

ARTÍCULOS

Nanovacunas en acuicultura, una alternativa para el manejo de enfermedades

Nanovaccines in aquaculture, an alternative for disease management

Norma Hernández

ORCID: [0000-0003-1128-5016](https://orcid.org/0000-0003-1128-5016)/ehernandez@pg.cibnor.mx

Maestría en Ciencias, Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste SC (CIBNOR)

Elizabeth Monreal-Escalante

ORCID: [0000-0002-2798-6151](https://orcid.org/0000-0002-2798-6151)/emonreal@cibnor.mx

Investigadora, Cátedra Conacyt/CIBNOR

Gabriela Navarro-Tovar

ORCID: [0000-0003-3789-2324](https://orcid.org/0000-0003-3789-2324)/gnavarrotovar@gmail.com

Investigadora, Cátedra Conacyt/Universidad Autónoma de San Luis Potosí (UASLP)

Carlos Angulo

ORCID: [0000-0002-7965-1679](https://orcid.org/0000-0002-7965-1679)/eangulo@cibnor.mx

Investigador, CIBNOR

RESUMEN

Dentro de la actividad de acuicultura, que es de las más importantes del mundo, existen factores que impiden el desarrollo esperado y causan pérdidas de millones de dólares. Uno de estos factores es la vibriosis, una de las enfermedades más infecciosas y que tiene un gran impacto en esta actividad. El objetivo de este artículo es exponer las características de esta enfermedad que daña los peces de las zonas tropicales y subtropicales en todo el mundo, además de exponer todas las vacunas que existen para tratar de erradicarla. Actualmente existen 26 vacunas de uso comercial, pero la mayoría están dirigidas para el salmón del Atlántico y se ha dejado desprotegidas a muchas otras especies de peces, además de los altos costos de producción de vacunas. A pesar de que existen estos antibióticos para la trata de la vibriosis, el uso inadecuado ha traído como consecuencia la creación de cepas más dañinas.

PALABRAS CLAVE

acuicultura, vibriosis, nanovacunas, peces

ABSTRACT

Among the aquaculture activity, which is among the most important in the world, there are factors that impede the expected development and cause losses of millions of dollars. One of these factors is vibriosis, one of the most infectious diseases and it has a great impact on this activity. The objective of this article is to expose the characteristics of this disease that damages fish in tropical and subtropical zones around the world, in addition to exposing all the existent vaccines to try to eradicate it. There are currently 26 vaccines in commercial use, but most are aimed at the Atlantic salmon and many other fish species have been left unprotected, in addition to the high costs of vaccine production. In spite of the existence of these antibiotics to treat vibriosis, improper use has resulted in the creation of more harmful strains.

KEY WORDS

aquaculture, vibriosis, nanovaccines, fish

La acuicultura es el sector primario de más rápido crecimiento en el mundo; sin embargo, las enfermedades infecciosas representan un impedimento importante para el desarrollo de esta actividad y son la causa más importante de pérdidas económicas. Se calcula que el 10% de la producción acuícola mundial se ve afectada por enfermedades infecciosas, lo que representa más de diez mil millones de dólares en pérdidas anuales para el sector (Adams, 2019).

En este contexto, la vibriosis es una de las enfermedades infecciosas más graves que afectan a peces en zonas tropicales y subtropicales del mundo, causando una alta mortalidad en la acuicultura. Entre los patógenos que pueden causar la vibriosis se encuentran *Vibrio harveyi*, *V. parahaemolyticus*, *V. alginolyticus* y *V. anguillarum*. Aunque los antibióticos pueden ser muy efectivos en el tratamiento de enfermedades bacterianas, su uso inapropiado ha dado lugar a la generación de cepas de bacterias resistentes, además de causar daño al ambiente.

Por ello, desde hace algunas décadas, las vacunas se reconocen como una forma segura, ecológica y eficiente para controlar las enfermedades infecciosas. Una vacuna le confiere protección a un organismo contra enfermedades infecciosas. Actualmente existen 26 vacunas comerciales para peces; sin embargo, están dirigidas principalmente al salmón del Atlántico (*Salmo salar*), mientras que para otras especies de peces su uso está poco establecido debido a que no existen opciones para ellas, bajo rendimiento o elevado costo (Ma et al., 2019).

La mayoría de las vacunas comerciales utilizan patógenos muertos que se administran por inyección intraperitoneal, aunque en algunos países está permitido el uso de vacunas de organismos atenuados, por ejemplo, en Estados Unidos donde se utilizan en el bagre (*Ictalurus punctatus*). El uso de organismos completos en vacunas representa un problema cuando éstos son difíciles o costosos de cultivar, aunado a que los organismos atenuados pueden recuperar su virulencia.

Por ello, la búsqueda de nuevas alternativas ha llevado al desarrollo y autorización de una vacuna de ADN contra necrosis hematopoyética infecciosa y de una vacuna basada en un péptido contra el virus de la necrosis pancreática infecciosa para peces, en Canadá y Noruega, respectivamente. Por otro lado, las vacunas comerciales para peces se formulan para ser administradas por diferentes vías, dependiendo de la edad y el tamaño del pez. Las vías de administración incluyen la vía oral (mediante mezcla con el alimento), la inmersión (o baño) y la inyección por vía intraperitoneal o intramuscular.

La vacunación por inyección normalmente provee la protección más alta, aunque está asociada con un manejo intensivo y estrés para los organismos. Debido a esto, la administración oral se considera la ruta ideal para administrar sustancias bioactivas en peces de cultivo. El uso de vacunas orales en peces representa facilidad para los acuicultores, ahorro de tiempo, bienestar animal y menores costos de manipulación. Sin embargo, uno de los retos

a los que se enfrentan las vacunas orales es el riesgo de degradación de los compuestos activos en el ambiente intestinal hostil antes de que llegue de manera efectiva al sitio de acción donde se producirá la respuesta inmunitaria.

Una de las alternativas que se han explorado para aumentar la efectividad de las vacunas orales es el uso de nanovacunas. Las nanovacunas son vacunas suministradas utilizando partículas (nanopartículas) que tienen un tamaño inferior a los 100 nanómetros (nm). Un nanómetro equivale a una mil millonésima parte de un metro y, poniéndolo en perspectiva, para dimensionar su tamaño, un nanómetro es alrededor de 1/80000 parte del diámetro de un cabello humano, es decir, una hoja de papel tiene unos 100,000 nm de espesor.

En las nanovacunas, las nanopartículas son las encargadas de llevar (o acarrear) el componente vacunal (proteína, péptido, entre otras moléculas) al sitio donde se llevará a cabo la respuesta. Las ventajas del uso de nanopartículas como acarreadoras de vacunas incluyen mejorar la estabilidad, promover la protección contra la degradación digestiva y tener propiedades adyuvantes, las cuales son sustancias que tienen la capacidad de potenciar los efectos de las vacunas. Aunque sus beneficios son evidentes, el desarrollo de nanovacunas presenta ciertos retos, como la dificultad de producirlas con propiedades estables, su potencial toxicidad y, además, que su distribución en sistemas biológicos no está bien dilucidada, al igual que su eliminación.

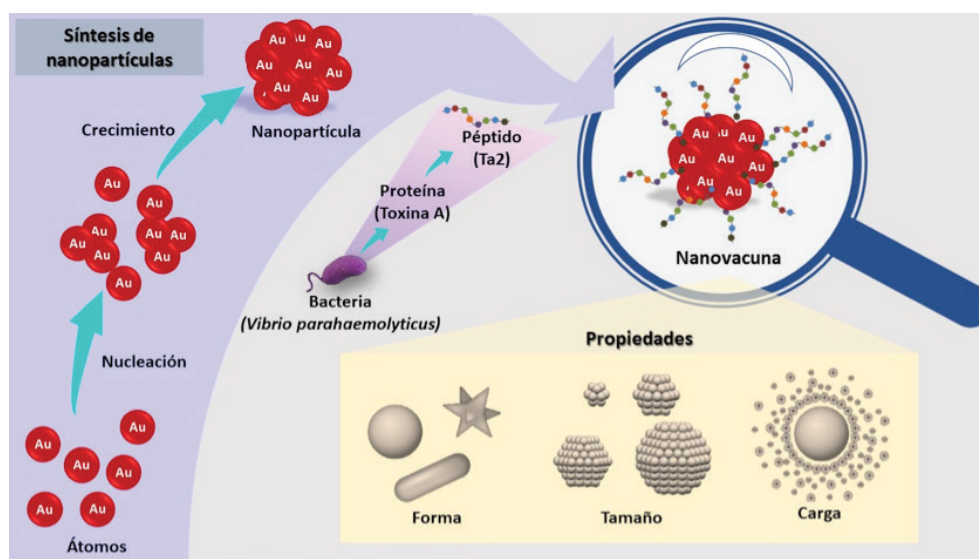
La citotoxicidad de una nanopartícula estará determinada por diversos factores, entre los que se incluyen sus propiedades fisicoquímicas, como el tamaño, la forma, la carga, la vía de exposición y la dosis. Existen dos enfoques por los cuales se pueden obtener nanopartículas: el primero es el enfoque descendente, donde un material a macroescala es transformado en finas partículas de tamaños nanométricos mediante métodos físicos, como la molienda o la litografía, y el segundo se trata del enfoque ascendente, donde las nanopartículas son sintetizadas por métodos químicos a partir de precursores atómicos o moleculares.

La naturaleza química de las nanopartículas es muy variada, pero se pueden dividir en orgánicas, inorgánicas y con base de carbono. En el caso de las nanovacunas para peces, las más investigadas son aquellas que están basadas en el uso de nanopartículas orgánicas, principalmente las de quitosano polimérico y de ácido poli (láctico-co-glicólico) (PLGA) (Shalan et al., 2016). No obstante, se ha encontrado que las nanopartículas de oro (AuNPs) tienen una alta estabilidad, baja citotoxicidad y alta biocompatibilidad. Además, las AuNPs pueden servir como adyuvantes, pues mejoran su actividad en el organismo donde se administran, lo que las convierte en candidatas para ser utilizadas como acarreadoras de vacunas (figura 1).

En este contexto, una línea de investigación que se sigue en el Grupo de Inmunología y Vacunología del Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste (CIBNOR), en colaboración con la Universidad Autónoma de San Luis Potosí (UASLP), es obtener y caracterizar la forma, tamaño y carga de una vacuna basada en AuNPs y en un péptido proveniente de la toxina A

de la bacteria *Vibrio parahaemolyticus*, como una alternativa para ser usada como nanovacu-
na oral contra *V. parahaemolyticus* en peces.

Figura 1
Nanovacuna basada en nanopartículas de oro y
un péptido de la bacteria *Vibrio parahaemolyticus*



Método

Las nanopartículas de oro fueron sintetizadas por el método de Turkevich. Éste es un método químico donde átomos de oro provenientes de una sal de oro son químicamente reducidos a oro metálico y, al comenzar a unirse, forman pequeños grupos de átomos agregados llamados centros de nucleación, a los que posteriormente se les unirán más átomos hasta alcanzar tamaños entre nueve y 120 nanómetros.

La reducción del oro y la estabilización de las nanopartículas se logra mediante la adición de citrato de sodio. Luego de la síntesis, las nanopartículas de oro, cuya carga superficial es negativa, fueron puestas en contacto con el péptido, proveniente de la toxina A de la bacteria *V. parahaemolyticus*, que presenta una carga positiva para que, mediante fuerzas físicas, se adhiriera sobre la superficie de las nanopartículas.

Posteriormente, se realizó la caracterización fisicoquímica de las nanopartículas y de las nanopartículas con el péptido. Los espectros de absorción de las AuNPs desnudas (sin péptido) y las AuNPs con el péptido adsorbido fueron obtenidos por la técnica de espectrofotometría ultravioleta-visible (UV-Vis). Además, las muestras se caracterizaron por dispersión de luz dinámica y electroforética (Malver-Zetasier nano ZS), con el fin de determinar el tamaño

y la carga superficial de las estructuras antes y después de las modificaciones debidas a la adición del péptido. La forma y el tamaño de las nanopartículas desnudas se determinó por medio de microscopía electrónica de transmisión (TEM).

Resultados

En las absorciones ópticas que se midieron antes y después de agregar el péptido a las nanopartículas de oro se encontró que el pico de máxima absorción para las nanopartículas sin péptido se ubica en 525 nm y en 575 nm para la nanovacuna. La imagen obtenida por TEM de las AuNPs se muestra en la figura 2.

Figura 2
Micrografía de nanopartículas de oro (19 ± 5)*
sintetizadas por el método de Turkevich

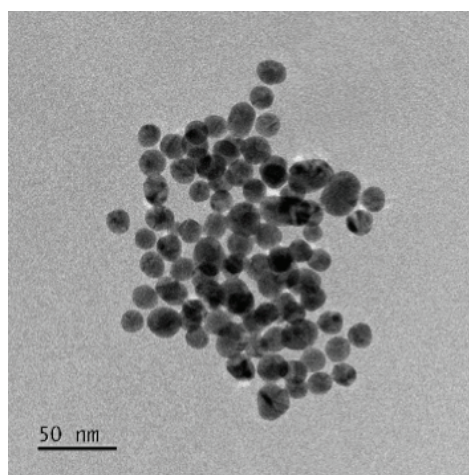


Imagen obtenida por microscopía electrónica de transmisión (TEM) en el Centro de Investigación en Ciencias de la Salud y Biomedicina (CICSAB) de la UASLP.

* Es el valor del diámetro hidrodinámico en nm, obtenido en el equipo de dispersión dinámica de luz al dispersar las AuNPs con péptido, en una solución fisiológica a pH 7.4 (*buffer* de fosfatos).

En la imagen se observan partículas que tienen forma esférica, con un tamaño de alrededor de los 16 nm. Los valores del diámetro y la carga obtenidos por medio de las técnicas de dispersión de luz dinámica y electroforética se presentan en la tabla 1. Las AuNPs sin péptido tienen una carga superficial negativa de -48 milivolts, mientras que la carga de la nanovacuna es de -5.6 milivolts. Además, se encontró que el diámetro de las AuNPs desnudas cuando están en solución es de 19 nm y que aumenta a 317 nm cuando se agrega el péptido.

Tabla 1
Tamaño y carga superficial de nanopartículas de oro (AuNPs) y nanovacuna

Muestra	Tamaño (nm \pm DE)	Carga superficial (mV \pm DE)
AuNPs	19 \pm 5	-48
Nanovacuna	317 \pm 109	-5.6

Discusión

En los procesos de síntesis de nanopartículas no es posible observar de forma directa lo que está ocurriendo ni tampoco si el producto de la síntesis contiene nanopartículas debido a que, por su tamaño, son imperceptibles al ojo humano e incluso al microscopio óptico. Sin embargo, una manera rápida de obtener información es utilizando técnicas ópticas, como la espectrofotometría. Las mediciones mediante espectrofotometría UV-Vis arrojan una curva (conocida como espectro de absorción) que representa la luz absorbida por la muestra al hacer pasar por ella un láser.

Las AuNPs con formas esféricas y tamaños menores a los 100 nm tienen un espectro de absorción con un pico máximo entre las longitudes de onda de 520 y 580 nm. En general, entre mayor sea la longitud de onda del pico máximo, mayor será el tamaño de las nanopartículas de oro. Esto significa que un cambio en el espectro de absorción también representa un cambio en la superficie de las nanopartículas.

En el caso de las nanopartículas de oro sintetizadas en este trabajo, presentan un solo pico de absorción, lo que indica que se trata de nanopartículas con formas esféricas. Además, el hecho de que exista un movimiento en la longitud de onda del pico de máxima absorción de la nanovacuna (575 nm) con respecto a las nanopartículas sin péptido (525 nm) es una primera evidencia para suponer que hubo un cambio en la superficie de las AuNPs al añadir el péptido y que éste se adhirió logrando aumentar el tamaño de las nanopartículas.

La microscopía electrónica, a diferencia de la microscopía óptica, utiliza un haz de electrones que permite obtener imágenes de objetos con tamaños del orden de nanómetros. La medición de los diámetros individuales de las nanopartículas que se observan en las imágenes obtenidas por TEM permiten determinar su tamaño promedio.

El tamaño es uno de los factores que determinan la citotoxicidad de nanopartículas. Se ha encontrado un efecto citotóxico en nanopartículas de oro con tamaños menores de 2 nm, mientras que las que tiene tamaños mayores a los 15 nm no son tóxicas, por lo que las nanopartículas de oro sintetizadas para este trabajo son potencialmente seguras. Adicionalmente, las imágenes obtenidas por TEM confirman que la forma de las nanopartículas de oro es esférica.

La información que se obtiene de las técnicas de caracterización de nanopartículas es complementaria. En este caso, conocer la forma de las partículas permite seleccionar la

técnica adecuada para conocer otros parámetros importantes. Por ejemplo, las técnicas basadas en la dispersión de la luz ofrecen información sobre el tamaño y la carga de las nanopartículas, siempre y cuando se trate de muestras con estructuras esféricas, que conservan su individualidad y se encuentran dispersas en agua u otro solvente.

En la técnica de dispersión de luz dinámica se mide la velocidad del movimiento de las partículas y se relaciona con su tamaño, bajo la premisa de que las partículas con tamaños pequeños se mueven más rápido que las partículas con tamaños mayores. Cabe mencionar que el tamaño que se obtiene por esta técnica es conocido como diámetro hidrodinámico, y se refiere al diámetro que las partículas tienen en solución, donde están en interacción con otras moléculas, por lo que es mayor al diámetro que se obtiene en una muestra seca.

Esta es la razón por la cual en este estudio el diámetro de las nanopartículas de oro obtenido por dispersión dinámica de luz (19 nm) es mayor al obtenido por microscopía electrónica (16 nm). El aumento de tamaño de la nanovacuna (317 nm) con respecto a las nanopartículas de oro (19 nm) y el cambio en la carga de la superficie (de -48 a -5.6 mV) confirma la unión del péptido a las nanopartículas. El tamaño real de las AuNPs con péptido puede ser menor a 317 nm; sin embargo, otro dato claro de la interacción del péptido con las AuNPs es el cambio en el pico de absorción máxima en el UV-Vis, como se describió anteriormente.

En cuanto a la técnica de dispersión de luz electroforética, la velocidad del movimiento de las nanopartículas a través de un campo eléctrico se relaciona con su carga y las nanopartículas se verán mayor o menormente atraídas hacia los electrodos con carga opuesta, dependiendo de su propia carga. La carga está relacionada con la estabilidad de las nanopartículas. Los valores por encima de los ± 30 milivolts representan una alta estabilidad, lo que evita el riesgo de que pierdan su tamaño nanométrico en poco tiempo.

El hecho de que la nanovacuna no tenga altos valores de carga implica que su almacenamiento a largo plazo es poco conveniente. Sin embargo, las nanopartículas de oro desnudas son altamente estables, por lo que es posible almacenar de manera independiente las nanopartículas y el péptido hasta su uso como nanovacuna. Es decir, que la preparación de la formulación se puede realizar mezclando las nanopartículas con el péptido justo antes de usarse.

Conclusiones

En este trabajo se describió la caracterización de un sistema con potencial para ser utilizado como nanovacuna en peces utilizando nanopartículas de oro y un péptido proveniente de la toxina A de la bacteria *Vibrio parahaemolyticus*. Los estudios realizados muestran que se logró obtener una nanovacuna con características fisicoquímicas adecuadas para ser administrada en sistemas biológicos, por lo cual la siguiente etapa es evaluar la citotoxicidad y el potencial inmunoestimulante e inmunoprotector de la nanovacuna en peces.

El conocimiento sobre la inmunomodulación en las mucosas por nanopartículas modificadas con subunidades permitirá dilucidar las células blanco, mecanismos (inductores, reguladores y efectores) y actividades funcionales, contribuyendo al conocimiento para la manipulación del sistema inmune de las mucosas en modelo de pez.

Referencias

- Adams, A. (2019). Progress, challenges and opportunities in fish vaccine development. *Fish and Shellfish Immunology*, 90, 210-214. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2019.04.066>
- Ma, J., J. Bruce, T., M. Jones, E. y D. Cain, K. A (2019). Review of Fish Vaccine Development Strategies: Conventional Methods and Modern Biotechnological Approaches. *Microorganisms*, 7 (11), 569. <https://doi.org/10.3390/microorganisms7110569>
- Shalan, M. Saleh, M., El-Mahdy, M. y El-Matbouli, M. (2016). Recent progress in applications of nanoparticles in fish medicine: A review. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine*, 12 (3), 701-710. <https://doi.org/10.1016/j.nano.2015.11.005>