



CENTRO DE INVESTIGACIONES BIOLÓGICAS  
DEL NOROESTE, S.C.

---

Programa de Estudios de Posgrado

**“Neutralización de la toxinas PirA y PirB de *Vibrio parahaemolyticus* asociado a AHPND con fragmentos de anticuerpos desplegados en fagos”**

TESIS

Que para obtener el grado de

**Maestro en Ciencias**

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

P r e s e n t a

**Edgar Asdrúbal Trujillo García**

La Paz, Baja California Sur, Marzo de 2016

## ACTA DE LIBERACIÓN DE TESIS

En la Ciudad de La Paz, B. C. S., siendo las 11 horas del día 3 del Mes de Febrero del 2016, se procedió por los abajo firmantes, miembros de la Comisión Revisora de Tesis avalada por la Dirección de Estudios de Posgrado y Formación de Recursos Humanos del Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, S. C., a liberar la Tesis de Grado titulada:

**"Neutralización de la toxinas PirA y PirB de *Vibrio parahaemolyticus* asociado a AHPND con fragmentos de anticuerpos desplegados en fagos"**

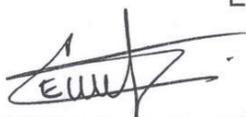
Presentada por el alumno:

**Edgar Asdrúbal Trujillo García**

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

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

LA COMISIÓN REVISORA



Dr. Carlos Eliud Angulo Valadez  
Director de Tesis



Dr. Felipe de Jesús Ascencio Valle  
Co-Tutor



Dr. Baltazar Becerra Luján  
Co-Tutor



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

## **COMITÉ TUTORIAL**

### **Director de Tesis:**

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

### **Co-tutor:**

Dr. Felipe de Jesús Ascencio Valle  
Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste S.C.

### **Co-tutor:**

Dr. Baltazar Becerril Luján  
Instituto de Biotecnología UNAM.

### **Comité revisor de tesis:**

Dr. Carlos Eliud Angulo Valadez  
Dr. Felipe de Jesús Ascencio Valle  
Dr. Baltazar Becerril Luján

### **Jurado de Examen de grado:**

Dr. Carlos Eliud Angulo Valadez  
Dr. Felipe de Jesús Ascencio Valle  
Dra. María Antonia Guzmán Murillo

### **Suplente**

Dr. Angel Isidro Campa Córdova

## RESUMEN

En los últimos cinco años la producción de camarón a nivel mundial se ha visto afectada por la Enfermedad de Necrosis Hepatopancreática Aguda (AHPND, por sus siglas en inglés) que ha causado hasta el 100% de mortandad en los cultivos. Esta enfermedad ha sido asociada a cepas de *Vibrio parahaemolyticus* que poseen un plásmido llamado pVA1, el cual posee los genes *pirA* y *pirB* que codifican para las toxinas PirA y PirB, que son principal factor virulento en camarón que provoca la AHPND y que solo habían sido descritas en bacterias del género *Photorhabdus*. Por lo anterior, es necesario encontrar una manera eficiente y específica de tratar la enfermedad. Una alternativa que ha demostrado ser viable para neutralizar patógenos y toxinas es el uso de anticuerpos recombinantes, ya que con las nuevas biotecnologías se pueden seleccionar fragmentos de anticuerpos específicos y altamente afines por el blanco; así como producirlos de manera rápida y eficiente. Por lo tanto el objetivo de este trabajo fue seleccionar y producir fragmentos de anticuerpos desplegados en fagos que reconozcan y neutralicen las toxinas PirA y PirB de una cepa de *V. parahaemolyticus* asociadas al AHPND. Con este fin, se realizó la transformación de la cepa de *E. coli* BL21 con el vector de clonación pET-28atoxA y pET-32atoxB para expresar y purificar las toxinas recombinantes PirA y PirB. Ambas sirvieron como blanco para seleccionar fragmentos de anticuerpos que se unen a la toxina mediante la técnica de despliegue en fagos. A partir de una biblioteca de anticuerpos humanos no inmune ( $8 \times 10^{11}$  UFC/mL), desplegados en la superficie de fagos, se seleccionaron fagos-scFv anti-PirA y anti-PirB mediante dos rondas de bioselección. Para la toxina PirA se obtuvieron títulos de  $2.26 \times 10^4$  UFC/mL y  $5 \times 10^4$  UFC/mL para la primera y segunda ronda, respectivamente; mientras que para la toxina PirB se obtuvieron  $3.33 \times 10^4$  UFC/mL y  $6.2 \times 10^5$  UFC/mL, respectivamente. Todas las rondas fueron evaluadas por ELISA y los títulos y los valores de absorbancia indican un reconocimiento hacia PirA y PirB, así como un enriquecimiento de los anticuerpos más afines por estas toxinas. En los retos para evaluar la capacidad de neutralización de scFv de manera indirecta midiendo el porcentaje de mortalidad se encontró una la disminución en el porcentaje de mortalidad 25 por ciento a las 24 h y 56 por ciento las 48 h ( $p < 0.05$ ) en el grupo tratado con los fagos-scFv anti PirA y anti PirB en grupo retado con el medio libre de células de *V. parahaemolyticus* con las toxinas. En conclusión, los anticuerpos desplegados en fagos reconocen y neutralizan específicamente a PirA y PirB, reduciendo la mortalidad en camarón con AHPND.

*Palabras Clave:* Toxinas PirA y PirB, Fragmentos de anticuerpos, *V. parahaemolyticus*, AHPND, despliegue de fagos, cultivo de camarón.

## ABSTRACT

In the last five years shrimp worldwide production has been affected by a disease named Acute Hepatopancreatic Necrosis Disease (AHPND) that has caused great losses in this sector reaching in some cases up to 100% mortality in crops. This disease has been associated a strains of *V. parahaemolyticus* that posses a plasmid called pVA1, which has the *pirA* and *pirB* genes encoding to PirA and PirB toxins, the main virulent factor causing the AHPND in shrimps that had only been described in bacteria of the genus *Vibrio* and. Thus, its necessary finding an efficient and specific treatment can help to eradicate or decreases the disease. The use of recombinant antibodies has proven being a feasible alternative to neutralize pathogens and toxins beside the new biotechnologies can select specific and high-affinity antibody fragments for the target and produce quickly and efficiently. Therefore the aim of this study was to select and produce fragments displayed on phage antibodies that recognize and neutralize PirB and PirA toxins from a strain of *V. parahaemolyticus* associated with AHPND. For that reason the transformation of *E. coli* BL21 strain with the cloning vector pET-28atoxA and pET - 32atoxB was performed to express and purify recombinant toxins PirA and PirB. Both toxins served as blank to select fragments of antibodies that bind to toxins by phage display technique. Since a library of human antibodies non-immune ( $8 \times 10^{11}$  CFU/mL), displayed on the surface of phage, phage-scFv anti-PirA and anti-PirB were selected by two rounds of biopanning. Phage-scFv that recognize toxin PirA were obtained titles to  $2.26 \times 10^4$  CFU/mL and  $5 \times 10^4$  CFU/mL for the first and second round respectively while for toxin PirB were obtained  $3.33 \times 10^4$  CFU/mL for the first and  $6.2 \times 10^5$  CFU/mL for the second one. Rounds were evaluated by ELISA, titles and the absorbance values indicate recognition and an enrichment of the affinity antibodies for these toxins. In the challenges to assess the ability of neutralizing scFv indirectly by measuring the mortality rate decreased of 25 per cent at 24 h and 56 per cent at 48 h was found in the percentage of mortality ( $p < 0.05$ ) in the group treated with anti-scFv phage anti-PirA and anti-PirB group than group challenged with cell-free medium of *V. parahamolyticus* with toxins. In conclusion, the antibodies displayed on phage recognize and neutralize specifically to PirA y PirB reducing mortality in shrimps with AHPND.

**Keywords:** Toxins PirA y PirB, Single Chain Fragment Variable, *V. parahaemolyticus*, AHPND, Phage display, shrimp farming.

## **DEDICATORIA**

A mi familia por siempre apoyarme en lo que he decidido hacer en la vida, en especial a mi Madre por siempre estar ahí y a mi hermana por siempre brindarme su ayuda incondicional. También agradecer el gran esfuerzo de mi Padre por siempre tratar darme la mejor educación.

## **AGRADECIMIENTOS**

A CONACYT por apoyo otorgado con la beca 301979 además de ayudar en la formación de estudiantes de posgrado y por ser la institución formadora de recursos humanos y científicos que tanto necesita el país.

Al CIBNOR por darme la oportunidad de cursar el posgrado de calidad y de poder conocer una institución con gente trabajadora y amable que facilitaron mi formación como maestro en ciencias.

Al Dr. Carlos por aceptar ser mi director de tesis y ayudarme en mi formación, por su ímpetu y sus ganas que no pierde y por darse el tiempo de atender a sus estudiantes de una manera incansable.

Al Dr. Felipe por su abrirme las puertas para formar parte de su equipo de trabajo y poder participar en este proyecto.

Al Dr. Baltazar por sumarse en este trabajo para enriquecerlo como guía y colaborador.

A la M. en C. Gorettee por toda la ayuda, por sus enseñanzas y su paciencia y por su buena disposición.

A mis compañeros laboratorio de Patogénesis por hacer fácil el trabajo con su ayuda y convivencia.

A mis compañeros de Maestría que estuvieron en todo momento en esta aventura.

A mi familia que es la base de todo lo que he hecho siempre agradecido.

A mi Universidad por formarme como profesional y darme las herramientas para seguir adelante y poder haber ingresado a un posgrado.

Al estado que aporta recursos para poder tener centros públicos como es el CIBNOR y así poder formar ciencia y tecnología que ayuden al país.

Este trabajo se realizó en el Laboratorio de Patogénesis Microbiana del Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste S.C. y fue financiado por los proyectos titulados “Fortalecimiento de la infraestructura de investigación y desarrollo de biotecnología enfocada hacia Una Sola Salud: Interfaz Animal-Hombre-Ecosistema. CONACYT-INFR-2014-01/225924” y “Conservación y aprovechamiento de la biodiversidad de microorganismos marinos: fortalecimiento de la contribución de los mares al desarrollo económico nacional. CONACYT-PDCPN2014-01/248033”.

## CONTENIDO

RESUMEN .....	iv
ABSTRACT.....	v
DEDICATORIA .....	vi
AGRADECIMIENTOS.....	vii
LISTA DE TABLAS .....	xi
LISTA DE FIGURAS.....	xii
<b>1. INTRODUCCIÓN .....</b>	<b>1</b>
<b>2. ANTECEDENTES.....</b>	<b>2</b>
2.1 Enfermedad de Necrosis Hepatopancreática Aguda (AHPND) .....	2
2.2 <i>Vibrio parahaemolyticus</i> asociado a AHPND .....	3
2.3 Factores de Virulencia del <i>Vibrio parahaemolyticus</i> .....	4
2.4 Toxinas PirA y PirB .....	6
2.5 Alternativas contra AHPND .....	7
2.6 Terapia de anticuerpos y el despliegue de fagos .....	8
<b>3. JUSTIFICACIÓN.....</b>	<b>11</b>
<b>4. HIPÓTESIS.....</b>	<b>12</b>
<b>5. OBJETIVO GENERAL.....</b>	<b>13</b>
5.1 Objetivos particulares.....	13
<b>6. MATERIALES Y MÉTODOS .....</b>	<b>14</b>
6.1 Transformación con pET-28aToxA y pET-32aToxB y expresión de las toxinas Pir A y Pir B recombinantes .....	14
6.1.1 Vectores pET-28aToxA y pET-32aToxB .....	14
6.1.2 Clonación de los vectores en células <i>E. coli</i> TOP10 .....	14
6.1.2 PCR de Colonia de células <i>E. coli</i> TOP10 transformadas.....	15
6.1.3 Purificación de de los vectores pET-28aToxA y pET-32aToxB clonados en células TOP10 y preparación de células competentes <i>E. coli</i> BL 21 (D3). 15	15
6.1.4 Transformación de células de <i>E. coli</i> BL 21 (D3) con los vectores pET- 28aToxA y pET-32aToxB .....	16
6.1.5 PCR de colonia de células <i>E. coli</i> BL21 (D3) .....	16
6.1.6 Expresión de las toxinas PirA y PirB recombinantes.....	16

6.1.7 Detección de las toxinas recombinantes .....	17
6.1.8 Western blot .....	17
6.2 Purificación y cuantificación de las toxinas PirA y PirB recombinantes.....	18
6.3 Despliegue de fagos; bioselección de clones de fagos con que despliegan fragmentos de anticuerpos (scFv) anti-PirA y anti-PirB.....	20
6.3.1 Elución .....	20
6.3.2 Titulación de fagos-scFv anti-PirA y anti-PirB .....	20
6.3.3 Amplificación de Fagos-scFv anti-PirA y anti-PirB .....	21
6.3.4 Purificación.....	21
6.3.5 Segundo Biopanning .....	21
6.3.6 Phage-ELISA .....	22
6.4 Evaluación de la neutralización de las Toxinas PirA y PirB .....	22
6.4.1 Cultivo de <i>V. parahaemolyticus</i> asociado a AHPND .....	23
6.4.2 Identificación de la cepa de <i>V. parahaemolyticus</i> asociada a AHPND y detección de Toxinas PirA y PirB .....	23
6.4.3 Bioensayo .....	24
6.5 Analisis estadístico.....	27
<b>7. RESULTADOS .....</b>	<b>28</b>
7.1 Transformación y expresión de las toxinas Pir A y Pir B recombinantes .....	28
7.1.1 Transformación de células Top 10 .....	28
7.1.2 Secuenciación de los amplicones de 542pb de pET-28aToxA y de 1593pb pET-32aToxB del producto de PCR de colonias transformadas .....	28
7.1.3 Transformación de células BL21 (D3) .....	28
7.1.4 Inducción a la expresión de las toxinas recombinantes .....	31
7.1.5 Detección de las toxinas Pir A y Pir B recombinantes.....	32
7.2 Purificación de las toxinas A y B recombinantes.....	32
7.3 Bioselección de clones de fagos con que despliegan fragmentos de anticuerpos (scFv) anti-PirA y anti-PirB .....	34
7.4 Evaluación de la neutralización de las Toxinas PirA y PirB .....	35
7.4.1 Identificación de la cepa de <i>V. parahaemolyticus</i> asociada a AHPND y detección de Toxinas Pir A y Pir B .....	35
7.4.2 Bioensayo .....	37
<b>8. DISCUSIÓN .....</b>	<b>39</b>
<b>9. CONCLUSIONES .....</b>	<b>47</b>
<b>10. LITERATURA CONSULTADA .....</b>	<b>48</b>

## LISTA DE TABLAS

<b>Tabla I.</b> Factores de virulencia de cepas de <i>V. parahaemolyticus</i> asociadas a AHPND .....	6
<b>Tabla II.</b> Secuencia y características de los cebadores utilizados en los PCR. ....	15
<b>Tabla III.</b> Estimación de tres dosis para el reto con el medio con toxinas y tres Para el reto con el <i>V. parahaemolyticus</i> .....	25
<b>Tabla IV.</b> Valores de titulación de las rondas I y II tanto de fagos-scFv anti-PirA y fagos-scFv anti-PirB. ....	34
<b>Tabla V.</b> Porcentaje de mortalidad en estimación de dosis. ....	37

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Corte histológico de hepatopáncreas sano e infectado por AHPND. ....	3
<b>Figura 2.</b> Mapas de los vectores pET-28aToxA y pET-32aToxB.....	14
<b>Figura 3.</b> Diagrama de flujo para la obtención de la toxinas recombinantes .....	19
<b>Figura 4.</b> Diseño del bioensayo .....	26
<b>Figura 5.</b> Secuencias de los genes de las células transformadas con pET-28aToxA y pET-32aToxB. ....	29
<b>Figura 6.</b> Electroforesis de colonias de células <i>E. coli</i> TOP 10 transformadas.....	30
<b>Figura 7.</b> Electroforesis de colonias de células <i>E. coli</i> BL21 transformadas.....	30
<b>Figura 8.</b> Electroforesis de la cinética de expresión de las toxinas recombinantes. ....	31
<b>Figura 9.</b> Electroforesis de las proteínas totales de las células transformadas y la electrotransferencia Western blot.....	32
<b>Figura 10.</b> Electroforesis de los purificados de las toxinas recombinantes.....	33
<b>Figura 11.</b> Gráfica de los valores de densidad óptica (OD) de las rondas I y II de los Fagos-scFv anti-PirA y anti-PirB.....	35
<b>Figura 12.</b> Electroforesis para la identificación del <i>V. parahaemolyticus</i> asociado a AHPND.....	36
<b>Figura 13.</b> Gráfica de la detección de las toxinas PirA y PirB en cultivo de <i>V. parahaemolyticus</i> . ....	36
<b>Figura 14.</b> Gráfica de porcentaje de mortalidad del reto con medio con el <i>V. parahaemolyticus</i> .....	38
<b>Figura 15.</b> Gráfica de porcentaje de mortalidad del reto con medio con toxinas PirA y PirB.....	38

## 1. INTRODUCCIÓN

Dentro de los mayores problemas que enfrenta la industria de la acuicultura están las enfermedades causadas por varios agentes biológicos y no biológicos. Particularmente el cultivo de camarón es vulnerable a enfermedades pandémicas relacionadas con virus y bacterias, que son la causa de una mortalidad alta y por ende pérdidas en la producción (Lightner *et al.*, 2012). Entre las enfermedades de mayor importancia para la acuicultura están las de etiología bacteriana, que se ven en aumento por las condiciones de los cultivos con altas densidades y la mala calidad del agua que se usa para tal fin (Álvarez *et al.*, 2000). En estos sistemas de cultivo, el balance natural de bacterias se ve alterado propiciando la proliferación de cepas bacterianas patógenas con mayor virulencia que disminuyen la defensa inmune del camarón (Garriques y Arévalo, 1995). En años recientes la aparición de una enfermedad llamada Síndrome de la mortalidad temprana (EMS, por sus siglas en inglés) colapsó la producción de los cultivos de camarón. El EMS causa mortalidad en el camarón dentro los primeros 25 días después de la siembra post-larvaria. Los primeros brotes de esta enfermedad aparecieron en Asia, particularmente en China en el año 2009 (FAO, 2012). En México, los primeros brotes se dieron en marzo del 2013 en el estado de Nayarit, y ya para el mes de mayo, en los cultivos de Sinaloa y Sonora. Estos estados son los de mayor producción de camarón en el país y hubo pérdidas hasta del 95% del cultivo en algunas granjas. Es por eso que en México ese año se registró una pérdida total de alrededor del 65% de la producción comparado con el año anterior (Nunan *et al.*, 2014). Esta enfermedad se le ha asociado con una cepa virulenta de *Vibrio parahaemolyticus* (Tran *et al.*, 2013). Una vez identificado el patógeno responsable la enfermedad fue llamada Enfermedad de Necrosis Hepatopancreática Aguda (AHPND) y aunque no se conocían bien que mecanismos o factores virulentos que hacían tan letal a esta cepa, diversos estudios encontraron distintos genes que codifican a factores de virulencia que no

habían sido reportados en cepas de *V. parahaemolyticus* (Gómez-Gil *et al.*, 2014; Joshi *et al.*, 2014; Kondo *et al.*, 2014). Sin embargo recientemente se determinó que la adquisición del plásmido pVA1 contiene los genes que confieren hipervirulencia a la bacteria y se demostró que entre ellos las toxinas PirA y PirB de manera conjunta son las responsables de la AHPND (Lee *et al.*, 2015).

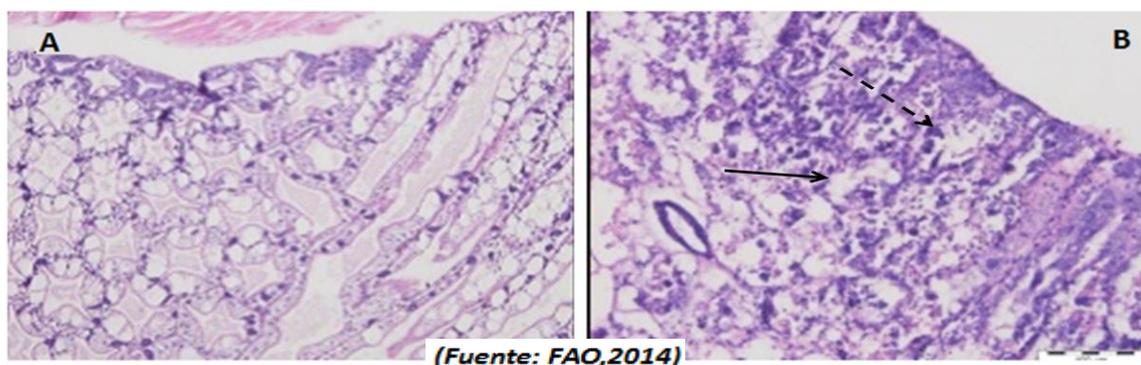
## **2. ANTECEDENTES**

### **2.1 Enfermedad de Necrosis Hepatopancreática Aguda (AHPND)**

El EMS fue llamado posteriormente Síndrome de Necrosis Hepatopancreática aguda (AHPNS) debido al cuadro clínico y los signos que presentaba en el hepatopáncreas (HP) del camarón; sin embargo, no es hasta que se reconoce al patógeno causante de la enfermedad se le comienza a llamar Enfermedad de Necrosis Hepatopancreática Aguda (AHPND por su siglas en inglés) (FAO, 2014). La patología de AHPND está limitada al hepatopáncreas y la naturaleza de la patología sugiere que esta enfermedad esta mediada por toxinas (Tran *et al.*, 2013). En camarones infectados, la histopatología muestra (Fig.1) una degeneración del HP tanto en la parte distal como proximal con una disfunción de las células presentes en esas zonas del HP (Lightner *et al.*, 2012). Además, las células epiteliales de los túbulos presentan ámpulas debido a la cariomegalia (desprendimiento del núcleo), y las células hepatopancreáticas se desprenden de los túbulos y se vuelven necróticas, lo cual sugirió la interacción de 2 o más proteínas tóxicas (Huan, 2014).

Al principio, se sospechaba que el AHPND era causado por un agente biológico y se realizaron diversos ensayos utilizando diferentes tejidos y órganos provenientes de camarones enfermos. Los resultados mostraron que las lesiones causadas por AHPND podían inducirse experimentalmente. Los análisis histopatológicos de camarones demostraron que el AHPND está limitado sólo al HP (FAO, 2014). Lightner *et al.* (2012), abordaron el problema bajo el supuesto de que el agente causal era una bacteria que coloniza el tracto digestivo del camarón en la estación

temprana de la infección, y que estas bacterias liberan toxinas que causan el mal funcionamiento y la necrosis del HP (Lightner *et al.*, 2012). Los autores realizaron dos retos con poblaciones de bacterias: unas provenientes del estómago y otras provenientes del HP. Los resultados permitieron concluir que solo las bacterias del estómago inducían AHPND. Años más tarde el mismo Dr. Lightner y sus colaboradores de la Universidad de Arizona mediante la obtención de varios aislados, retos y estudios histopatológicos lograron identificar como responsable del AHPND a una cepa de *Vibrio parahaemolyticus* (Tran *et al.*, 2013)



**Figura 1.** Imagen histológica de hepatopáncreas A) Hepatopáncreas sano donde se muestra las células epiteliales normales y un lumen bien definido. B) Hepatopáncreas con los típicos signos de AHPND; desprendimiento de las células de los epiteliales (flecha solida) y ámpulas en las mismas (flecha punteada).

## 2.2 *Vibrio parahaemolyticus* asociado a AHPND

En general, el *V. parahaemolyticus* asociado a AHPND es idéntico a las cepas no asociadas a AHPND, a excepción de la adquisición de plásmido pVA1. El *V. parahaemolyticus* es una bacteria Gram-negativa, halófila y mesófila, que tiene forma de bacilo y que puede presentar dos morfologías: con un flagelo polar ó rodeado de varios flagelos. Este patógeno habita en ambientes salinos, marinos o estuarinos, y prolifera rápidamente en climas cálidos (Kaneco y Colwell, 1973). Se puede encontrar nadando libremente, fijado en el fondo del agua o habitando bivalvos y crustáceos (McCarter, 1999). Si bien algunas cepas de *V.*

*parahaemolyticus* se encuentran en su ambiente sin causar enfermedades, muchas cepas son patógenas para animales y los seres humanos (Kumar *et al.*, 2011). De hecho, desde 1950 se ha convertido en la causa principal de intoxicación de personas que consumen mariscos infectados en todo el mundo (Su y Liu, 2007).

### **2.3 Factores de Virulencia del *Vibrio parahaemolyticus***

Se tienen bien identificados los principales factores de virulencia del *Vibrio parahaemolyticus* que van desde adhesinas como molécula de adhesión multivalente 7 (MAM7), distintos tipos de flagelos, sistemas de secreción y diferentes toxinas (Broberg *et al.*, 2011). En particular, la adquisición de un segundo sistema de secreción tipo III (T3SS2) y de las proteínas hemolisina directa termoestable (TDH) y hemolisina relacionada con TDH (TRH) ha llevado a distintas cepas con varios tipos y niveles de patogenicidad (Okada *et al.*, 2010). De hecho, casi todos los *V. parahaemolyticus* aislados en laboratorios clínicos poseen actividad  $\beta$ -hemolítica atribuida a TDH o TRH (Yeung y Boor, 2004). La TDH es considerada uno de los principales factores de virulencia de esta bacteria (Wang *et al.*, 2012). El *V. parahaemolyticus* se distribuye ampliamente en los ambientes costeros de todo el mundo. La mayoría de los aislados de muestras ambientales y de mariscos han dado negativo para TDH y TRH, lo cual, sugiere que la mayoría de las cepas de *V. parahaemolyticus* del medio ambiente no son patógenas (Vimala *et al.*, 2010).

Estos factores de virulencia son los que más se han descrito en la literatura debido a que las cepas mejor estudiadas son derivadas de casos clínicos que afectan al humano. Sin embargo, los primeros estudios de cepas asociadas a AHPND sugirieron otros factores de virulencia involucrados en esta enfermedad. Existen trabajos donde no encontraron a la toxina TDH en las cepas relacionadas con AHPND (Joshi *et al.*, 2014). En el trabajo de Kondo *et al.* (2014) secuenciaron 3 cepas relacionadas a AHPND y no encontraron las islas de patogenicidad relacionadas a cepas virulentas aisladas de casos clínicos. En este mismo trabajo

comparan secuencias genómicas de 3 cepas asociadas a AHPND y 3 cepas no asociadas, y una de las diferencias relevantes encontradas fue que solo las cepas asociadas a AHPND poseían una secuencia que codifica para el Pilus IV y que posiblemente estaba dentro de un plásmido. En otro trabajo reciente, Gómez-Gil *et al.* (2014) también hacen una secuenciación genómica de una cepa relacionada con esta enfermedad aislada de un brote en cultivos de camarón en México y encuentran distintos tipos de factores de virulencia: (1) cinco sistemas de adquisición de hierro, (2) siete diferentes tipos de sistemas de secreción, (3) 14 genes que codifican para toxinas, de los cuales dos de ellos codifican para RTX y para el Pilus IV (confirmando lo encontrado por Kondo *et al.*, 2014). Por último, en el trabajo de Yang *et al.* (2014) se reportó la secuenciación de 3 cepas asociadas a AHPND y encontraron cuatro genes homólogos de *V. cholerae* que codifican para la toxina de la zona ocluyente, la enterotoxina accesoria del cólera, y los genes *toxR* y *toxS* que son activadores transcripcionales de distintos genes de virulencia de esta especie. Uno de los resultados interesantes es que estos genes también están presentes en la cepa secuenciada por el Grupo del Dr. Gómez-Gil en México y en dos de las tres cepas secuenciadas por el Grupo del Dr. Hirono en Japón (Kondo *et al.*, 2014). Otro de los resultados interesantes de la investigación de Yang *et al.* (2014) es que también encuentran una secuencia homóloga que codifica para PirAB, una toxina binaria que está conformada por las toxinas PirA y PirB de las bacterias del género *Photorhabdus*. Esta bacteria vive como simbiote de ciertos nemátodos y se utiliza para el control biológico de larvas del mosquito *Aedes aegypti* (Ahantarig *et al.*, 2009). La secuencia de los genes *pirA* y *pirB* se encuentra dentro del un plásmido pVA1, cuya parte de su secuencia de este plásmido se utiliza como marcador molecular de cepas de *V. parahaemolyticus* asociadas a la AHPND (Flegel *et al.*, 2014 Joshi *et al.*, 2014). En la Tabla I se describen los factores de virulencia hasta ahora sugeridos en cepas de *V. parahaemolyticus* asociadas a la AHPND.

**Tabla I.** Factores de virulencia de cepas de *V. parahaemolyticus* asociadas a AHPND donde se muestran sus características moleculares: Número de nucleótidos, número de aminoácidos y el peso molecular, así como la referencia de la publicación donde se reporto por primera vez.

Factor de virulencia	N° de Nt	N° de a.a	Peso molecular( kD)	Referencia
RTX	9723	3240	342.3 kD	(Gomez-Gil <i>et al.</i> , 2014)
Toxina de la zónula ocluyente (ZOT)	1200	399	45 kD	(Yang <i>et al.</i> , 2014)
Enterotoxina accesoria del cólera	294	98	11.5 kD	(Yang <i>et al.</i> , 2014)
Activador transcripcional (TOXR)	885	294	32.53 kD	(Yang <i>et al.</i> , 2014)
Proteína reguladora de membrana (TOXS)	522	173	19.73 kD	(Yang <i>et al.</i> , 2014)
PirA	318	A105	13 kD	(Yang <i>et al.</i> , 2014)
PirB	1260	B419	50.11 kD	(Yang <i>et al.</i> , 2014)
Pilus IV (Pilín A)	405	134	13.66 kD	(Gomez-Gil <i>et al.</i> , 2014) (Kondo <i>et al.</i> , 2014)

## 2.4 Toxinas PirA y PirB

Estas toxinas fueron identificadas en la bacteria *Photobacterium luminescens*, bacteria que mantiene una relación simbiótica con nemátodos entomopatógenicos de la familia Heterorhabditidae (Waterfield *et al.*, 2005). Estas toxinas actúan como proteínas binarias, ambas son necesarias para que exista una toxicidad en mosquitos y palillas (Blackburn *et al.*, 2006; Ahantarig *et al.*, 2009). Se ha observado que la patología de las toxinas en la larva de la polilla afecta el epitelio del intestino medio y provocando una severa inflamación y desprendimiento de las membranas apicales (Blackburn *et al.*, 2006). Los camarones afectados por AHPND muestran una respuesta patológica similar a la que muestra el intestino medio de los insectos afectados por las toxinas PirA y PirB. Por lo tanto se sospechaba que las toxinas PirA y PirB tuvieran participación en el desarrollo de la AHPND ya que tanto los camarones y los insectos son artrópodos (Han *et al.*, 2015).

Fue hasta agosto del 2015 en que se confirmó que estas toxinas de manera conjunta son las responsables de la Enfermedad de Necrosis Hepatopancreática Aguda. En este trabajo se realizaron una serie de retos a los camarones con las toxinas recombinantes purificadas, con *E. coli* transformadas con los genes de las toxinas y con el plásmido que contiene los genes que codifican para las toxinas PirA y PirB (pAV1) mutado. Los retos con las toxinas recombinantes purificadas PirA y PirB vía oral (ingesta obligada) mostraron que era necesario la presencia de las dos toxinas para causar mortalidad. El reto vía oral con *E. coli* expresando los genes de las toxinas también indujo mortalidad con la presencia de los dos genes. El último reto fue *V. parahaemolyticus* con el plásmido con los dos genes y el plásmido mutado en la secuencia de los genes. En este último experimento se observó que *V. parahaemolyticus* sin el plásmido o con el plásmido mutado (interrupción de los genes) no causaba mortalidad, mientras que el *V. parahaemolyticus* que contenía el plásmido silvestre causaba mortalidad (Lee *et al.*, 2015). Este estudio demostró que para que existiera una mortalidad era necesario que se encuentren las dos toxinas presentes. Además realizaron una caracterización de las toxinas por cristalografía y se observó que de manera conjunta tienen una conformación estructural parecida a la toxina Bacillus cry que es una toxina entomopatógena, y se sugiere que puede actuar como una poroformina formando hoyos en las membranas celulares (Lee *et al.*, 2015). Finalmente, el trabajo de Kondo *et al.* (2015) demuestra la responsabilidad de estos genes de virulencia en la AHPND al encontrar este plásmido en *V. harveyi* en un brote de la enfermedad en Vietnam, demostrando que la transferencia horizontal de estos genes de virulencia son la causa de AHPND.

## **2.5 Alternativas contra AHPND**

En la actualidad, el control de la vibriosis causada por *V. parahaemolyticus* en el cultivo de camarón es mediante el tratamiento con antibióticos. La acuicultura de camarón ha sido uno de los sectores que más ha usado esta estrategia de tratar las infecciones (Venkateswara, 2014). Sin embargo, el uso indiscriminado de

antibióticos ha generado cepas resistentes que han causado graves pérdidas económicas, efectos nocivos al medio ambiente y por lo tanto está siendo prohibida por muchos países (Arthur *et al.*, 2000). Además, se ha encontrado que algunas cepas de *V. parahaemolyticus* asociados a AHPND cuentan con un pequeño plásmido que le da resistencia a tetraciclina que es el antibiótico más utilizado en la acuicultura (Han *et al.*, 2015). Actualmente se está tratando de controlar los brotes de enfermedades causadas por *Vibrio spp.* usando varias alternativas, las cuales incluyen: medidas de bioseguridad más estrictas, un mejor manejo de los cultivos, tratamiento del agua, selección de semillas y reproductores (FAO, 2014); la aplicación de químicos no dañinos como ácidos orgánicos en dieta (Ng *et al.*, 2015); extracto crudo de Jengibre azul en la dieta (Chaweepeak *et al.*, 2015); el uso de inmunoestimulantes orales como prebióticos y probióticos (Rodríguez *et al.*, 2007; Thompson *et al.*, 2010); o el uso de bacterias al cultivo como *Bacillus* para cambiar el pH del sedimento y evitar el crecimiento y proliferación del *Vibrio* (MAC, 2013); la terapia fágica para controlar el número de bacterias (Martinez-Diaz e Hipólito-Morales 2013; Mateus *et al.*, 2014); la implementación de sistemas novedosos como Bioflocs (Ekasari *et al.*, 2014), policultivos (Zorriehzahra y Banaederakhshan, 2015), entre otras estrategias (Cabello, 2006; DeSchryver *et al.*, 2014).

## **2.6 Terapia de anticuerpos y el despliegue de fagos**

Una alternativa interesante para tratar enfermedades de cual tipo es mediante anticuerpos capaces de reconocer y neutralizar moléculas tóxicas propias del patógeno (Safaei *et al.*, 2013). La terapia con anticuerpos, a diferencia de los antibióticos, se basa en el reconocimiento y neutralización de las moléculas tóxicas del microorganismo patógeno de una manera específica (Hudson y Souriau, 2003). De forma independiente, el sistema inmune del hospedero podrá interactuar con el microorganismo para su reconocimiento y neutralización de manera activa (Ardekani *et al.*, 2013). En años recientes, la ingeniería de anticuerpos combinada con las estrategias selección ha proporcionado una

herramienta atractiva que permite la producción y selección de anticuerpos contra antígenos específicos (Doppalapudi, 2010). Uno de los formatos de anticuerpos que ha tenido mucho éxito son los fragmentos variables de cadena sencilla (scFv) (Azzazy *et al.*, 2002). En comparación con la generación de anticuerpos monoclonales por la técnica de hibridoma, los anticuerpos scFv pueden ser fácilmente manipulados genéticamente para mejorar su especificidad y afinidad, reduciendo los costos de producción (Pini y Bracci., 2000). Estos fragmentos de anticuerpo se caracterizan por estar constituidos por los dominios variables, tanto de la cadena ligera como de la cadena pesada del anticuerpo, unidas por un “linker” de alrededor de 15 aminoácidos (Pande *et al.*, 2010). En este sentido, pueden generar bibliotecas de anticuerpos de cadena sencilla que son específicos para un antígeno determinado. Este tipo de anticuerpos se han utilizado ampliamente para la detección y neutralización de gérmenes patógenos *in vitro* e *in vivo* (Azzazy *et al.*, 2000; Sidhu, 2000; Pande *et al.*, 2010; Chaemchuen *et al.*, 2011). En la última década, la tecnología del despliegue en fagos de bibliotecas de anticuerpos se ha convertido en una de las técnicas efectivas para seleccionar anticuerpos o péptidos que detecten y/o neutralicen de forma específica moléculas tóxicas o microorganismos patógenos (Cai *et al.*, 2010). La técnica del despliegue de fagos fue desarrollada por George P. Smith en 1985. Se basa en la selección específica de variantes de péptidos desplegados en la superficie de bacteriófagos. Mediante ingeniería genética, se pueden generar bibliotecas que codifican para una gran variedad de péptidos o proteínas. Estas proteínas, ya sean anticuerpos, enzimas o antígenos determinados, son desplegadas en la superficie del bacteriófago y estos se unen a otra molécula blanco en función de su afinidad por ella. El proceso de selección *in vitro* de los diferentes bacteriófagos se le llama *Biopanning* (Smith, 1985; Yi *et al.*, 2003).

Existen numerosos estudios de como con esta tecnología se detectan y neutralizan diferentes tipos de toxinas de distintos organismos; como por ejemplo el trabajo donde se seleccionaron de scFv a partir de librerías de anticuerpos

humanos naïve para su neutralización de la citotoxicidad de la toxina Shiga de *E. coli* enterohemorrágica (Neri *et al.*, 2011). La toxina Rtx de *Vibrio vulnificus* fue detectada con un scFv seleccionado a partir de una librería de anticuerpos humanos (Hsu *et al.*, 2011). Toxinas de algas marinas (Garet *et al.*, 2010) en este estudio se obtuvo varios anticuerpos recombinantes contra las Palytoxinas a partir de dos Librerías de anticuerpos humanos naïve. Toxinas desde animales ponzoñosos como los alacranes, Riaño-Umbarila *et al.* (2013) utilizaron el despliegue de fagos y evolución dirigida para construir una biblioteca mutante y seleccionaron scFv que se unen a toxinas de escorpión. En un inicio el scFv seleccionados solo reconocían a la toxina cn2 la cual constituye el 6.8% del total del veneno del escorpión *Centruroides noxius*, sin embargo mediante la evolución dirigida solo fue necesario el cambio de algunos aminoácidos para que reconociera otras toxinas, como la toxina CII1 segunda mayor componente toxico del veneno del alacrán, sin afectar el reconocimiento de la toxina principal. Incluso toxinas del mismo *V. parahaemolyticus* para contrarrestar enfermedades gastrointestinales humanas, en el trabajo de Wang *et al.* (2012), utilizaron con éxito la tecnología de despliegue en fagos para la obtención de un anticuerpo en formato scFv, llamado scFv-LA3, el cual puede inhibir la citotoxicidad de TLH de *V. parahaemolyticus*.

### 3. JUSTIFICACIÓN

En los últimos años el *V. parahaemolyticus* ha sido descrito como el causante de la Enfermedad de Necrosis Hepatopancreática Aguda que afecta al camarón provocando graves pérdidas en el sector acuícola. Sin embargo, hoy se sabe que la responsable de esta enfermedad es la adquisición de manera horizontal de un plásmido que contiene los genes que codifican para de las toxinas PirA y PirB. El uso de antibióticos resulta insuficiente para atacar este problema, ya que además de que su aplicación está siendo prohibida en la mayoría de los países debido a los problemas ambientales que este representa, este patógeno tiene genes que le dan resistencia a tetraciclina, antibiótico de mayor uso en la acuicultura. Se requiere de alternativas para atacar este patógeno o a las toxinas responsables para ayudar a los camarones a contrarrestar la enfermedad. Diversos estudios han logrado la neutralización o inactivación exitosa de otros patógenos o moléculas tóxicas que afectan a diferentes organismos, mediante la utilización de fragmentos de anticuerpos y que en conjunto con la técnica del despliegue de fagos, se pueden seleccionar de manera fácil y rápida contra un blanco determinado sin pérdida de especificidad. Por lo tanto, si se sabe que las toxinas PirA y PirB son las responsables de causar AHPND, una alternativa viable para combatir esta enfermedad es neutralizando estas toxinas mediante el uso de anticuerpos recombinantes que gracias a las nuevas técnicas de ingeniería de anticuerpos que permite su diseño, producción y selección de manera rápida y a un relativo bajo costo, además de las ventajas que como agente terapéutico confiere, debido a su especificidad y afinidad contra un blanco determinado sin afectar otras células o moléculas del organismo tratado.

#### 4. HIPÓTESIS

- Si las toxinas PirA y PirB son las responsables de producir la enfermedad, entonces a partir de una biblioteca de anticuerpos desplegada en fagos se podrán encontrar scFv que reconozcan y neutralicen estas toxinas disminuyendo la mortandad de los camarones expuestos a las toxinas de una cepa de *V. parahaemolyticus* asociada a AHPND.

## 5. OBJETIVO GENERAL

- Evaluar la neutralización de las toxinas con los fragmentos de anticuerpos desplegados en los fagos en camarones retados con las toxinas PirA y PirB y una cepa de *V. parahaemolyticus* asociada a AHPND.

### 5.1 Objetivos particulares

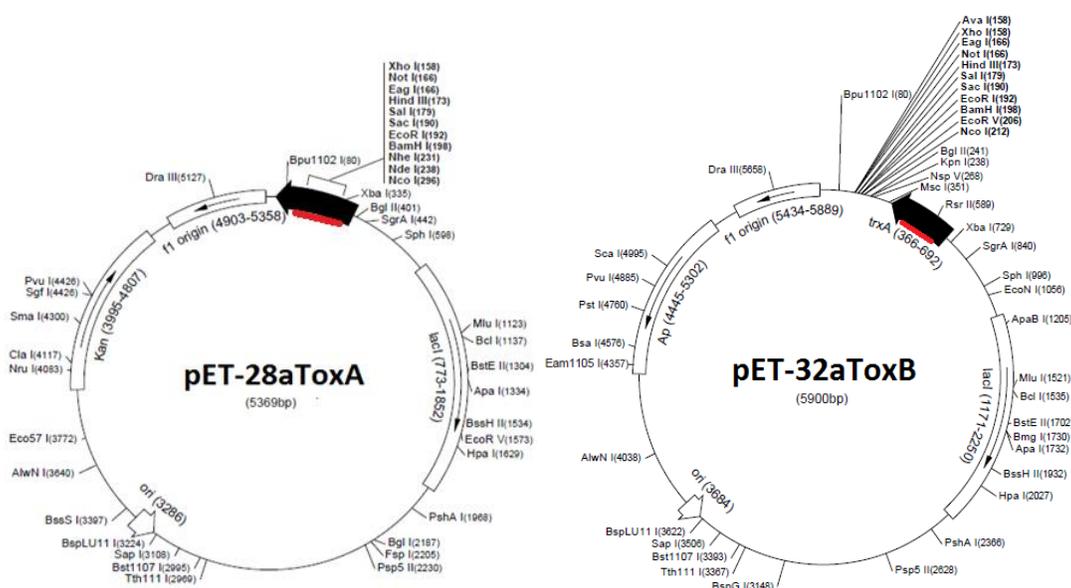
- 1) Expresar las toxinas PirA y PirB recombinantes en células de *E. coli* BL21.
- 2) Seleccionar fagos que despliegan los fragmentos de anticuerpo que se unan con afinidad y especificidad a las toxinas PirA y PirB de *V. parahaemolyticus* asociada a AHPND.
- 3) Analizar el potencial de neutralización de los fagos-scFv seleccionados mediante un bioensayo en camarones expuestos a las toxinas PirA y PirB y a una cepa de *V. parahaemolyticus* asociada a AHPND.

## 6. MATERIALES Y MÉTODOS

### 6.1 Transformación con pET-28aToxA y pET-32aToxB y expresión de las toxinas Pir A y Pir B recombinantes

#### 6.1.1 Vectores pET-28aToxA y pET-32aToxB

Los vectores fueron construidos en el Laboratorio de Ciencias Genómicas de la Universidad de Ciencia y Tecnología Marina de Tokio, por el equipo de trabajo del Dr. Ikuo Hirono utilizando los sitios de restricción *Eag I* y *Xho I* de pET-28a y *Nco I* y *Xho I* en pET-32a (Fig. 2).



**Figura 2.** Imagen de los mapas de los vectores pET-28aToxA y pET-32aToxB, la línea roja representa el gen de la toxina A y el gen de la toxina B en cada uno de los vectores.

#### 6.1.2 Clonación de los vectores en células *E. coli* TOP10

Vectores pET-28aToxA y pET-32aToxB fueron clonados en células *E. coli* Top10 mediante el protocolo de shock térmico (Sambrook y Russell, 2001). Las células transformadas con pET-28aToxA fueron cultivadas en agar Luria-Bertani (LB) con 25µL de ampicilina a una concentración de 100 µg/mL mientras que las células

transformadas con pET-32aToxB se cultivaron en agar LB con 25µL de Kanamicina a una concentración de 50 µg/mL µg/mL. Los cultivos fueron incubados a 37°C por una noche, para seleccionar las colonias transformadas que fueron resistentes al antibiótico.

### **6.1.2 PCR de Colonia de células *E. coli* TOP10 transformadas**

Una vez crecidas colonias de células transformadas en medios con antibióticos, se procedió a confirmar la transformación por PCR de colonia con las siguientes condiciones en el termociclador: 5 min a 95°C, seguido de 34 ciclos of 30 s de desnaturalización a 95°C, 30 s y una temperatura de alineación de 52°C por 60 s y la elongación a 72°C, para finalmente darle 7 min la ultima extensión a 72°C. Con los cebadores sentido para el promotor T7 y el antisentido del Terminador T7 (Tabla II), regiones características de estos vectores. Una vez obtenida la amplificación de nuestros fragmentos de interés, se mandó a secuenciar nuestros productos de PCR a GENEWIZ, Inc.

**Tabla II.** Secuencia y características de los cebadores utilizados en los PCR de colonias

<b>NOMBRE</b>	<b>Secuencia de 5´ a 3´ separada en codones</b>	<b># Bases</b>	<b>Tm</b>	<b>G-C</b>
T7 PROMOTOR F	TAA TAC GAC TCA CTA TAG GG	20	48 °C	40%
T7TERMNADOR R	GCT AGT TAT TGC TCA GCG G	19	53 °C	52.6%
PirB F	AGT GCT CGG TCA AGC GAC G	19	55 °C	55%

### **6.1.3 Purificación de de los vectores pET-28aToxA y pET-32aToxB clonados en células TOP10 y Preparación de células competentes *E. coli* BL 21 (D3)**

Se realizó la purificación de los vectores de las células *E. coli* Top10 con el kit *Zyppy Plasmid minprep* de Zymoresearch según las especificaciones de la casa comercial (Zymoresearch , Irvine, CA, USA). Se prepararon células químicamente competentes con CaCl<sub>2</sub> para su posterior transformación; se reactivaron las células *E. coli* BL 21 (D3), que estaban congeladas con glicerol al 30% a -80°C,

con un preinóculo de 700µL en 10mL de medio LB que se incubó a 37°C en agitación orbital constante a 200rpm por una noche. Una vez activadas las células se tomó una alícuota de 500µL del preinoculo para ser cultivado en medio SOB a 37°C por 3 h en agitación orbital constante a 200rpm. Después se le agregó 500 µL de MgCl<sub>2</sub> 2M y se dejó incubar por 10 min en hielo. Las células se recuperaron por centrifugación a 2700xg por 10 min a 4°C. Una vez cosechadas, las células fueron resuspendidas en 10mL de CaCl<sub>2</sub> frío añadido lenta cuidadosamente por las paredes del tubo. Se volvió a centrifugar a 2700xg por 10 min a 4°C se descartó el sobrenadante y se le volvió agregar 1.4mL de CaCl<sub>2</sub> mas 600µL de glicerol. Para su almacenamiento en alícuotas de 100µL a -80°C para su posterior uso (Sambrok y Russell, 2001).

#### **6.1.4 Transformación de células de *E. coli* BL 21 (D3) con los vectores pET-28aToxA y pET-32aToxB**

La transformación de las células *E. coli* BL 21 (D3) también se realizó por shock térmico con el protocolo de Sambrook y Russell (2001) como se describió para la transformación de las células TOP10.

#### **6.1.5 PCR de colonia de células *E. coli* BL21 (D3)**

De igual manera una vez crecidas colonias de células transformadas en medios con antibióticos, se procedió a confirmar la transformación por PCR de colonia con cebadores sentido para el promotor T7 y el antisentido del Terminador T7 con las mismas condiciones que se realizó la PCR de colonia para las células top 10. Sin embargo en este caso las células transformadas con el vector pET-32aToxB se utilizó el cebador sentido que reconocía parte de la secuencia del gen de la toxina PirB dentro del vector (Tabla II).

#### **6.1.6 Expresión de las toxinas PirA y PirB recombinantes**

La expresión de las toxinas recombinantes en las bacterias transformadas se indujo con Isopropil-β-D Tiogalactopiranosido (IPTG). Se escogió una colonia transformada tanto con el vector pET-28aToxA y pET-32aToxB. Posteriormente se

cultivo en preinoculos de 5mL de medio LB con antibiótico (ampicilina 100mg/mL para la transformadas pET-28aToxA y kanamcina 100mg/mL para la que tiene el vector pET-32aToxB). Se incubó a 37°C por toda una noche en agitación constante orbital constante a 200rpm, y una vez activadas las células, se cultivaron en un volumen de 25mL de medio LB con sus respectivos antibióticos a 37 °C hasta su crecimiento logarítmico dentro de 2 a 3 h. Luego, se tomó una alícuota de 1mL a tiempo cero, se indujo al resto del cultivo con IPTG 1mM y después se tomaron alícuotas de 1mL cada hora hasta por 4 hrs. para analizar la cinética de la expresión (Sambrok y Russell, 2001).

#### **6.1.7 Detección de las toxinas recombinantes**

La detección de la proteína fue por medio de una electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecilsulfato sódico (SDS-PAGE, LaemLi , 1970). Para ello, se cosecharon las células transformadas e inducidas para la expresión de las recombinantes por centrifugación a 12000xg por 10 min. Se retiró el sobrenadante para posterior uso y las células se resuspendieron en 600 µL de amortiguador de lisis. Después se realizó una sonicación de 3 pulsos de 15 segundos. Se centrifugó a 12000xg por 10 min para descartar residuos celulares y se tomó el sobrenadante que con el contenido proteico. Se corrieron 2 geles discontinuos de 4%-12%: (1)uno con los extractos proteicos torales de las alícuotas tomadas cada hora de inducción de ambas células transformadas; y (2) otro gel con el sobrenadante de los cultivos de las alícuotas tomadas cada hora también para determinar si estas toxinas eran secretadas al medio por las células transformadas.

#### **6.1.8 Western blot**

Después de la electroforesis, las proteínas se transfirieron a una membrana de polifluoruro de vinilideno PVDF se humedecieron los componentes (papel filtro) con Buffer de transferencia (Tris-BASE 20 mM, Glicina150 mM, Metanol 20%). Se realizó la electrotransferencia a a 400 mA durante 30 minutos. Una vez terminada la

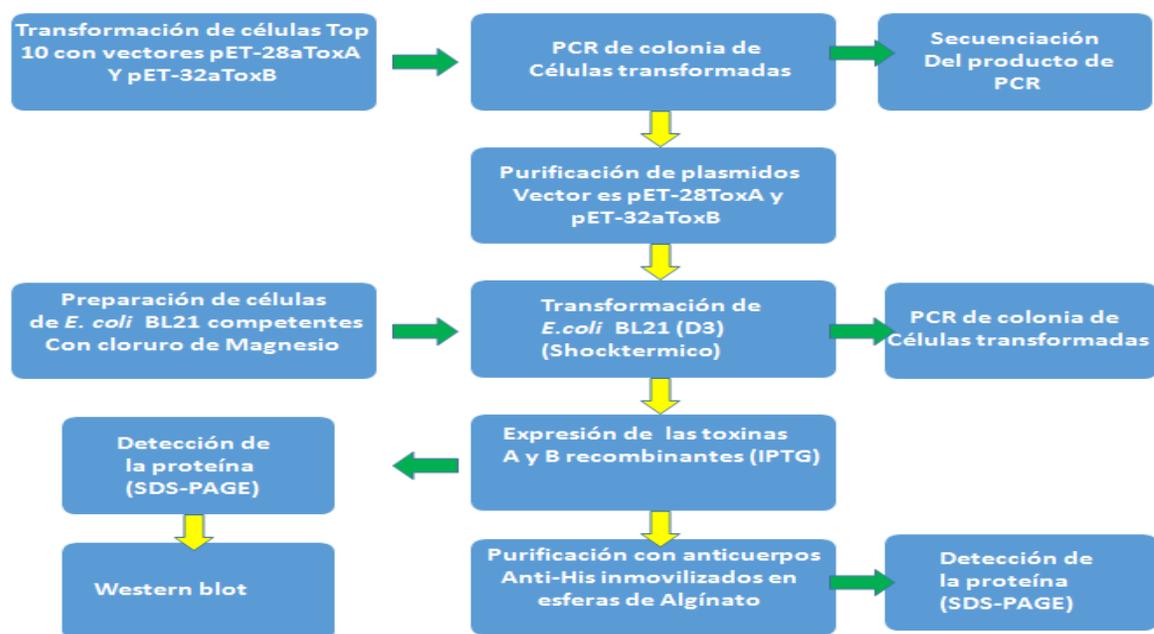
transferencia se colocó la membrana en en leche descremada en polvo al 5% en Buffer TNT (Tris-HCl 0.1M, pH 7.5, NaCl, 0.15M, Tween-20 0.05%) para bloquearla durante 1h a temperatura ambiente o toda la noche a 4 °C. Se realizaron tres lavados con TNT durante 5 minutos. Y se Incubó durante 2 horas con el anticuerpo primario (Anti-HIS GE27-4710-01 SIGMA) en Buffer TNT a 25 °C. Se volvió a lavar 3 veces con TNT durante 5 minutos. Para posteriormente incubarse durante 2 horas con el anticuerpo (Anti-Conejo IGg A6154 SIGMA) conjugado con peroxidasa en Buffer TNT a 25 °C. se volvió a lavar 3 veces con TNT durante 5 minutos. Para al final mezclar 10 mL de DAB y una gota de la solución de revelado para desarrollar la reacción con la peroxidasa. Esto se hizo con el fin de corroborar que las proteínas recombinantes se estaban expresando.

## **6.2 Purificación y cuantificación de las toxinas PirA y PirB recombinantes**

La purificación de la toxina PirA se realizó con anticuerpos anti-his inmovilizados en microesferas de alginato. Las microesferas se hicieron al 5% de alginato en agua destilada y esterilizada que se mezcló con el anticuerpo Anti-His GE27-4710-01 SIGMA diluido 1:1000. Esta solución fue vertida con una jeringa de insulina a una solución de  $\text{ClCa}_2$  al 7% para su solidificación en forma de microesfera. Posteriormente se tomó 500 $\mu\text{L}$  de esfera en un tubo Eppendorf y se le agregó 150  $\mu\text{L}$  de nuestras proteínas totales. Se dejó incubando por 1 hora en movimiento, se descartó el sobrenadante y después se eluyó las proteínas que se unieron al anticuerpo anti-His con 150 $\mu\text{L}$  Acido acético al 3%. Se tomó el sobrenadante y se corrió un SDS-PAGE (4%-12) y para confirmar la purificación. La concentración de la proteína purificada se determinó por ensayo de Bradford (1976) con el reactivo *Bio-Rad Protein Assay Dye Reagent Concentrate*.

La toxina PirB fue purificada por cromatografía de afinidad de iones metálicos inmovilizados (IMAC) en el Laboratorio de biofarmacéuticos recombinantes de la Facultad de Ciencias Químicas, Universidad Autónoma de San Luis Potosí por el Dr. Sergio Rosales y sus colaboradores. Brevemente, se utilizó una columna de 3 cm x 1.5 cm de diámetro y se cargó con 8 mL de  $\text{Ni}^{2+}$  y se equilibró con el buffer A

( $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  20mM, NaCl 500 mM, pH 7,0) a una velocidad de flujo de 0.5 mL/min usando el Sistema BioRad Biologic LP. La fase soluble se inyectó a un flujo de 0.1 mL/min durante 1 h. La elución se indujo con el buffer B ( $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  20 mM, 500 mM NaCl, 500 mM imidazol, pH: 7,0) a un flujo de 0.5 mL/min, y se obtuvieron recogiendo 10 fracciones de 1.5 mL. Posteriormente, las fracciones fueron analizadas mediante SDS-PAGE. El eluido con la toxina PirB recombinante se diluyó en PBS y se concentró por microfiltración utilizando un filtro Amicon de un tamaño de 10 kDa (Millipore). Y la concentración se determinó por el método de Lowry *et al.* (1951).



**Figura 3.** Diagrama de flujo para la obtención de la toxinas recombinantes. Desde la transformación de células *E. coli* top 10 one-shot con los vectores pET-28aToxA y pET-32aToxB hasta la detección por western blot de ambas toxinas y la purificación con microesferas de alginato de la toxina PirA.

### **6.3 Despliegue de fagos; Bioselección de clones de fagos con que despliegan fragmentos de anticuerpos (scFv) anti-PirA y anti-PirB**

Se utilizó una librería de scFv-IgG humanos de origen no inmune (scFv-IgG naïve) que fue proporcionada por el Dr. Karen Manoutcharian del Instituto de Investigaciones Biomédicas (IIE) de la UNAM. Así como la cepa TG1 de *Escherichia coli* necesaria para la amplificación de fagos M13.

#### **6.3.1 Elución**

Se sensibilizaron 4 pozos de una placa de micro titulación de 96 pozos con 500 ng/100µL de toxinas PirA y PirB recombinantes (dos pozos por cada toxina) y se dejaron incubando a 4°C por una noche. Posteriormente se lavaron los pozos 3 veces con buffer fosfato salino a un pH 7.4 (PBS) y se bloquearon con 300 µL PBS-leche descremada 5% dejándose incubar a 37°C por 2 h seguido de 3 lavados con PBS. Después se depositó  $8 \times 10^{11}$  PFU en 200 µL de librería de fagos-ScFv de humano no inmune a cada pozo y la placa se dejó incubando toda la noche a 4°C. Después se lavaron los pozos 5 veces con PBS-Tween 20 al 0.1% y dos veces más solo con PBS. Los fagos adheridos fueron eluidos con un 100 µL buffer de elusión (PBS Trietilamina 1.4%) y se dejó incubando por 30 min. Al final el eluato se neutralizó con 100 µL de Tris-HCl 1M.

#### **6.3.2 Titulación de fagos-scFv anti-PirA y anti-PirB**

Se realizaron 4 diluciones seriales (1:500 1:500 1: 500 y 1:10) en medio de LB los fagos eluidos y amplificados. Cada una de las diluciones se usó para infectar 200 µL de células *E. coli* TG1 en crecimiento logarítmico ( $\sim 0.5$ ) por 45 minutos a 37°C. Pasado ese tiempo, las células infectadas fueron plaqueadas en LB que contenía ampicilina y glucosa al 2%. Las placas se incubaron toda la noche a 37°C. Para obtener el título (número de unidades formadoras de colonia) se contó el número de colonias en cada caja de LB/Ampicilina/Glucosa, se multiplicó cada número por el factor de dilución y por el número de microlitros usados para la infección.

### **6.3.3 Amplificación de Fagos-scFv anti-PirA y anti-PirB**

Una vez obtenido el título se amplificaron en 10 mL de un cultivo de células TG1 con en LB y glucosa al 4% y ampicilina, en fase exponencial del crecimiento, después se dejó incubando a 37°C con una agitación de 250 rpm por 2 h. Para el rescate del fagémido se agregó 10µL de fago helper M13K07 (N0315S New England BioLabs) y se incubó por 2 h a 37°C en agitación orbital constante a 250 rpm. Una vez obtenidas nuestras células superinfectadas se depositaron en un matraz con 40 mL de LB con ampicilina y kanamicina a 37°C por 18 horas en agitación orbital constante a 250 rpm para su amplificación.

### **6.3.4 Purificación**

Para la purificación, el cultivo se centrifugó a 8000xg por 20 min a 4°C para descartar las células de TG1 y recuperar el sobrenadante con los fagos amplificados. Después de la centrifugación al sobrenadante se le agregó 1/6 del volumen total de polietilenglicol 8000 (PEG) y se dejó incubando por 2 h para precipitar a los clones fago scFv. Se centrifugó a 8000 x g por 30 min a 4°C, se descartó el sobrenadante y el pellet se resuspendió en 4 mL de Tris-amortiguador salino (TBS). Luego se le agregó 1/5 del volumen total de PEG (800µL) y se dejó incubando por 1h a 4°C. Se centrifugó a 13000 x g por 20 min a 4°C, se descartó el sobrenadante y se resuspendió el pellet con 1 mL de TBS. Finalmente, los fagos purificados se almacenaron a 4°C para su uso posterior en el siguiente *biopanning*.

### **6.3.5 Segundo Biopanning**

El segundo biopanning se realizó como se describió anteriormente, a excepción que se aumentó en número de lavados a 10 con PBS/Tween 20 al 0.1% y 3 lavados más solo con PBS. Lo anterior con el objetivo de aumentar la astringencia y por lo tanto la afinidad de los Fagos-scFv a las toxinas. Después de los dos episodios de selección, los fagos-scFv eluidos que reconocieron a la toxina PirA

como a los que reconocieron a la toxina PirB se utilizaron para evaluar las rondas por ELISA.

### **6.3.6 Phage-ELISA**

El Ensayo por inmuno absorción ligado a enzimas (ELISA) es utilizado para evaluar las rondas de selección y la afinidad de los clones con el anticuerpo para las toxinas. Se sensibilizaron 6 pozos (tres pozos para la ronda 1 y tres pozos para la ronda 2) con 10 µg de la toxina PirA en un volumen de 100 µL de PBS pH 7.4 de la misma manera con la toxina PirB esto con el fin de evaluar por triplicado cada ronda. Luego, se incubaron por 24 h a 4°C. Se lavaron 5 veces los pozos con PBS. Después los pozos se bloquearon con 300 µL de PBS con 5% de leche descremada por 1 h para posteriormente ser lavados por 5 ocasiones con PBS. Se añadió a los pozos correspondientes  $3 \times 10^{11}$  UFC/mL en 100 µL de los fagos eluidos que reconocieron a las toxinas PirA y PirB, respectivamente, de las rondas 1 y 2 y se incubaron por 2 horas a 37°C. Se realizaron 5 lavados mas con 300 µL PBS/Tween 20 al 0.1% y 2 con PBS, para eliminar residuos de Tween). Se añadieron 100 µL con anticuerpos (dilución 1:300) anti-fago M13 conjugado con la enzima peroxidasa (HRP) y se incubó por 1 hora a 37°C. Se lavaron 5 veces con PBS para finalmente añadir 200 µL de de una solución de o-fenilendiamina (OPD) P8287 SIGMA al 0.4 mg/mL (10mg de (OPD) en 25 mL amortiguador de citratos y fosfatos 0.05 M pH 5.0). Y se dejó incubando por 30 min a temperatura ambiente. Por último se medio la intensidad del color a una longitud de onda de 450 nm en el lector de microplacas (BioRad-UV).

### **6.4 Evaluación de la neutralización de las Toxinas PirA y PirB**

Se realizó un ELISA con las proteínas totales de un cultivo de *V. parahaemolyticus* asociado a AHPND y también con el mismo cultivo libre de células de *V. parahaemolyticus* para detectar a las toxinas PirA y PirB en el medio.

#### **6.4.1 Cultivo de *V. parahaemolyticus* asociado a AHPND**

Se trabajó con una cepa aislada de un brote en las granjas camarinícolas del CIBNOR, Baja California Sur. Se asilaron de muestras de tejidos de camarones moribundos con los clásicos signos de AHPND que se homogenizaron y por dilución se sembraron en medio TSA y TSB NaCl al 2.5%. Posteriormente se tomó 100µL *V. parahaemolyticus* y se dejó crecer toda la noche a 30°C a 150 rpm. Posteriormente se cosecharon las células por centrifugación a 10,000 x g y fueron lisadas sonicación 2 pulsos de 15 segundos a temperatura ambiente.

#### **6.4.2 Identificación de la cepa de *V. parahaemolyticus* asociada a AHPND y detección de Toxinas PirA y PirB**

Se realizó una PCR con los cebadores AP1 y AP2 reportados por Flegel *et al.* (2014) para identificar cepas asociadas a AHPND con las especificaciones del autor. Describir con detalle. Fueron utilizados dos juegos de cebadores sentido (F) y antisentido (R); juego de cebadores AHPND 1 (AP1) y juego de cebadores AHPND 2 (AP2): AP1F, 5'- CCT TGG GTG TGC TTA GAG GAT G -3'; AP1R, 5'- GCA AAC TAT CGC GCA GAA CAC C -3'; y AP2F, 5'- TCA CCC GAA TGC TCG CTT GTG G -3'; AP2R, 5'- CGT CGC TAC TGT CTA GCT GAA G -3'. El programa de ciclos en el termociclador fue el siguiente 5 min a 94°C, seguido de 30 ciclos of 30 s de desnaturalización a 94°C, 30 s y una temperatura de alineación de 60°C por 60 s y la elongación a 72°C, para finalmente darle 10 min la ultima extensión a 72°C. Para detectar las toxinas se depositaron 100 µL de las proteínas totales de *V. parahaemolyticus* y 100 µL del cultivo crudo en pozos de una microplaca por triplicado. Se utilizó medio LB (100 µL) y proteínas totales de *E. coli* como controles negativos. Las toxinas PirA y PirB recombinantes se utilizaron como controles positivos. Para la detección se empleó la técnica de ELISA utilizando  $8 \times 10^{11}$  UFC/100 µL de los fagos-scFv anti-PirA y anti-PirB; el anticuerpo anti-M13 (27942101, GE Healthcare Life Sciences) conjugado con la enzima peroxidasa diluido 1:2000; la solución reveladora-sustrato 10 mg OPD (P8287, SIGMA) en

25mL de amortiguador de citrato-fosfato para revelar Finalmente se midió la densidad óptica a 450 nm en el lector de microplacas.

### **6.4.3 Bioensayo**

Se trabajó con 198 camarones de 20 g de peso libres de AHPND. Estos fueron aclimatados por 2 días en el laboratorio húmedo INOVA de BioHelis® en 18 contenedores de 40L (10 camarones por contenedor) con agua marina contando las condiciones y manejo de bioseguridad adecuadas. Se estimó la dosis para dos retos por inmersión: 1) Solo con el medio de cultivo libre de células de *V. parahaemolyticus* (Medio-toxinas PirA y PirB); y 2) con las células de *V. parahaemolyticus* + el medio de cultivo.

#### **6.4.3.1 Estimación de dosis**

Para el reto con el Medio-toxinas PirA y PirB primero se cultivó la cepa de *V. parahaemolyticus* asociado a AHPND en 5mL de TBS al 2.5% de NaCl hasta llevarla a fase logarítmica a una  $OD_{600}$  de 0.8~0.9. Posteriormente se depositaron 3mL del cultivo en 300mL TBS al 2.5% de NaCl y se dejó cultivando por todo una noche. Al siguiente día las células fueron cosechadas y descartadas para obtener solo medio de cultivo con las toxinas PirA y PirB. A partir de ahí se realizaron 3 diluciones del medio con las toxinas con agua marina (1:10, 1:30 y 1:100). Para el reto con *V. parahaemolyticus*, se cultivó la cepa de *V. parahaemolyticus* asociado a AHPND en 5mL durante la noche a 30°C. Al siguiente día se tomaron 2mL del cultivo para 100mL TBS al 2.5% de NaCl y se dejó crecer hasta llevarla a fase logarítmica a una  $OD_{600}$  de 0.8~0.9. A partir de ahí se realizaron 3 concentraciones diferentes para estimar la dosis tabla ( $1 \times 10^6$ ,  $1 \times 10^3$ ,  $1 \times 10^2$  UFC/mL). Tres camarones por diluciones y concentraciones fueron sumergidos por 15 min y después regresados a su contenedor de 15L con todo y el contenido. Se evaluó la dosis por la mortalidad que presentaron a las 12, 24, 36, 48 y 60 h. Una vez obtenida la dosis ideal, se realizó el bioensayo propiamente con los dos distintos métodos de inmersión (Tabla III).

**Tabla III.** Estimación de dosis

Dosis	Reto con medio con toxinas	Reto con <i>V. parahaemolyticus</i>
1	Dilución 1:10	$1 \times 10^6$ UFC/mL
2	Dilución 1:30	$1 \times 10^3$ UFC/mL
3	Dilución 1:100	$1 \times 10^2$ UFC/mL

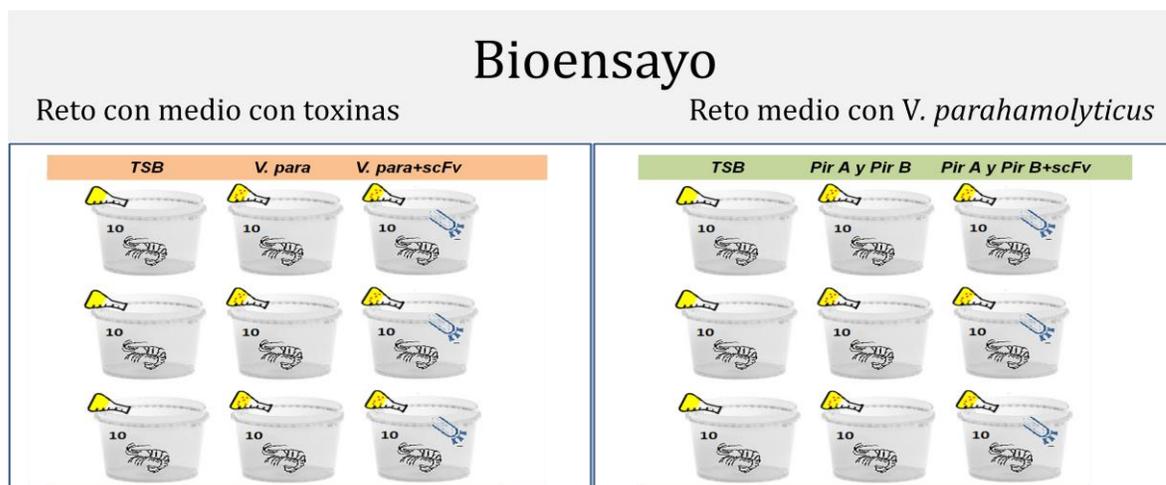
#### **6.4.3.2 Retos por inmersión en medio con toxinas Pir A y Pir B y con *V. parahaemolyticus* asociado a AHPND**

Se amplificaron los fagos-scFv anti-PirA y anti-PirB que se encontraban almacenados en células TG1 a  $-80^{\circ}\text{C}$ . Se realizó un preinoculo con 100 $\mu\text{L}$  de la suspensión celular en 2mL de LB a  $37^{\circ}\text{C}$  a 200 rpm por 4 h hasta fase logarítmica. Después se agregaron 10  $\mu\text{L}$  de fago helper MK13 y se incubó por 2 h a  $37^{\circ}\text{C}$  a 200 rpm. Luego se escaló el cultivo a 200mL de LB con 200  $\mu\text{L}$  ampicilina 100 mg/mL y kanamicina 50mg/mL y incubó por 18 h en agitación constante a 200 rpm a  $37^{\circ}\text{C}$  (velocidad, temperatura). Posteriormente se purificó y se tituló de la misma manera como si indica en la sección de purificación y titulación de materiales y métodos del despliegue de fagos. También se cultivó la cepa de *V. parahaemolyticus* asociada a AHPND para reto como se indica en la sección de estimación de dosis. Solo que en este caso se aumentó el volumen de cultivo a un 1L de TBS NaCl 2.5% durante para el reto de solo medio con las toxinas y se cultivó 25mL de *V. parahaemolyticus* que se llevó a fase logarítmica y se ajustó a una a una  $\text{OD}_{600}$  de 0.8~0.9 para el reto con el *V. parahaemolyticus*.

La inmersión se realizó por 15 min en 3 litros de dilución 1:10 medio con toxinas-agua marina (300mL de medio con toxinas en 2700mL de agua marina) conjugado con  $1 \times 10^{11}$  UFC/mL de Fagos-scFv anti-PirA y  $1 \times 10^{11}$  UFC/mL de Fagos-scFv anti-PirB con una concentración final de  $3 \times 10^7$  UFC/mL Fagos-scFv anti-pirA y  $3 \times 10^7$  UFC/mL de Fagos-scFv anti-PirB. Pasado los 15 min se regresaron los camarones a su estanque de 40L con todo y la suspensión. Para el reto con el cultivo de *V. parahaemolyticus* se ajustó a  $1 \times 10^6$  UFC/mL en 3 L de agua marina y

se realizó el mismo procedimiento que el reto anterior conjugado con  $1 \times 10^{11}$  UFC/mL de Fagos-scFv anti-PirA y  $1 \times 10^{11}$  UFC/mL de Fagos-scFv anti-PirB. Se evaluó la mortalidad a las 24 y 48 horas de los tratamientos así como los controles negativos (inmersión solo en medio TSB NaCl 2.5%) y controles positivos (inmersión en las mismas condiciones que de medio con toxinas y *V. parahaemolyticus* pero sin Fagos-scFv anti-PirA y anti-PirB) (Fig. 5).

Al final del experimento se tomó muestra de tejido del hepatopáncreas, hemolinfa, branquias y musculo (50-100 mg) y fueron depositados en 1mL de RNA-later y se almacenó a  $-80^{\circ}\text{C}$  para posterior uso. También se guardaron las cabezas con el hepatopáncreas completo y se fijaron en frascos con solución de Davidson (etanol al 95% formaldehído al 39% y ácido acético glacial) para estudios de histopatología.



**Figura 4.** Diseño del Bioensayo que se dividió en dos retos; inmersión medio con toxinas y en cultivo de *V. parahaemolyticus* asociados a AHPND. **TSB)** inmersión en TSB NaCl 2.5% que sirvió como control negativo para los dos retos. **V. para)** inmersión en cultivo de *V. parahaemolyticus* asociado a AHPND como control positivo. **PirA y PirB)** Inmersión en el medio con toxinas libre de células de *V. parahaemolyticus* como control negativo psitivo. **V. para+scFv)** *Vibrio parahaemolyticus* conjugado con los scFv anti-PirA y anti-pirB. **PirA y Pi B+scFv)** el medio con las toxinas conjugado con el scFv anti-PirA y anti-PirB.

### **6.5 Análisis estadístico**

Los bioensayos fueron realizados por triplicado y se obtuvo un promedio  $\pm$  la desviación estándar para cada grupo. Los datos fueron analizados estadísticamente mediante el análisis de varianza (ANOVA) donde fueron comparados tiempo y tratamiento. La comparación de medias fue realizada por el análisis de Tukey. Las diferencias se consideraron estadísticamente significativas cuando  $P < 0.05$ . Todos los datos fueron analizados con el programa InfoStat Statistical Software.

## 7. RESULTADOS

### 7.1 Transformación y expresión de las toxinas Pir A y Pir B recombinantes

#### 7.1.1 Transformación de células Top 10

La transformación de la células TOP 10 se comprobó con PCR de 10 colonias transformadas con pET-28aToxA con antibiótico ampicilina (100 mg/mL) y 3 colonias transformadas con pET-32aToxB que crecieron en agar LB kanamicina (100 mg/mL). Se corrió una electroforesis en un gel de agarosa al 0.8% y se obtuvieron una amplificación de 542pb en las 10 colonias transformadas con pET-28aToxA. Y de las tres colonias de las células pET-32aToxB que crecieron en el medio con antibiótico solo una presentó la amplificación de 1593pb (Fig. 6).

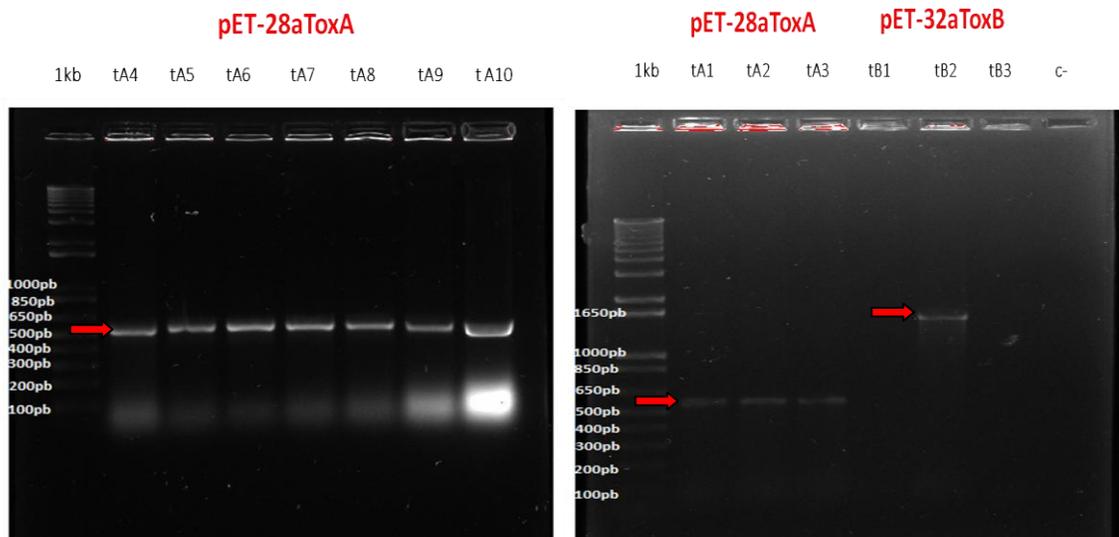
#### 7.1.2 Secuenciación de los amplicones de 542pb de pET-28aToxA y de 1593pb pET-32aToxB del producto de PCR de colonias transformadas

La secuenciación realizada por la casa comercial GENEWIZ, nos confirmó que en la amplificación obtenida en el PCR dentro el promotor y el terminador de la región T7 característico de los vectores pET se encuentra los genes de nuestro interés tanto el gen que codifica para la toxina A como el que codifica para la toxina B en los los sitios de restricción *Eag I* y *Xho I* de pET-28a y *Nco I* y *Xho I* en pET-32a. La secuencia es idéntica (542pb para *pirA* y 1593 para *pirB*) a la reportada por el Dr. Hirono en DDBJ/EMBL/Genbank con el número de acceso AB972427 (Fig. 5).

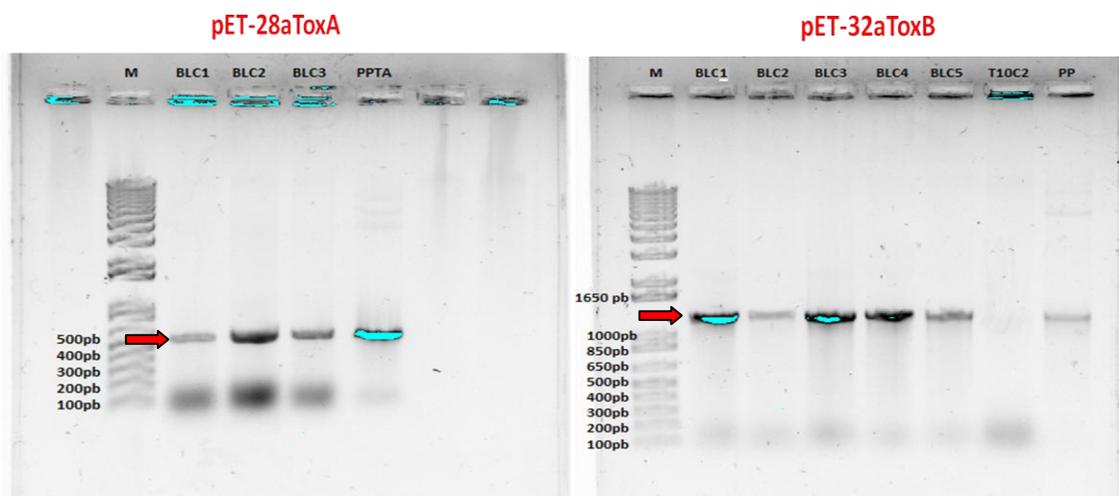
#### 7.1.3 Transformación de células BL21 (D3)

La transformación de la células BL21 (D3) también se comprobó con PCR de 3 colonias que crecieron en agar LB con antibiótico ampicilina (100 mg/mL) para las transformadas con pET-28aToxA y de 4 colonias transformadas con pET-32aToxB kanamicina (100 mg/mL). Se corrió una electroforesis en un gel de agarosa al 0.8% y se obtuvieron una amplificación de 542pb en las 3 colonias transformadas con pET-28aToxA. Y de las 4 colonias de las células pET-32aToxB que crecieron en el medio con antibiótico con un producto de amplificación de 1336pb (Fig. 7).





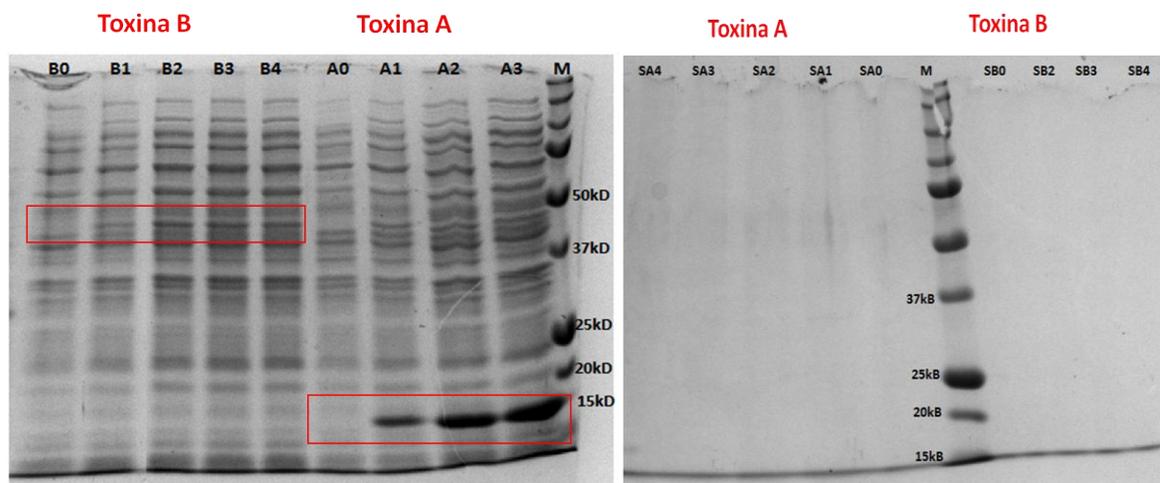
**Figura 6.** A) Electroforesis de 7 colonias (tA4, tA5, tA6, tA7, tA8 tA9 y tA10) transformadas con pET-28aToxA el amplicón esperado es de 542pb amplificado con los cebadores del promotor y el terminador T7 B) Electroforesis de 3 colonias transformadas con pET-32aToxB solo una amplificó (tB2) el amplicón esperado es de 1593pb amplificado con los cebadores del promotor y el terminador T7.



**Figura 7.** Electroforesis de 3 colonias (BLC1, BLC2 y BLC3) transformadas con pET-28aToxA PPTA es el plásmido purificado que sirvió de control positivo. Se muestra el amplicón esperado de 542pb amplificado con los cebadores del promotor y el terminador T7 B) Electroforesis de 5 colonias transformadas (BLC1, BLC2, BLC3 BLC4 Y BLC5) con pET-32aToxB PP que es el plásmido purificado de las sirvió como control positivo mientras que la células top10 sin transformar sirvió como control negativo. Se muestra el amplicón esperado de 1336pb amplificado con los cebadores sentido del gen de la toxina B y e cebador del terminador T7.

#### 7.1.4 Inducción a la expresión de las toxinas recombinantes

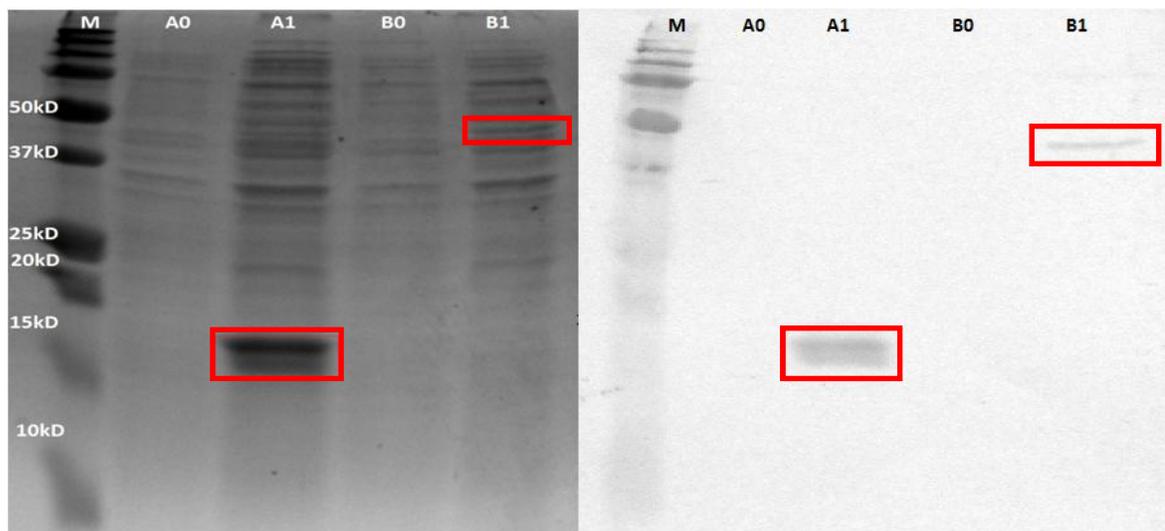
Las células transformadas con los vectores pET-28aToxA y pET-32aToxB fueron inducidas con IPTG 1mM para producir las toxinas PirA y PirB recombinantes. (13kD PirA y 50 kD PirB) El patrón de proteínas se observó en geles de poliacrilamida con dodecilsulfato sódico (SDS-PAGE) discontinuo (4-12%). Se corrieron los lisados celulares y el medio sin células, ambos sin inducir, y a la una, dos, tres y cuatro horas después de la inducción. Estas mostraron una mayor expresión a las 4 horas después de la inducción. Al tiempo cero, sin la presencia del inductor IPTG, no se observó la presencia de la proteína del tamaño esperado. En las células transformadas con pET-28aToxA fue más evidente la expresión de la proteína recombinante. Se realizó el mismo corrimiento electroforético con los medios cultivos libres de células de los mismos tiempos para determinar si las toxinas recombinantes eran excretadas al medio. En este corrimiento no se observaron el proteínas ni las toxinas recombinantes se confirmó que las toxinas no eres secretados al medio por las células BL21 transformadas (Fig. 8)



**Figura 8.** Cinética de expresión de las toxinas recombinantes (13kD PirA y 50 kD PirB) **A)** proteínas totales de las células transformadas con pET-28aToxA y pET-32aToxB: *B0* sin inducción, *B1* a una hora de la inducción, *B2* a dos horas de la inducción, *B3* a tres horas y *B4* a la cuarta hora. *A0* sin inducción, *A1* a una hora de la inducción, *A2* a dos horas de la inducción, *A3* a tres horas. **B)** La segunda electroforesis son los medios de los cultivos de las ambas células transformadas también tiempo cero y las posteriores horas después de la inducción donde se muestra que no hay excreción de las dos toxinas recombinantes al medio.

### 7.1.5 Detección de las toxinas PirA y PirB recombinantes

El Western blot mostró que las toxinas recombinantes con etiquetas de histidina tuvieron afinidad al anticuerpo anti-His, y por lo tanto ser las toxinas recombinantes las que se están expresando. Se muestra en la transferencia la banda en el carril A1 con el peso molecular esperado de 12 kD de la toxina PirA y el carril B1 la banda del peso molecular esperado de 50kD de la toxina PirB. Lo anterior corroboró que son las toxinas recombinantes que se indujeron, mientras que en los tiempos ceros sin inducción no se observó alguna banda del tamaño esperado (Fig. 9).

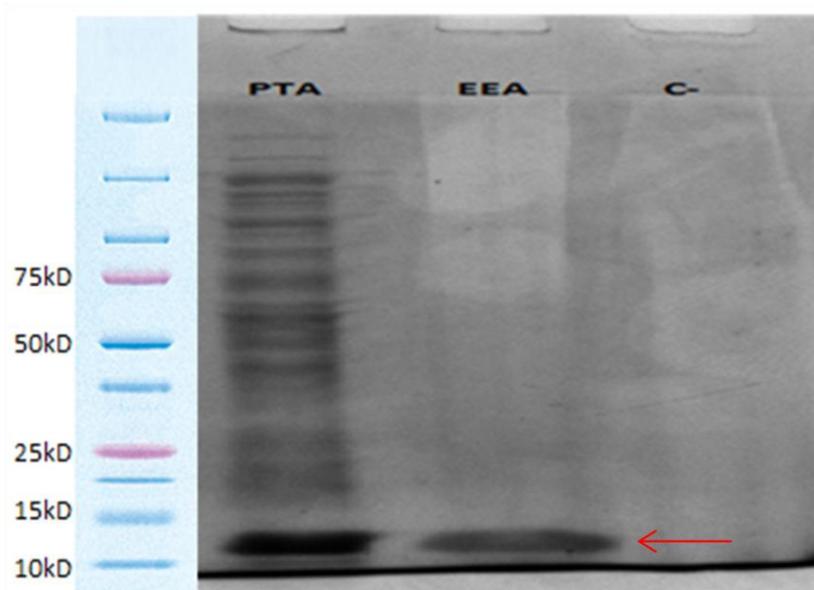


**Figura 9. A)** Electroforesis de las proteínas totales de las células transformadas con pET-28aToxA, A0 sin inducción A1 con inducción y las células totales transformadas con pET-32aToxB B0 sin inducción y B1 con inducción. **B)** Membrana de electrotransferencia del gel de poliacrilamida correspondiente por western blot con los anticuerpo anti-his.

### 7.2 Purificación de las toxinas PirA y PirB recombinantes

La purificación con anticuerpos anti-his inmovilizados en microesferas de alginato se verificó también con un gel de poliacrilamida (SDS-PAGE, 4-12%). En el caso de la toxina PirA se muestra en el carril *PTA* donde se corre las proteínas totales de las células inducidas y en el carril *EEA* el eluido de de las microesferas de

alginate con el anticuerpo anti-his que solo inmovilizó a toxinas A recombinantes. El control negativo fue la interacción de las proteínas totales y las microesferas sin anticuerpo (Fig. 10). La cuantificación por el método Bradford no dio un resultado de **9.23mg/mL** de la toxina PirA a partir de 25 mL de cultivo de *E. coli* BL 21 transformada con pET-28aToxA. En el caso de la toxina PirB no se obtuvo el mismo resultado esperado con la purificación con anticuerpos anti-his inmovilizados con microesferas de alginate. Por esta razón La Toxina PirB fue purificada por Cromatografía en el Laboratorio de Biofarmacéuticos Recombinantes en la Facultad de Ciencias Químicas de la Universidad Autónoma de San Luis Potosí y se obtuvo **0.14mg/mL** a partir de 25 mL de cultivo de *E. coli* BL21 transformado con pET-32aToxB.



**Figura 10.** Electroforesis de los purificados de las toxinas recombinantes **A)** PTA proteínas totales de las células transformadas con pET-28aToxA, EEA Toxina PirA recombinante purificada con microesferas de alginate **B)** PTB y PTBD proteínas totales de las células transformadas con pET-32aToxB EEB1 y EEB2 corrimientos de la purificación de la toxina B recombinante.

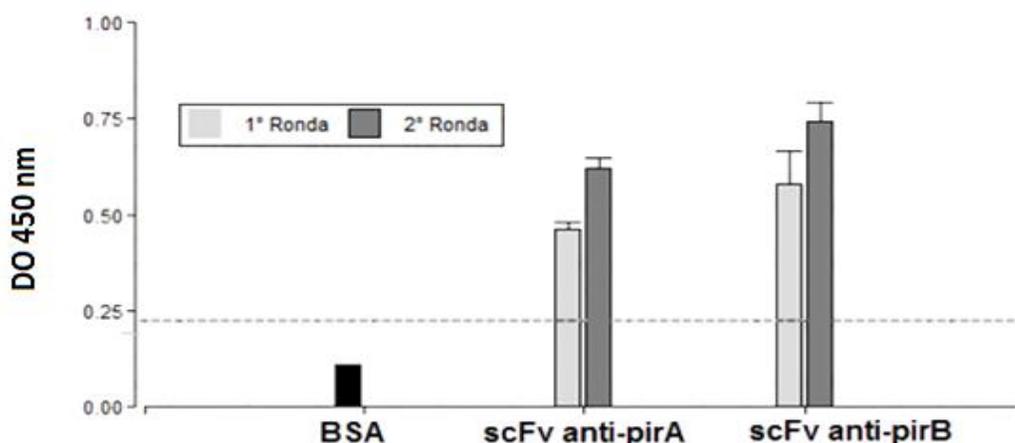
### 7.3 Bioselección de clones de fagos con que despliegan fragmentos de anticuerpos (scFv) anti-PirA y anti-PirB

A partir de una biblioteca de anticuerpos humanos no inmune ( $8 \times 10^{11}$  UFC/mL), desplegados en la superficie de fagos, se seleccionaron fragmentos de anticuerpos anti-PirA y anti-PirB mediante dos rondas de bioselección. Para anti-PirA se obtuvieron títulos de  $2.26 \times 10^4$  UFC/mL y  $5 \times 10^4$  UFC/mL para la primera y segunda ronda, respectivamente; mientras que para anti-PirB se obtuvieron  $3.33 \times 10^4$  UFC/mL y  $6.2 \times 10^5$  UFC/mL, respectivamente (Tabla IV). Todas las rondas fueron evaluadas por ELISA. Tanto los títulos como los valores de absorbancia indican un reconocimiento hacia PirA y PirB, así como un enriquecimiento de los anticuerpos más afines por estas toxinas (Fig. 11).

**Tabla IV.** Valores de titulación de las rondas I y II tanto de fagos-scFv anti-PirA como fagos-scFv anti-PirB.

scFv anti-Pir A			scFv anti-PirB		
Ronda	Entrada	Salida	Ronda	Entrada	Salida
1	$8 \times 10^{11}$ UFC/mL	$2.3 \times 10^4$ UFC/mL	1	$8 \times 10^{11}$ UFC/mL	$3.3 \times 10^4$ UFC/mL
2	$6.6 \times 10^{11}$ UFC/mL	$5 \times 10^4$ UFC/mL	2	$6.3 \times 10^{11}$ UFC/mL	$6.2 \times 10^5$ UFC/mL

NOTA: La primera entrada es el título de la biblioteca con todas las variantes de fagos-scFv que puede haber en ella. La primera salida son los fagos-scFv que reconocieron a las toxinas con las distintas variaciones de afinidad. La segunda entrada son los fagos-scFv que reconocieron a las toxinas. Y por último la segunda salida es la cantidad del fagos-scFv con más afinidad.



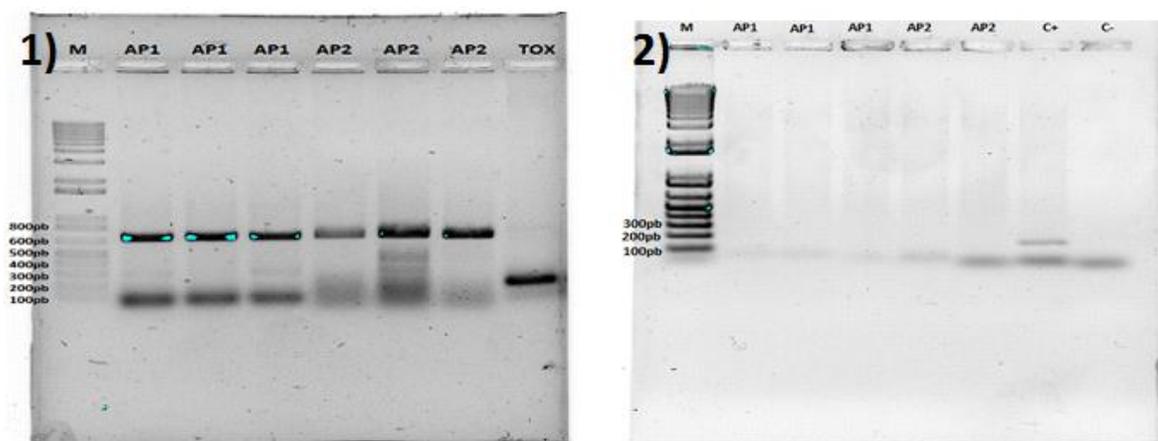
**Figura 11.** La grafica muestra los valores de densidad óptica (OD) de 450nm que arrojo el ELISA de las rondas I y II y de los fagos- scFv. Que reconocieron a las toxinas PirA y PirB respectivamente. Se considera como positivo cuando el valor es el doble que el blanco (BSA).

## 7.4 Evaluación de la neutralización de las Toxinas PirA y PirB

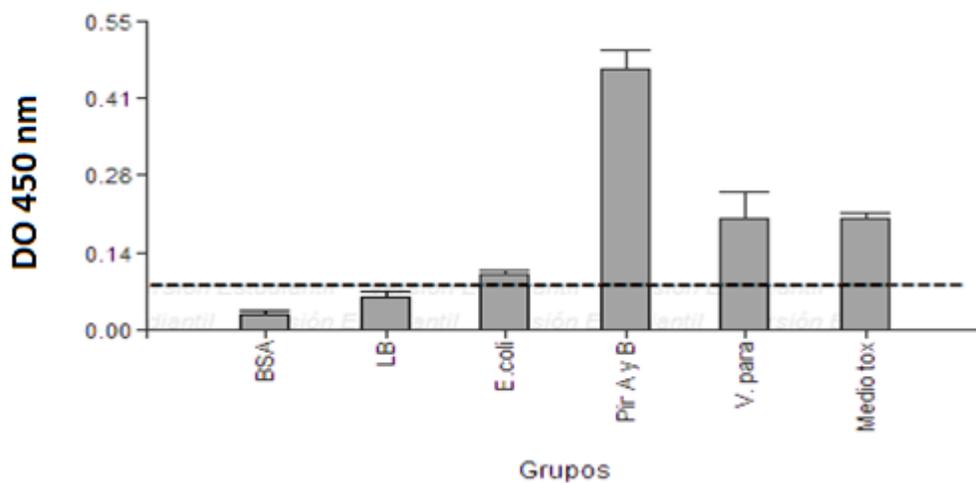
### 7.4.1 Identificación de la cepa de *V. parahaemolyticus* asociada a AHPND y detección de Toxinas PirA y PirB

Se logró identificar a una cepa de *V. parahaemolyticus* asociada a AHPND con los cebadores AP1 y AP2 (Flegel *et al.*, 2014) se amplificó una región del plásmido (pVA1) que codifica para los genes de mayor virulencia de estas cepas y que sirve como marcador molecular para su identificación (Fig. 12).

Las toxinas PirA y PirB fueron detectadas en el medio del cultivo de *V. parahaemolyticus* asociado al AHPND libre de células, así como en las proteínas totales de la misma bacteria. Los valores de OD a 450nm más del doble del blanco (BSA) se consideran positivos. Como controles negativos se utilizaron medio LB y un lisado de *E. coli* BL21 y como control negativo una mezcla de las toxinas recombinantes PirA y PirB (Fig. 13).



**Figura 12.** 1) Electroforesis con ADN de una cepa asociada a AHPND, el tamaño esperado es de 700pb tanto para el amplicón con los cebadores AP1 y los cebadores AP2, ToxR de 200pb como control positivo para asegurar que es *Vibrio parahaemolyticus*. 2) Electroforesis con ADN de una cepa no asociada a AHPND.



**Figura 13.** Detección de las toxinas PirA y PirB con los fagos-scFv anti PirA y anti PirB por ELISA OD<sub>450</sub>. Como controles negativos medio **LB** y lisado de *E. coli* BL21. Como control positivo un conjugado de las dos toxinas **PirA y PirB** recombinantes. Se evaluó la detección de un Lisado de *V. parahaemolyticus* asociado a AHPND (**V. para**) así como el medio de cultivo con las toxinas PirA y PirB (**Medio tox**). Se considera positivo al valor doble que el blanco (**BSA**).

## 7.4.2 Bioensayo

### 7.4.2.1 Estimación de la dosis

Para el reto con medio de cultivo con las toxinas PirA y PirB. De las tres dosis (diluciones del medio con las toxinas con agua marina) y el reto con el *V. paraemolyticus* se presentaron los siguientes porcentajes de mortalidad Tabla V.

**Tabla V.** Porcentaje de mortalidad de las tres diferentes concentraciones para el reto con el medio con toxinas y las tres diferentes concentraciones para el reto con el *V. parahaemolyticus* asociado a AHPND para estimar dosis para el bioensayo.

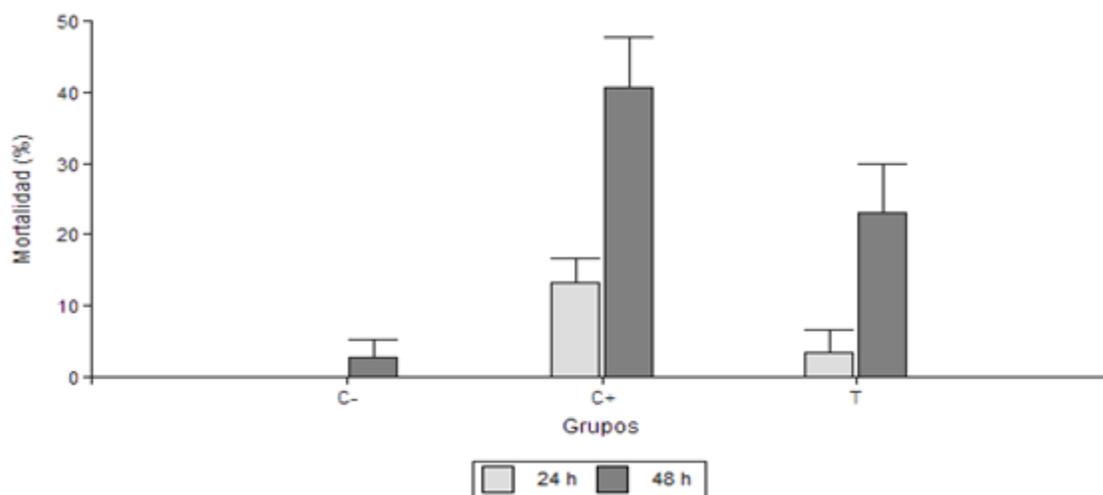
<b>Tiempos</b>	<b>Medio con toxinas PirA y PirB</b>			<b><i>V. parahaemolyticus</i></b>		
	<i>1:10</i>	<i>1:30</i>	<i>1:100</i>	<i>1x10<sup>6</sup> UFC/mL</i>	<i>1x10<sup>3</sup> UFC/mL</i>	<i>1x10<sup>2</sup> UFC/mL</i>
<b>12 h</b>	0%	0%	0%	0%	0%	0%
<b>24 h</b>	0%	0%	0%	0%	0%	0%
<b>36 h</b>	0%	0%	0%	33%	0%	0%
<b>48 h</b>	100%	33%	0%	100%	0%	0%
<b>60 h</b>		100%	0%		100%	33%

### 7.4.2.2 Reto por inmersión en medio con toxinas

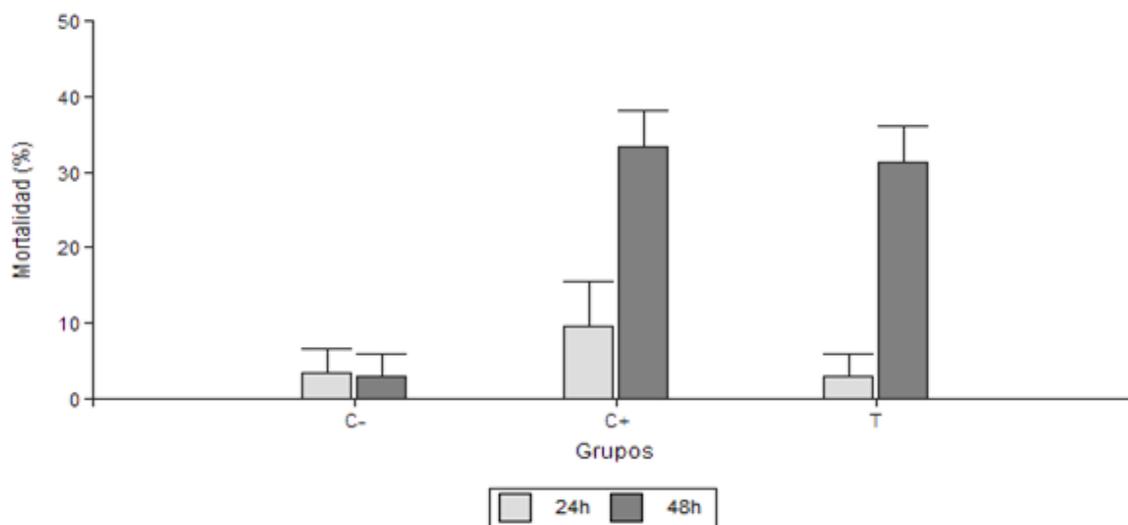
En el reto por inmersión en el medio de cultivo con las toxinas PirA y PirB libre de células de *V. parahaemolyticus* se observa una disminución significativa ( $p < 0.05$ ) en la mortalidad a las 24 h y 48 h en el grupo tratado con los fagos-scFv anti PirA y anti PirB respecto al grupo control positivo (Fig. 14).

### 7.4.2.3 Reto por inmersión con *V. parahamolyticus*

En el reto por inmersión con la cepa de *V. parahaemolyticus* asociada a AHPND se observa una disminución significativa ( $p < 0.05$ ) en el porcentaje de mortalidad a las 24 h pero no se observa a 48 h en el grupo tratado con los fagos-scFv anti PirA y anti PirB respecto al grupo control positivo (Fig. 15).



**Figura 14.** Porcentaje acumulado de mortalidad del reto por inmersión a el medio de cultivo con las toxinas PirA y PirB (C-) control negativo inmersión solo en medio TSB al 2.5% NaCl. (C+) control positivo inmersión en medios de cultivo con toxinas PirA y PirB (T) Grupo tratado inmersión en medio de cultivo con toxinas PirA y PirB con  $1 \times 10^{11}$  UFC/mL scFv- anti PirA y anti PirB.



**Figura 15.** Porcentaje acumulado de mortalidad del reto por inmersión a *V. parahaemolyticus* (C-) control negativo inmersión solo en medio TSB al 2.5% NaCl. (C+) control positivo inmersión a *V. parahaemolyticus* (T) Grupo tratado inmersión a *V. parahaemolyticus* y scFv- anti Pir A y anti Pir B.

## 8. DISCUSIÓN

La enfermedad de necrosis hepatopancreática aguda es la problemática actual de mayor impacto en la industria del cultivo de camarón tanto en México como en el mundo (FAO 2014). La patología de AHPND perjudica al hepatopáncreas y las características histopatológicas sugiere que esta enfermedad están involucradas al menos dos diferentes toxinas (Tran *et al.*, 2013; Nam, 2013). Se ha observado que el AHPND está limitado solo al hepatopáncreas y no se detecta infección en este órgano por bacterias al menos en la fase aguda (FAO, 2014). Se sugiere que el *V. parahaemolyticus* coloniza el tracto digestivo del camarón en la estación temprana de la infección, y que estas bacterias liberan toxinas que causan la necrosis del hepatopáncreas (Lightner *et al.*, 2012). Se tienen bien identificados los principales factores de virulencia de numerosas cepas de *Vibrio parahaemolyticus* que van desde las toxinas hemolíticas como la TDH hasta distintos sistemas de secreción (Broberg *et al.*, 2011). Estos factores son los que más se han descrito en la literatura debido a que las cepas mejor estudiadas son derivadas de casos clínicos que afectan al humano. Sin embargo, los estudios recientes de cepas asociadas a AHPND han presentado otros factores de virulencia que no habían sido descritos en *V. parahaemolyticus* (Gómez-Gil *et al.*, 2014; Joshi *et al.*, 2014; Kondo *et al.*, 2014; Yang *et al.*, 2014). Este último trabajo encontraron genes que codifican para toxinas PirA y PirB, toxinas que solo habían sido descritas en bacterias del género *Photorhabdus* y *Xenorhabdus*. Las cuales, se ha observado actúan como proteínas binarias para que exista una toxicidad, afectando el epitelio del intestino medio y provocando una severa inflamación y desprendimiento de las membranas apicales las toxinas en larvas de polillas (Blackburn *et al.*, 2006; Ahantarig *et al.*, 2009). En los camarones afectados por AHPND se muestran una histopatología similar, solo que en este caso en el epitelio del hepatopáncreas, por lo tanto se sospechaba que las toxinas PirA y PirB tuvieran participación en el AHPND ya que tanto los camarones y los insectos son artrópodos (Han *et al.*, 2015) Aún no se sabe cuál es el mecanismo preciso en

cómo actúan estas toxinas por lo que afecta a este grupo de animales, sin embargo, Lee *et al.* (2015) confirmaron que estas toxinas son las responsables de la de Enfermedad de Necrosis Hepatopancreática Aguda (AHPND). En este trabajo se realizaron una serie de retos en camarones con las toxinas recombinantes purificadas, con *E. coli* transformadas con los genes de las toxinas y con el plásmido (pVA1) que contiene las genes que codifican para las toxinas PirA y PirB. (Lee *et al.*, 2015). En ese mismo estudio también encontraron que para que existiera una mortalidad considerable era necesario que se encuentren las dos toxinas presentes. También se caracterizaron las toxinas por cristalografía y se observó que asociación conjunta de estas toxinas tienen una conformación estructural parecida a la toxina Bacillus cry y se sugiere que actúa como una formando poros en las membranas celulares (Lee *et al.*, 2015).

En la actualidad, el control de las vibriosis causada por *V. parahaemolyticus* en el cultivo de camarón es mediante el tratamiento con antibióticos (Venkateswara, 2014). Sin embargo, se está desestimando el uso antibióticos por las razones previamente mencionadas (FAO, 2000). Es por esto que se está tratando de controlar el brote del AHPND de distintas maneras las cuales incluyen medidas de bioseguridad más estrictas, un mejor manejo y tratamiento del agua, selección de semillas y stocks libres de contaminación y más resistentes a enfermedades (FAO, 2014); también el uso de sistemas novedosos como los Bioflocs (Ekasari *et al.*, 2014) y poli-cultivos (Zorriehzahra y Banaederakhshan, 2015); o tratamientos alternativos como es el uso de sustancias inocuas al medio ambiente como ácidos orgánicos en la dieta (Ng *et al.*, 2015); así como también el uso de extracto crudo Jengibre azul (Chaweepack *et al.*, 2015) o la aplicación de prebióticos y probióticos para estimular el propio sistema inmune del camarón; u otro uso de bacterias como las del genero Bacillus en el sedimento para cambiar el pH del mismo y evitar la proliferación del *V. parahaemolyticus* (MAC, 2013) e incluso la aplicación de terapia fágica en la cual se busca aislar bacteriófagos capaces de infectar cepas *V. parahaemolyticus* involucradas la enfermedad y así contralar a

las bacterias (Martínez-Díaz e Hipólito-Morales 2013; Mateus *et al.*, 2014). Todos estos tratamientos alternativos han tenido diferentes grados de eficacia sin embargo no han tenido un éxito rotundo en la erradicación de la enfermedad.

Por lo anterior, en este trabajo se propuso neutralizar toxinas PirA y PirB propias del patógeno con el uso de fragmentos anticuerpos como una alternativa viable e interesante para combatir al AHPND. La terapia con anticuerpos, se basa en el reconocimiento y neutralización de las moléculas tóxicas del microorganismo patógeno de una manera específica (Hudson y Souriau, 2003). Además de forma paralela, el sistema inmune del hospedero podrá interactuar con el microorganismo para su reconocimiento y neutralización de manera activa (Ardekani *et al.*, 2013). En la última década, la tecnología del despliegue en fagos de bibliotecas de anticuerpos se ha convertido en una de las técnicas efectivas y exitosas para seleccionar anticuerpos o péptidos que detecten y/o neutralicen de forma específica moléculas tóxicas o microorganismos patógenos (Cai *et al.*, 2010). Existen numerosos trabajos del uso de esta tecnología neutralizando toxinas de diferentes fuentes como el caso de toxinas de animales ponzoñosos como los alacranes (Riaño-Umbarila *et al.*, 2013), toxinas de otras bacterias (Garet *et al.*, 2010; Neri *et al.*, 2011) incluso de toxinas como la Rtx de *Vibrio vulnificus* (Hsu *et al.*, 2011). Incluso de toxinas de el mismo *V. parahaemolyticus* como en el trabajo de Wang *et al.* (2012) en el cual utilizaron con éxito la tecnología de despliegue en fagos para la obtención de un anticuerpo, llamado scFv-LA3, el cual puede inhibir la citotoxicidad de TLH de *V. parahaemolyticus*.

En este estudio se buscaron y seleccionaron por primera vez scFv policlonales, a partir de una biblioteca prefabricada de origen humano no inmune, capaces de reconocer con alta afinidad a las toxinas PirA y PirB. Esto con el fin de neutralizar a las toxinas para auxiliar a los camarones infectados por AHPND y así poder disminuir la mortalidad y que pueda servir como un potencial tratamiento paliativo contra la enfermedad. Las librerías de fagos de origen no inmune o vírgenes son construidas para seleccionar anticuerpos que se unan a cualquier antígeno, razón

por la cual se les considera de uso universal (Sidhu, 2000). De esta forma, se pudieron encontrar scFv capaces de unirse a las toxinas PirA y PirB sin la necesidad de realizar una inmunización o el previo conocimiento de la existencia o la naturaleza de esta interacción imitando de forma artificial el proceso de selección clonal del sistema inmune (Arap, 2005; Winter *et al.*, 1994). Algunas enfermedades de humanos y de animales superiores han sido controladas con el uso de anticuerpos o péptidos con distintos grados de éxito contra infecciones de origen viral y bacteriano (Juliano *et al.*, 2001; Tran *et al.*, 2009). Además los anticuerpos generados a partir de esta tecnología pueden ser utilizados en el desarrollo de tecnologías para el diagnóstico de enfermedades en formatos tales como ELISA, inmunofluorescencia, western blot, inmunodifusión, inmuno-PCR entre otras por su gran especificidad y afinidad. Incluso, utilizarlos como sustrato para identificar secuencias peptídicas o epitopos de las toxinas. Utilizando biblioteca de péptidos, se seleccionan fagos con péptidos que reconocen a las scFv anti-PirA y anti-PirB. Se secuencía el ADN de estos fagos y así conocer la secuencia de amino ácidos que fue reconocida por los scFv correspondientes (Böttger y Böttger, 2009).

Durante el proceso de selección o *biopanning* se logró enriquecer la población de fagos afines para las toxinas PirA y PirB. Esto quedó reflejado a través del incremento en el título de los fagos eluidos en cada una de las rondas. La dilución seriada permite su cuantificación indirecta cuando se infecta a las células TG1 en una placa y cada colonia representa la infección por un único clon de fago; la selección con antibiótico permite el conteo de colonias que representan las célula transformada, de tal manera que el número de colonias refleja el número de fagos infectivos según el manual de Ph.D.<sup>TM</sup> Phage Display Libraries New England BioLabs (NEB). Otra forma de evaluar este enriquecimiento consiste en medir mediante un inmunoensayo la unión de los scFv a las toxinas tanto PirA como PirB donde hubo un aumento de la señal en ambos casos, de la ronda I a la II, lo que supone un incremento en el número de fagos específicos y por tanto un

enriquecimiento de las secuencias más afines a las toxinas. En la primera ronda de selección, el número de lavados, y por lo tanto la astringencia en el proceso, hace que la selección no tan rigurosa y por lo tanto el número de clones de fagos es muy amplio y el rango de afinidades también (Vispo y Puchades, 2001). Al aumentar el número de lavados, y por lo tanto la astringencia, en el segundo biopanning el número de clones es menor pero su afinidad es mayor. Se observó un incremento del título entre la ronda I y la ronda II y al momento de realizar el phage ELISA con el mismo número de lavados para ambas rondas, la ronda II muestra un incremento en la señal dada por el enriquecimiento de los fagos más afines tanto para los scFv anti-PirA como scFv anti-PirB. Este proceso va seleccionando los fagos con mayor afinidad ya que en cada ronda se va depurando la selección al eliminar los fagos menos afines y amplificando los más afines para introducirlos a la siguiente ronda de biopanning. El hecho de que desde la ronda I se haya alcanzado valores muy altos hace que no haya una diferencia muy marcada con la ronda II podría ser que se alcanzó un punto de saturación (Arap, 2005). Además debe tomarse en cuenta que durante el biopanning pueden seleccionarse fagos con alta afinidad pero con desventajas para su propagación es decir su capacidad de replicación que hagan que no prevalezcan en la siguiente ronda (Yang y Nolan, 2007).

El rendimiento obtenido de fagos por mililitro de medio cultivado obtenido durante la propagación de los fagos fue ligeramente elevado pero coincide con lo reportado a lo reportado en la literatura (Manoutcharian, 2005; Vispo y Puchades, 2007). La especificidad de la unión de los scFv desplegados en los fagos se determinó por phage ELISA y el número de fago-scFv positivos coinciden en cantidad de fagos a la en la señal obtenida. Para determinar la afinidad de la biblioteca por las toxinas habría que considerar la valencia del scFv desplegado. La gran mayoría de los scFv son monovalentes y solo una fracción muy pequeña son polivalentes (NEB). La monovalencia de los scFv permite una selección de alta afinidad por la disminución de los efectos de la avidéz. Sin embargo, esa

misma avidéz causa una mayor sensibilidad al detectar uniones de baja afinidad (Seergeva *et al.*, 2006). No tenemos datos que sean comparables con los estimados por este trabajo para darle un real dimensión a nuestros valores de absorbancia y títulos (entradas y salidas de fagos-scFv) obtenidos ya que no conocemos la cantidad de antígeno en este caso las proteínas PirA y PirB que reconocieron los scFv policlonales. Sin embargo, comparando otros estudios se ajustan a valores esperados cuando existe una afinidad significativa por la molécula blanco.

El bloqueo de las toxinas PirA y PirB responsables de la patología del AHPND es un método eficaz y específico para el control de la infección. Hoy en día se sabe que son responsables (Han *et al.*, 2015; Lee *et al.*, 2015) y no el patógeno *per se*. Kondo *et al.*, 2015 encontraron que otros *Vibrios*, y no solo el *V. parahaemolyticus*, habían adquirido también los genes que codifican para estas toxinas. Es por eso que la especificidad del tratamiento hacia el factor de virulencia resulta de mayor relevancia. Dada la especificidad observada de los scFv para las toxinas PirA y PirB se puede pensar en su utilización biotecnológica como posibles neutralizantes. En general, la efectividad de los scFv como neutralizantes tóxicos radica en su habilidad para unirse a sitios activos o biológicamente relevantes de las proteínas blanco logrando bloquearlas. Los mecanismos involucrados en la infección de *V. parahaemolyticus* son poco conocidos al igual que la actividad de las toxinas involucradas (Huan, 2014; FAO, 2014). Los scFv pueden bloquear la patología bacteriana uniéndose a las toxinas claves para el desarrollo de la enfermedad impidiendo la acción de las mismas. Muchas compañías farmacéuticas utilizan el phage display para el descubrimiento de péptidos y anticuerpos basándose en estas propiedades (Drews, 2000). La unión del scFv a la proteína dependerá no solo de la estructura primaria del péptido sino también de su configuración tridimensional ya que existen epítomos continuos y discontinuos. Los epítomos continuos se encuentran formados de residuos adyacentes mientras que los discontinuos involucran residuos separados

ampliamente en la secuencia primaria de la proteína pero unidos espacialmente en la proteína plegada (Arap, 2005).

Aunque hasta hace poco tiempo se caracterizaron las toxinas PirA y PirB se optó por utilizar una librería de anticuerpos humano no imune. Una población de fagos que exponen distintos anticuerpos en sus superficies y que reconocen diferentes epítomos de un mismo antígeno, como en el caso de las rondas eluidas, equivale a anticuerpos policlonales. La potencialidad de estas rondas como neutralizantes queda manifiesta con trabajos previos con anticuerpos policlonales contra proteínas tóxicas que han logrado una supervivencia aumentada de los organismos y células expuestos a esta tipo de moléculas (Mustahq *et al.*, 2006; Ha *et al.*, 2008; Garet *et al.*, 2010; Neri *et al.*, 2011; Wang *et al.*, 2012).

La neutralización de los scFv anti PirA y anti PirB fue corroborada de manera indirecta mediante dos retos distintos. El reto con la cepa de *V. parahaemolyticus* asociado a AHPND se pudo observar una disminución en la mortalidad cuando se trató con los scFv anti-PirA y anti-PirB a las 24 h a las 48 h no hay una diferencia significativo con el grupo control. Se sugiere que la capacidad de los scFv se vio rebasada frente al crecimiento de la bacteria dentro de los contenedores con los camarones y al haber más crecimiento bacteriano también aumento la cantidad de toxina y la cantidad de fagos  $1 \times 10^{11}$  UFC/mL no fue la suficiente para poder neutralizar las toxinas a las 48 h. Sin embargo en el reto con el medio con las toxinas libre de células se pudo observar una disminución significativa de la mortalidad tanto a las 24 h como a las 48 h en el grupo tratado con scFv anti-PirA y anti-PirB respecto al grupo control positivo. En este caso la cantidad de toxinas fue constante ya que no había células bacterianas que excretaran más toxinas y por lo tanto la cantidad de  $1 \times 10^{11}$  UFC/mL fagos scFv si lograron neutralizar a las toxinas y por lo tanto disminuir la mortalidad. La mayoría de los trabajos *in vivo* e *in vitro* donde se utiliza scFv para bloquear o neutralizar toxinas de distinto índole han encontrado distintos rangos de éxito (Hsu *et al.*, 2011; Neri *et al.*, 2011; Garet *et al.*, 2010; Riaño-Umbarila *et al.*, 2013; Wang *et al.*, 2012). Esto sugiere que la

utilización de scFv junto con el despliegue de fagos como terapia o de manera preventiva es una alternativa para reducir los efectos de las enfermedades hasta en organismos utilizados en la acuicultura.

El formato para la utilización de estas herramientas biotecnológicas se determinará dependiendo el uso que se les quiera dar, ya sea como terapia o como reactivo. Si se desea usar scFv como terapia se tiene la opción de utilizar al fago como agente de liberación y coadyuvante (Manoutcharian, 2005) o si se desea se puede producir solo el scFv para la determinación de su constante de afinidad y posterior uso como terapia o como reactivo para la investigación o detección del AHPND. Más aún se puede utilizar estos scFv anti-PirA y PirB en contra de una librería de péptidos para identificar epítomos de las toxinas, esto con el fin de que puedan ser utilizados como potenciales vacunas para prevenir futuros brotes.

## 9. CONCLUSIONES

- El método que se utilizó para purificación de las toxinas con anticuerpos inmovilizados en microesferas de alginato, resulto ser una manera sencilla rápida y eficiente para la purificación de proteínas. Se necesitan más ensayos para medir el rendimiento, optimizar y estandarizar esta técnica.
- Se pudieron obtener scFv policlonales capaces de reconocer a las toxinas PirA y PirB a partir de una biblioteca de anticuerpos de humanos no inmune mediante la técnica del despliegue de fagos.
- Se tuvieron una gran cantidad de fagos-scFv con que reconocieron a las toxinas desde la primera ronda. Con una amplio rango de afinidad
- Se pudo comprobar la presencia de las toxinas y su excreción por parte de la cepa de *V. parahaemolyticus* con los scFv anti-PirA y scFv anti-pirB previamente seleccionados
- El porcentaje de mortalidad disminuyó a las 24 h en ambos retos (En medio con toxina y a *V. parahamolyticus*) cuando se usaron los fagos-scFv anti-PirA y anti-PirB.
- El porcentaje de mortalidad disminuyó a las 48 h en el reto con medio con las toxinas y los fagos, no así en el reto con el *V. parahamolyticus* con los fagos scFv anti-PirA y anti-PirB.

## 10. LITERATURA CONSULTADA

Alvarez, J., B. Austin, A. Alvarez, C. Agurto. 2000. Especies de *Vibrio* y *Aeromonas* aisladas del intestino de camarones marinos sanos silvestres y cultivados en Venezuela. *Vet Tropical*. 25 (1): 5-27.

Ahantarig A., N. Chantawat, N.R. Waterfield, R. French-Constant, P. Kittayapong. 2009. PirAB toxin from *Photorhabdus asymbiotica* as a larvicide against dengue vectors. *Appl Environ Microbio*. 75 (13): 4627–9.

Arap M.A. 2005. Phage display technology-Applications and innovations. *Genet Mol Biol*. 28(1):1-9.

Ardekani L.S., L.M. Gargari, I. Rasooli, M.R. Bazl, M. Mohammadi, W. Ebrahimzadeh, H. Zare. 2013. A novel nanobody against urease activity of *Helicobacter pylori*. *Int J Infect Dis*. 17(9): 723–8.

Arthur J.R., C.R. Lavilla-Pitogo, R.P. Subasinghe. 2000. Use of chemicals in aquaculture in Asia. *FAO/SEAFDEC/CIDA*.

Azzazy H.M., W.E. Highsmith. 2002. Phage display technology: clinical applications and recent innovations. *J Clin Biochem*. 35(6): 425–445.

Blackburn M.B., R.R. Farrar, N.G. Novak, S.D. Lawrence. 2006. Remarkable susceptibility of the diamondback moth (*Plutella xylostella*) to ingestion of Pir toxins from *Photorhabdus luminescens*. *Entomol Exp Appl*. 121: 31–37.

Bradford, M.M. 1976. Rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem*. 72: 248–254.

Broberg C. A., T.J. Calder, K. Orht. 2011. *Vibrio parahaemolyticus* cell biology and pathogenicity determinants. *Microb Infect*. 13: 992-1001.

Böttger V., A. Böttger. 2009. Epitope Mapping Using Phage Display Peptide Libraries. En: Reineke, U., Schutkowski M. (eds) Protocol Epitope Mapping Protocols. Segunda Edicion. USA, New York. 181-201 pp.

Cabello F. 2006. Heavy use of prophylactic antibiotics in aquaculture. *Microbial*. 8: 1137- 1144.

Chaemchuen S., S. Rungpragayphan, Y. Poovorawan, K. Patarakul. 2011. Identification of candidate host proteins that interact with LipL32, the major outer membrane protein of pathogenic *Leptospira*, by random phage display peptide library. *Vet Microbiol*. 153: 178–185.

Chaweepeak T., B. Muenthaisong, S. Chaweepeak, K. Kamei. 2015. The Potential of Galangal (*Alpinia galanga*) Extract against the Pathogens that Cause White Feces Syndrome and Acute Hepatopancreatic Necrosis Disease (AHPND) in Pacific White Shrimp (*Litopenaeus vannamei*). *Int J Biol*. 7 (3): 8–17.

Cai J., Y.W. Zhong, X. Jing , L. Chen, F. Li, D.P. Xu. 2010. Screening of mimotopes of swine influenza virus a (H1N1) by phage display technology. *Med J Chin PLA*. 35(1): 61-67.

De Schryver P., T. Defoirdt, P. Sorgeloos. 2014. Early mortality syndrome outbreaks: a microbial management issue in shrimp farming. *PLoS Pathog*. 10(4): 104-113.

Doppalapudi V. R. 2010. Chemical generation of bispecific antibodies. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A*. 107:22611–22616.

Drews, J. 2000. Drug discovery: a historical perspective. *Science*. 287: 1960–1964.

Ekasari J., M.H. Azhar, E.H. Surawidjaja, S. Nuryati, P. De Schryver, P. Bossier. 2014. Immune response and disease resistance of shrimp fed biofloc grown on different carbon sources. *Fish Shellfish Immunol* 41: 332-339.

FAO.2012. The State of World Fisheries and Aquaculture 2012. Rome.

FAO. 2014. Report of the FAO/MARD Technical Workshop on Early Mortality Syndrome (EMS) or Acute Hepatopancreatic Necrosis Syndrome (AHPND) of Cultured Shrimp (under TCP/VIE/3304). Hanoi, Viet Nam, 25–27 June 2013. FAO Fisheries and Aquaculture Report.

Flegel T.W., C.F. Lo. 2014. Announcement regarding free release of primers for specific detection of bacterial isolates that cause acute hepatopancreatic necrosis disease (AHPND). 1-7.

[http://www.enaca.org/modules/library/publication.php?publication\\_id=1128](http://www.enaca.org/modules/library/publication.php?publication_id=1128).

Garet E., A. Cabado, J.M. Vieites, A. Gonzalez-Fernandez. 2010. Rapid isolation of single-chain antibodies by phage display technology direct against one of the most potent marine toxins: Palytoxin. *Toxicon*. 55: 1519-1526.

Garrigues D., G. Arévalo G. 1995. An evaluation of the production and use of live bacterial isolate to manipulate the microbial flora in the commercial production of *Penaeus vannamei* post larvae in Ecuador. Proceedings of the Special Session on Shrimp Farming. World Aquaculture Society. Baton Rouge, Louisiana, U.S.A. pp 53-59.

Gomez-gil B., S. Soto-rod ríguez, R. Lozano, M. Betancourt-lozano. 2014. Draft Genome Sequence of *Vibrio parahaemolyticus* Strain M0605, Which Causes Severe Mortalities of Shrimps in Mexico. *genomeA*. 2(2): 13-14.

Ha Y.M., Y.L. Kim, K.H. Kim. 2008. Neutralization of white spot syndrome virus (WSSV) for *Penaeus chinensis* by antiserum raised against recombinant VP19. *J Env Biol*. 29(4): 513-517.

Han J. E., K.F.J. Tang, L.H. Tran, D.V. Lightner. 2015. Photorhabdus insect-related (Pir) toxin-like genes in a plasmid of *Vibrio parahaemolyticus*, the causative agent of acute hepatopancreatic necrosis disease (AHPND) of shrimp. *Dis Aquat Organ*. 113(1): 33–40.

Han J. E., L.L. Mohny, K.F.J. Tang K, C.R. Pantoja, D.V. Lightner. 2015. Plasmid mediated tetracycline resistance of *Vibrio parahaemolyticus* associated with acute hepatopancreatic necrosis disease (AHPND) in shrimps. *Aquaculture*. 2: 17–21.

Huan U. E. 2014. Understanding EMS and developing a Mitigation Potocol. Bio Valance FAVA 2014 28-30th Nov 2014 Marina Bay Sands – Singapore.

Hudson P.J., C. Souriau. 2003. Engineered antibodies. *Nat Med*. 9 (1):129–134..

Hsu F., L. Chou, L. Hor, H. Chang. 2011. A human sigle-chain variable fragment targeting to *Vibrio vulnificus* RtxA toxin. *J Microbiol Methods*. 84: 94-100.

Joshi J., J. Srisala, V.H. Truong, I.T. Chen, B. Nuangsaeng, O. Suthienkul, S. Thitamadee. 2014. Variation in *Vibrio parahaemolyticus* isolates from a single Thai shrimp farm experiencing an outbreak of acute hepatopancreatic necrosis disease (AHPND). *Aquaculture*. 428(4): 297–302.

Juliano R.L., A. Astriab-Fisher, D. Falke. 2001. Macromolecular therapeutics. *Mol Interv*. 1: 40–53.

Kaneko T., R.R. Colwell. 1973. Ecology of *Vibrio parahaemolyticus* Chesapeake Bay. *J Bacteriol*. 113(1): 24–32.

Kondo H., S. Tinwongger, P. Proespraiwong, R. Mavichak, S. Unajak, R. Nozaki. 2014. Draft Genome Sequences of Six Strains of *Vibrio parahaemolyticus* Isolated from Early Mortality Syndrome / Acute Hepatopancreatic Necrosis Disease Shrimp in Thailand. *genomeA*. 2(2): 2–3.

Kondo H., P.T. Van, L.T. Dang, I. Hirono. 2015. Draft genome sequence of non-*Vibrio parahaemolyticus* acute hepatopancreatic necrosis disease strain KC13.17.5, isolated from diseased shrimp in Vietnam. *genomeA*. 3(5): 14-15.

Kumar B. K., P. Raghunath, D. Devegowda, V.K. Deekshit, M.N. Venugopal, I. Karunasagar. 2011. Development of monoclonal antibody based sandwich ELISA

for the rapid detection of pathogenic *Vibrio parahaemolyticus* in seafood. *Int J Food Microbiol.* 145(1): 244–9.

Lightner D.V., R.M. Redman, C.R. Pantoja, B.L. Noble, L.H. Tran. 2012. Early mortality syndrome affects shrimp in Asia. *Glob Aquacult Advocate*: 40.

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

Lowry O.H, N.J. Rosenbrough, A. Farr, R.J. Randall. 1951. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem*; 193:265-75.

Manoutcharian K. 2005. Bacteriophages as tools for vaccine and drug development. *Espert Rev. Vaccines* 4(1):5-7

Martínez-Díaz S. F., A. Hipólito-Morales. 2013. Efficacy of phage therapy to prevent mortality during the vibriosis of brine shrimp. *Aquaculture.* 400 (1): 120–124.

Mateus L., L. Costa, Y.J. Silva, C. Pereira, A. Cunha, A. Almeida. 2014. Efficiency of phage cocktails in the inactivation of *Vibrio* in aquaculture. *Aquaculture*, 424 (1): 167–173.

McCarter L. 1999. The multiple identities of *Vibrio parahaemolyticus*. *J. Mol. Microbiol. Biotechnol.* 1: 51-57.

Ministry of Agriculture and Cooperatives (MAC) in Thailand, Department of Fisheries. 2013. Mitigation Measures for Management and Control of EMS/AHPNS Risk, Strengthening of Credibility for Thai Shrimp Industry.

Musthaq S., K. Yoganandhan, R. Sudhakaran, S. Kumar, A.S Hameed. 2006. Neutralization of white spot syndrome virus of shrimp by antiserum raised against recombinant VP28. *Aquaculture* 253(1-4): 98-104.

Nam V. 2013. FAO Fisheries and Aquaculture Report No. 1053 Report of the FAO / MARD Technical Workshop on Early Mortality Syndrome (EMS ) or Acute Hepatopancreatic Necrosis Syndrome ( AHPNS ) of Cultured Shrimp ( under TCP / VIE / 3304 ) (Vol. 1053, pp. 25–27).

New England BioLabs. Tools, P. (n.d.). Ph . D . <sup>TM</sup> Phage Display Libraries.

Neri P., N. Shigemori, S. Hamada-Tsutsumi, K. Tsukamoto, H. Arimitsu, T. Shimizu, Y. Akahori, Y. Kurosawa, Y. Tsuji. 2011. Single chain variable fragment antibodies against Shiga Toxins isolated from a human antibody phage display library. *Vaccine*. 29: 5340-5346.

Ng W., C. Koh, C. Teoh, N. Romano N. 2015. Farm-raised tiger shrimp, *Penaeus monodon*, fed commercial feeds with added organic acids showed enhanced nutrient utilization, immune response and resistance to *Vibrio harveyi* challenge. *Aquaculture*, 1–9.

Nunan L., D. Lightner, C. Pantoja, S. Gomez-Jimenez. 2014. Detection of acute hepatopancreatic necrosis disease (AHPND) in Mexico. *Dis Aquat Organ*. 111(1): 81–6.

Okada N., S. Matsuda, J. Matsuyama, K.S. Park, C. de los Reyes, K. Kogure, T. Honda, T. Iida. 2010. Presence of genes for type III secretion system 2 in *Vibrio mimicus* strains. *BMC Microbiol*. 10: 302-314.

Pini A., L. Bracci. 2000. Phage display of antibody fragments. *Curr Protein Pept Sci*. 1:155–69.

Pande J., M.M. Szewczyk, A.K. Grover. 2010. Phage display: concept, innovations, applications and future. *Biotechnol. Adv*. 28: 849–858.

Riaño-Umbarila L., T. Olamendi-Portugal, C. Morelos-Juarez, G.B. Gurrola, L.D. Possani, B. Becerril. 2013. A novel human recombinant antibody fragment capable of neutralizing Mexican scorpion toxins. *Toxicon*, 76: 370-376.

Rodríguez J., Y. Espinosa, F. Echaverria, G. Cárdenas, R. Román, S. Stern. 2007. Exposure to probiotics and  $\beta$ -1,3/1,6-glucans in larviculture modifies the immune response of *Penaeus vannamei* juveniles and both the survival to White spot Syndrome Virus challenge and pond culture. *Aquaculture*. 273: 405-415.

Safae Ardekani L., S.L. Mousavi, S.L. Gargari, I. Rasooli, M. RajabiBazl, M. Mohammadi, W. Ebrahimizadeh, H. Bakherad, H. Zare H. 2013. A novel nanobody against urease activity of *Helicobacter pylori*. *Int J Infect Dis*. 17: 723–728.

Sambrook J., D.W. Russel. 2001. *Molecular cloning. A laboratory manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press.

Sergeeva A., M.G. Kolonin, J.J.Molldrem, H. Pasqualini. 2006. Display Technologies: application for the discovery of drug and gene delivery agents. *Adv Drug Deliv Rev* 58(15): 1622-1654.

Sidhu S.S.2000. Phage display in pharmaceutical biotechnology. *Curr Opin Biotech*. 11: 610-616.

Smith G.P. 1985. Filamentous fusion phage: novel expresion vectors thar display cloned antigens on the virion surface, *Science*. 228: 1315-1317.

Su Y.C., C. Liu. 2007. *Vibrio parahaemolyticus*: a concern of seafood safety. *Food Microbiol*. 24: 549-558.

Thompson J., S. Gregory, S. Plummer, R.J. Shields, A.F. Rowley. 2010. An in vitro and in vivo assessment of potential *Vibrio* spp. As probiotics for the pacific White shrimp *Litopenaeus vannamei*. *J Aplic Micribiol*.109: 1177-1187.

Tran M., B. Zhou, P.L. Petterson, M.J. Gonzalez, S. Mayfield. 2009. Synthesis and Assembly of a Full-Length Human Monoclonal Antibody in Algal Chloroplasts. *Biotechnol Bioeng.* 104 (4): 663-673.

Tran L., L. Nunan, R.M. Redman, L.L. Mohny, C.R. Pantoja, K. Fitzsimmons, D.V. Lightner. 2013. Determination of the infectious nature of the agent of acute hepatopancreatic necrosis syndrome affecting penaeid shrimp. *Dis Aquat Organ*, 105 (1): 45–55.

Venkateswara R. 2014. *Vibriosis en la acuicultura del camarón*. Neospark Drugs and Chemicals.

Vimala B., T.K. Lin, V.C. Chong. 2010. Isolation Detection and Genomic Differentiation of *Vibrio cholerae* and *Vibrio parahaemolyticus* in Bachok Kelantan. *Malaysian J. Sci.* 29: 1–10.

Vispo N.S., Y. Puchades. 2001. Bacteriófagos: de la terapia con fagos a la biología combinatoria. *Biotec Aplic.* 1: 135-147

Wang R., S. Fang, D. Wu, J. Lian, J. Fan, Y. Zhang, W. Lin. 2012. Screening for a single-chain variable-fragment antibody that can effectively neutralize the cytotoxicity of the *Vibrio parahaemolyticus* thermolabile hemolysin. *Appl Environ Microbiol.* 78(14): 4967–4975.

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

Winter G., A.D. Griffiths, R.E. Hawkins, H.R. Hoogenboom. 1994. Making Antibodies by Phage Display Technology. *Annu. Rev. Immunol.* 12: 433-455.

Yang L., J.P. Nolan. 2007. High-throughput screening and characterization of clones selected from phage display libraries. *Cytometry Part A.* 71: 625-631.

Yang Y., I. Chen, C. Lee, C. Chen, S. Lin L. Hor L, Y. Huang. 2014. Draft Genome Sequences of Four Strains of *Vibrio parahaemolyticus* , Three of Which Cause Early Mortality Syndrome / Acute Hepatopancreatic Necrosis Disease in Shrimp in China and Thailand. genomeA. 2(5), 2–3.

Yeung P., K.J. Boor. 2004. Epidemiology, pathogenesis, and prevention of foodborne *Vibrio parahaemolyticus* infections, Foodborne Pathog. Dis. 1: 74-88.

Yi G., Z. Wang, Y. Qi. 2003. A phage-displayed peptide can inhibit infection by white spot syndrome virus shrimp. J. Gen. Virol. 84: 2545-2553.

Zorriehzahra M.J., R. Banaederakhshan .2015. Early mortality syndrome (EMS) as new emerging threat in shrimp industry. Adv. Anim. Vet. Sci. 3(2): 64-72.