



CENTRO DE INVESTIGACIONES BIOLÓGICAS
DEL NOROESTE, S.C.

Programa de Estudios de Posgrado

**PROTOTIPO DE UNA NANOVACUNA ORAL UTILIZANDO EL
EPÍTOPE Ta2 DE LA TOXINA A DE *Vibrio parahaemolyticus*
EN LEUCOCITOS DE PEZ**

TESIS

Que para obtener el grado de

Maestro en Ciencias

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

Presenta:

Norma Estela Hernández Loredo

La Paz, Baja California Sur, septiembre 2020.

ACTA DE LIBERACIÓN DE TESIS

En la Ciudad de La Paz, B. C. S., siendo las 12 horas del día 8 del Mes de septiembre del 2020, se procedió por los abajo firmantes, miembros de la Comisión Revisora de Tesis avalada por la Dirección de Estudios de Posgrado y Formación de Recursos Humanos del Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, S. C., a liberar la Tesis de Grado titulada:

"Prototipo de una nanovacuna oral utilizando el epítotope Ta2 de la toxina A de *Vibrio parahaemolyticus* en leucocitos de pez"

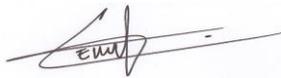
Presentada por el alumno:

Norma Estela Hernández Loredo

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.

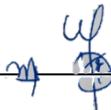
LA COMISIÓN REVISORA



Dr. Carlos Eliud Angulo Valadez
Co-Director de Tesis



Dra. Gabriela Navarro Tovar
Co-Directora de Tesis



Dra. Elizabeth Monreal Escalante
Co-Tutora de Tesis



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

Conformación de Comités

Comité Tutorial

Dr. Carlos Eliud Angulo Valadez

Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste S.C.

Co-Director de Tesis

Dra. Gabriela Navarro Tovar

Universidad Autónoma de San Luís Potosí

Co-Directora de Tesis

Dra. Elizabeth Monreal Escalante

Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste S.C.

Co-Tutora de Tesis

Comité Revisor de Tesis

Dr. Carlos Eliud Angulo Valadez

Dra. Gabriela Navarro Tovar

Dra. Elizabeth Monreal Escalante

Jurado de Examen

Dr. Carlos Eliud Angulo Valadez

Dra. Gabriela Navarro Tovar

Dra. Elizabeth Monreal Escalante

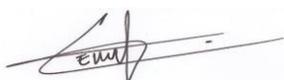
Suplente

Dr. Luis Hernández Adame

Resumen

El uso de nanopartículas en Vacunología ha aumentado en los últimos años debido a su capacidad para estimular o suprimir las respuestas inmunitarias. En este contexto, las nanopartículas de oro (AuNPs) han sido ampliamente investigadas para tratar múltiples padecimientos. Las AuNPs se han empleado para tratar desde cáncer hasta enfermedades causadas por virus o bacterias, como es el caso de *Vibrio parahaemolyticus*. La bacteria marina *V. parahaemolyticus* es responsable de causar vibriosis en camarones y peces. Recientemente *V. parahaemolyticus* adquirió un plásmido (plásmido pVA). El plásmido pVA posee una toxina binaria (Toxina A y Toxina B) y está asociado al Síndrome de la Necrosis Aguda del Hepatopáncreas. Un estudio, realizado en nuestro grupo de investigación, encontró que la Toxina A posee propiedades inmunomoduladoras y protectoras contra *V. parahaemolyticus*. Siguiendo esta línea de investigación, un sistema basado en AuNPs y epítopes de la Toxina A representa una potencial nanovacuna oral en peces. En este trabajo, un epítipo de la Toxina A (Ta2) se adsorbió sobre la superficie de AuNPs por medio de interacciones electrostáticas (AuNPs-Ta2). Este sistema fue caracterizado mediante DLS, potencial Z, espectrofotometría UV-vis y Microscopía Electrónica. Además, su citotoxicidad y su potencial como inmunoestimulante, se evaluó en pruebas *in vitro* en leucocitos de bazo de pez (*Seriola rivoliana*). AuNPs-Ta2 no mostró citotoxicidad en células expuestas a concentraciones de 5.1 y 10.1 nM (con respecto a AuNPs). Se analizó la actividad de enzimas asociadas a la respuesta inmune (fagocitosis, superóxido dismutasa, catalasa, mieloperoxidasa, explosión respiratoria, óxido nítrico). Se encontraron diferencias significativas en la actividad catalasa y mieloperoxidasa de los leucocitos estimulados con el prototipo de la nanovacuna con respecto al control. El conocimiento sobre la inmunomodulación en las mucosas por AuNPs modificadas con subunidades permitirá elucidar las células, mecanismos (inductores, reguladores y efectores) y actividades funcionales. Esto contribuye al conocimiento para la manipulación del sistema inmune de las mucosas en modelo de pez.

Palabras Claves: *Vibrio parahaemolyticus*, Toxina A, AuNPs, Nanovacuna, Pez.



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

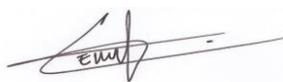


Vo.Bo.
Dra. Gabriela Navarro Tovar
Co-Directora de Tesis

Summary

Nanoparticles possess the ability to stimulate or suppress immune responses. In this context, gold nanoparticles (AuNPs) have been extensively investigated to treat multiple conditions. AuNPs show the potential to treat from cancer to diseases caused by viruses or bacteria, such as *Vibrio parahaemolyticus*. *V. parahaemolyticus* is a marine bacterium responsible of vibriosis in shrimp and fish. Recently, *V. parahaemolyticus* acquired a plasmid (plasmid pVA). Plasmid pVA encodes a binary toxin (Toxin A and Toxin B), which was associated with the acute hepatopancreatic necrosis disease. Our research group demonstrated that Toxin A in fish had immunomodulatory and protective effects against *V. parahaemolyticus*. Following this line of research, a system based on AuNPs and Toxin A peptides represents a potential oral nanovaccine in fish. In this study, a system of an epitope of Toxin A (Ta2) adsorbed onto the surface of AuNPs through electrostatic interactions (AuNPs-Ta2) was characterized by DLS, Z potential, UV-vis spectrophotometry, and Electron Microscopy. Furthermore, the AuNPs-Ta2 cytotoxicity and the immunostimulant effects were evaluated. *In vitro* tests were performed on fish spleen leukocytes (*Seriola rivoliana*). AuNPs-Ta2 showed no cytotoxicity in cells exposed to concentrations of 5.1 and 10.1 nM (concerning AuNPs). The activity of enzymes associated with the immune response (phagocytosis, superoxide dismutase, catalase, myeloperoxidase, respiratory explosion, nitric oxide) was analyzed. Stimulated leukocytes with AuNPs-Ta2 increased significantly the activity of catalase and myeloperoxidase for the control. Knowledge of immunomodulation in the mucosa by subunit-modified AuNPs will allow elucidating cells, mechanisms (inductors, regulators and effectors) and functional activities, as a basis for the manipulation of the mucosal immune system in a fish model.

Key words: *Vibrio parahaemolyticus*, Toxin A, AuNPs, Nanovaccine, Fish.



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



Vo.Bo.
Dra. Gabriela Navarro Tovar
Co-Directora de Tesis

Dedicatoria

A mi familia.

A mi mamá, a mi papá, a mi hermana y a la memoria del abuelo.

A todas las personas increíbles que conocí y a las que seguí conociendo en los últimos dos años.

Agradecimientos

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por la beca otorgada 921918 y el financiamiento del proyecto: Inmunomodulación funcional y comparada de las mucosas por nanovacunas orales en crustáceos, peces y mamíferos (FC2016/2820), para la realización de esta tesis.

Al Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste S. C., (CIBNOR), por las instalaciones prestadas para realizar los experimentos y las actividades académicas. Al área de Posgrado por la beca otorgada para realizar una estancia en la UASLP que permitió obtener la caracterización del material. A todo el personal administrativo del CIBNOR por todas las facilidades y atenciones brindadas.

A mi comité tutorial. Al Dr. Carlos Eliud Angulo Valadez, la Dra. Gabriela Navarro Tovar y la Dra. Elizabeth Monreal Escalante por su disposición y ayuda para realizar el presente trabajo.

A la Dra. Martha Reyes Becerril, por su apoyo en la obtención y procesamiento de muestras para las técnicas inmunológicas.

Al Grupo de Inmunología y Vacunología por su ayuda en la sección biológica de esta tesis.

Al Dr. Mauricio Comas por su ayuda en las microscopias.

Al Dr. Gabriel Castañón y a su alumno Aaron Milo por permitirnos y apoyarnos las mediciones en DLS.

Al Dr. José Luis Rodríguez por facilitarnos la técnica de ICP-MS.

A todos los técnicos y estudiantes del área de biotecnología del CICSaB (UASLP) que apoyaron en la caracterización del sistema.

Contenido

Resumen	i
Summary	ii
Dedicatoria	ii
Agradecimientos	iii
Contenido	iv
Lista de tablas	vii
Nomenclatura / Unidades (SI)	viii
1. INTRODUCCIÓN	1
1.1. Uso de vacunas en la acuicultura.....	1
1.2. Vacunas orales en peces.....	3
1.3. Nanopartículas de oro (AuNPs)	3
1.4. Nanovacunas.....	6
2. ANTECEDENTES	7
2.1 Nanovacunas utilizando AuNPs	7
2.2. Mecanismos de respuesta inmune por nanovacunas utilizando AuNPs.....	7
3. JUSTIFICACIÓN	10
4. HIPOTESIS	12
5. OBJETIVOS	13
5.1. Objetivo general.....	13
5.2. Objetivos particulares	13
6. MATERIAL Y METODOS	14
6.1. Síntesis y caracterización de AuNPs-Ta2	14
6.1.1. Síntesis de AuNPs	14
6.1.2. Adsorción del epítoto Ta2 sobre AuNPs.....	14
6.1.3. Caracterización morfológica y fisicoquímica de AuNPs-Ta2.....	15
6.1.4. Determinación de la eficiencia de carga de Ta2 sobre AuNPs por ELISA	15
6.2. Peces	17
6.2.1 Aislamiento de leucocitos de bazo de pez	17
6.3 Viabilidad celular de AuNPs-Ta2.....	17

6.4. Caracterización de las propiedades inmunoestimulantes de AuNPs-Ta ₂ <i>in vitro</i>	18
6.4.1. Estimulación con AuNPs-Ta ₂	18
6.4.2. Fagocitosis.....	19
6.4.3. Explosión respiratoria	19
6.4.4. Óxido nítrico	19
6.4.5. Superóxido dismutasa.....	19
6.4.6. Catalasa	20
6.4.7. Mieloperoxidasa.....	20
6. 5. Análisis estadístico	20
7. RESULTADOS	21
7.1 Caracterización de AuNPs-Ta ₂	21
7.1.1 Caracterización óptica y morfológica.....	21
7.1.2 Carga superficial y radio hidrodinámico por DLS.....	23
7.1.3 Rendimiento de reacción de la síntesis de AuNPs	24
7.1.4 Eficiencia de carga de Ta ₂ sobre la superficie de AuNPs.....	24
7.2 Experimentos <i>in vitro</i> utilizando leucocitos.....	24
7.2.1 Viabilidad celular	24
7.2.2 Respuestas inmunológicas y antioxidantes	25
8. DISCUSIÓN.....	27
8.1 Caracterización de AuNPs-Ta ₂	27
8.2 Viabilidad celular.....	29
8.3 Respuestas inmunológica y antioxidantes.....	31
9. CONCLUSIONES	34
10. LITERATURA CITADA	36
11. ANEXO	47

Lista de figuras

- Figura 1.** Espectros de absorción ultravioleta visible (UV-Vis) de soluciones acuosas. (a) AuNPs-Ta2 (5.1 nM con respecto a AuNPs); (b) Ta2 (265.65 $\mu\text{g} / \text{mL}$); y (c) AuNPs desnudas (5.1 nM). Las mediciones se realizaron utilizando un equipo de Espectrofotometría UV-Vis SHIMADZU (UV-1900). Las muestras fueron analizadas a temperatura ambiente. 22
- Figura 2.** Micrografías de AuNPs. Las AuNPs fueron sintetizadas por el método de Turkevich. Imágenes obtenidas por Microscopía Electrónica de Transmisión (TEM) en el equipo JEOL-2100. El tamaño promedio de diámetro ($16.5 \pm 5 \text{ nm}$) se obtuvo midiendo 246 estructuras mediante el software ImageJ. 22
- Figura 3.** Espectroscopia de Rayos X por Energía Dispersiva (EDS) de AuNPs. Gráficos obtenidos en microscopía electrónica de transmisión en equipo JEOL-2100 acoplado a EDS Rayos X..... 23
- Figura 4.** Efecto de AuNPs-Ta2 A, AuNPs-Ta2 B, AuNPs A, AuNPs B, Ta A y Ta B a las 24 h sobre la viabilidad de leucocitos de bazo de Jurel (*Seriola rivoliana*). La viabilidad se evaluó al final de las 24 h midiendo la fluorescencia de resazurina. Los resultados se muestran como medias \pm desviación estándar (DE) de tres muestras independientes. Las diferentes letras denotan diferencias significativas entre los grupos tratados ($p < 0.05$). 25
- Figura 5.** Respuesta inmunológica debida a AuNPs-Ta2. a) Habilidad fagocítica, b) explosión respiratoria, c) producción de óxido nítrico, d) actividad superóxido dismutasa, e) actividad catalasa y f) actividad mieloperoxidasa de leucocitos de bazo de Jurel (*Seriola rivoliana*) estimulados con AuNPs-Ta2, AuNPs y Ta2 por 24 h. Los resultados se muestran como medias \pm desviación estándar (DE) de tres muestras independientes. Las diferentes letras denotan diferencias significativas entre los grupos tratados ($p < 0.05$). 26

Lista de tablas

Tabla I. Vacunas de subunidades con licencia para peces.....	2
Tabla II. Herramientas y métodos para la caracterización de NPs.	5
Tabla III. Concentraciones de AuNPs-Ta2.	18
Tabla IV. Potencial ζ y radio hidrodinámico de AuNPs y AuNPs-Ta2 obtenidos por DLS. ...	23

Nomenclatura / Unidades (SI)

nm =nanómetro / 1 nm= 1×10^{-9} m.

M=molar / 1M=1 mol m⁻³

μM= micromolar / 1 μM = 1×10^{-6} mol m⁻³

mM=milimolar / 1 mM= 1×10^{-3} mol m⁻³

μg= microgramo / 1 μg= 1×10^{-9} kg

μg g⁻¹= microgramos por gramo / 1 μg g⁻¹ = 1×10^{-3} g kg⁻¹

g.mol⁻¹= gramos por mol / Peso molecular de un compuesto

L= litro / 1 L= 0.01 m³

mL= mililitro /1 mL= 1×10^{-6} m³

μL= microlitro / 1 μL= 1×10^{-9} m³

mg L⁻¹= miligramos por litro / 1 mg L⁻¹= 1×10^{-3} kg m⁻³

h= hora / 1h=3600 s

rpm= revoluciones por minuto / 1rpm=0.104719755 rad.s⁻¹

ng=nanogramo / 1ng = 1×10^{-12} kg

u.a.= unidades arbitrarias

μm= micrómetro / 1 μm= 1×10^{-6} m

g=gravedad / 1g = 9.8m s⁻²

mV= milivoltio / 1V=Joule.Coulomb=1 m2kg s⁻³ A⁻¹

1. INTRODUCCIÓN

1.1. Uso de vacunas en la acuicultura

La acuicultura es el sector primario de más rápido crecimiento en el mundo (Vinay et al., 2018). Uno de los grandes retos a los que se enfrenta la acuicultura son las enfermedades marinas infecciosas. Las patologías infecciosas resultan un impedimento importante para el desarrollo del sector acuícola, siendo la causa más importante de pérdida económica (Lafferty et al., 2015). En este contexto, la vibriosis es una de las enfermedades infecciosas más graves y afecta a peces marinos en zonas tropicales y subtropicales del mundo. Dentro de los patógenos capaces de producir vibriosis se encuentran principalmente *Vibrio harveyi*, *Vibrio parahaemolyticus*, *Vibrio alginolyticus* y *Vibrio anguillarum* (Li et al., 2013). Específicamente, *V. parahaemolyticus* es un importante patógeno halófilo que puede causar una amplia gama de enfermedades en los animales acuáticos. También es la causa de enfermedades graves transmitidas por los mariscos en los humanos como resultado del consumo de mariscos (Baffone et al., 2005).

Generalmente, la vibriosis es tratada con antibióticos que, aunque pueden ser muy efectivos, en el tratamiento a largo plazo suelen conducir a la resistencia. Además, el uso de antibióticos puede dañar el medio ambiente. Por ello, desde hace algunas décadas, las vacunas se vislumbran como una forma más segura, ecológica y eficiente para controlar los patógenos infecciosos (Anderson, 1992). Aunque actualmente existen 26 vacunas comerciales para peces, la mayoría están dirigidas al salmón del Atlántico (*Salmo salar*), mientras que para otras especies de peces su uso está poco establecido debido a la falta de vacunas, bajo rendimiento, o elevado costo (Ma et al., 2019). Las vacunas comerciales para peces utilizan patógenos muertos que se administran por inyección intraperitoneal, aunque en algunos países está permitido el uso de vacunas de organismos atenuados, por ejemplo, en Estados Unidos donde se utiliza en el bagre (*Ictalurus punctatus*) (Adams, 2019). El uso de organismos completos en vacunas representa un problema cuando estos son difíciles o costosos de cultivar, aunado a que los organismos atenuados pueden recuperar su virulencia (Dhar et al., 2014). Por ello, la búsqueda de nuevas alternativas ha

llevado al desarrollo y autorización de las tres vacunas de subunidades para peces que se describen en la Tabla I.

Tabla I. Vacunas de subunidades con licencia para peces.

Enfermedad	Patógeno	Peces principales	Antígeno	Vía de administración	País
Necrosis pancreática infecciosa	Virus de la necrosis pancreática infecciosa <i>Birnavirus</i>	Salmónidos, lubina, dorada, rodaballo, bacalao del Pacífico	Proteínas de la cápside VP2 y VP3	Oral	Canadá, EUA
Necrosis pancreática infecciosa	Virus de la necrosis pancreática infecciosa <i>Birnavirus</i>	Salmónidos, lubina, dorada, rodaballo, bacalao del Pacífico	Proteínas VP2	Intraperitoneal	Canadá, Chile, Noruega
Viremia de primavera del virus de la carpa	Virus de la viremia de primavera de la carpa <i>Rhabdovirus</i>	Carpa	Glicoproteína G	Intraperitoneal	Bélgica

* Tomado de (Ma et al., 2019).

Siguiendo este contexto, en años recientes se encontró que *V. parahaemolyticus* adquirió un plásmido (plásmido *pVA*) que posee una toxina binaria (Toxina A y Toxina B) (Li et al., 2014). Un estudio en nuestro grupo de investigación encontró que la Toxina A posee propiedades inmunomoduladoras contra *V. parahaemolyticus* (Reyes-Becerril et al., 2016, 2017). Por lo tanto, la Toxina A se perfila como una vacuna para peces contra *V. parahaemolyticus*. Además, mediante análisis bioinformáticos se han identificado péptidos de la Toxina A con potencial inmunoestimulante (epítopes). Entre ellos, se indicó al epítope Ta2 como un candidato para ser utilizado en una vacuna de subunidades contra *V. parahaemolyticus*. El epítope Ta2 se trata de la secuencia expuesta IVVINNGASR de la Toxina A de *V. parahaemolyticus* y fue seleccionado mediante la predicción de unión de péptidos a Células B, utilizando la herramienta REVXINE 2.0.

1.2. Vacunas orales en peces

La vía de vacunación oral es el método ideal de administración de vacunas en peces, desde el punto de vista de los costos de manipulación (Embregts y Forlenza, 2016). Además, la vacunación oral promueve el bienestar animal ya que es casi libre de estrés para los peces (Ahmadivand et al., 2017). Sin embargo, la administración de vacunas orales involucra el riesgo a la degradación de los compuestos bioactivos, como péptidos y proteínas, en el ambiente intestinal hostil (Chadwick et al., 2009). La degradación de los compuestos bioactivos evita que lleguen de manera efectiva al sitio de acción donde se producirá la respuesta inmunitaria. Los nanoacarreadores se han propuesto como una alternativa para transportar a los compuestos bioactivos hacia su sitio de acción (Skwarczynski y Toth, 2012). Las ventajas que presenta el uso de nanoacarreadores incluyen mejorar la estabilidad, promover la protección contra la degradación prematura y tener propiedades adyuvantes (Kole et al., 2018). Las nanopartículas de oro (AuNPs), uno de los nanoacarreadores propuestos, han mostrado tener efectos inmunoestimulantes y protectores en camarones (*Litopenaeus vannamei*) contra *V. parahaemolyticus* (Tello-Olea et al., 2019).

1.3. Nanopartículas de oro (AuNPs)

Las nanopartículas (NPs) se definen como partículas con un tamaño de 10 a 100 nm y en algunos casos hasta 1000 nm (Gheibi Hayat y Darroudi, 2019). En la actualidad, el uso de NPs se ha visto extendido a diversas áreas de estudio debido a sus características novedosas. Dentro de las características que hacen atractivas a las NPs se encuentran el tamaño pequeño y la gran área de superficie por unidad de masa. Otras características de las NPs que son aprovechadas son su carga superficial y una capacidad para existir en diferentes formas geométricas estables (Devanabanda et al., 2016). Las NPs se pueden dividir dependiendo de su naturaleza química en orgánicas, inorgánicas y con base de carbono. Las NPs inorgánicas incluyen a las NPs basadas en metales y óxidos metálicos (Ealias y Saravanakumar, 2017). Dentro de los compuestos utilizados para el desarrollo de NPs metálicas, el oro ha recibido especial interés gracias a sus propiedades físicas y químicas (Kogan et al., 2007).

El oro metálico (Au^0) posee poca reactividad química que se demuestra por su incapacidad de interactuar con los compuestos de la atmósfera. Asimismo, el oro presenta dificultad para la formación de óxidos y sulfuros o para disolverse en ácidos comunes (Louis y Pluchery, 2012). Por lo anterior, un núcleo de oro es inerte y esencialmente no tóxico para las células (Boisselier y Astruc, 2009). Las AuNPs absorben y dispersan de manera resonante la luz visible e infrarroja cercana al excitar la oscilación de su plasmón de resonancia superficial (PRS). El cambio en los parámetros intrínsecos (forma y tamaño) de las AuNPs implica un ajuste de la banda del PRS en el rango espectral. Entre las variaciones de parámetros que se han estudiado se encuentran el material (partículas bimetálicas o híbridas), el tamaño y la forma (esfera, varilla, cubo, triángulo, etc.) (Jain et al., 2006). Además, las AuNPs pueden penetrar los vasos sanguíneos y las barreras de los tejidos. También, las AuNPs pueden ser dirigidas a una célula determinada mediante su funcionalización con moléculas específicas (Carabineiro, 2017). Derivado de esto, una amplia variedad de materiales funcionales se ha logrado obtener. Entre los materiales estudiados se encuentran nanopartículas modificadas con péptidos, proteínas, anticuerpos, oligosacáridos y ácidos nucleicos (Levy et al., 2010; Sapsford et al., 2013). Esto permite que los nanomateriales actúen como plataformas multifuncionales para fines terapéuticos y de diagnóstico (Yeh et al., 2012).

Aunque existen diversos métodos de síntesis para obtener AuNPs, la vía química es la más común. La síntesis química consiste en una reacción de reducción donde iones $\text{Au}(\text{III})$ son reducidos a oro metálico (Agunloye et al., 2018). Una de las metodologías más utilizadas en la síntesis química de AuNPs es la desarrollada por Turkevich en 1951. El método de Turkevich está basado en la reducción de HAuCl_4 por citrato de sodio en agua (Turkevich et al., 1954; Herizchi et al., 2016). El tamaño, la forma y las propiedades superficiales de las AuNPs pueden ser manipuladas desde la síntesis. La modificación de las características de las AuNPs tiene el fin de adecuarlas a la función para la que fueron diseñadas (Zhang, 2015). Las AuNPs han sido estudiadas en múltiples ocasiones por su superficie única, inercia química, alta densidad de electrones y fuerte absorción óptica. Las AuNPs tienen aplicaciones en genómica, química clínica, inmunoensayos del desarrollo de vacunas,

biosensores, diagnóstico y control de microorganismos, imágenes de células cancerosas y administración de fármacos (Jazayeri et al., 2016). Las características fisicoquímicas que poseen las AuNPs, modulan aspectos importantes de su comportamiento como biodistribución, citotoxicidad e inmunoreconocimiento (Rahme et al., 2018). La caracterización de una nanopartícula incluye, pero no se limita a la medición de tamaño y forma, superficie química y estado de agregación/aglomeración (Hall et al., 2007). La diversidad de aplicaciones y naturaleza de las NPs hacen que la variedad de métodos para su caracterización sea muy extensa. En la Tabla II se muestran algunas de las herramientas de caracterización más utilizadas (Bhatia, 2016).

Tabla II. Herramientas y métodos para la caracterización de NPs.

Parámetro	Método de caracterización
Interacción acarreador – fármaco	Calorimetría diferencial de barrido
Determinación de carga	Anemometría Doppler Láser Potenciómetro Zeta
Análisis químico de superficie	Espectrometría de masas de iones secundarios estáticos Sorptómetro
Estabilidad de fármacos	Bioensayo de fármaco extraído de nanopartículas. Análisis químico del fármaco.
Estabilidad de dispersión de NPs	Temperatura de floculación crítica (CFT) Microscopía de fuerza atómica
Tamaño de partícula y distribución	Difractometría láser Espectroscopía de correlación de fotones (PCS) Microscopía electrónica de barrido Microscopía electrónica de transmisión Dispersión dinámica de luz
Perfiles de liberación	Características de liberación <i>in vitro</i> bajo condiciones fisiológicas.
Hidrofobicidad superficial	Enlace de rosa de bengala (tinte) Medición del ángulo de contacto con el agua. Espectroscopía de fotoelectrones de rayos X

1.4. Nanovacunas

El tamaño del inmunógeno es un factor muy importante en la eficiencia de una vacuna. Las partículas utilizadas en una vacuna deben tener un tamaño similar al patógeno para que puedan ser fagocitadas (Fujita y Taguchi, 2017). Las nanopartículas tienen un área superficial más amplia para la unión o absorción de antígenos peptídicos que las micropartículas, por ellos su uso ha tomado gran relevancia. Las AuNPs han mostrado tener la capacidad para suprimir o activar el sistema inmune (Bastús et al., 2009). Entre las nanopartículas diseñadas para la administración de vacunas (nanovacunas) se pueden distinguir varios modelos de unión al antígeno. Esto dependiendo de si el material en el que están basadas es duro o blando. En las nanopartículas de materiales duros, como el oro, se ha logrado promover la fijación del antígeno mediante la adsorción física simple o métodos más complejos. Métodos como la conjugación química o la encapsulación han sido estudiados (Zhao et al., 2014). Se habla de adsorción cuando el antígeno se encuentra adherido sobre la superficie por medio enlaces poco estables. Se utilizan enlaces basados en la carga o en una interacción hidrófoba. Por ello, en un sistema *in vivo* existe una rápida disociación del antígeno y la nanopartícula (Mody et al., 2013). A diferencia de la adsorción, la encapsulación se trata de una interacción más estable. En ella, el antígeno solo se puede liberar cuando se descompone la nanopartícula *in vivo* o dentro de la célula (He et al., 2000). En la conjugación química, el antígeno está unido químicamente a la superficie de la nanopartícula. Por lo que, la célula endocita el antígeno junto con la nanopartícula y luego se libera dentro de la célula (Slütter et al., 2010). Entre los sistemas de administración utilizando nanopartículas de materia blanda se encuentran los basados en partículas similares a virus o VLPs (virus-like particles), o en liposomas. En ellos la unión del antígeno se logra mediante conjugación química, adsorción, encapsulación o fusión a nivel de ADN (Middelberg et al., 2011; Giddam et al., 2012). Siguiendo esta línea de investigación, en este trabajo se estudiará el potencial inmunoestimulador del epítipo Ta2 de la toxina A adsorbido sobre AuNPs. El sistema será evaluado *in vitro* en leucocitos de pez como una potencial nanovacuna oral contra *V. parahaemolyticus*.

2. ANTECEDENTES

2.1 Nanovacunas utilizando AuNPs

Las AuNPs se han utilizado para tratar diversos padecimientos relacionados con bacterias y toxinas extracelulares, bacterias intracelulares, virus, hongos y protozoos (Marques Neto et al., 2017). En estos sistemas, las AuNPs funcionan como un acarreador de moléculas que tiene propiedades antigénicas, adheridas a su superficie por diferentes técnicas (Getts et al., 2015). Usualmente la aplicación de las AuNPs es la de ser un acarreador, también pueden tener la función de ser adyuvantes en el tratamiento de padecimientos que requieren potenciar sus efectos (Chiodo et al., 2014). Sin embargo, por lo novedoso que resulta el uso nanovacunas, sus efectos no están claros y en muchos casos se encuentran en investigación. Debido al potencial que tiene las AuNPs como acarreadoras de subunidades y ADN se han convertido en blanco de diversos estudios para describir los mecanismos de respuesta inmune que presentan las AuNPs modificadas administradas por diversas vías. Salazar-González et al., 2015, realizaron una revisión donde condensan parte de los estudios reportados hasta entonces sobre AuNPs utilizadas como nanovacunas. Para este trabajo se realizó una actualización de la revisión (Ver Anexo).

2.2. Mecanismos de respuesta inmune por nanovacunas utilizando AuNPs

A pesar de que los mecanismos siguen siendo poco conocidos, existen muchos informes que indican que las AuNPs exhiben características adyuvantes. Por ejemplo, pueden promover el reclutamiento de células inmunes, la activación de células presentadoras de antígeno y la producción de citocinas (Lin et al., 2018). Posteriormente, estos efectos conducen a la inducción de mecanismos de respuestas humorales y celulares. Sin embargo, las respuestas se correlacionan a las características fisicoquímicas de las AuNPs que determinan su capacidad inmunoestimulante o inmunomoduladora (Marques Neto et al., 2017). Después de ser administradas, la fagocitosis de las AuNPs por células del sistema inmune será dependiente de su tamaño (Dykman y Khlebtsov, 2017). Una vez que son fagocitadas, inicia el mecanismo de explosión respiratoria en el que se formarán especies reactivas de oxígeno (ROS) y nitrógeno (RNS). Dentro de las ROS que se forman durante la explosión respiratoria se encuentran especies radicales como el anión

superóxido (O_2^-) y el radical hidroxilo (OH^-), pero también especies de oxígeno más reactivas como los radicales peroxilo (RO_2) y alcoxilo (RO). A partir de la dismutación del anión superóxido se forma otra ROS: el peróxido de hidrógeno (H_2O_2) (Yang et al., 2013). En cuanto a la producción de especies reactivas de nitrógeno (RNS), la RNS primaria es el óxido nítrico (NO) que conduce a la generación de otras RNS por oxidación (Flannagan et al., 2009). Aunque las ROS y las RNS constituyen un sistema de defensa contra patógenos, son oxidantes citotóxicos ya que son moléculas altamente energéticas y reactivas debido a que los electrones de sus orbitales externos no están apareados (Halliwell, 2006). Por ello, cuando las ROS y las RNS están presentes en altas concentraciones tienen efectos nocivos sobre las macromoléculas celulares esenciales, como proteínas, lípidos y ácidos nucleicos (Schieber y Chandel, 2014). En condiciones normales, las ROS y las RNS son compuestos oxidantes que luego de ser producidos son contrarrestados por los sistemas antioxidantes para mantener la integridad del organismo (Yang et al., 2013). Existen dos tipos de antioxidantes: (i) antioxidantes no enzimáticos como vitamina E, carotenoides o metalotioneínas; y (ii) enzimas antioxidantes que incluyen superóxido dismutasa (SOD), catalasa (CAT) y mieloperoxidasa (Belozerskaya y Gessler, 2007).

Por otro lado, las proteínas y péptidos son unos de los antígenos más utilizados en las vacunas basadas en AuNPs. El uso común de péptidos y proteínas en nanovacunas se debe a que pueden ser acoplados fácilmente a AuNPs, por ejemplo, a través de la adsorción fisicoquímica (Zhang et al., 2020). El desarrollo de nanovacunas basadas en subunidades ha dado lugar a múltiples estudios que tratan de elucidar sus efectos y mecanismos. Dakterzada et al., (2016) desarrollaron una vacuna contra *Pseudomonas aeruginosa* basada en una subunidad de flagelina y AuNPs. La vacuna provocó una respuesta de IgG comparable a la inducida por el adyuvante de Freund. La flagelina es un agonista del receptor tipo Toll 5 (TLR5) pero el reconocimiento y la señalización dependen de la estructura. Sin embargo, este estudio usó solo un fragmento (1–161aa) de flagelina y su capacidad para activar TLR5 no pudo mantenerse.

Otro de los estudios donde se utilizan vacunas basadas en AuNPs contra una bacteria intracelular (*Listeria monocytogenes*) fue el de Rodríguez-Del Río et al., (2015). En este trabajo, se utilizaron células dendríticas (DC) cargadas *in vitro* con una formulación de AuNPs y un antígeno de *L. monocytogenes*. Las DC se transfirieron, vía parental, a un animal sin tratamiento previo. Se indujeron células Th1, CD8 + y células natural killer (NK) que proporcionaron una mejor protección contra *L. monocytogenes* que el enfoque de vacuna tradicional. En otro estudio, los autores funcionalizaron AuNPs con el dominio III de la glicoproteína de envoltura derivada del serotipo 2 del virus del dengue (EDIII) (AuNPs-E). Las AuNPs-E indujeron un alto nivel de anticuerpos que mediaba la neutralización específica del serotipo del virus del dengue. Se encontró que el nivel de anticuerpos dependía tanto del tamaño de las AuNPs como de la concentración de AuNPs-E (Quach et al., 2018).

Recientemente, la proteína rSm29 de *Schistosoma mansoni* se unió a AuNPs en forma de barra. Se observó una respuesta inmunológica Th1 en ratones con una mayor producción de IFN- γ , principalmente por células T CD4⁺ y CD8⁺. Además, se activaron células dendríticas *in vitro*. Se mejoró la expresión de MHCII y MHCI y la producción de IL-1 β en una forma dependiente de NLRP3, ASC y Caspasa-1 (Assis et al., 2018). También se ha evidenciado que la inmunogenicidad de las vacunas de subunidades se puede aumentar formulándolas con NPs. En un trabajo se conjugó la hemaglutinina trimetral recombinante de influenza A / Aichi / 2/68 (H3N2) en la superficie de AuNPs. Los resultados mostraron protección a los huéspedes contra retos de gripe letal, mejorando las respuestas de las células B de la mucosa. Además, se estimuló la proliferación de células T CD4⁺ y la activación de células CD8⁺ (Wang et al., 2018).

3. JUSTIFICACIÓN

Uno de los mayores retos a los que se enfrenta la acuicultura es la prevención y tratamiento de patologías microbianas, como las producidas por bacterias. Dentro de las enfermedades bacterianas comunes que afectan a los organismos acuáticos se encuentra la vibriosis. La vibriosis es una enfermedad que causa una alta mortalidad en la acuicultura marina y de agua dulce, con una gran pérdida económica. *Vibrio parahaemolyticus* es una bacteria marina gramnegativa capaz de causar vibriosis. *V. parahaemolyticus* provoca exoftalmia, úlceras, septicemias y opacidad corneal en peces. Para hacer frente a patógenos, como *V. Parahaemolyticus*, generalmente se recurre al uso de antibióticos. No obstante, el uso inapropiado de antibióticos ha dado lugar a la generación de cepas resistentes, además de causar daño al medio ambiente. Por ello, la vacunación en peces ha resultado ser una herramienta de prevención a brotes de enfermedades, esencial para evitar pérdidas económicas graves.

Las vacunas comerciales para peces se formulan para ser administradas por diferentes vías dependiendo de la edad y el tamaño del pez. Las vías de administración incluyen la vía oral (mediante mezcla con el alimento), la inmersión (o baño) o la inyección vía intraperitoneal o intramuscular. La vacunación por inyección normalmente provee la protección más alta, aunque, está asociada con un manejo intensivo y estrés para los organismos. Por ello, la administración oral se considera la ruta ideal para administrar sustancias bioactivas en peces acuícolas. El uso de vacunas orales en peces representa facilidad para los usuarios, ahorro de tiempo, bienestar animal y menores costos de manipulación. Sin embargo, compuestos bioactivos, como los péptidos y las proteínas, permanecen poco biodisponibles cuando se administran por vía oral. Las vacunas formuladas con péptidos y proteínas presentan baja permeabilidad de la mucosa y la falta de estabilidad en el entorno gastrointestinal. La administración oral de péptidos y proteínas resulta en la degradación de los compuestos antes de la absorción. Los vehículos nanoestructurados, como son las AuNPs, proveen de estabilidad a péptidos con potencial inmunológico (epítopes) administrados vía oral. De esta manera, las vacunas basadas en AuNPs, permiten que los compuestos bioactivos que transportan lleguen al sitio de

interés. No obstante, no existen estudios sobre nanovacunas orales para peces basadas en AuNPs. En el presente trabajo se propone un prototipo de vacuna oral para peces contra *V. parahaemolyticus* basada en la adsorción del epítotope Ta2 de la toxina de A de *V. parahaemolyticus* sobre la superficie de AuNPs. Con este estudio se contribuirá al conocimiento de nanovacunas de AuNPs orales que permitan hacer frente a enfermedades que atacan a especies acuícolas de interés comercial.

4. HIPOTESIS

Si las AuNPs poseen propiedades inmunoestimulantes y actividad protectora contra infecciones mediante su administración en crustáceos, peces y mamíferos y, además, la toxina A de *Vibrio parahaemolyticus* tiene propiedades inmunomoduladoras contra *V. parahaemolyticus*, entonces, un sistema basado en la adsorción del epítoto Ta2 de la toxina A sobre AuNPs tendrá las características adecuadas para ser administrado en leucocitos de pez y poseerá propiedades inmunoestimulantes para ser utilizado como un prototipo de nanovacuna contra *V. parahaemolyticus*.

5. OBJETIVOS

5.1. Objetivo general

Obtener un prototipo de nanovacuna basada en la adsorción del epítoto Ta2 de la toxina A sobre la superficie de AuNPs (AuNPs-Ta2) y analizar los mecanismos de la respuesta inmune contra *Vibrio parahaemolyticus* debidos a su administración *in vitro* en modelo de pez.

5.2. Objetivos particulares

1. Obtener AuNPs cargadas con el epítoto Ta2 de la Toxina A de *Vibrio parahaemolyticus*.
2. Obtener la caracterización físico-química del sistema AuNPs-Ta2.
3. Determinar el potencial del sistema nanopartícula-epítoto como vehículo de entrega de vacunas mediante bioensayos *in vitro* en leucocitos de pez.

6. MATERIAL Y METODOS

6.1. Síntesis y caracterización de AuNPs-Ta2

6.1.1. Síntesis de AuNPs

La síntesis de AuNPs se realizó mediante el método de Turkevich et al., (1954). En este método el citrato de sodio dihidratado ($\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) >99% (Sigma Aldrich) es utilizado como agente reductor y estabilizante de una sal de cloruro áurico trihidratada ($\text{HAuCl}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$), Sigma-Aldrich. Durante la síntesis, se colocaron 20 mL de una solución 1.0 mM de $\text{HAuCl}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ en un matraz de 50 mL de capacidad. El matraz se llevó a 90 °C en una placa de calentamiento con agitación constante. Al comenzar a hervir la solución, se adicionaron gota a gota 2 mL de una solución de $\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 38.8 mM. Se mantuvo la temperatura durante 2 minutos para permitir que la solución virará de color a rojo vino. Posteriormente, se dejó reposar a temperatura ambiente. Una vez sintetizadas, las nanopartículas se almacenaron en oscuridad a 4 °C.

6.1.2. Adsorción del epítoto Ta2 sobre AuNPs

El epítoto utilizado (Ta2) fue seleccionado previamente mediante herramientas inmunoinformáticas (REXINE 2.0) y fue sintetizado por la compañía GenScript (EUA). La secuencia del epítoto es IVVINNGASR, tiene un peso molecular de 1042.10 Da y un punto isoelectrico calculado en 10.55.

La carga eléctrica del epítoto es positiva a pH fisiológico (7.4). El epítoto se unió mediante fuerzas electrostáticas con las AuNPs (AuNPs-Ta2) que poseen carga negativa. Se determinó la concentración de epítoto que al ser incorporada a una solución de AuNPs mantenía a las partículas estables y sin aglomeraciones. Para ello, se utilizó una concentración fija de AuNPs. La evaluación se realizó en placas de 96 pozos, donde se adicionó a cada pozo, 15 μL de AuNPs (190 $\mu\text{g}/\text{mL}$). Se probó un rango de concentraciones de Ta2 de 0 a 2700 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$.

Se incorporó NaCl al 10% en volúmenes iguales al gradiente de concentraciones del epítoto. Esto permitió evaluar la concentración mínima de epítoto necesario para

estabilizar las AuNPs. La precipitación de las AuNPs se utilizó como un indicativo de que el coloide no era estable bajo esa concentración del epítotope.

6.1.3. Caracterización morfológica y fisicoquímica de AuNPs-Ta2

El plasmón de resonancia superficial fue estudiado por la técnica de espectrofotometría UV-Vis. Se contrastaron los espectros de AuNPs desnudas, el epítotope y las AuNPs con el epítotope adsorbido.

Para conocer el diámetro hidrodinámico y la carga superficial antes y después de las modificaciones debidas a la adición del epítotope se utilizó la técnica de Dispersión Dinámica de Luz (DLS). Las muestras fueron evaluadas en el equipo Malver-Zetasier nano ZS.

La forma y tamaño de las nanopartículas desnudas se analizó por medio de Microscopía Electrónica de Transmisión (TEM) en un equipo JEOL-2100. Además, se realizó un análisis de Rayos X por Energía Dispersiva (EDS) para conocer los elementos más abundantes en las estructuras.

Las AuNPs-Ta2 se caracterizaron por Microscopía Electrónica de Barrido (SEM) (FEI-QUANTA FEG 250).

6.1.4. Determinación de la eficiencia de carga de Ta2 sobre AuNPs por ELISA

El porcentaje de eficiencia de carga (%EC) de Ta2 sobre la superficie de AuNPs se realizó mediante la técnica ELISA indirecta. Para ello, se produjeron sueros hiperinmunes como se describe a continuación. El epítotope Ta2 fue resuspendido en agua inyectable. La solución se utilizó para inmunizar 2 ratones BALB/C de 6-8 semanas de edad (23.3 ± 2.10 g de peso promedio). El esquema de inmunización se siguió como se describe a continuación. En el día 1 se inmunizó en el cojinete plantar del pie posterior con 10 μ g de Ta2, emulsionados en 10 μ L de adyuvante de Freund completo (CFA). Las dosis posteriores se administraron vía intraperitoneal los días 8, 15, 24. Se utilizaron 50 μ g de Ta2, emulsionados en 50 μ L de adyuvante de Freund incompleto (IFA). Se aplicaron otros refuerzos en los días 29 y 38 con una dosis de 50 μ g de Ta2 emulsionados en 100 μ L de CFA. En el día 23 y 37 se sangraron los ratones de la cola para determinar los títulos de anticuerpos IgG mediante ELISA. Las muestras de sangre fueron centrifugadas a 6000 rpm a 4 °C por 15 minutos y se colectó el

suero. Para realizar el ELISA, en una placa de 96 pozos se colocaron 1 μg de Ta2 diluido en buffer de carbonatos por pozo. La placa se incubó a 4°C durante 24 horas. Se realizaron tres lavados con PBS adicionado con Tween 20 (0.05 % v/v). Posteriormente, se realizó un bloqueo con leche descremada al 5 % a temperatura ambiente por 2 horas. Se realizaron tres lavados con PBS-Tween 20. A cada pozo, se añadieron 50 μL del suero obtenido por cada ratón y se realizaron 6 diluciones en los pozos (1:20 a 1:640). Se incubó la placa a 4 °C durante 24 horas. Se realizaron tres lavados con PBS-Tween 20. Se añadieron 100 μL del anticuerpo Anti-IgG de ratón unido a peroxidasa (Sigma A9044) en una dilución 1:1000. Se incubó la placa a temperatura ambiente por dos horas. Finalmente, se realizaron tres lavados con PBS-Tween 20 y se reveló en oscuridad con 100 μL de una solución sustrato con tetrametilbencidina (TMB, Sigma T5525). La reacción fue detenida con 25 μL de ácido sulfúrico 2 M y se midió la absorbancia a 490 nm. Posteriormente, se sacrificaron los ratones en el día 50 y se colectó la sangre por punción cardiaca. Las muestras de sangre fueron centrifugadas a 6000 rpm a 4 °C por 15 minutos para colectar el suero, que posteriormente, se almacenó a - 80 °C.

Para la cuantificación de la eficiencia de carga del epítipo, se prepararon 200 μL de AuNPs-Ta2. Las AuNPs-Ta2 se centrifugaron a 1000 revoluciones por minuto (rpm) durante 5 minutos y se colectó el sobrenadante. En una placa de 96 pozos se colocaron muestras del sobrenadante por triplicado y se realizaron diluciones (1:20 a 1:320). Además, se colocó un blanco de PBS. Siguiendo la metodología ya descrita, se realizó un ELISA indirecto utilizando como control negativo el suero de ratones no inmunizados. Simultáneamente, se construyó una curva de calibración a partir de las mediciones obtenidas por ELISA indirecta de 7 diluciones del epítipo (1:32 a 1:2048) y cuyos valores se aproximaron a una recta. Por medio de la curva de calibración se obtuvieron las masas contenidas en el sobrenadante de AuNPs-Ta2. El %EC de Ta2 sobre AuNPs se calculó de acuerdo con la siguiente ecuación:

$$\%EC = \frac{M_{inicial} - M_{libre}}{M_{inicial}} \cdot 100 \quad (1)$$

Donde M_{inicial} , corresponde a la masa de Ta2 inicial y M_{libre} a la masa encontrada en el sobrenadante.

6.2. Peces

Se utilizaron 4 peces (*Seriola rivoliana*) para los experimentos *in vitro*. Los peces fueron examinados, bañados en agua dulce y puestos en cuarentena, donde fueron monitoreados para identificar posibles infecciones y/o parásitos. Los especímenes se mantuvieron a 26 °C, con un fotoperiodo de 12 horas luz/oscuridad. Con condiciones de oxígeno disuelto entre 4.3-6.9 mg/L, un pH entre 7.7-8.1 y la concentración de nitritos y amonio total permaneció debajo de 0.02 mg/l.

Para la extracción de los órganos a utilizar, los peces se anestesiaron utilizando eugenol (50mg/l). Una vez inconscientes, los peces fueron decapitados y se extrajeron los órganos de interés.

6.2.1 Aislamiento de leucocitos de bazo de pez

Después de sacrificar los peces y coleccionar el bazo, los órganos se tamizaron (40 μm). Se utilizó medio RPMI (Sigma R0883) adicionado con heparina para evitar la formación de coágulos. Se realizaron lavados con medio RPMI adicionado con suero fetal bovino (SFB). Se midió la concentración celular utilizando el equipo TC-20 (Bio-Rad) y se ajustó la concentración a 1×10^6 células/mL (Reyes-Becerril et al., 2018).

6.3 Viabilidad celular de AuNPs-Ta2

Se seleccionó la concentración del epítipo que mostraba la mejor estabilidad. Se preparó una solución de AuNPs-Ta2 (solución stock) que contenía concentraciones finales de 1500 $\mu\text{g/mL}$ de Ta2 y 44 $\mu\text{g/mL}$ de AuNPs. A partir de la solución stock se realizaron diluciones con PBS (10 mM) para obtener AuNPs-Ta2 con las concentraciones que se muestran en la Tabla III.

Tabla III. Concentraciones de AuNPs-Ta2.

Concentración	Concentración de AuNPs (nM)	Concentración de Ta2 (µg/mL)
A	5.1	265.65
B	10.1	531.31

La viabilidad celular del prototipo de nanovacuna se evaluó en leucocitos de bazo de Jurel (*Seriola rivoliana*), obtenidos con la metodología ya descrita para su aislamiento. Para cada tratamiento, en una placa de 96 pozos, se mezclaron 80 µL de leucocitos con 20 µL del estímulo. Se probaron por triplicado AuNPs, Ta2 y AuNPs-Ta2 a las concentraciones A y B descritas en la Tabla I. Además, se utilizó PBS (10 mM) como control positivo y DMSO como control negativo.

Las células de pez estimuladas se incubaron durante 24 horas a 25 °C y 5 % de CO₂. Posteriormente, se agregaron 10 µL de resazurina a cada pozo y se homogenizó con micropipeta. La placa se cubrió de la luz y se incubó durante 24 horas a 25 °C y 5 % de CO₂. A continuación, se midió fluorescencia a 560 nm de excitación y 590 nm de emisión en un equipo Varioskan (Thermo Fisher Scientific) (Green et al., 1982).

Además, los leucocitos estimulados con los diferentes tratamientos fueron analizados mediante Microscopia Electrónica de Barrido (SEM) (FEI-QUANTA FEG 250) para confirmar su integridad estructural.

6.4. Caracterización de las propiedades inmunoestimulantes de AuNPs-Ta2 *in vitro*

6.4.1. Estimulación con AuNPs-Ta2

En una placa de 24 pozos se colocaron 800 µL de leucocitos de bazo de *Seriola rivoliana* (1x10⁶ cel/mL) por pozo. Los leucocitos fueron estimulados con 200 µL de AuNPs, Ta2 y AuNPs-Ta2 con concentraciones A (Tabla I) e incubados a 25°C, 5% de CO₂. Se utilizó como control positivo PBS (10 mM).

Se dejó incubando la placa durante 24 horas a 25 °C. Se tomaron muestras para los ensayos de fagocitosis, explosión respiratoria (NBT), óxido nítrico (NO), superóxido dismutasa (SOD), catalasa (CAT) y mieloperoxidasa (MPO).

6.4.2. Fagocitosis

En una placa de 96 pozos, se colocaron 100 µL de cultivo celular por triplicado y se realizaron dos lavados con PBS. Se agregaron 100 µL de rojo neutro al 0.08 % en medio RPMI sin rojo fenol. La placa se incubó durante 4 horas a 37 °C y después se lavó con PBS. Se adicionaron 100 µL de buffer de lisis (ácido acético/etanol; 1:1) y se incubó a 4 °C por 2 horas. Finalmente, se midió la densidad óptica a 570 nm en el espectrofotómetro (Wang et al., 2017).

6.4.3. Explosión respiratoria

Se tomaron 100 µL de cultivo celular por triplicado y se colocaron en tubos de 1.5 mL. Las muestras se centrifugaron a 3000 rpm por 1 minuto a temperatura ambiente. Se eliminó el sobrenadante, y las células se resuspendieron en una solución de NBT (Sigma N6876, 1 mg/mL) y se incubaron en oscuridad durante 2 horas a temperatura ambiente. Una vez transcurrido el tiempo se eliminó la solución NBT centrifugando las muestras y decantando. Se añadieron 100 µL de metanol 70% (v/v) y se incubaron 10 minutos. Se eliminó el alcohol por centrifugación y se añadieron 120 µL de hidróxido de potasio 2 M y 140 µL de dimetilsulfóxido (DMSO). Se tomaron 200 µL y se colocaron en las placas de 96 pozos para leer absorbancia en el espectrofotómetro a 655 nm (Kemenade et al., 1994).

6.4.4. Óxido nítrico

Se añadieron 100 µL de cultivo celular por triplicado en una placa de 96 pozos. Se adicionaron 100 µL de reactivo de Griess (Sigma G4410, 4mg/mL) y se incubaron durante 15min en oscuridad y a temperatura ambiente. Se leyó la absorbancia en el espectrofotómetro a 490 nm (Neumann et al., 1995).

6.4.5. Superóxido dismutasa

La actividad de superóxido dismutasa (SOD) se determinó empleando el kit comercial SOD (Sigma 19160). Se colocaron 20 µL del cultivo celular de cada tratamiento por triplicado en

placas de 96 pozos. Se agregaron 200 μL de la solución de trabajo (WST) y 20 μL de solución de trabajo enzimática y se incubaron 20 min a 37°C. Posteriormente, la placa se leyó a 450 nm y la actividad se determinó de acuerdo con la siguiente ecuación:

$$\text{Act. SOD (\% inhibición)} = \frac{(\text{Ablanco1}-\text{Ablanco3})-(\text{Amuestra}-\text{Ablanco2})}{\text{Ablanco1}-\text{Ablanco3}} \cdot 100 \quad (2)$$

6.4.6. Catalasa

Se midió la actividad de catalasa utilizando el reactivo de Purpald (Sigma 162892). Se colocaron 25 μL del buffer de dilución, 50 μL de Metanol y 5 μL de peróxido de hidrógeno diluido en una placa de 96 pozos. Se agregaron 50 μL de cultivo celular (muestra) por triplicado. La placa se cubrió con papel aluminio y se incubó 20 minutos a temperatura ambiente y con agitación constante (120 rpm). Transcurrido el tiempo, se añadió 25 μL de hidróxido de potasio (KOH) 10M y 50 μL del reactivo de Purpald. Luego se incubó nuevamente durante 10 minutos y se añadieron 25 μL de peryodato de potasio. Se incubaron durante 5 minutos y se leyó la absorbancia en el espectrofotómetro a 655 nm (Greenwald, 2018).

6.4.7. Mieloperoxidasa

Se colocaron 20 μL de cultivo celular (muestra) por triplicado en una placa de 96 pozos. Se añadieron 100 μL de la solución de trabajo con TMB (40 mL H₂O destilada, 10 μL de peróxido de hidrógeno (30%), 1 pastilla de TMB). Se añadieron 50 μL de ácido sulfúrico 2M y se midió absorbancia en el espectrofotómetro a 450 nm (Quade y Roth, 1997).

6. 5. Análisis estadístico

Todos los bioensayos y mediciones se realizaron por triplicado y se calculó la media (\pm desviación estándar, DE) para cada grupo y el tiempo de muestreo. Se realizó un análisis de varianza de una vía (ANOVA) usando el software SPSS v.19.0 (SPSS, Richmond, VA, EE. UU.).

Las medias se separaron mediante una prueba de comparación múltiple de Tukey. Se realizaron análisis estadísticos con los datos obtenidos para cada muestra. Las diferencias se consideraron estadísticamente significativas cuando $P < 0.05$.

7. RESULTADOS

7.1 Caracterización de AuNPs-Ta₂

7.1.1 Caracterización óptica y morfológica

Las absorciones ópticas de AuNPs, Ta₂ y AuNPs-Ta₂ se muestran en la Fig. 1. En las AuNPs se presenta una absorción en la región visible con un pico principal de 455 nm a 590 nm. Las AuNPs presentan un pico más definido en comparación con el sistema AuNPs-Ta₂. El pico máximo de las AuNPs se centra en 525 nm. Por otro lado, en las AuNPs-Ta₂ el plasmón de resonancia superficial (PRS) mostró cambios importantes en el ancho del pico y la posición. Las AuNPs-Ta₂ presentan una absorción en la región visible con un pico principal de 465 nm a 695 nm. El pico máximo en las AuNPs-Ta₂ se centró en 575 nm. La caracterización por Microscopía Electrónica de Transmisión (TEM) de las AuNPs se presenta en la Fig. 2. En ella se observa la presencia de nanopartículas metálicas cuasi-esféricas con pequeña distribución de tamaño (16.5 ± 5 nm). El tamaño es el promedio de diámetro medido en 246 estructuras utilizando el software ImageJ. La adsorción de Ta₂ sobre AuNPs fue confirmada por Microscopía Electrónica de Barrido.

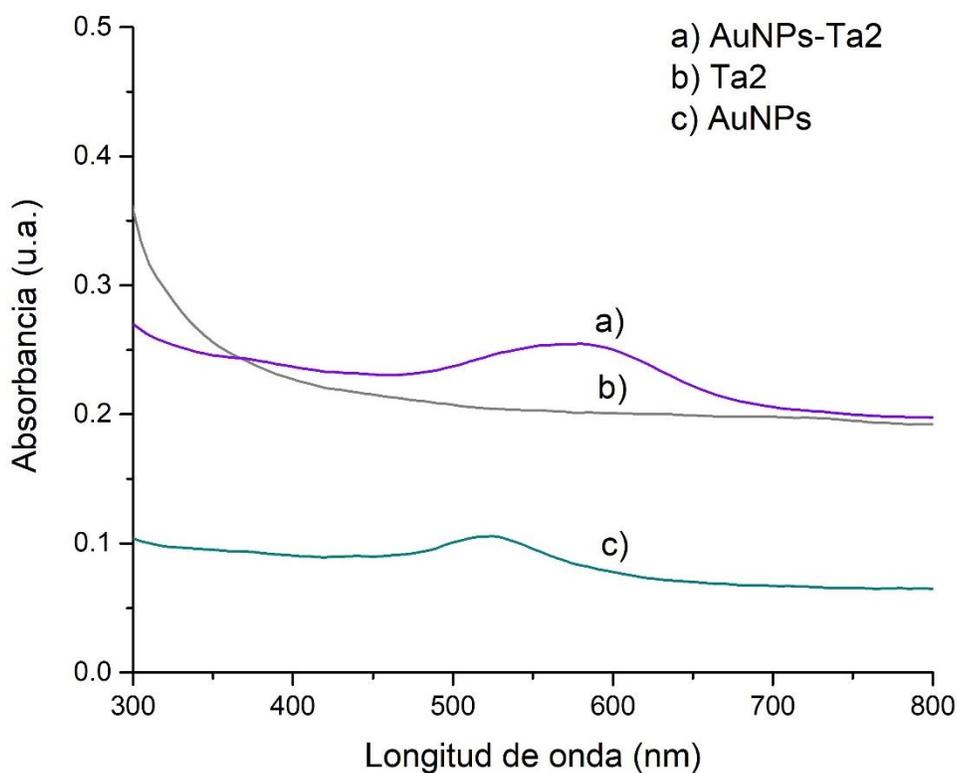


Figura 1. Espectros de absorción ultravioleta visible (UV-Vis) de soluciones acuosas. (a) AuNPs-Ta2 (5.1 nM con respecto a AuNPs); (b) Ta2 (265.65 $\mu\text{g} / \text{mL}$); y (c) AuNPs desnudas (5.1 nM). Las mediciones se realizaron utilizando un equipo de Espectrofotometría UV-Vis SHIMADZU (UV-1900). Las muestras fueron analizadas a temperatura ambiente.

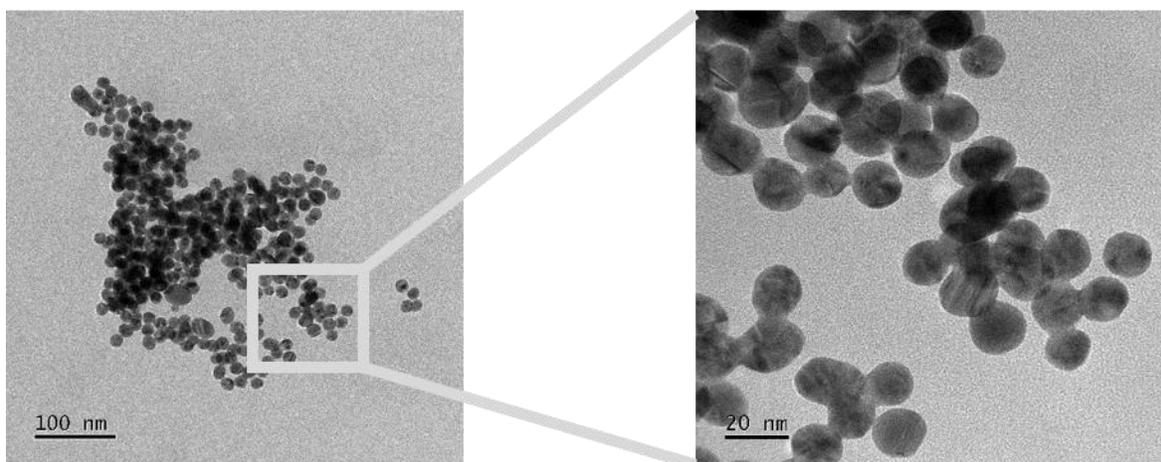


Figura 2. Micrografías de AuNPs. Las AuNPs fueron sintetizadas por el método de Turkevich. Imágenes obtenidas por Microscopía Electrónica de Transmisión (TEM) en el

equipo JEOL-2100. El tamaño promedio de diámetro (16.5 ± 5 nm) se obtuvo midiendo 246 estructuras mediante el software ImageJ.

Además, se realizó un análisis de Rayos X por Energía Dispersiva (EDS) para las AuNPs (Fig. 3). El EDS indica que el elemento más abundante en las muestras es Au con 70% de abundancia.

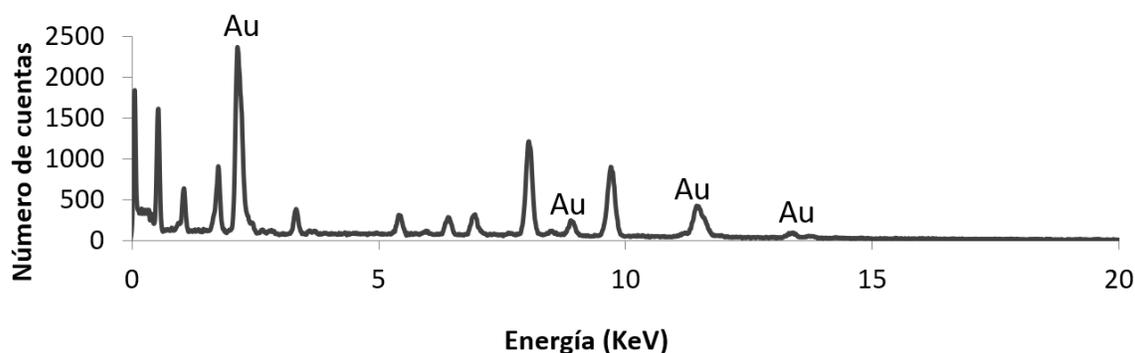


Figura 3. Espectroscopia de Rayos X por Energía Dispersiva (EDS) de AuNPs. Gráficos obtenidos en microscopía electrónica de transmisión en equipo JEOL-2100 acoplado a EDS Rayos X.

7.1.2 Carga superficial y radio hidrodinámico por DLS

En la Tabla II se muestra el potencial ζ (PZ) obtenido por la técnica de Dispersión Dinámica de Luz (DLS) de las AuNPs y AuNPs-Ta2. Las AuNPs desnudas tiene un PZ negativo (-48 mV). Las AuNPs-Ta2 presentan una carga negativa menor (-5.6 mV). El diámetro hidrodinámico de AuNPs y AuNPs-Ta2 fue determinado por DLS y se presenta en la Tabla IV. También se incluye el índice de polidispersión (PI) para cada muestra. Se observa un aumento de tamaño en AuNPs-Ta2 con respecto a las AuNPs.

Tabla IV. Potencial ζ y radio hidrodinámico de AuNPs y AuNPs-Ta2 obtenidos por DLS.

Muestra	Diámetro hidrodinámico (nm \pm DE)	Índice de polidispersión (u.a)	Carga superficial (mV)
AuNPs	19 ± 5	0.401	-48
AuNPs-Ta2	317 ± 109	0.308	-5.6

Las soluciones analizadas contenían una concentración 5.1 nM de con respecto de las AuNPs.

7.1.3 Rendimiento de reacción de la síntesis de AuNPs

El análisis de Espectrometría de Masas con Plasma Acoplado Inductivamente (ICP-MS) determinó la concentración de AuNPs. La ICP-MS reveló que una solución preparada con una concentración de 7.6 $\mu\text{g/mL}$ de oro contiene una concentración de 3.85 $\mu\text{g/mL}$ de AuNPs. El rendimiento de reacción para esta síntesis es de 50.66 %.

7.1.4 Eficiencia de carga de Ta₂ sobre la superficie de AuNPs

Mediante la técnica de ELISA se obtuvo un porcentaje de la eficiencia de carga (%EC) del epítipo adsorbido sobre la superficie de las AuNPs es de 89.5 ± 5.7 %.

7.2 Experimentos *in vitro* utilizando leucocitos

7.2.1 Viabilidad celular

La viabilidad de los leucocitos fue mayor en un 90% después de la estimulación con tratamientos con AuNPs-Ta₂ A, AuNPs-Ta₂ B, AuNPs A, AuNPs B, Ta A y Ta B. (Fig. 4). El sistema AuNPs-Ta₂ no mostró citotoxicidad en células expuestas a concentraciones de 5.1 y 10.1 nM (con respecto a AuNPs). El control positivo de la citotoxicidad DMSO redujo la viabilidad celular al 3%. La viabilidad de los leucocitos se evaluó con respecto al control (PBS).

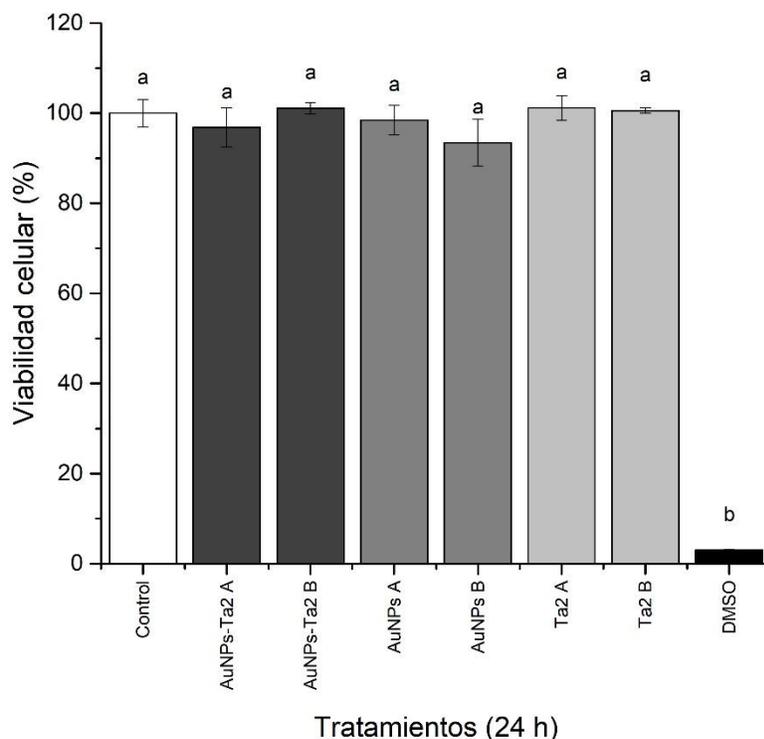
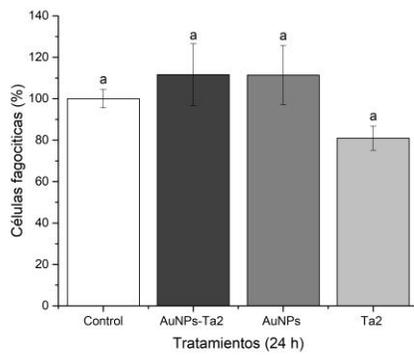


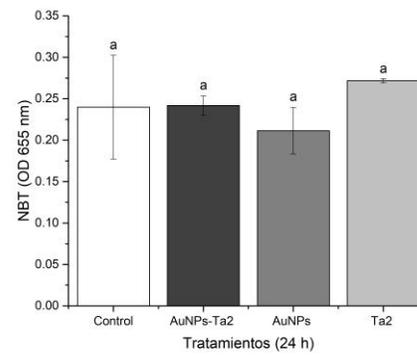
Figura 4. Efecto de AuNPs-Ta2 A, AuNPs-Ta2 B, AuNPs A, AuNPs B, Ta A y Ta B a las 24 h sobre la viabilidad de leucocitos de bazo de Jurel (*Seriola rivoliana*). La viabilidad se evaluó al final de las 24 h midiendo la fluorescencia de resazurina. Los resultados se muestran como medias \pm desviación estándar (DE) de tres muestras independientes. Las diferentes letras denotan diferencias significativas entre los grupos tratados ($p < 0.05$).

7.2.2 Respuestas inmunológicas y antioxidantes

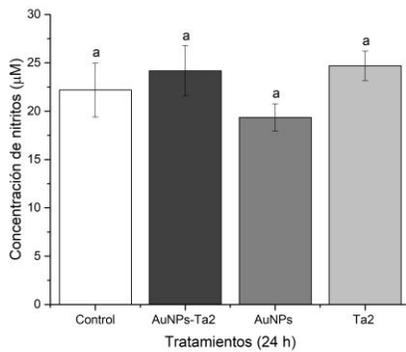
Se analizó la actividad de enzimas asociadas a la respuesta inmune (fagocitosis, superóxido dismutasa, catalasa, mieloperoxidasa, explosión respiratoria, óxido nítrico). Los leucocitos estimulados con AuNPs-Ta2 A muestran un aumento en la habilidad fagocita, explosión respiratoria, producción de óxido nítrico, aunque no es significativa (Fig. 5a, 5b y 5c). En cuanto a las enzimas antioxidantes, la actividad superóxido dismutasa fue similar entre los tratamientos y el grupo de control (Fig. 5d). Sin embargo, la actividad de catalasa aumentó significativamente en los leucocitos estimulados con los tres tratamientos a las 24 h, con respecto del control (Fig. 5e). Se encontraron diferencias significativas en la actividad mieloperoxidasa de los leucocitos estimulados con AuNPs-Ta2 con respecto al control, AuNPs y Ta2 (Fig. 5f).



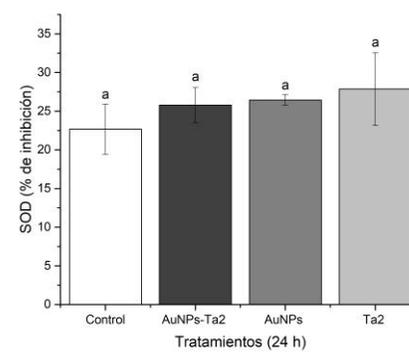
a)



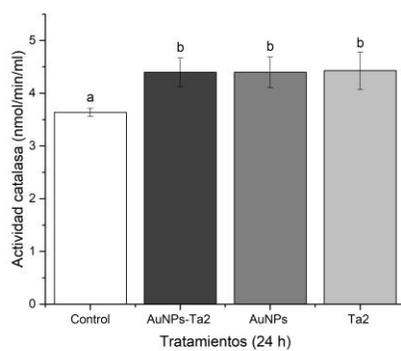
b)



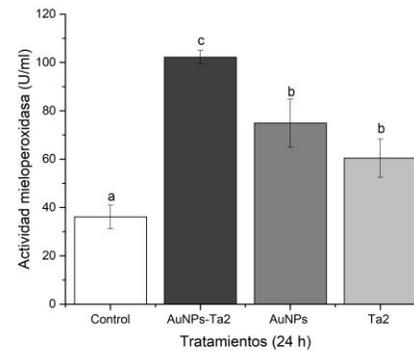
c)



d)



e)



f)

Figura 5. Respuesta inmunológica debida a AuNPs-Ta2. a) Habilidad fagocítica, b) explosión respiratoria, c) producción de óxido nítrico, d) actividad superóxido dismutasa, e) actividad catalasa y f) actividad mieloperoxidasa de leucocitos de bazo de Jurel (*Seriola rivoliana*) estimulados con AuNPs-Ta2, AuNPs y Ta2 por 24 h. Los resultados se muestran como medias \pm desviación estándar (DE) de tres muestras independientes. Las diferentes letras denotan diferencias significativas entre los grupos tratados ($p < 0.05$).

8. DISCUSIÓN

8.1 Caracterización de AuNPs-Ta₂

El plasmón de resonancia superficial (PSR) se refiere a las oscilaciones colectivas de electrones restringidos en las nanopartículas metálicas debidas a la interacción con la radiación electromagnética y está relacionado con las características de las nanopartículas. La forma, el tamaño y la modificación química de la superficie de las AuNPs son algunos de los factores asociados al ancho y la posición del PRS (Amendola et al., 2017). En un estudio realizado por El-Brolossy et al., (2008) se evaluaron los espectros de absorción de AuNPs sintetizadas con varias formas. Se encontró que en nanoestructuras esféricas solo se presenta un pico de absorción. En contraste, cuando se forman partículas asimétricas en la solución, se observan dos picos (Panda y Chattopadhyay, 2007). Los espectros UV-Vis obtenidos tanto para las AuNPs como para las AuNPs-Ta₂ solo muestran un pico. Este pico es atribuido al PRS derivado de las AuNPs. Por lo tanto, las soluciones AuNPs y AuNPs-Ta₂ contienen estructuras con formas esféricas. En tanto que un aumento en el ancho del pico de adsorción denota una amplia distribución de tamaños en las nanopartículas.

Generalmente, el espectro UV-Vis de AuNPs esféricas no agregadas está compuesto por una banda alrededor de los 520 nm, debido al PRS (Amendola y Meneghetti, 2009). Los picos máximos de absorción para AuNPs de 2.5 a 100 nm se encuentran entre los 520 y 580 nm (Haiss et al., 2007). El PRS es visible como un pico centrado en 523 nm en AuNPs esféricas de 20 nm, según lo reportado por Martínez et al., (2013). Esta longitud de onda está muy cercana a la encontrada en las AuNPs (525 nm), cuyo diámetro se aproxima a los 20 nm. Por otro lado, el desplazamiento hacia el rojo del PRS representa un aumento de la longitud de onda absorbida por las AuNPs y está asociado con el aumento de tamaño debido a interacciones en su superficie (Park y Shumaker-Parry, 2014). Después de añadir epítoto Ta₂ a las AuNPs hubo un desplazamiento de 50 nm en el pico máximo del espectro de absorción. Esto implica un cambio en la superficie de las AuNPs y sugiere que el epítoto Ta₂ logró adsorberse sobre la superficie de las AuNPs.

La síntesis de AuNPs realizada mediante el método de Turkevich et al., (1954), produce nanopartículas monodispersas en el rango de tamaños entre 9 y 120 nm (Kimling et al., 2006). El tamaño de nanopartícula obtenido por este método está determinado por la relación molar entre el citrato y el oro (Zabetakis et al., 2012). La composición de las nanopartículas puede ser confirmada mediante un análisis de Rayos X por Energía Dispersiva (EDS). Los picos que se muestran en un EDS son característicos para cada elemento y confirman la composición de oro metálico en las nanoestructuras.

En cuanto al análisis de la carga superficial o potencial ζ (PZ), las AuNPs mostraron valores negativos mayores a los de las AuNPs-Ta2. Hubo una disminución en la carga superficial negativa de aproximadamente el 82 % después de la adsorción del epítotope. Las AuNPs sintetizadas por el método de Turkevich tiene un PZ negativo inducido por los iones citrato que pasivan su superficie. Ta2 tiene un punto isoeléctrico 10.55 por lo que a pH fisiológico tiene carga positiva. La variación entre el PZ de AuNPs y AuNPs-Ta2 es debida a la interacción de Ta2 con AuNPs. Los iones citratos existentes en la superficie de las AuNPs son desplazados por el epítotope Ta2 con carga catiónica (Olmedo et al., 2008).

Para que la concentración teórica de AuNPs suspendidas en solución representará con precisión la concentración real, tendría que haberse llevado una reacción completa (Rahman, 2016). Por ello, es necesario implementar técnicas que sean adecuadas para determinar la concentración total en soluciones coloidales (Scheffer et al., 2008). Se ha demostrado que la Espectrometría de Masas con Plasma Acoplado Inductivamente (ICP-MS) es una herramienta con un límite de detección de 0.15 $\mu\text{g/L}$ de Au y que ha logrado cuantificar síntesis de AuNPs obtenidas por el método de Turkevich con rendimientos de reacción mínimos de 62.6 % (Allabashi et al., 2009). Además, se han encontrado rendimientos de reacción para AuNPs sintetizadas por Turkevich de 60.38 % (Dong et al., 2020) y 25.88 % (Beermann et al., 2007), lo cual indica que el rendimiento encontrado por ICP-MS de 50.66 % para las AuNPs desnudas se encuentra dentro del rango reportado para este método.

En los sistemas nanoacarreadores, la determinación de la cantidad de péptido incorporado a las estructuras se reporta como eficiencia de carga. Las eficiencias de carga de péptidos acoplados a AuNPs son variables. Los péptidos interactúan de manera específica con las nanopartículas dependiendo de las condiciones en las que son obtenidas. Se ha observado que el porcentaje de eficiencia de carga (%EC) de AuNPs se ve modificado para un mismo péptido al variar el tamaño de las AuNPs de 5 nm (57.9 %) a 10 nm (79.8 %) (Kumar et al., 2018). También se ha reportado la influencia del pH en el %EC de AuNPs (Harrison et al., 2017). Kalimuthu et al., (2018) midieron el sobrenadante de AuNPs conjugadas con un péptido que es internalizado por las células de linfoma murino A20. Las mediciones revelaron que no se encontraban rastros del péptido por lo que su %EC es cercano al 100 %. En contraste, %EC para tres péptidos acoplados a la superficie AuNPs se logró funcionalizar con un valor cercano al 25 %. En una nanovacuna basada en AuNPs y un toxoide tetánico se reportó un %EC del 60 % (Pokharkar et al., 2011). Por otro lado, en un estudio donde se recubrió con AuNPs con dos diferentes péptidos se encontró que cerca de un cuarto de la superficie de las nanopartículas quedo recubierta por los péptidos (Bartczak et al., 2011) La eficiencia de carga que se obtuvo para las AuNPs-Ta2 se encuentra dentro de los porcentajes reportados para diferentes sistemas basados en AuNPs y péptidos.

8.2 Viabilidad celular

Las AuNPs son altamente estudiadas para aplicaciones médicas debido a sus características entre las que se incluye su gran biocompatibilidad (Lopes et al., 2019). Sin embargo, la citotoxicidad en las AuNPs no es una constante ya que está determinada por diversos factores entre los que se encuentran sus propiedades fisicoquímicas como son: el tamaño, la forma y la carga superficial (Cancino-Bernardi et al., 2018). En un estudio en células sanas y cancerígenas se encontró un efecto citotóxico mayor en AuNPs con tamaños menores (5 nm) en comparación con las que tenían tamaños mayores (20 y 50 nm) (Xia et al., 2019). Por otro lado, en un estudio *in vitro* con líneas celulares de cáncer humano se ha reportado que la forma y el tamaño de las AuNPs puede afectar la viabilidad celular. Los resultados de dicho estudio arrojaron que las AuNPs con formas

esféricas y de barra demostraron ser más tóxicas que las que tenían forma de estrella, flor y prisma (Woźniak et al., 2017). La viabilidad de las células expuestas a AuNPs también depende del agente que se utilice como estabilizante durante la síntesis debido a que la estabilidad, capacidad de dispersión y propiedades de interacción de la AuNPs están controladas principalmente por la química de su superficie (Uchiyama et al., 2014). La prueba de viabilidad celular de un estudio demostró un efecto citotóxico distinguible en concentraciones altas para las AuNPs estabilizadas con citrato de sodio en comparación con las AuNPs estabilizadas con almidón o goma arábiga; lo anterior es debido a que el recubrimiento de la superficie con citrato es de naturaleza ácida en comparación con los otros dos (Vijayakumar y Ganesan, 2012).

La viabilidad celular es el número de células sanas en una muestra y es un indicador para comprender los mecanismos en acción de ciertos genes, proteínas y vías involucradas en la supervivencia o muerte celular después de la exposición a agentes potencialmente seguros o tóxicos (Adan et al., 2016). La toxicidad de los nanomateriales es una de las limitantes para el uso de nanopartículas en la producción de vacunas (Gheibi Hayat y Darroudi, 2019). En este sentido, la concentración de las AuNPs es un factor determinante ya que una mayor concentración involucra un aumento en la citotoxicidad (Soenen et al., 2012). Esta dependencia se observa en la viabilidad celular evaluada para las AuNPs desnudas, aunque no es significativa, existe una menor viabilidad celular para las AuNPs con mayor concentración (10.1 nM). Sin embargo, la modificación de la superficie de las AuNPs con diversas moléculas puede disminuir su citotoxicidad (Gangwar et al., 2012). Por ejemplo, las AuNPs estabilizadas con biotina o lisina fueron más biocompatibles y no mostraron toxicidad para las células de mamíferos a una concentración máxima de hasta 250 μ M comparadas con las que no tenían modificación superficial (Yen et al., 2009). De igual manera, en una nanovacuna contra el virus del Nilo occidental basada en AuNPs modificadas con un péptido para obtener formas de cubo, esfera y barras, no se encontró citotoxicidad en ninguno de los casos (Niikura et al., 2013). De acuerdo con los estudios de viabilidad celular, las AuNPs desnudas y las AuNPs-Ta2 sintetizadas en este trabajo tienen

las características adecuadas para no ser citotóxicas por lo que son potencialmente seguras para ser administradas en peces.

8.3 Respuestas inmunológica y antioxidantes

La endocitosis es un proceso fundamental que utilizan las células para internalizar moléculas y macromoléculas. La fagocitosis es un tipo de endocitosis realizada por células especializadas y cuya función principal es la absorción de patógenos, células muertas y desechos celulares, aunque también está involucrada en la absorción de nutrientes (Canton y Battaglia, 2012). Esta función celular puede internalizar partículas grandes ($>1 \mu\text{m}$) y de tamaño nanométrico, como virus y diversos tipos de nanomateriales (Akinc y Battaglia, 2013). Por ejemplo, las AuNPs modificadas con ácido 5-aminovalérico favorecen una fagocitosis rápida y se acumulan en el citosol (Hasanzadeh Kafshgari et al., 2015). Por otro lado, en un estudio *in vitro* de una proteína de la cápside (Cap) de un circovirus porcino patógeno conjugada con AuNPs, se encontró que las AuNPs contribuyeron a la fagocitosis de la proteína Cap (Li et al., 2020). Además, el efecto adyuvante de las AuNPs se ha asociado con la penetración más eficiente del sistema en las células fagocíticas, lo que supone una mejor presentación del antígeno a las células productoras de anticuerpos (Dykman, 2020). Lo anterior coincide con el aumento en la actividad fagocítica que muestran los leucocitos expuestos a AuNPs-Ta₂ y AuNPs con respecto al control. Sin embargo, el cambio no es estadísticamente significativo. Probablemente, un aumento en la concentración de AuNPs utilizadas representaría un aumento en la actividad fagocítica de los leucocitos.

La fagocitosis de una partícula extraña puede inducir el mecanismo de explosión respiratoria (Staerck et al., 2017). La explosión respiratoria está caracterizada por un aumento violento en la demanda de oxígeno que los fagocitos (incluidos neutrófilos, macrófagos y eosinófilos) utilizan en la producción de potentes agentes microbicidas (ROS) (Thomas, 2017). Las AuNPs de 15 nm desnudas y conjugadas con antígenos de alto y bajo peso molecular han demostrado mejorar la actividad respiratoria de macrófagos de rata y ratón (Staroverov et al., 2009). Por otro lado, al administrar tres dosis diferentes (0.25, 2.5, 25 ppm) de AuNPs en ratones, durante tres períodos de tiempo diferentes (7,

14, 28 días), los ratones que recibieron las AuNPs mostraron una elevada actividad respiratoria en los granulocitos y los monocitos. Sin embargo, ésta fue transitoria y solo se notó después de un tiempo corto post-administración (Małaczewska, 2015). Además, en un estudio realizado en pollos, donde se administraron cuatro dosis diferentes de AuNPs (0.5 - 2 mg/ kg de peso/ día), se encontró que en los organismos donde la administración fue por periodos cortos (3 días) hubo un aumento en la actividad de explosión respiratoria de los leucocitos, excepto con la dosis más baja (Sembratowicz y Ognik, 2018). De acuerdo con lo anterior, una dosis con una concentración demasiado baja de AuNPs imposibilitaría observar la respuesta inmunológica. A este posible factor se le atribuye el hecho de que, tanto para las AuNPs desnudas como para AuNPs-Ta₂ evaluadas en este trabajo, no se encontró un aumento en el parámetro de explosión respiratoria. Curiosamente, la fagocitosis también puede activar el mecanismo de producción de RNS en lugar de ROS (Fang y Vázquez-Torres, 2019). No obstante, en este estudio, la producción de RNS en los leucocitos no se vio afectada por las AuNPs desnudas o el conjugado AuNPs-Ta₂, lo que coincide con la posibilidad de una concentración baja para inducir estos mecanismos.

Los antioxidantes enzimáticos son producidos por las células fagocíticas, así como por microorganismos patógenos, para regular la respuesta de la explosión respiratoria contra los agentes infecciosos o para escapar del exceso de ROS generado por las células fagocíticas durante la respuesta de la explosión respiratoria, respectivamente (Piacenza et al., 2019). Como ya se mencionó anteriormente, dentro de las enzimas que actúan para contrarrestar las ROS producidas se encuentran la mieloperoxidasa, catalasa y superóxido dismutasa. En este trabajo se encontró un aumento significativo, con respecto del control, de la actividad catalasa y mieloperoxidasa al estimular leucocitos de *Seriola rivoliana* tanto con la vacuna como con las AuNPs desnudas. En comparación, estos resultados son similares a estudios previos sobre la exposición de AuNPs en organismos acuáticos. En un estudio se reportó un aumento en los niveles de catalasa en el bivalvo *Mytilus edulis* tras la exposición (24 h) con AuNPs (750 ppb) sintetizadas con citrato (Tedesco et al., 2008). De igual manera, en el hígado de peces (*Sparus aurata*) se encontró que la actividad de catalasa aumentó significativamente después de la exposición (96 h) de los peces con

1600 mg/L de AuNPs sintetizadas con citrato y recubiertas con polivinilpirrolidona (Barreto et al., 2019). En el caso de la mieloperoxidasa, los estudios realizados en ratas Wistar revelaron que la administración oral con dosis de 40 $\mu\text{g}/\text{kg}$ de AuNPs recubiertas con albúmina sérica humana (HSA) causó un aumento de la actividad de mieloperoxidasa (Cancino-Bernardi et al., 2018).

9. CONCLUSIONES

Se logró obtener un prototipo de vacuna oral para peces basada en AuNPs modificadas con un epítotope de la toxina A de *Vibrio parahaemolyticus*. Las AuNPs sintetizadas mostraron tener una forma cuasi esférica con un diámetro hidrodinámico de 19 ± 5 nm y uno real de 16.5 ± 5 nm. Las muestras analizadas de AuNPs tuvieron un 70% de abundancia de Au y el rendimiento de la reacción para la síntesis fue del 50.66 %. Las AuNPs modificadas con el epítotope Ta2 presentaron un diámetro hidrodinámico mayor que las desnudas (317 ± 109 nm), un desplazamiento del pico de máxima absorción de 525 nm a 575 nm y un cambio en la carga superficial de -48 mV a -5.6 mV. El porcentaje de la eficiencia de carga del epítotope adsorbido sobre la superficie de las AuNPs fue de 89.5 ± 5.7 %. En los experimentos de viabilidad celular, las AuNPs desnudas y las AuNPs-Ta2 con concentraciones de 5.1 nM y 10.1 nM (con respecto a AuNPs) no mostraron tener efectos citotóxicos sobre leucocitos de bazo de pez (*Seriola rivoliana*). La respuesta inmune y antioxidante de leucocitos de bazo de *Seriola rivoliana* estimulados con el prototipo de nanovacuna aumentaron la actividad catalasa y mieloperoxidasa. Sin embargo, los parámetros de fagocitosis, explosión respiratoria, óxido nítrico y superóxido dismutasa no fueron afectados significativamente.

La dosis evaluada en los experimentos *in vitro* resultó insuficiente para mostrar cambios significativos en los ensayos de respuestas inmunológicas y antioxidantes. Por ello, se propone como perspectiva estudiar una dosis mayor. Se sugiere analizar la dosis más alta que se evaluó en el experimento de viabilidad celular (10.1 nM, con respecto a AuNPs). Esta concentración de AuNPs-Ta2 no mostró ser citotóxica en las pruebas de viabilidad celular, por lo que se considera segura para ser administrada en los leucocitos. Una vez realizados los ensayos *in vitro*, la siguiente etapa es evaluar *in vivo* el potencial inmunoestimulante e inmunoprotector del prototipo de nanovacuna. Para ello, se propone realizar un experimento *in vivo* con 36 peces por tratamiento administrando 2 dosis de 40 µg de AuNPs-Ta2 (con respecto al epítotope Ta2), separadas una semana entre cada dosis. En el ensayo *in vivo* se determinaría la actividad de enzimas antioxidantes, la producción de inmunoglobulina M y la expresión de genes asociados a la respuesta

inmune. Asimismo, es necesario evaluar la protección del prototipo de nanovacuna contra *V. parahaemolyticus* mediante un reto bacteriano.

Los resultados obtenidos en este trabajo contribuyen al conocimiento para la manipulación del sistema inmune en modelo de pez. Además, el conocimiento sobre la inmunomodulación por AuNPs modificadas con subunidades permitirá elucidar las células, mecanismos (inductores, reguladores y efectores) y actividades funcionales. De esta manera, el uso de las nanopartículas metálicas como acarreadores de vacunas se plantea como una alternativa potencial al uso de antibióticos en la industria acuícola.

10. LITERATURA CITADA

Adams, A. 2019. Progress, challenges and opportunities in fish vaccine development. *Fish & shellfish immunology*. 90:210-214.

Adan, A., Y. Kiraz, y Y. Baran 2016. Cell Proliferation and Cytotoxicity Assays. *Current Pharmaceutical Biotechnology*. 17(14):1213-1221.

Agunloye, E., L. Panariello, A. Gavriilidis, y L. Mazzei 2018. A model for the formation of gold nanoparticles in the citrate synthesis method. *Chemical Engineering Science*. 191:318-331.

Ahmadvand, S., M. Soltani, M. Behdani, Ø. Evensen, E. Alirahimi, R. Hassanzadeh, y E. Soltani 2017. Oral DNA vaccines based on CS-TPP nanoparticles and alginate microparticles confer high protection against infectious pancreatic necrosis virus (IPNV) infection in. *Developmental & Comparative Immunology*. 74:178-189.

Akinc, A. y G. Battaglia 2013. Exploiting endocytosis for nanomedicines. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 5, a016980p.

Allabashi, R., W. Stach, A. De La Escosura-Muñiz, L. Liste-Calleja, y A. Merkoçi 2009. ICP-MS: a powerful technique for quantitative determination of gold nanoparticles without previous dissolving. *Journal of Nanoparticle Research*. 11(8):2003.

Almeida, J.P.M., A.Y. Lin, E.R. Figueroa, A.E. Foster, y R.A. Drezek 2015. In vivo gold nanoparticle delivery of peptide vaccine induces anti-tumor immune response in prophylactic and therapeutic tumor models. *Small*. 11(12):1453-1459.

Amendola, V., R. Pilot, M. Frascioni, O.M. Maragò, y M.A. Iatì 2017. Surface plasmon resonance in gold nanoparticles: a review. *Journal of Physics: Condensed Matter*. 29(20):203002.

Amendola, V. y M. Meneghetti 2009. Size evaluation of gold nanoparticles by UV-vis spectroscopy. *Journal of Physical Chemistry C*. 113(11):4277-4285.

Anderson, D.P. 1992. Immunostimulants, adjuvants, and vaccine carriers in fish: applications to aquaculture. *Annual Review of Fish Diseases*. 2:281-307.

Assis, N.R.G., A.J. Caires, B.C. Figueiredo, S.B. Morais, F.S. Mambelli, F. V. Marinho, L.O. Ladeira, y S.C. Oliveira 2018. The use of gold nanorods as a new vaccine platform against schistosomiasis. *Journal of Controlled Release*. 275:.

Baffone, W., A. Casaroli, R. Campana, B. Citterio, E. Vittoria, L. Pierfelici, y G. Donelli 2005. «In vivo» studies on the pathophysiological mechanism of *Vibrio parahaemolyticus* TDH+-induced secretion. *Microbial Pathogenesis*. 38(2-3):133-137.

Barhate, G., M. Gautam, S. Gairola, S. Jadhav, y V. Pokharkar 2014. Enhanced mucosal immune responses against tetanus toxoid using novel delivery system comprised of chitosan-functionalized gold nanoparticles and botanical adjuvant: Characterization, immunogenicity, and stability assessment. *Journal of Pharmaceutical Sciences*.

103(11):3448-3456.

Barreto, A., L.G. Luis, E. Pinto, A. Almeida, P. Paíga, L.H.M.L.M. Santos, C. Delerue-Matos, T. Trindade, A.M.V.M. Soares, K. Hylland, S. Loureiro, y M. Oliveira 2019. Effects and bioaccumulation of gold nanoparticles in the gilthead seabream (*Sparus aurata*) – Single and combined exposures with gemfibrozil. *Chemosphere*. 215:248-260.

Bartczak, D., T. Sanchez-Elsner, F. Louafi, T.M. Millar, y A.G. Kanaras 2011. Receptor-mediated interactions between colloidal gold nanoparticles and human umbilical vein endothelial cells. *Small*. 7(3):388-394.

Bastús, N.G., E. Sánchez-Tilló, S. Pujals, C. Farrera, M.J. Kogan, E. Giralt, A. Celada, J. Lloberas, y V. Puntès 2009. Peptides conjugated to gold nanoparticles induce macrophage activation. *Molecular immunology*. 46(4):743-748.

Beermann, B., E. Carrillo-Nava, A. Scheffer, W. Buscher, A.M. Jawalekar, F. Seela, y H.J. Hinz 2007. Association temperature governs structure and apparent thermodynamics of DNA-gold nanoparticles. *Biophysical Chemistry*. 126(1-3):124-131.

Belozerskaya, T.A. y N.N. Gessler 2007. Reactive oxygen species and the strategy of antioxidant defense in fungi: A review. *Applied Biochemistry and Microbiology*. 43(5):506-515.

Bhatia, S. 2016. Nanoparticles Types , Classification , Characterization , Fabrication Methods. *Natural Polymer Drug Delivery Systems*. 33-91.

Boisselier, E. y D. Astruc 2009. Gold nanoparticles in nanomedicine: preparations, imaging, diagnostics, therapies and toxicity. *Chemical society reviews*. 38(6):1759-1782.

Brinãs, R.P., A. Sundgren, P. Sahoo, S. Morey, K. Rittenhouse-Olson, G.E. Wilding, W. Deng, y J.J. Barchi 2012. Design and synthesis of multifunctional gold nanoparticles bearing tumor-associated glycopeptide antigens as potential cancer vaccines. *Bioconjugate Chemistry*. 23(8):1513-1523.

Cai, H., F. Degliangeli, B. Palitzsch, B. Gerlitzki, H. Kunz, E. Schmitt, R. Fiammengo, y U. Westerlind 2016. Glycopeptide-functionalized gold nanoparticles for antibody induction against the tumor associated mucin-1 glycoprotein. *Bioorganic and Medicinal Chemistry*. 24(5):1132-1135.

Cancino-Bernardi, J., V.S. Marangoni, J.C.F. Besson, M.E.C. Cancino, M.R.M. Natali, y V. Zucolotto 2018. Gold-based nanospheres and nanorods particles used as theranostic agents: An in vitro and in vivo toxicology studies. *Chemosphere*. 213:41-52.

Canton, I. y G. Battaglia 2012. Endocytosis at the nanoscale. *Chemical Society Reviews*. 41(7):2718-2739.

Carabineiro, S.A.C. 2017. Applications of Gold Nanoparticles in Nanomedicine: Recent Advances in Vaccines . *Molecules*. 22(5):857.

Chadwick, S., C. Kriegel, y M. Amiji 2009. Delivery strategies to enhance mucosal

vaccination. *Expert Opinion on Biological Therapy*. 9(4):427-440.

Chen, Y.S., Y.C. Hung, W.H. Lin, y G.S. Huang 2010. Assessment of gold nanoparticles as a size-dependent vaccine carrier for enhancing the antibody response against synthetic foot-and-mouth disease virus peptide. *Nanotechnology*. 21(19):.

Chiodo, F., M. Marradi, J. Park, A.F.J. Ram, S. Penadés, I. Van Die, y B. Tefsen 2014. Galactofuranose-coated gold nanoparticles elicit a pro-inflammatory response in human monocyte-derived dendritic cells and are recognized by DC-SIGN. *ACS Chemical Biology*. 9(2):383-389.

Dakterzada, F., A. Mohabati Mobarez, M. Habibi Roudkenar, y A. Mohsenifar 2016. Induction of humoral immune response against *Pseudomonas aeruginosa* flagellin(1-161) using gold nanoparticles as an adjuvant. *Vaccine*. 34(12):.

Devanabanda, M., S.A. Latheef, y R. Madduri 2016. Immunotoxic effects of gold and silver nanoparticles: Inhibition of mitogen-induced proliferative responses and viability of human and murine lymphocytes in vitro. *Journal of immunotoxicology*. 13(6):897-902.

Dhar, A.K., S.K. Manna, y F.C. Thomas Allnutt 2014. Viral vaccines for farmed finfish. *Virusdisease*. 25(1):1-17.

Dong, J., P.L. Carpinone, G. Pyrgiotakis, P. Demokritou, y B.M. Moudgil 2020. Synthesis of precision gold nanoparticles using Turkevich method. *KONA Powder and Particle Journal*. 37:224-232.

Dykman, L.A. 2020. Gold nanoparticles for preparation of antibodies and vaccines against infectious diseases. *Expert Review of Vaccines*. 19(5):465-477.

Dykman, L.A. y N.G. Khlebtsov 2017. Immunological properties of gold nanoparticles. *Chemical Science*, 8, 1719-1735p.

Ealias, A.M. y M.P. Saravanakumar 2017. A review on the classification, characterisation, synthesis of nanoparticles and their application . *IOP Conf. Ser.: Mater. Sci. Eng.* 263:.

El-Brolosy, T.A., T. Abdallah, M.B. Mohamed, S. Abdallah, K. Easawi, S. Negm, y H. Talaat 2008. Shape and size dependence of the surface plasmon resonance of gold nanoparticles studied by Photoacoustic technique. *European Physical Journal: Special Topics*. 153(1):361-364.

Embregts, C.W.E. y M. Forlenza 2016. Oral vaccination of fish: lessons from humans and veterinary species. *Developmental & Comparative Immunology*. 64:118-137.

Fang, F.C. y A. Vázquez-Torres 2019. Reactive nitrogen species in host–bacterial interactions. *Current Opinion in Immunology*. 60:96-102.

Flannagan, R.S., G. Cosío, y S. Grinstein 2009. Antimicrobial mechanisms of phagocytes and bacterial evasion strategies. *Nature Reviews Microbiology*. 7(5):355-366.

Fujita, Y. y H. Taguchi 2017. Nanoparticle-Based Peptide Vaccines. *Micro- and*

Nanotechnology in Vaccine Development. Elsevier Inc., 149-170p.

Gangwar, R.K., V.A. Dhumale, D. Kumari, U.T. Nakate, S.W. Gosavi, R.B. Sharma, S.N. Kale, y S. Datar 2012. Conjugation of curcumin with PVP capped gold nanoparticles for improving bioavailability. *Materials Science and Engineering C*. 32(8):2659-2663.

Gao, W., R.H. Fang, S. Thamphiwatana, B.T. Luk, J. Li, P. Angsantikul, Q. Zhang, C.M.J. Hu, y L. Zhang 2015. Modulating antibacterial immunity via bacterial membrane-coated nanoparticles. *Nano Letters*. 15(2):1403-1409.

Getts, D.R., L.D. Shea, S.D. Miller, y N.J.C. King 2015. Harnessing nanoparticles for immune modulation. *Trends in Immunology*. 36(7):419-427.

Gheibi Hayat, S.M. y M. Darroudi 2019. Nanovaccine: A novel approach in immunization. *Journal of Cellular Physiology*. 234(8):12530-12536.

Giddam, A.K., M. Zaman, M. Skwarczynski, y I. Toth 2012. Liposome-based delivery system for vaccine candidates: Constructing an effective formulation. *Nanomedicine*, 7, .

Green, L.C., D.A. Wagner, J. Glogowski, P.L. Skipper, J.S. Wishnok, y S.R. Tannenbaum 1982. Analysis of nitrate, nitrite, and [15N]nitrate in biological fluids. *Analytical Biochemistry*. 126(1):131-138.

Greenwald, R.A. 2018. *Handbook methods for oxygen radical research*. CRC Press,

Gregory, A.E., B.M. Judy, O. Qazi, C.A. Blumentritt, K.A. Brown, A.M. Shaw, A.G. Torres, y R.W. Titball 2015. A gold nanoparticle-linked glycoconjugate vaccine against *Burkholderia mallei*. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine*. 11(2):447-456.

Gulla, S.K., B.R. Rao, G. Moku, S. Jinka, N.V. Nimmu, S. Khalid, C.R. Patra, y A. Chaudhuri 2019. In vivo targeting of DNA vaccines to dendritic cells using functionalized gold nanoparticles. *Biomaterials Science*. 7(3):.

Haiss, W., N.T.K. Thanh, J. Aveyard, y D.G. Fernig 2007. Determination of size and concentration of gold nanoparticles from UV-Vis spectra. *Analytical Chemistry*. 79(11):4215-4221.

Hall, J.B., M.A. Dobrovolskaia, A.K. Patri, y S.E. McNeil 2007. Characterization of nanoparticles for therapeutics. *Nanomedicine*, 2, 789-803p.

Halliwel, B. 2006. Reactive species and antioxidants. Redox biology is a fundamental theme of aerobic life. *Plant Physiology*, 141, 312-322p.

Harrison, E., J.W.J. Hamilton, M. Macias-Montero, y D. Dixon 2017. Peptide functionalized gold nanoparticles: The influence of pH on binding efficiency. *Nanotechnology*. 28(29):295602.

Hasanzadeh Kafshgari, M., F. J. Harding, y N. H. Voelcker 2015. Insights into Cellular Uptake of Nanoparticles. *Current Drug Delivery*. 12(1):63-77.

He, Q., A.R. Mitchell, S.L. Johnson, C. Wagner-Bartak, T. Morcol, y S.J.D. Bell 2000. Calcium

- phosphate nanoparticle adjuvant. *Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology*. 7(6):.
- Herizchi, R., E. Abbasi, M. Milani, y A. Akbarzadeh 2016. Current methods for synthesis of gold nanoparticles. *Artificial Cells, Nanomedicine and Biotechnology*. 44(2):596-602.
- Huang, Y., F. Yu, Y.S. Park, J. Wang, M.C. Shin, H.S. Chung, y V.C. Yang 2010. Co-administration of protein drugs with gold nanoparticles to enable percutaneous delivery. *Biomaterials*. 31(34):9086-9091.
- Jain, P.K., K.S. Lee, I.H. El-Sayed, y M.A. El-Sayed 2006. Calculated Absorption and Scattering Properties of Gold Nanoparticles of Different Size, Shape, and Composition: Applications in Biological Imaging and Biomedicine. *Journal of physical chemistry B*. 110(14):7238-7248.
- Jazayeri, M.H., H. Amani, A.A. Pourfatollah, H. Pazoki-Toroudi, y B. Sedighimoghaddam 2016. Various methods of gold nanoparticles (GNPs) conjugation to antibodies. *Sensing and Bio-Sensing Research*, 9, 17-22p.
- Kalimuthu, K., B.C. Lubin, A. Bazylevich, G. Gellerman, O. Shpilberg, G. Luboshits, y M.A. Firer 2018. Gold nanoparticles stabilize peptide-drug-conjugates for sustained targeted drug delivery to cancer cells. *Journal of Nanobiotechnology*. 16(1):34.
- Kemenade, B., A. Groeneveld, B. Rens, y J. Rombout 1994. CHARACTERIZATION OF MACROPHAGES AND NEUTROPHILIC GRANULOCYTES FROM THE PRONEPHROS OF CARP (CYPRINUS CARPIO). *Journal of Experimental Biology*. 187(1):143-158.
- Kimling, J., M. Maier, B. Okenve, V. Kotaidis, H. Ballot, y A. Plech 2006. Turkevich method for gold nanoparticle synthesis revisited. *Journal of Physical Chemistry B*. 110(32):15700-15707.
- Kogan, M.J., I. Olmedo, L. Hosta, A.R. Guerrero, L.J. Cruz, y F. Albericio 2007. Peptides and metallic nanoparticles for biomedical applications. *Nanomedicine*. 2(3):287-306.
- Kole, S., R. Kumari, D. Anand, S. Kumar, R. Sharma, G. Tripathi, M. Makesh, K. V. Rajendran, y M.K. Bedekar 2018. Nanoconjugation of bicistronic DNA vaccine against *Edwardsiella tarda* using chitosan nanoparticles: Evaluation of its protective efficacy and immune modulatory effects in *Labeo rohita* vaccinated by different delivery routes. *Vaccine*. 36(16):2155-2165.
- Kumar, M., W. Tegge, N. Wangoo, R. Jain, y R.K. Sharma 2018. Insights into cell penetrating peptide conjugated gold nanoparticles for internalization into bacterial cells. *Biophysical chemistry*. 237:38-46.
- Lafferty, K.D., C.D. Harvell, J.M. Conrad, C.S. Friedman, M.L. Kent, A.M. Kuris, E.N. Powell, D. Rondeau, y S.M. Saksida 2015. Infectious Diseases Affect Marine Fisheries and Aquaculture Economics. *Annual Review of Marine Science*. 7(1):471-496.
- Levy, R., U. Shaheen, Y. Cesbron, y V. Sée 2010. Gold nanoparticles delivery in mammalian live cells: a critical review Raphaël Lévy, Umbreen Shaheen, Yann Cesbron & Violaine Sée.

Nano reviews. 1(1):4889.

Li, L., S.L. Lin, L. Deng, y Z.G. Liu 2013. Potential use of chitosan nanoparticles for oral delivery of DNA vaccine in black seabream *Acanthopagrus schlegelii* Bleeker to protect from *Vibrio parahaemolyticus*. Journal of Fish Diseases. 36(12):987-995.

Li, Y., X. Hu, X. Zhang, Z. Liu, X. Ding, L. Xia, y S. Hu 2014. *Photorhabdus luminescens* PirAB-fusion protein exhibits both cytotoxicity and insecticidal activity. FEMS Microbiology Letters. 356(1):23-31.

Li, Y., Q. Jin, P. Ding, W. Zhou, Y. Chai, X. Li, Y. Wang, y G. Zhang 2020. Gold nanoparticles enhance immune responses in mice against recombinant classical swine fever virus E2 protein. Biotechnology Letters. 42(7):1169-1180.

Lin, A.Y., J.P. Mattos Almeida, A. Bear, N. Liu, L. Luo, A.E. Foster, y R.A. Drezek 2013. Gold Nanoparticle Delivery of Modified CpG Stimulates Macrophages and Inhibits Tumor Growth for Enhanced Immunotherapy. PLOS ONE. 8(5):e63550.

Lin, L.C.W., S. Chattopadhyay, J.C. Lin, y C.M.J. Hu 2018. Advances and Opportunities in Nanoparticle- and Nanomaterial-Based Vaccines against Bacterial Infections. Advanced Healthcare Materials, 7, 1701395p.

Lopes, T.S., G.G. Alves, M.R. Pereira, J.M. Granjeiro, y P.E.C. Leite 2019. Advances and potential application of gold nanoparticles in nanomedicine. Journal of Cellular Biochemistry. 120(10):16370-16378.

Louis, C. y O. Pluchery 2012. Gold nanoparticles for physics, chemistry and biology. World Scientific.

Ma, J., T.J. Bruce, E.M. Jones, y K.D. Cain 2019. A review of fish vaccine development strategies: Conventional methods and modern biotechnological approaches. Microorganisms. 7(11):569.

Małaczewska, J. 2015. Effect of oral administration of commercial gold nanocolloid on peripheral blood leukocytes in mice. Polish Journal of Veterinary Sciences. 18(2):273-282.

Marques Neto, L.M., A. Kipnis, y A.P. Junqueira-Kipnis 2017. Role of metallic nanoparticles in vaccinology: Implications for infectious disease vaccine development. Frontiers in Immunology. 8:239.

Martínez, J.C., N.A. Chequer, J.L. González, y T. Cordova 2013. Alternative Methodology for Gold Nanoparticles Diameter Characterization Using PCA Technique and UV-VIS Spectrophotometry. Nanoscience and Nanotechnology. 2(6):184-189.

Middelberg, A.P.J., T. Rivera-Hernandez, N. Wibowo, L.H.L. Lua, Y. Fan, G. Magor, C. Chang, Y.P. Chuan, M.F. Good, y M.R. Batzloff 2011. A microbial platform for rapid and low-cost virus-like particle and capsomere vaccines. Vaccine. 29(41):.

Mody, K.T., A. Popat, D. Mahony, A.S. Cavallaro, C. Yu, y N. Mitter 2013. Mesoporous silica nanoparticles as antigen carriers and adjuvants for vaccine delivery. Nanoscale, 5, .

Neumann, N.F., D. Fagan, y M. Belosevic 1995. Macrophage activating factor(s) secreted by mitogen stimulated goldfish kidney leukocytes synergize with bacterial lipopolysaccharide to induce nitric oxide production in teleost macrophages. *Developmental and Comparative Immunology*. 19(6):473-482.

Niikura, K., T. Matsunaga, T. Suzuki, S. Kobayashi, H. Yamaguchi, Y. Orba, A. Kawaguchi, H. Hasegawa, K. Kajino, T. Ninomiya, K. Ijiro, y H. Sawa 2013. Gold Nanoparticles as a Vaccine Platform: Influence of Size and Shape. *ACS nano*. 7(5):3926-3938.

Olmedo, I., E. Araya, F. Sanz, E. Medina, J. Arbiol, P. Toledo, A. Álvarez-Lueje, E. Giralt, y M.J. Kogan 2008. How changes in the sequence of the peptide CLPFFD-NH₂ can modify the conjugation and stability of gold nanoparticles and their affinity for β -amyloid fibrils. *Bioconjugate Chemistry*. 19(6):1154-1163.

Paciotti, G.F., L. Myer, D. Weinreich, D. Goia, N. Pavel, R.E. McLaughlin, y L. Tamarkin 2004. Colloidal gold: A novel nanoparticle vector for tumor directed drug delivery. *Drug Delivery: Journal of Delivery and Targeting of Therapeutic Agents*. 11(3):.

Panda, B.R. y A. Chattopadhyay 2007. Synthesis of Au Nanoparticles at "all" pH by H₂O₂ Reduction of HAuCl₄. *Journal of nanoscience and nanotechnology*. 7(6):1911-1915.

Park, J.W. y J.S. Shumaker-Parry 2014. Structural study of citrate layers on gold nanoparticles: Role of intermolecular interactions in stabilizing nanoparticles. *Journal of the American Chemical Society*. 136(5):1907-1921.

Piacenza, L., M. Trujillo, y R. Radi 2019. Reactive species and pathogen antioxidant networks during phagocytosis. *Journal of Experimental Medicine*. 216(3):501-516.

Pokharkar, V., D. Bhumkar, K. Suresh, Y. Shinde, S. Gairola, y S.S. Jadhav 2011. Gold nanoparticles as a potential carrier for transmucosal vaccine delivery. *Journal of Biomedical Nanotechnology*. 7(1):.

Quach, Q.H., S.K. Ang, J.H.J. Chu, y J.C.Y. Kah 2018. Size-dependent neutralizing activity of gold nanoparticle-based subunit vaccine against dengue virus. *Acta Biomaterialia*. 78:224–235.

Quade, M.J. y J.A. Roth 1997. A rapid, direct assay to measure degranulation of bovine neutrophil primary granules. *Veterinary Immunology and Immunopathology*. 58(3-4):239-248.

Rahman, S. 2016. Size and concentration analysis of gold nanoparticles with ultraviolet-visible spectroscopy. *Undergraduate Journal of Mathematical Modeling: One+ Two*. 7(1):2.

Rahme, K., G. Minassian, M. Sarkis, M. Nakhli, R. El Hage, E. Souaid, J.D. Holmes, y E. Ghanem 2018. Assessment of Charged AuNPs: From Synthesis to Innate Immune Recognition. *Journal of Nanomaterials*.

Reyes-Becerril, M., M. Maldonado-García, C. Guluarte, A. León-Gallo, S. Rosales-Mendoza, F. Ascencio, I. Hirono, y C. Angulo 2016. Evaluation of ToxA and *Vibrio parahaemolyticus*

lysate on humoral immune response and immune-related genes in Pacific red snapper. *Fish & Shellfish Immunology*. 56:310-321.

Reyes-Becerril, M., C. Guluarte, D. Ceballos-Francisco, C. Angulo, y M.Á. Esteban 2017. Enhancing gilthead seabream immune status and protection against bacterial challenge by means of antigens derived from *Vibrio parahaemolyticus*. *Fish & shellfish immunology*. 60:205-218.

Reyes-Becerril, M., F.A. Guardiola, V. Sanchez, M. Maldonado, y C. Angulo 2018. *Sterigmatomyces halophilus* β -glucan improves the immune response and bacterial resistance in Pacific red snapper (*Lutjanus peru*) peripheral blood leucocytes: In vitro study. *Fish and Shellfish Immunology*. 78:392-403.

Rodriguez-Del Rio, E., M. Marradi, R. Calderon-Gonzalez, E. Frande-Cabanes, S. Penadés, N. Petrovsky, y C. Alvarez-Dominguez 2015. A gold glyco-nanoparticle carrying a listeriolysin O peptide and formulated with AdvaxTM delta inulin adjuvant induces robust T-cell protection against listeria infection. *Vaccine*. 33(12):1465-1473.

Safari, D., M. Marradi, F. Chiodo, H.A. Th Dekker, Y. Shan, R. Adamo, S. Oscarson, G.T. Rijkers, M. Lahmann, J.P. Kamerling, S. Penadés, y H. Snippe 2012. Gold nanoparticles as carriers for a synthetic *Streptococcus pneumoniae* type 14 conjugate vaccine. *Nanomedicine*. 7(5):651-662.

Salazar-González, J.A., O. González-Ortega, y S. Rosales-Mendoza 2015. Gold nanoparticles and vaccine development. *Expert Review of Vaccines*, 14, .

Sapsford, K.E., W.R. Algar, L. Berti, K.B. Gemmill, B.J. Casey, E. Oh, M.H. Stewart, y I.L. Medintz 2013. Functionalizing nanoparticles with biological molecules: Developing chemistries that facilitate nanotechnology. *Chemical Reviews*. 113(3):1904-2074.

Scheffer, A., C. Engelhard, M. Sperling, y W. Buscher 2008. ICP-MS as a new tool for the determination of gold nanoparticles in bioanalytical applications. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*. 390(1):249-252.

Schieber, M. y N.S. Chandel 2014. ROS function in redox signaling and oxidative stress. *Current Biology*, 24, R453-R462p.

Sembratowicz, I. y K. Ognik 2018. Evaluation of immunotropic activity of gold nanocolloid in chickens. *Journal of Trace Elements in Medicine and Biology*. 47:98-103.

Skwarczynski, M. y I. Toth 2012. Peptide-Based Subunit Nanovaccines. *Current Drug Delivery*. 8(3):282-289.

Slütter, B., P.C. Soema, Z. Ding, R. Verheul, W. Hennink, y W. Jiskoot 2010. Conjugation of ovalbumin to trimethyl chitosan improves immunogenicity of the antigen. *Journal of Controlled Release*. 143(2):.

Soenen, S.J., B. Manshian, J.M. Montenegro, F. Amin, B. Meermann, T. Thiron, M. Cornelissen, F. Vanhaecke, S. Doak, W.J. Parak, S. De Smedt, y K. Braeckmans 2012.

Cytotoxic effects of gold nanoparticles: A multiparametric study. *ACS Nano*. 6(7):5767-5783.

Staerck, C., A. Gastebois, P. Vandeputte, A. Calenda, G. Larcher, L. Gillmann, N. Papon, J.P. Bouchara, y M.J.J. Fleury 2017. Microbial antioxidant defense enzymes. *Microbial Pathogenesis*. 110:56-65.

Staroverov, S.A., N.M. Aksinenko, K.P. Gabalov, O.A. Vasilenko, I. V. Vidyasheva, S.Y. Shchyogolev, y L.A. Dykman 2009. Effect of gold nanoparticles on the respiratory activity of peritoneal macrophages. *Gold Bulletin*. 42(2):153-156.

Tao, W., K.S. Ziemer, y H.S. Gill 2014. Gold nanoparticle-M2e conjugate coformulated with CpG induces protective immunity against influenza A virus. *Nanomedicine*. 9(2):237-251.

Tao, W. y H.S. Gill 2015. M2e-immobilized gold nanoparticles as influenza A vaccine: Role of soluble M2e and longevity of protection. *Vaccine*. 33(20):2307-2315.

Tedesco, S., H. Doyle, G. Redmond, y D. Sheehan 2008. Gold nanoparticles and oxidative stress in *Mytilus edulis*. *Marine Environmental Research*. 66(1):131-133.

Tello-Olea, M., S. Rosales-Mendoza, A.I. Campa-Córdova, G. Palestino, A. Luna-González, M. Reyes-Becerril, E. Velazquez, L. Hernandez-Adame, y C. Angulo 2019. Gold nanoparticles (AuNP) exert immunostimulatory and protective effects in shrimp (*Litopenaeus vannamei*) against *Vibrio parahaemolyticus*. *Fish & Shellfish Immunology*. 84:756-767.

Thomas, D.C. 2017. The phagocyte respiratory burst: Historical perspectives and recent advances. *Immunology Letters*. 192:88-96.

Torres, A.G., A.E. Gregory, C.L. Hatcher, H. Vinet-Oliphant, L.A. Morici, R.W. Titball, y C.J. Roy 2015. Protection of non-human primates against glanders with a gold nanoparticle glycoconjugate vaccine. *Vaccine*. 33(5):686-692.

Turkevich, J., G. Garton, y P.C. Stevenson 1954. The color of colloidal gold. *Journal of colloid Science*. 9:26-35.

Uchiyama, M.K., D.K. Deda, S.F. De Paula Rodrigues, C.C. Drewes, S.M. Bolonheis, P.K. Kiyohara, S.P. De Toledo, W. Colli, K. Araki, y S.H.P. Farsky 2014. In vivo and In vitro toxicity and anti-inflammatory properties of gold nanoparticle bioconjugates to the vascular system. *Toxicological Sciences*. 142(2):497-507.

Vetro, M., D. Safari, S. Fallarini, K. Salsabila, M. Lahmann, S. Penadés, L. Lay, M. Marradi, y F. Compostella 2017. Preparation and immunogenicity of gold glyco-nanoparticles as antipneumococcal vaccine model Preparation and immunogenicity of gold glyco-nanoparticles as anti-pneumococcal vaccine model. *Nanomedicine*. 12(1):13-23.

Vijayakumar, S. y S. Ganesan 2012. In vitro cytotoxicity assay on gold nanoparticles with different stabilizing agents. *Journal of Nanomaterials*. 2012:.

Vinay, T.N., S. Bhat, T. Gon Choudhury, A. Paria, M.H. Jung, G. Shivani Kallappa, y S.J. Jung

2018. Recent Advances in Application of Nanoparticles in Fish Vaccine Delivery. *Reviews in Fisheries Science and Aquaculture*. 26(1):29-41.

Wang, C., W. Zhu, Y. Luo, y B.-Z. Wang 2018. Gold nanoparticles conjugating recombinant influenza hemagglutinin trimers and flagellin enhanced mucosal cellular immunity. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine*. 14(4):1349-1360.

Wang, M., P. Zhu, S. Zhao, C. Nie, N. Wang, X. Du, y Y. Zhou 2017. Characterization, antioxidant activity and immunomodulatory activity of polysaccharides from the swollen culms of *Zizania latifolia*. *International Journal of Biological Macromolecules*. 95:809-817.

Woźniak, A., A. Malankowska, G. Nowaczyk, G.F. Bartosz, K. Tuśnio, R. Słomski, A. Zaleska-Medynska, y S. Jurga 2017. Size and shape-dependent cytotoxicity profile of gold nanoparticles for biomedical applications. *J Mater Sci: Mater Med*. 28(6):92.

Xia, Q., J. Huang, Q. Feng, X. Chen, X. Liu, X. Li, T. Zhang, S. Xiao, H. Li, Z. Zhong, y K. Xiao 2019. Size- and cell type-dependent cellular uptake, cytotoxicity and in vivo distribution of gold nanoparticles. *International Journal of Nanomedicine*. 14:6957-6970.

Yang, Y., A. V. Bazhin, J. Werner, y S. Karakhanova 2013. Reactive oxygen species in the immune system. *International Reviews of Immunology*. 32(3):249-270.

Yeh, Y.C., B. Creran, y V.M. Rotello 2012. Gold nanoparticles: preparation, properties, and applications in bionanotechnology. *Nanoscale*. 4(6):1871-1880.

Yen, H.J., S.H. Hsu, y C.L. Tsai 2009. Cytotoxicity and immunological response of gold and silver nanoparticles of different sizes. *Small*. 5(13):1553-1561.

Yeom, J.H., B. Lee, D. Kim, J. kook Lee, S. Kim, J. Bae, Y. Park, y K. Lee 2016. Gold nanoparticle-DNA aptamer conjugate-assisted delivery of antimicrobial peptide effectively eliminates intracellular *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. *Biomaterials*. 104:.

Yeste, A., M. Nadeau, E.J. Burns, H.L. Weiner, y F.J. Quintana 2012. Nanoparticle-mediated codelivery of myelin antigen and a tolerogenic small molecule suppresses experimental autoimmune encephalomyelitis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 109(28):.

Zabetakis, K., W.E. Ghann, S. Kumar, y M.C. Daniel 2012. Effect of high gold salt concentrations on the size and polydispersity of gold nanoparticles prepared by an extended Turkevich-Frens method. *Gold Bulletin*. 45(4):203-211.

Zeng, L., Z. Liao, W. Li, Q. Yuan, P. Wu, Z. Gu, Z. Liu, y G. Liao 2019. Non-covalent glycosylated gold nanoparticles/peptides nanovaccine as potential cancer vaccines. *Chinese Chemical Letters*.

Zhang, J., L. Mou, y X. Jiang 2020. Surface chemistry of gold nanoparticles for health-related applications. *Chemical Science*, 11, 923-936p.

Zhang, X. 2015. Gold Nanoparticles: Recent Advances in the Biomedical Applications. *Cell Biochemistry and Biophysics*. 72(3):771-775.

Zhao, L., A. Seth, N. Wibowo, C.-X. Zhao, N. Mitter, C. Yu, y A.P.J. Middelberg 2014. Nanoparticle vaccines. *Vaccine*. 32(3):327-337.

Zhou, X., X. Zhang, X. Yu, X. Zha, Q. Fu, B. Liu, X. Wang, Y. Chen, Y. Chen, Y. Shan, Y. Jin, Y. Wu, J. Liu, W. Kong, y J. Shen 2008. The effect of conjugation to gold nanoparticles on the ability of low molecular weight chitosan to transfer DNA vaccine. *Biomaterials*. 29(1):111-117.

11. ANEXO

Nanovacunas de AuNPs utilizando diferentes vías de administración.

Molécula acoplada a las AuNPs	Antígeno/ Enfermedad*	Biomodelo	Dosis/ Vía de administración	Resultados	Ref.
Tamaño/ Forma					
ADN					
ADN 1-9 nm/ Esférica	HBsAg/HBV	Ratón	1-10 mg/ Intramuscular	Indujo potentes respuestas de los linfocitos T citotóxicos en ratones y anticuerpos séricos específicos de IgG con una potencia de 10 veces en comparación con la vacuna de ADN desnudo	(Zhou et al., 2008)
ADN 15, 30 y 80 nm/ Esférica	Cáncer	Ratón	6.4 µg/ Inyección intratumoral	Las AuNPs de 15 nm indujeron la infiltración de macrófagos y células dendríticas, inhibieron significativamente el crecimiento de tumores y promovieron la supervivencia en ratones.	(Lin et al., 2013)
ADN-péptidos 15 nm / Esférica	Péptidos antimicrobianos/ <i>Salmonella enterica</i> serovar <i>Typhimurium</i>	Ratón	5 inmunizaciones intervalos de 24 h/ 8 mg/kg/ Inyección intravenosa	La administración del sistema resultó en una inhibición completa de la colonización de <i>S. Typhimurium</i> en los órganos de los ratones, lo que lleva	(Yeom et al., 2016)

ADN	Cáncer	Ratón	3 inmunizaciones intervalos de 7 días/ 180 µg/ Subcutánea	a una supervivencia del 100% de los ratones Se indujo una respuesta inmune de larga duración (180 días) contra melanoma murino. Se inhibió significativamente el crecimiento del melanoma y aumentó la supervivencia global de los ratones portadores de melanoma en entornos terapéuticos.	(Gulla et al., 2019)
-----	--------	-------	---	---	----------------------------

Proteínas

Proteína	TNF/ Cáncer	Ratón	6-24 mg/ Intravenosa	La dosis de 15 mg de Au-TNF causa la regresión del tumor en un 79% con el 100% de la supervivencia de los ratones	(Pacio tti et al., 2004)
30 nm/ Esférica					
Proteína	OVA	Ratón	200 µM/ Percutánea	Se indujeron anticuerpos séricos específicos de IgG en ratones	(Huan g et al., 2010)
5 nm/ Esférica					
Proteína	Dominios N- terminales de la flagelina/ <i>Pseudomonas</i> <i>aeruginosa</i>	Ratón	3 inmunizaciones intervalos de 14 días/ 10 µg/ Subcutánea	Se produjeron títulos altos de anticuerpos anti- flagelina en comparación con el grupo no inmune y / o que recibió flagelina sin adyuvante. Se encontró actividad funcional y especificidad de los	(Dakt erzad a et al., 2016)
15 nm/ Esférica					

Proteína recombinante	rSm29/ Esquistosomiasis	Ratón	3 inmunizaciones intervalos de 15 días/ 2 µg/ Intraperitoneal	anticuerpos anti-flagellina contra la cepa homóloga Se observó una respuesta inmunológica Th1 en ratones con una mayor producción de IFN-γ, principalmente por células T CD4 ⁺ y CD8 ⁺ . Además, activaron células dendríticas <i>in vitro</i> , mejorando la expresión de MHCII y MHCI y la producción de IL-1β en una forma dependiente de NLRP3, ASC y Caspasa-1	(Assis et al., 2018)
--/ Barra					

Péptidos

Péptido	VP1e/FMDV	Ratón	10 ng/µL/ Subcutánea e intraperitoneal	Se observó una unión máxima de anticuerpos en las AuNPs de diámetro 8 a 17 nm y se indujo IgG específica en suero de ratones	(Chen et al., 2010)
2-50 nm/ Esférica					
Péptido	TT/ <i>C. tetani</i>	Ratón	40 Lf/ Oral	Se inducen títulos de IgA específica en la mucosa intestinal de ratones	(Pokh arkar et al., 2011)
25 nm/ Esférica					
Péptido	Glicoproteína de oligodendrocito de mielina/ Esclerosis múltiple	Ratón	6 µg/ Intraperitoneal	Las AuNPs expandieron las Treg+FoxP3 y suprimieron el desarrollo de encefalomiелitis autoinmune experimental	(Yeste et al., 2012)
60 nm/ Esférica					

<p>Péptido 40 nm/ Esférica</p> <p>36 nm largo, 10 nm ancho/ Barra</p>	<p>Envoltura de proteína/ WNV</p>	<p>Ratón</p>	<p>100 ng/ Intraperitoneal</p>	<p>Se indujeron títulos de hasta 1200 de IgG específica en ratones y la producción de TNF-α, IL-6, IL-12 y GM-CSF en DCs</p> <p>Las NPs de barra pueden suministrar antígenos WNV de manera más eficiente a los macrófagos e inducir la secreción de IL-1b e IL-18 en las DCs</p>	<p>(Niikura et al., 2013)</p>
<p>Péptido 40 nm/ Esférica</p>	<p>TT/ <i>C. tetani</i></p>	<p>Ratón</p>	<p>20 Lf/mL/ Oral</p>	<p>Las AuNPs provocaron IgG e IgA sistémicas específicas y se encontró IgA local en lavados intestinales y heces</p>	<p>(Barhate et al., 2014)</p>
<p>Péptido 12 nm/ Esférica</p>	<p>Antígeno M2e/ Virus de la influenza</p>	<p>Ratón</p>	<p>60 μg/ Intranasal</p>	<p>Se indujo IgG sérica específica y protección contra un desafío letal en ratones. La presencia de M2e libre en la formulación de partículas funcionalizadas incrementó la inmunogenicidad e indujo una inmunoprotección de larga duración</p>	<p>(Tao et al., 2014; Tao y Gill, 2015)</p>
<p>Péptido 30 nm/ Esférica</p>	<p>Cáncer</p>	<p>Ratón</p>	<p>2×10^{11}/ Subcutánea</p>	<p>AuNP-OVA provoca respuestas significativas específicas de antígeno</p>	<p>(Almeida et al., 2015)</p>

Péptido 1.5 nm/ Esféricas	LLO / <i>Listeria monocytogenes</i>	Ratón	Una inmunización/ 5 µg/ Parental	Se indujo inmunidad de células T específicas de LLO y protección contra <i>Listeria</i> . La protección esta correlacionada con una mayor frecuencia de células T CD4 ⁺ y CD8 ⁺ esplénicas, células NK y CD8α ⁺ DC y producción de citocinas Th1 (IL-12, IFN-γ, TNF-α y MCP-1), después del reto	(Rodríguez-Del Rio et al., 2015)
Péptido 13 nm/ Esférica	Cáncer	Ratón	4 inmunizaciones intervalos de 21 días/ 12.2 nM/ Parental	Los ratones mostraron respuestas inmunes mediadas por MHC-II significativas y sus antisueros reconocieron células de cáncer de mama MCF-7 humano	(Cai et al., 2016)
Péptido 20, 40 y 80 nm/ Esférica	EDIII/ Dengue	Ratón	0.125-2 nM/ Subcutánea	Las AuNPs-E indujeron un alto nivel de anticuerpos que median la neutralización específica del serotipo del virus del dengue. El nivel de anticuerpos depende tanto del tamaño de las AuNPs como de la concentración de AuNPs-E	(Quach et al., 2018)
Péptido 10 nm/ Esférica	Cáncer	Ratón	4 inmunizaciones intervalos de 7 días/ 15.5 nmol o 31 nmol/	La dosis que contiene 31 nmol induce una respuesta inmune <i>in vivo</i> más fuerte. Se	(Zeng et al., 2019)

Intraperitoneal observaron altos niveles de anticuerpos IgG1, IgG2b e IgG3 el día 28. El crecimiento del melanoma en ratones se inhibió significativamente.

Carbohidratos

Carbohidrato 3-5 nm/ Esférica	Antígeno de glucopéptidos asociado a tumor/ Cáncer	Ratón	50 µM/ Subcutánea	Los ratones inmunizados con estas partículas produjeron isotipos tanto de IgM como de IgG contra cada antígeno glicopeptídico.	(Brinã et al., 2012)
Carbohidrato 2 nm/ Esférica	Pn14PS/S. <i>pneumoniae</i>	Ratón	3 µg/ Subcutánea	Se indujeron títulos de hasta 1000 de IgG específica en ratones y la producción de TNF-α, IL-2, IL-5.	(Safari et al., 2012)
Carbohidratos 2 nm/ Esférica	Tri-19F y Tetra-14/ <i>Streptococcus pneumoniae</i>	Ratón	2 inmunizaciones intervalos de 35 días/ 6 µg/ Intradermal	La presencia concomitante de Tri-19F y Tetra-14 en la misma nanopartícula mejoró críticamente los títulos de anticuerpos IgG específicos hacia el polisacárido tipo 14 de <i>Streptococcus pneumoniae</i> en comparación con las AuNPs desnudas. No se produjeron anticuerpos IgG contra el polisacárido tipo 19F.	(Vetro et al., 2017)

Otras moléculas

Vesículas de membrana externa bacteriana 42 nm	<i>Escherichia coli</i>	Ratón	0.2 o 0.02 µg/ Subcutánea	Activación rápida de células dendríticas que residen en los ganglios linfáticos. Respuestas de anticuerpos fuertes y duraderas y producción de IFN-g e IL-17 pero no de IL-4 (respuestas Th1 y Th17).	(Gao et al., 2015)
LPS 15 nm/ Esférica	TetHc, Hcp 1 y FliC/ <i>Burkholderia mallei</i>	Ratón	0.93 g/ Intranasal	Se indujeron títulos de anticuerpos más altas en comparación con el LPS desnudo y mejor protección contra un desafío de inhalación letal.	(Gregory et al., 2015)
LPS 15 nm/ Esférica	FliC/ <i>Burkholderia mallei</i>	Macaco Rhesus	20 µg/ Subcutánea	El desafío del aerosol produjo mortalidad en el 50% de los animales. Los títulos séricos de IgG específicos de LPS fueron significativamente más altos en 3 animales vacunados que sobrevivieron en comparación con 3 animales vacunados que murieron.	(Torres et al., 2015)

*Modificado de Salazar-González et al., 2015.