microalga tiene potencial para mejorar la respuesta Th1. Esto es de vital importancia en el desarrollo de alguna vacuna potencial contra MAP, donde la respuesta Th1 son primordiales en la protección del huésped ante una infección de dicha micobacteria (Hara *et al.*, 2007).

En bazo, la producción de IL-10 no se incrementó en aquellos tratamientos donde estaba el rAg85b, sino solo en aquel al cual se le administró la microalga por sí sola. Esto podría estar indicando que *Schizochytrium* sp. podría estar induciendo una respuesta anti-inflamatoria (Cyktor y Turner, 2011) generada por la producción de IL-10. Además, la microalga por sí sola es capaz de inducir también una respuesta pro-inflamatoria representada por los niveles de las citocinas TNF- α e IFN- γ , además de IL-2 e IL-17 en bazo e intestino. Esta última citocina es producida por las células Th17, cuya diferenciación es rápidamente inducida por la interacción con IL-1 y TNF- α (Liang *et al.*, 2006).

10. CONCLUSIONES

El presente trabajo demuestra que *Schizochytrium* sp. posee la capacidad de expresar de forma transitoria la proteína MAP1609c (Ag85b) en un proceso que implica un período corto de tiempo (48 h).

El ensayo *in vivo* en modelo de ratón BALB/c muestra que *Schizochytrium* sp. induce la producción de IgA en mucus y heces, además de IgG total y específica en suero al ser coadministrada con el rAg85b.

El rAg85b aumenta la fagocitosis y aumenta la explosión respiratoria al combinarlo con *Schizochytrium* sp.

El rAg85b y *Schizochytrium* sp., así como la coadministración de ambos, tienden a aumentar la expresión de citocinas en intestino y bazo.

Los análisis histológicos demuestran que la administración oral de *Schizochytrium* sp. no provoca daño en intestino e hígado de ratón.

11. RECOMENDACIONES

Es probable que un esquema de inmunización vía intraperitoneal y en combinación con algún adyuvante incremente la respuesta inmunológica sistémica. Con base a nuestros resultados, se plantea realizar un estudio comparativo del efecto adyuvante de *Schizochytrium* sp. contra aquel ejercido por otros compuestos inmunoestimulantes (propios de la microalga o de otras especies) y con adyuvantes como el adyuvante completo e incompleto de Freund, CTB, LTB, entre otros. Dado que en nuestro experimento la combinación entre la microalga y el rAg85b resultaron mejores inductores de anticuerpos totales, se propone utilizar la microalga y el Ag85b en combinación de otras vacunas para verificar el efecto adyuvante de ambos.

12. LITERATURA CITADA

- Bannantine, J. P., M. E. Hines, L. E. B. II, A. M. Talaat, S. Sreevatsan, J. R. Stabel, V. Kapur. 2014. A rational framework for evaluating the next generation of vaccines against *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis*. *Front. cell Infect. Microbiol.* 4.
- Bayne, A. C. V., D. Boltz, C. Owen. 2013. Vaccination against influenza with recombinant hemagglutinin expressed by *Schizochytrium* sp. confers protective immunity. *PLoS ONE.* 8:4.
- Belisle, J.T., V. D. Vissa, T. Sievert, K. Takayama, P. J. Brennan, G. S. Besra. 1997. Role of the major antigen of *Mycobacterium tuberculosis* in cell wall biogenesis. *Science.* 276:1420–2.
- Brady, C., D. O'Grady, F. O'Meara, J. Egan, H. Bassett. 2008. Relationships between clinical signs, pathological changes and tissue distribution of *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* in 21 cows from herds affected by Johne's disease. *Vet. Rec.* 5:147-152.
- Chang, K. J. L., C. M. Nichols, S. I. Blackburn. 2014. Comparison of thraustochytrids *Aurantiochytrium* sp., *Schizochytrium* sp., *Thraustochytrium* sp., and *Ulkenia* sp. for production of biodiesel, long-chain omega-3 oils, and exopolysaccharide. *Mar. biotechnol.* 4:396-411.
- Chen, X., G. J. Fernando, M. L. Crichton, C. Flaim, S. R. Yukiko, E. J. Fairmaid, L. E. Brown. 2011. Improving the reach of vaccines to low-resource regions, with a needle-free vaccine delivery device and long-term thermostabilization. *J. Control. Release.* 3:349-355.
- Cheng, M., J. E. Fry, S. Pang, H. Zhou, C. M. Hironaka, D. R. Duncan, Y. Wan. 1997. Genetic transformation of wheat mediated by *Agrobacterium tumefaciens*. *Plant Physiol.* 3:971-980.
- Cheng, R., R. Ma, K. Li. 2012. *Agrobacterium tumefaciens* mediated transformation of marine microalgae *Schizochytrium*. *Microbiol. Res.* 3:179-186.
- Chew, B. P., J. S. Park, T. S. Wong, H. W. Kim, B. C. Weng, K. M. Byrne, M. G. Hayek, G. A. Reinhart. 2000. Dietary β -carotene stimulates cell-mediated and humoral immune response in dogs. *J. Nutr.* 130:1910–1913.
- Chiodini, R. J. 1993. Abolish *Mycobacterium paratuberculosis* strain 18. *J. Clin. Microbiol.* 7:1956.
- Chu, W. L., L. Van Quynh, A. K. Radhakrishnan. 2013. Effect of *Spirulina* (Arthrospira) supplementation on the immune response to tetanus toxoid vaccination in a mouse model. *J. Diet. Suppl.* 3:229-240.

Clairborne A. 1985. Catalase activity. In: Greenwald RA, editor. CRC Handbook of methods for oxygen radical research. Boca Raton: CRC Press. 283e4.

Cocito, C., P. Gilot, M. Coene, M. de Kesel, P. Poupart, P. Vannuffel. 1994. Paratuberculosis. Clin. Microbiol. Rev. 7:328-45.

Cyktor, J. C., J. Turner. 2011. Interleukin-10 and immunity against prokaryotic and eukaryotic intracellular pathogens. Infect. Immun. 8:2964-2973.

Dalmo, R. A., J. Børgwald. 2008. β -glucans as conductors of immune symphonies. Fish Shellfish Immunol. 25(4), 384-396.

Dauvillée, D., S. Delhaye, S. Gruyer, C. Slomianny, S. E. Moretz, C. d'Hulst, S. Tomavo. 2010. Engineering the chloroplast targeted malarial vaccine antigens in *Chlamydomonas* starch granules. PLoS One. 12:e15424.

Dreesen, I.A., H. G. Charpin-El, M. Fussenegger. 2010. Heat-stable oral alga-based vaccine protects mice from *Staphylococcus aureus* infection. J. Biotechnol. 3:273-280.

Ellingson, J. L., J. L. Anderson, J. J. Koziczkowski, R. P. Radcliff, S. J. Sloan, S. E. Allen, N. M. Sullivan. 2005. Detection of viable *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in retail pasteurized whole milk by two culture methods and PCR. J. Food Prot. 68:966-72.

Elmore, S. 2007. Apoptosis: a review of programmed cell death. Toxicol. Pathol. 4:495-516.

Esser, M. T., R. D. Marchese, L. S. Kierstead, L. G. Tussey, F. Wang, N. Chirmule. 2003. Memory T cells and vaccines. Vaccine. 21:419-30.

Feng, S., W. Feng, L. Zhao. 2014. Preparation of transgenic *Dunaliella salina* for immunization against white spot syndrome virus in crayfish. Arch. Virol. 3:519-525.

Food and Drug Administration, Department of Health and Human Services. 2004. Substances affirmed as generally recognized as safe: Algal Oil (*Schizochytrium* sp.). GRN no. 137.

Franklin, S., B. Ngo, E. Efuet, S. P. Mayfield. 2002. Development of a GFP reporter gene for *Chlamydomonas reinhardtii* chloroplast. Plant J. 6:733-744.

Frey, S. E., R. M. R. Aplasca, H. Reynales. 2014. Comparison of the safety and immunogenicity of an MF59®-adjuvanted with a non-adjuvanted seasonal influenza vaccine in elderly subjects. Vaccine. 39:5027-5034.

Furuhjelm, C., M. C. Jenmalm, K. F. Magnusson. 2011. Th1 and Th2 Chemokines, vaccine-induced immunity, and allergic disease in infants after maternal ω -3 fatty acid supplementation during pregnancy and lactation. *Pediatr. Res.* 3:259-264.

Goldstein, D. A., J. A. Thomas. 2004. Biopharmaceuticals derived from genetically modified plants. *Qjm.* 11:705-716.

Gregory, J. A., A. B. Topol, D. Z. Doerner, S. Mayfield. 2013. Alga-produced cholera toxin-Pfs25 fusion proteins as oral vaccines. *Appl. Environ. Microbiol.* 13:3917-3925.

Gregory, J. A., F. Li, L. M. Tomosada, C. J. Cox, A.B. Topol. 2012. Algae-produced Pfs25 elicits antibodies that inhibit malaria transmission. *PLoS ONE.* 5:e37179.

Gurzell, E. A., H. Teague, M. Harris, J. Clinthorne, S. R. Shaikh, J. I. Fenton. 2013. DHA-enriched fish oil targets B cell lipid microdomains and enhances ex vivo and *in vivo* B cell function. *J. Leukoc. Biol.* 4:463-470.

Gurzell, E. A., H. Teague, M. Harris. 2013. DHA-enriched fish oil targets B cell lipid microdomains and enhances ex vivo and *in vivo* B cell function. *J. Leukoc. Biol.* 4:463-470.

Hara, H., I. Kawamura, T. Nomura, T. Tominaga, K. Tsuchiya, M. Mitsuyama. 2007. Cytolysin-dependent escape of the bacterium from the phagosome is required but not sufficient for induction of the Th1 immune response against *Listeria monocytogenes* infection: distinct role of Listeriolysin O determined by cytolysin gene replacement. *Infect. Immun.* 75:3791-801.

Hawkins, R. L., M. Nakamura. 1999. Expression of human growth hormone by the eukaryotic alga, *Chlorella*. *Curr. Microbiol.* 6:335-341.

Hayashi, O., T. Hirahashi, T. Katoh, H. Miyajima, T. Hirano, Y. Okuwaki. 1998. Class specific influence of dietary *Spirulina platensis* on antibody production in mice. *J. Nutr. Sci. Vitaminol.* 6:841-851.

Hempel, F., J. Lau, A. Klingl. 2011. Algae as protein factories: expression of a human antibody and the respective antigen in the diatom *Phaeodactylum tricorutum*. *PLoS ONE.* 6:12.

Henson, P. M., D. L. Bratton, V. A. Fadok. 2001. Apoptotic cell removal. *Curr. Biol.* 19:795-805.

Hernández, M., G. Rosas, J. Cervantes. 2014. Transgenic plants: a 5-year update on oral antipathogen vaccine development. *Expert Rev. Vaccines.* 12:1523-36.

Hines, M. E., M. R. Ilha, S. Rajeev, A. L. Jones, L. Whittington, V. Kapur. 2014. Evaluation of novel oral vaccine candidates and validation of a caprine model of Johne's disease. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* Frontiers in cellular and infection microbiology, 4.

Hoang, M. H., N. C. Ha, L. T. Tam, H. T. L. Anh, N. T. H. Thu, D. D. Hong. 2014. Extraction of squalene as value-added product from the residual biomass of *Schizochytrium mangrovei* PQ6 during biodiesel producing process. *J. Biosci. Bioeng.* 6:632-639.

Hsu, H. Y., N. Jeyashoke, C. H. Yeh, Y. J. Song, Hua, K. F., L. K. Chao. 2009. Immunostimulatory bioactivity of algal polysaccharides from *Chlorella pyrenoidosa* activates macrophages via Toll-like receptor 4. *J. Agric. Food Chem.* 2:927-936.

Huang, G., F. Chen, D. Wei. 2010. Biodiesel production by microalgal biotechnology. *Appl. Energy.* 1:38-46.

Jarvis, E. E., L. M. Brown. 1991. Transient expression of firefly luciferase in protoplasts of the green alga *Chlorella ellipsoidea*. *Curr. Genet.* 19:317-321.

Johnston, C., A. Coffey, J. O'Mahony. 2010. Development of a novel oral vaccine against *Mycobacterium avium paratuberculosis* and Johne disease: a pathobiotechnological approach. *Bioengineered.* 3:155-163.

Kaneko, Y., F. Nimmerjahn, J. V. Ravetch. 2006. Anti-inflammatory activity of immunoglobulin G resulting from Fc sialylation. *Science.* 5787:670-673.

Kathaperumal, K., V. Kumanan, S. McDonough, L. H. Chen, S. U. Park, M. A. Moreira, Y. F. Chang. 2009. Evaluation of immune responses and protective efficacy in a goat model following immunization with a cocktail of recombinant antigens and a polyprotein of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*. *Vaccine.* 1:123-135.

Knight, J. A. 2000. Review: Free radicals, antioxidants, and the immune system. *Ann. Clin. Lab. Sci.* 2:145-158.

Koets, A., V. Rutten, A. Hoek, F. van Mil, K. Müller, D. Bakker. 2002. Progressive bovine paratuberculosis is associated with local loss of CD4(+) T cells, increased frequency of gamma delta T cells, and related changes in T-cell function. *Infect. Immun.* 70:3856-64.

Kohen, R., A. Nyska. 2002. Invited review: Oxidation of biological systems: oxidative stress phenomena, antioxidants, redox reactions, and methods for their quantification. *Toxicol. Pathol.* 6:620-650.

Konopski, Z., L. T. Rasmussen, R. Seljelid, T. Eskeland. 1991. Phagocytosis of h-1,3,-D glucan-derivatized microbeads by mouse peritoneal macrophages involves three different receptors. *Scand. J. Immunol.* 33:297–306.

Kunisawa, J., E. Hashimoto, A. Inoue. 2014. Regulation of intestinal IgA responses by dietary palmitic Acid and its metabolism. *J. Immunol.* 4:1666-1671.

Kuo, C. J., C. P. Ptak, C.L. Hsieh, B. L. Akey, Y. F. Chang. 2013. Elastin, a novel extracellular matrix protein adhering to mycobacteria antigen 85 complex. *J. Biol. Chem.* 288:3886-3896.

Laemmli, U. K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature.* 227:680-685.

Lamichhane, A., T. Azegami, H. Kiyono. 2014. The mucosal immune system for vaccine development. *Vaccine.* 49:6711-6723.

Liang, S.C., X. Y. Tan, D. P. Luxenberg, R. Karim, K. Dunussi-Joannopoulos, Collins, M. Fouser. 2006. Interleukin (IL)-22 and IL-17 are coexpressed by Th17 cells and cooperatively enhance expression of antimicrobial peptides. *J. Exp. Med.* 203:2271–2279.

Losinger, W. C. 2005. Economic impact of reduced milk production associated with Johne's disease on dairy operations in the USA. *J. Dairy. Res.* 72:425–32.

Maderna, P., C. Godson. 2003. Phagocytosis of apoptotic cells and the resolution of inflammation. *Biochim. biophys. acta, Mol. basis dis.* 3:141-151.

Mardanov, E.S., R. Y. Kotlyarov, V. V. Kuprianov. 2015. Rapid high-yield expression of a candidate influenza vaccine based on the ectodomain of M2 protein linked to flagellin in plants using viral vectors. *BMC Biotechnol.* 1:42.

Maruyama, M., I. Horakova, H. Honda, X. H. Xing, N. Shiragami, H. Unno. 1994. Introduction of foreign DNA into *Chlorella saccharophila* by electroporation. *Biotechnol. Technol.* 8:821–826.

Mayer, A. M. S., A. D. Rodríguez, D. Berlinck. 2011. Marine compounds with antibacterial, anticoagulant, antifungal, antiinflammatory, antiprotozoal, antituberculosis and antiviral activities; affecting the immune and nervous system, and other miscellaneous mechanisms of action. *Comp. Biochem. Physiol.* 153:191-222.

Mioso, R., F. J. T. Marante, J. E. González. 2014. Metabolite profiling of *Schizochytrium* sp. by GC-MS, an oleaginous microbial source of biodiesel. *Braz. J. Microbiol.* 2:403-409.

Mullerad, J., I. Michal, Y. Fishman, A. H. Hovav, R. G. Barletta, H. Bercovier 2002. The immunogenicity of *Mycobacterium paratuberculosis* 85B antigen. *Med Microbiol Immun.* 4:179-187.

Naito, M., N. Ohara, S. Matsumoto, T. Yamada. 1998. The novel fibronectin-binding motif and key residues of mycobacteria. *J. Biol. Chem.* 273:2905–9.

Naser, S. A., G. Ghobrial, C. Romero, J. F. Valentine. 2004. Culture of *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* from the blood of patients with Crohn's disease. *The Lancet.* 364:1039-1044.

Park, S. U., K. Kathaperumal, S. McDonough, B. Akey, J. Huntley, J. P. Bannantine, Y. F. Chang. 2008. Immunization with a DNA vaccine cocktail induces a Th1 response and protects mice against *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* challenge. *Vaccine.* 34:4329-4337.

Parra, D., T. Korytar, F. Takizawa, J. O. Sunyer. 2016. B cells and their role in the teleost gut. *Dev. Comp. Immunol.* 64:150-66.

Paul, W. E., R. A. Seder. 1994. Lymphocyte responses and cytokines. *Review. Cell.* 76:241-51.

Pepponi, I., G. R. Diogo, E. Stylianou, C. J. Dolleweerd, P. M. Drake, M. J. Paul, R. Reljic. 2014. Plant-derived recombinant immune complexes as self-adjuvanting TB immunogens for mucosal boosting of BCG. *Plant Biotechnol. J.* 7:840-850.

Peterson, D. A., N. P. McNulty, J. L. Guruge, J. I. Gordon. 2007. IgA response to symbiotic bacteria as a mediator of gut homeostasis. *Cell Host Microbe.* 2:328–339.

Petrovsky, N., J. C. Aguilar. 2004. Vaccine adjuvants: current state and future trends. *Immunol. Cell Biol.* 5:488-496.

Petrovsky, N., P. D. Cooper. 2011. Carbohydrate-based immune adjuvants. *Expert rev. of vaccines.* 4:523-537.

Phelan, K., K. M. May. 2007. Basic techniques in mammalian cell tissue culture. *Current protocols in cell biology*, 1-1.

Qu, L., L. J. Ren, J. Li. 2013. Biomass composition, lipid characterization, and metabolic profile analysis of the fed-batch fermentation process of two different docosahexanoic acid producing *Schizochytrium* sp. strains. *Applied biochemistry and biotechnology.* 7:865-1876.

Reddacliff, L., J. Eppleston, P. Windsor, R. Whittington, S. Jones. 2006. Efficacy of a killed vaccine for the control of paratuberculosis in Australian sheep flocks. *Vet. Microbiol.* 1:77-90.

Reed, S. G., M. T. Orr, C. B. Fox. 2013. Key roles of adjuvants in modern vaccines. *Nat. Med.* 12:1597-1608.

Rosales-Mendoza, S., J. A. Salazar-González. 2014. Immunological aspects of using plant cells as delivery vehicles for oral vaccines. *Expert Rev. Vaccines.* 6:737-49.

Rosales-Mendoza, S., R. Ríos-Huerta, C. Angulo. 2015. An overview of tuberculosis plant-derived vaccines. *Expert Rev. Vaccines.* 6:877-889.

Rosseels, V., K. Huygen. 2008. Vaccination against paratuberculosis. *Expert. Rev. Vaccines.* 6:817-832.

Roupie, V., S. Viart, B. Leroy, M. Romano, N. Trincherro, M. Govaerts, K. Huygen. 2012. Immunogenicity of eight *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* specific antigens in DNA vaccinated and Map infected mice. *Vet. Immunol. Immunopathol. Veterinary immunology and immunopathology.* 1:74-85.

Saade, F., Y. H. Okubo, S. Trec. 2013. A novel hepatitis B vaccine containing Advax™, a polysaccharide adjuvant derived from delta inulin, induces robust humoral and cellular immunity with minimal reactogenicity in preclinical testing. *Vaccine.* 15:1999-2007.

Sahdev, S., S. K Khattar, K. S. Saini. 2008. Production of active eukaryotic proteins through bacterial expression systems: a review of the existing biotechnology strategies. *Mol. Cell. Biochem.* 1-2:249-264.

Schwartz, J. L., E. Flynn, G. Shklar. 1990. The effect of carotenoids on the antitumor immune response *in vivo* and *in vitro* with hamster and mouse effectors. *Micronutr. Immunol. Function.* 587:92-109.

Settles, E. W., J. A. Kink, A. Talaat. 2014. Attenuated strains of *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* as vaccine candidates against Johne's disease. *Vaccine.* 18:2062-2069.

Shimizu, Y., K. Karamatsu, A. Matsubara, Y. Yasutomi. 2008. Innovation of vaccine adjuvants. *Nippon Rinsho.*10:1915-1921.

Sohal, J. S., S. V. Singh, P. Tyagi, S. Subhodh, P. K. Singh, A. V. Singh. 2008. Immunology of mycobacterial infections: with special reference to *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis*. *Immunobiology.* 213:585-98.

- Specht, E. A., Mayfield, S. P. 2014. Algae-based oral recombinant vaccines. *Front. Microbiol.* 5.
- Strickley, R. G. 2004. Solubilizing excipients in oral and injectable formulations. *Pharm. Res.* 2:201-230.
- Surayot, U., J. Wang, J. H. Lee, C. Kanongnuch, Y. Peerapornpisal, S. You. 2015. Characterization and immunomodulatory activities of polysaccharides from *Spirogyra neglecta* (Hassall) Kützing. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 10:1644-1653.
- Takamura, S., K. Matsuo, Y. Takebe, Y. Yasutomi. 2005. Ag85B of mycobacteria elicits effective CTL responses through activation of robust Th1 immunity as a novel adjuvant in DNA vaccine. *J. Immunol.* 4:2541-2547.
- Takatsu, K., A. Kariyone. 2003. The immunogenic peptide for Th1 development. *Int. Immunopharmacol.* 6:783-800.
- Taparia, T., M. MVSS, R. Mehrotra. 2015. Developments and challenges in biodiesel production from microalgae: A review. *Biotechnol. Appl. Biochem.* 63:715–726.
- Vallée, H., P. Rinjard. 1926. Études sur l'entérite paratuberculeuse des bovides. *Res. Gen. Med. Vet.* 35:1.
- Wilkhu, J., S. E. McNeil, D. J. Kirby. 2011. Formulation design considerations for oral vaccines. *Ther. Deliv.* 9:1141-64.
- Wu, Y., H. Sun, F. Qin, Y. Pan, C. Sun. 2006. Effect of various extracts and a polysaccharide from the edible mycelia of *Cordyceps sinensis* on cellular and humoral immune response against ovalbumin in mice. *Phytother. Res.* 8:646-652.
- Yao, L., J. A. Gerde, S. L. Lee. 2015. Microalgae lipid characterization. *J. Agric. Food Chem.* 6:1773-1787.
- Yokoyama, R., D. Honda. 2007. Taxonomic rearrangement of the genus *Schizochytrium* sensu lato based on morphology, chemotaxonomic characteristics, and 18S rRNA gene phylogeny (Thraustochytriaceae, Labyrinthulomycetes): emendation for *Schizochytrium* and erection of *Aurantiochytrium* and *Oblongichytrium*. *Gen. Nov. Mycoscience.* 4:199-211.