

## Desarrollo de una proteína recombinante fimbrial F17 de *Escherichia coli* y respuesta inmune frente a células mononucleares periféricas sanguíneas (PBMC) de alpaca

Development of the recombinant fimbrial protein F17 of *Escherichia coli* and the immune response in alpaca peripheral blood mononuclear cells (PBMC)

Juan Siuce M.<sup>1</sup>, Jorge Maximiliano G.<sup>1</sup>, Raquel Hurtado C.<sup>1</sup>, Raúl Rosadio A.<sup>1</sup>,  
Lenin Maturrano H.<sup>1,2,3</sup>

### RESUMEN

*Escherichia coli* está asociada a diarreas que pueden producir la muerte en crías de alpacas de temprana edad. Patotipos de *E. coli* utilizan las fimbrias para adherirse al hospedero en la primera etapa de la patogénesis. Por ello, el presente estudio tuvo como objetivo desarrollar y producir una proteína recombinante de la adhesina fimbrial F17 de *E. coli* y evaluar su inmunogenicidad en células mononucleares periféricas de sangre (PBMC) de alpaca. Se utilizó a BL21 como vector de expresión, se purificó la proteína recombinante mediante cromatografía de afinidad inmovilizada y se evaluó la producción de citoquinas de PBMC a las 48 y 72 horas posterior al desafío con F17. Los resultados indican un aumento significativo de la producción de citoquinas de Th1/Th2, predominantemente IFN- $\gamma$  e IL-4. Por lo tanto, la mezcla BL21-F17 podría ser considerada como un potencial candidato vacunal para la prevención de las diarreas en alpacas producidas por *E. coli*.

**Palabras clave:** vacuna, *Escherichia coli*, F17, EHEC, alpaca

<sup>1</sup> Laboratorio de Microbiología y Parasitología Veterinaria, Facultad de Medicina Veterinaria, Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Lima, Perú

<sup>2</sup> Laboratorio de Zootecnia y Producción Agropecuaria, Facultad de Medicina Veterinaria, Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Lima, Perú

<sup>3</sup> E-mail: amaturranoh@unmsm.edu.pe

Recibido: 17 de abril de 2020

Aceptado para publicación: 15 de febrero de 2021

Publicado: 24 de abril de 2021

## ABSTRACT

*Escherichia coli* is associated with diarrhoea that can cause death in young alpacas. Patotypes of *E. coli* use the fimbriae to adhere to the host in the first stage of pathogenesis. Therefore, the present study aimed to develop and produce a recombinant protein of *E. coli* fimbrial adhesin F17 and to evaluate its immunogenicity in alpaca peripheral blood mononuclear cells (PBMC). BL21 was used as an expression vector, the recombinant protein was purified by immobilized affinity chromatography and the production of PBMC cytokines was evaluated 48 and 72 hours after the challenge with F17. The results indicate a significant increase in the production of Th1/Th2 cytokines, predominantly IFN- $\gamma$  and IL-4. Therefore, the BL21-F17 mixture could be considered as a potential vaccine candidate for the prevention of diarrhoea in alpacas produced by *E. coli*.

**Key words:** vaccine, *Escherichia coli*, F17, EHEC, alpaca

## INTRODUCCIÓN

La diarrea asociada a *Escherichia coli* es una enfermedad de importancia en crías de alpacas y llamas, cuya presentación está frecuentemente acompañada con septicemia. Las crías afectadas presentan profusa diarrea acuosa, letargia, deshidratación e incluso distensión abdominal (Whitehead y Anderson, 2006). En alpacas y llamas se han desarrollado diversos estudios para la identificación de factores de virulencia asociados a los patotipos de *E. coli* presentes. Así, se han descrito los patotipos EPEC, ETEC y EHEC como los más frecuentes a partir de aislados de crías y adultos, tanto en casos de animales con diarreas (enfermos) y sin diarrea (Cid *et al.*, 2012; Luna *et al.*, 2012; Mori *et al.*, 2014; Rosadio *et al.*, 2012). A la vez, se han descrito algunos serotipos fimbriales y su asociación con rotavirus en crías de alpacas con diarreas y en alpacas clínicamente sanas (Morales y Paredes, 2007).

Uno de los primeros factores de virulencia en la patogénesis de *E. coli* son las adhesinas, que le permite a la bacteria asentarse y colonizar las células blanco y, posteriormente, eliminar toxinas o proteínas

efectoras que alteran el funcionamiento normal de las células de la mucosa intestinal. Entre las adhesinas más representativas son las de tipo fimbrial, principalmente las fimbrias F4, F5, F6, F17, F41, F18, que están asociadas a los patotipos Enteropatógenicos (EPEC), y con mucha más frecuencia a los enterotoxigénicos (ETEC). En porcinos, la fimbria F18 está asociada a las *E. coli* productoras de Shiga toxina (STEC) (Nagy y Fekete, 1999). Sin embargo, estos patrones han mostrado variaciones particulares, tanto en aves como en bovinos, teniendo bacterias con combinaciones de factores de virulencia, tanto adhesinas como fimbrias de diferentes patotipos. Así, se ha reportado que la fimbria F17 es una familia de fimbrias y que sus variedades están asociados como principal adhesina de muchos patotipos, inclusive los necrotoxigénicos (NTEC) de reciente clasificación y los enterohemorrágicos (EHEC), cuya estructura fimbrial se compone de una base que es la proteína estructural mayor «A», mientras que la proteína estructural menor que tiene función de interacción o adhesión es la «G» (Bihannic *et al.*, 2014). Por ello, las fimbrias han servido como candidato vacunal contra *E. coli* para la inmunización de diferentes especies (Francis y Willgohs, 1991; Luna-Pineda *et al.*, 2016; Tiels *et al.*, 2008; Zhang *et al.*, 2018).

La vacunación sigue siendo una de las principales estrategias para la prevención de diarreas. Se han desarrollado diferentes tipos de vacunas contra *E. coli* para diferentes especies, con base a células muertas o bacterinas de determinado serotipo fimbrial o somático, toxoides, así como algunas vacunas recombinantes contra determinados antígenos estructurales, hallándose diferente grado de protección (Cox *et al.*, 2014). Entre las más difundidas y con mejores resultados en bovinos y porcinos son las orientadas contra determinados serotipos fimbriales (Hur *et al.*, 2012). Por ello, el presente estudio buscó determinar la capacidad inmunogénica de la proteína recombinante de la adhesina fimbrial F17 de *E. coli*, mediante la medición de citoquinas relacionadas a Th1 y Th2, paso importante en la evaluación de un candidato vacunal para la prevención de diarreas en alpacas asociadas a *E. coli*.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### Lugar del Estudio

El desarrollo y caracterización de la proteína F17 se llevó a cabo en las instalaciones de la Facultad de Microbiología, Inmunología y Bioquímica de *The University of Tennessee Health Science Center*, Memphis, USA, mientras que la evaluación *in vitro* de citoquinas se realizó en el Laboratorio de Biología y Genética Molecular de la Facultad de Medicina Veterinaria (FMV) de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos (UNMSM), Lima, Perú. Los protocolos utilizados fueron aprobados por el Comité de Ética y Bienestar Animal de la FMV-UNMSM, mediante Autorización de Ética N.º 2017-003.

### Proteína Recombinante F17 (rF17)

Los protocolos para la elaboración y producción de la proteína recombinante F17 (rF17) fueron adaptados de Gomes-Solecki *et al.* (2006), utilizándose el péptido señal de OspA de *Borrelia burgdorferi*.

Se utilizó la secuencia optimizada, acompañada del péptido señal del gen de la fimbria F17 N.º de Acceso NC\_012944.1 (pVir\_11 F17) del banco de genes (*Escherichia coli* Vir68); secuencia conformada por 1032 pares de bases, el cual fue insertado en el plásmido pET-28a (Novagen). El plásmido posee genes de resistencia a la kanamicina y una secuencia de residuos de histidina, para la purificación proteica.

Se utilizó a la *E. coli* competente BL21 (Biolab) para la transformación y expresión proteica de rF17 insertado el plásmido pET-28a para la purificación proteica, siguiendo las instrucciones del fabricante.

### Vector y Expresión de rF17

BL21 conteniendo pET-28<sup>a</sup>, plásmido codificante de rF17 (BL21+F17), fue cultivado en el medio TBY (caldo triptona y levadura) con kanamicina a una concentración final de 50 mg/ml, durante más de 12 h a 37 p C, con agitación a 200 rpm. Una vez que el cultivo alcanzó 0.7-0.9 de densidad óptica, se añadió 0.5 mM del inductor de expresión, isopropil-β-D-1-tiogalactopiranosido (IPTG) y se incubó durante 3 h con las condiciones previas. Luego, se centrifugó el cultivo a 4000 rpm durante 8 min, se descartó el sobrenadante y se añadió 5 ml de glicerol al 20% por litro de cultivo, y se almacenó a -80 °C. Se utilizó un método estándar para la caracterización proteica (Gomes-Solecki *et al.*, 2006).

### Purificación de rF17

Se estandarizó un protocolo para la purificación del antígeno vacunal recombinante rF17: utilizando tres soluciones: Solución de Unión: fosfato de sodio 0.1M pH 7.5. Urea 6 M; Solución de lavado: fosfato de sodio 0.1M pH 6.5. Urea 6 M; Solución de elución: fosfato de sodio 0.1 M pH 4.5. Urea 6 M. Asimismo, se utilizó una columna de purificación de proteínas, y con 500 µl de resina de cobalto.

Cuadro 1. Secuencias y características de los cebadores utilizados para las evaluaciones de citoquinas

Genes	Secuencias	Productos pares de bases (bp)	Temperatura de alineamiento (°C)
IFN- $\gamma$	5'-ATTGTCTCCTTCTACTTCAA-3' 5'-AGCGGAAGAGAAGTCAGAAT-3'	258	45
TNF $\alpha$	5'-CTACTCCCAGGTCCTCCTGA-3' 5'-GGTAGTTGGGCATGTTGATC-3'	251	60
IL-2	5'-AAACTCTCCAGGATGCTCAC-3' 5'-GGAAGTGAAGGGATCTGAAA-3'	202	49
IL-4	5'-CAAAGAACACAACCTGAGAAG-3' 5'-GGCTAAAGAAGATTATGAAG-3'	203	46
IL-10	5'-AAGCCTTGTCGGAGATGAC-3' 5'-AGCCATGAGTGAGTTCGACA-3'	246	55
GAPDH	5'-GTGAAGGTCGGAGTGAACG-3' 5'-GAGATGATGACCCTCTTGGC-3' 5'-CTCAAGTTGGGGGACAAAAA-3'	356	60

Finalmente se realizó una electroforesis para proteínas (SDS-PAGE) para la verificación de la expresión y la purificación de rF17. Además, se comprobó mediante Western Blot usando anticuerpos monoclonales contra los residuos de histidina (ThermoFisher) de las proteínas purificadas de la solución de elución.

### Inmunogenicidad

Para evaluar la respuesta inmune a través de la respuesta por citoquinas se utilizó un método *in vitro*, en el cual se cuantifica el ARN mensajero producido por los leucocitos de sangre periférica de alpaca frente al estímulo antigénico de la proteína vacunal, el cual consta de los siguientes pasos:

### Obtención de leucocitos circulantes

Para obtener células mononucleares sanguíneas periféricas (PBMC) se obtuvo sangre venosa de alpaca en un tubo de ensayo de 15 ml conteniendo EDTA como anticoagulante. Se utilizó una solución salina (PBS 1X con pH 7.4) que se mezcló con un mismo volumen de sangre (proporción 1:1).

Se utilizó el método de centrifugación en gradiente de densidad. Para ello, 03 volúmenes del reactivo Ficoll®-Paque (Sigma, USA) fue mezclado con 04 volúmenes de sangre con PBS. Se realizaron 2-3 lavados de las células con PBS 1X pH 7.4. Finalmente se suspendieron en medio de cultivo RPMI 1640 con L-Glutamina (Sigma, USA).

Para determinar la concentración celular se uniformizó cada cultivo a una concentración de células por ml (cel/ml). Se tomaron 5 µl del paquete celular y se mezclaron con 5 µl azul de tripán diluido al décimo con PBS (1:10). La concentración y evaluación de la viabilidad celular de determinó en una cámara de Neubauer (400X). Las células se diluyeron en RPMI 1640 con L-glutamina, adicionando 100 IU/ml de penicilina (Sigma, USA) y 10% de Suero Fetal Bovino (SFB) (Sigma, USA) inactivado por calor. Los homogenizados se colocaron en una placa de poliestireno para cultivo celular de 24 pocillos unos 1200 µl de cultivo celular con una concentración final de células  $1 \times 10^6$  células/ml.

### ***Evaluación de la respuesta inmune***

La respuesta de los leucocitos frente al estímulo del antígeno vacunal recombinante rF17 se evaluó con el siguiente esquema experimental:

Pocillo 1: Control celular (leucocitos circulantes).

Pocillo 2: Antígeno fimbrial – rF17 (10 ng)

Pocillo 3: BL21 (10 ng) sin antígeno fimbrial (sin plásmido)

Pocillo 4: BL21 (10 ng) + antígeno fimbrial rF17 (plásmido) (20 ng)

Las placas fueron incubadas a 37 °C. La evaluación de la expresión de ARN mensajero de las citoquinas de la respuesta inmune celular y humoral se realizó a las 48 y 72 horas, mediante un RT-PCR y la cuantificación relativa delta delta Ct ( $\Delta\Delta Ct$ ). Para la evaluación de citoquinas de la respuesta inmune Th1 y Th2 de alpacas (Odbileg *et al.*, 2005) se utilizaron los cebadores respectivos (Cuadro 1).

El RT-PCR fue realizado en un termociclador PikoReal 96 (Thermo Scientific), usando como fluoróforo Maxima SYBR Green. Se utilizó el ADNc (4 ng, aproximadamente) sintetizado a partir del ARNm obtenido durante la extracción de los

cultivos celulares incubados en diferentes tiempos. Para la prueba de PCR en tiempo real se utilizaron un Maxima SYBR Green/ROX qPCR Master Mix (2X) a concentración 1X. En la qPCR se llevó a 50 °C durante 2 min (TDG), luego una temperatura de desnaturalización (TD) inicial de 95 °C durante 10 min, luego 40 ciclos de desnaturalización (TD) a 95 °C durante 35 s, hibridación (TA) a la temperatura que corresponde a cada cebador durante 30 s y una extensión (TE) de 72 °C durante 35 s (40 en caso de GAPDH). Finalmente, una evaluación de la temperatura de disociación (TMELT), que va desde «X» - 95 °C, donde «X» corresponde a la TA de cada gen evaluado.

### **Análisis Estadístico**

Las diferencias de expresión de cada citoquina fueron evaluadas usando los valores cuantitativos de expresión de citoquinas relativos mediante los intervalos de confianza en un gráfico de barras utilizando el software *Graphpad Prism 7.0* (GraphPad Software, USA).

## **RESULTADOS**

### **Expresión y Purificación Proteica**

La caracterización de la proteína recombinante rF17 mediante la determinación de la naturaleza y ubicación de expresión del antígeno vacunal en el vector recombinante pET-28a, con base a la secuencia de nucleótidos de 35 Kda en promedio, determinó a rF17 en la fase detergente, tal como se observa en la Figura 01.

Se observó un producto aproximado de 35 Kda correspondiente a la purificación del antígeno vacunal, rF17, como se observa en la Figura 2. La evaluación de especificidad del purificado mediante la técnica de Western Blot muestra un producto único (Figura 3).

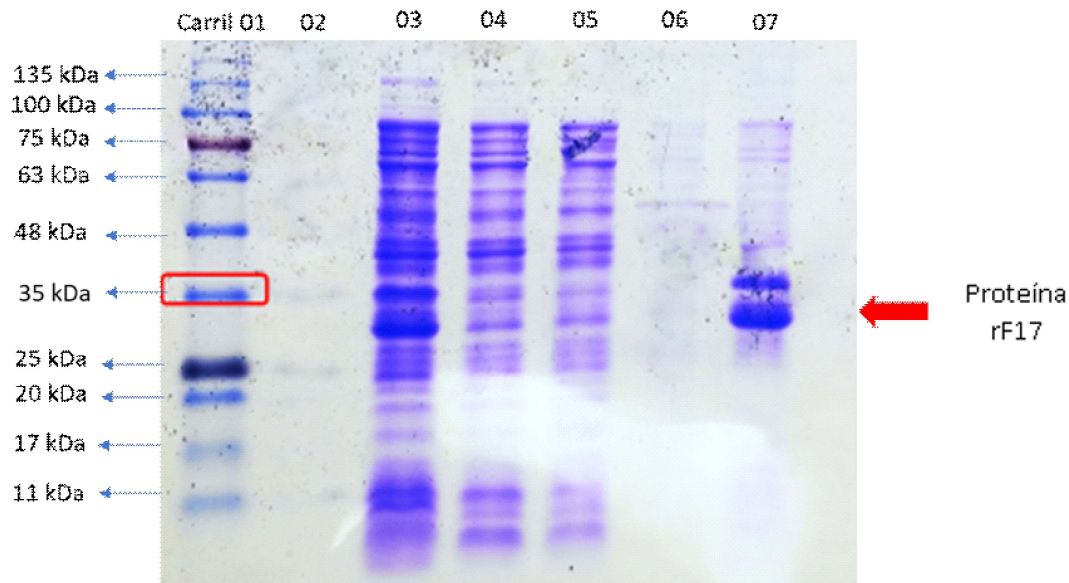


Figura 1. SDS-PAGE de la caracterización de la proteína recombinante rF17 usando el plásmido pET-28a. Carril 01: Marcador de peso molecular; Carril 02: blanco; Carril 03: célula completa; Carril 04: Citosol; Carril 05: Envoltura celular; Carril 06: Fracción acuosa, Carril 07: Fracción detergente. La flecha roja indica la proteína recombinante

### Evaluación de la Inmunogenicidad

La cuantificación relativa de la producción de ARNm de las citoquinas Interferón gamma (IFN), Factor de Necrosis Tumoral  $\alpha$ , IL-2, IL-4 e IL-10, estimulada por la proteína recombinante purificada rF17 en leucocitos de sangre periférica de alpaca (PBMC) mostraron los siguientes resultados: la mayor expresión de interferón gamma (IFN- $\gamma$ ) por leucocitos de sangre periférica de alpaca a las 48 h posterior a la exposición se evidenció en el grupo Vector ( $3.87 \pm 0.57$ ), el cual mostró niveles significativamente mayores en relación al control ( $2.13 \pm 0.58$ ), mientras que a las 72 h, tanto el Vector ( $5.00 \pm 0.90$ ) como la combinación Vector + rF17 ( $4.10 \pm 0.59$ ) mostraron niveles significativamente mayores que los controles (Figura 4).

La producción de TNF- $\gamma$  a las 48 y 72 h mostraron niveles relativamente similares comparado con el control frente a la proteína rF17, vector y la combinación, sin hallarse diferencias significativas (Figura 5).

La expresión de la interleucina 2 (IL-2) a las 48 horas de la exposición de las proteínas rF17, vector y la combinación mostraron niveles significativamente mayores en relación al control, siendo el vector ( $6.54 \pm 1.44$ ) el de mayor expresión. Sin embargo, a las 72 horas, solo el vector ( $5.32 \pm 1.77$ ) presentó niveles significativamente mayores (Figura 6).

En la expresión de la interleucina 4 (IL-4) a las 48 h de la exposición, solo los grupos Vector ( $5.62 \pm 1.12$ ) y la combinación Vector + rF17 ( $4.67 \pm 0.42$ ) mostraron niveles significativamente mayores con relación al

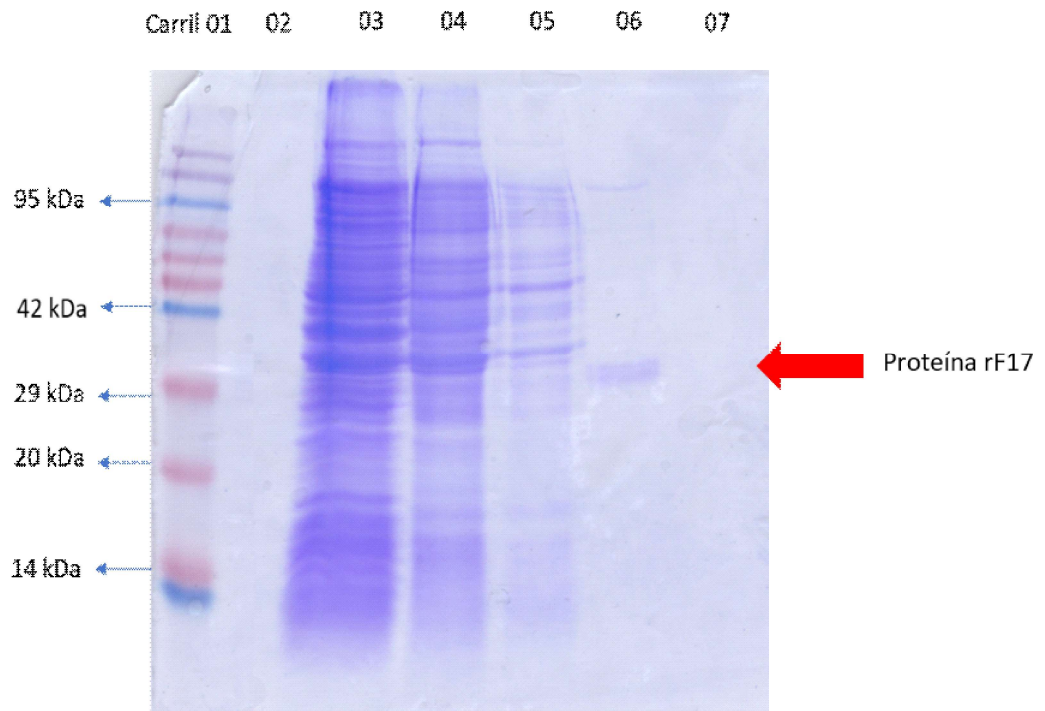


Figura 2. SDS-PAGE de la purificación de la proteína recombinante rF17. Carril 01: Marcador de peso molecular; Carril 02: blanco; Carril 03: Filtrado; Carril 04: Lavado A; Carril 05: Lavado B; Carril 06: Elusión 01, Carril 07: Elusión 02

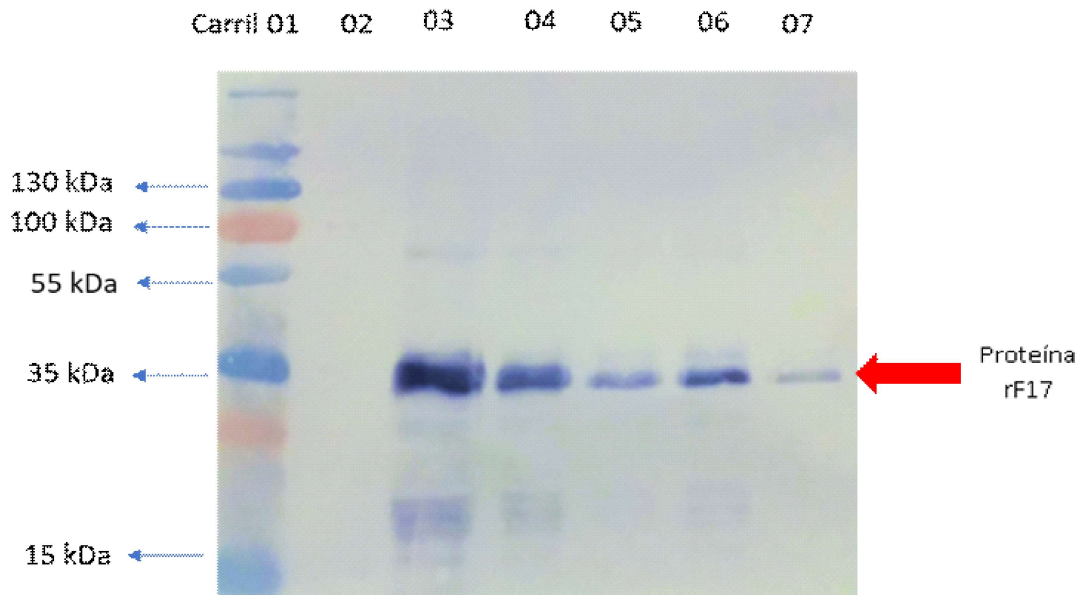


Figura 3. Western Blot usando un marcador de residuos de histidina. Carril 01: Marcador de peso molecular; Carril 02: blanco; Carril 03: Elusión 1; Carril 04: Elusión 2; Carril 05: Elusión 3; Carril 06: Elusión 4; Carril 07: Elusión 5. La flecha roja indica la proteína recombinante

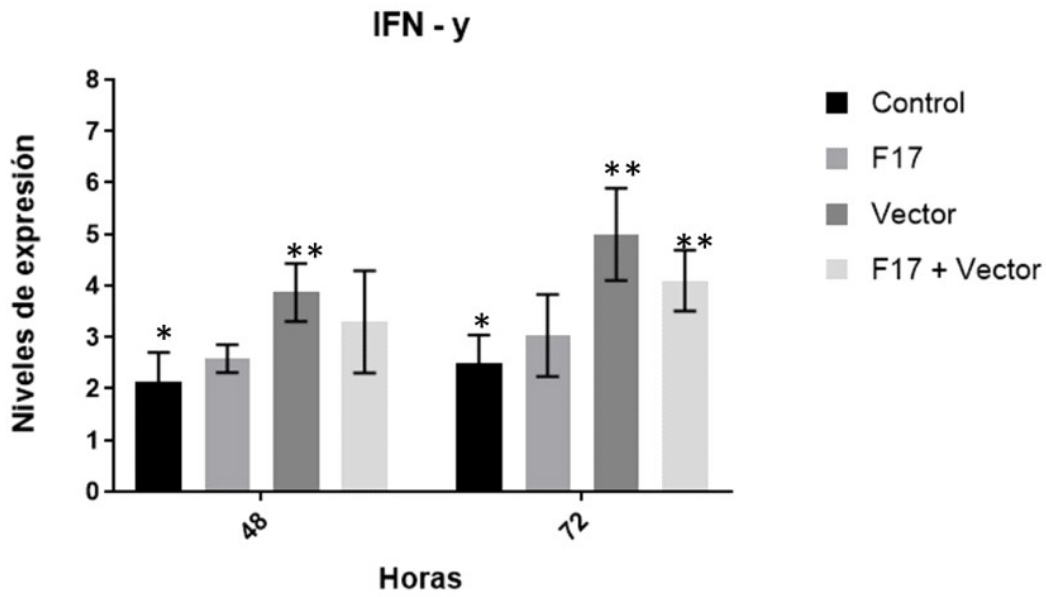


Figura 4. Niveles de expresión relativa de IFN- $\gamma$  producidos por células mononucleares sanguíneas periféricas estimulados por la proteína purificada rF17 y componentes estructurales del vector inactivado. Las barras representan la media  $\pm$  SEM

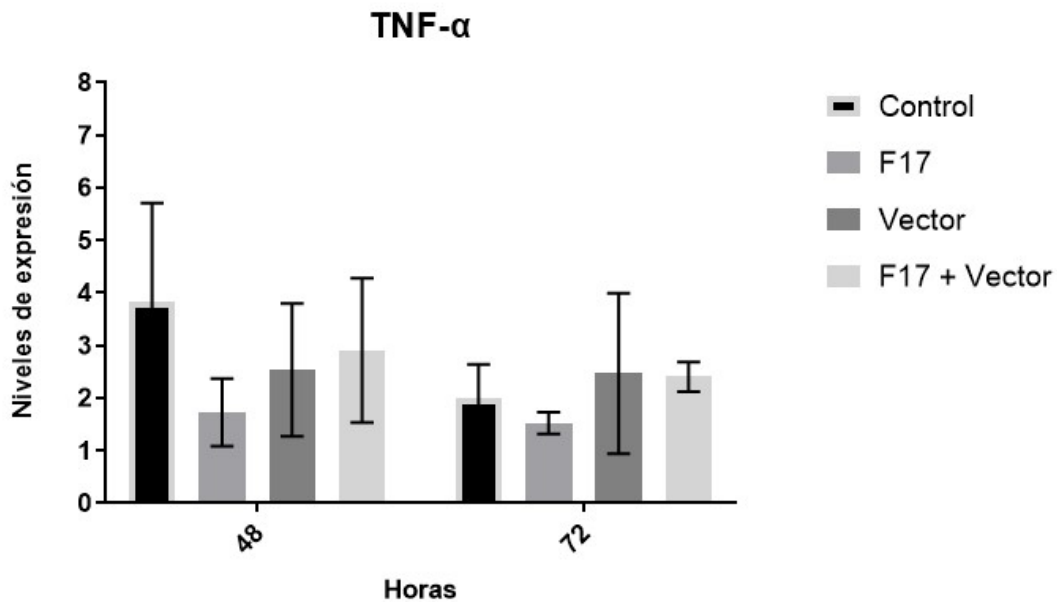


Figura 5. Niveles de expresión relativa de TNF- $\alpha$  producidos por células mononucleares sanguíneas periféricas estimulados por la proteína purificada rF17 y componentes estructurales del vector inactivado. Las barras representan la media  $\pm$  SEM



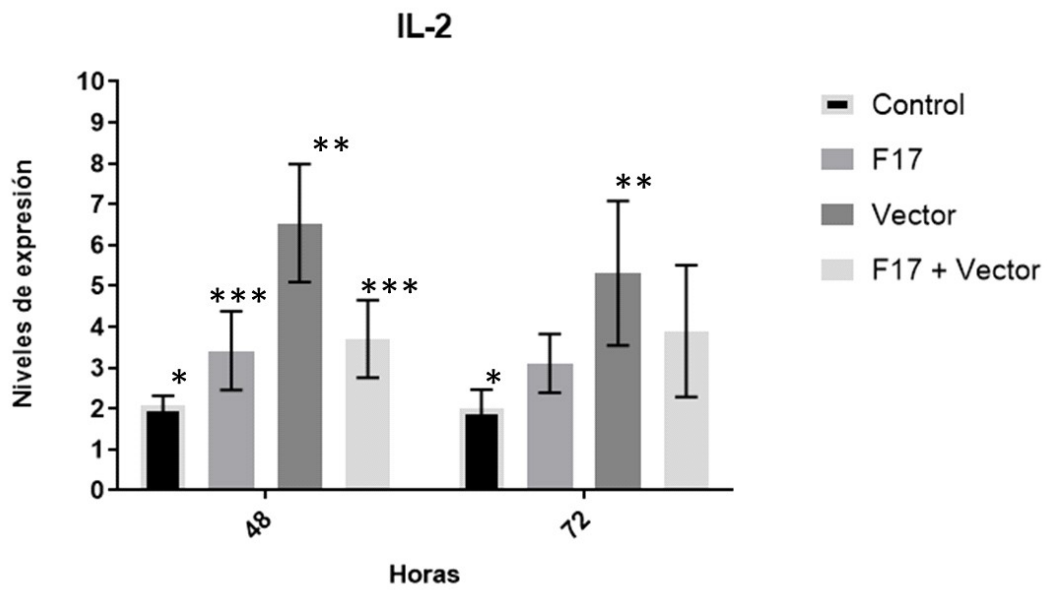


Figura 6. Niveles de expresión relativa de IL-2 producidos por células mononucleares sanguíneas periféricas estimulados por la proteína purificada F17 y componentes estructurales del vector inactivado. Las barras representan la media  $\pm$  SEM

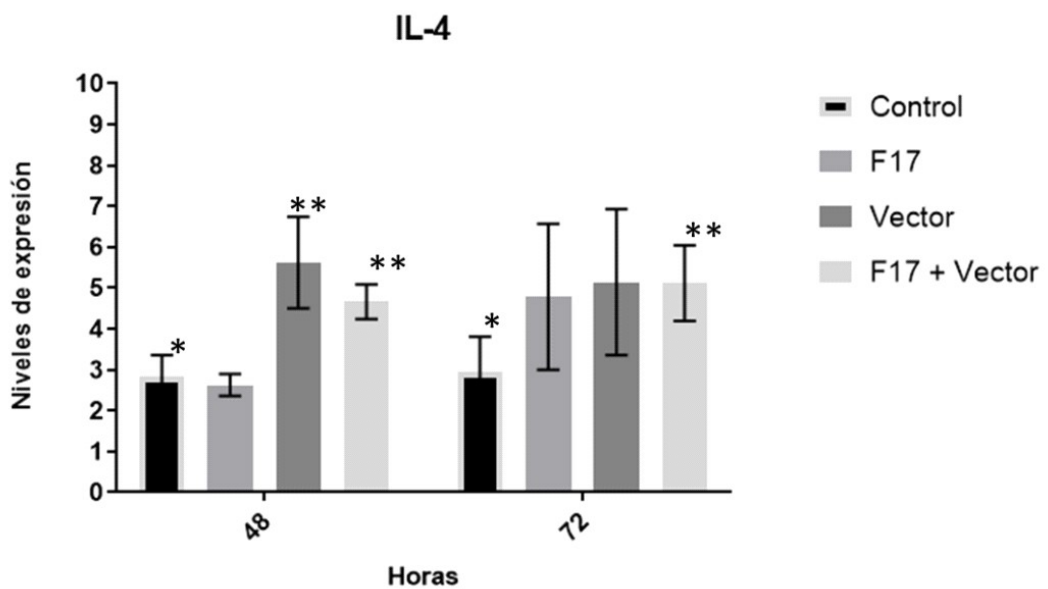


Figura 7. Niveles de expresión relativa de IL-4 producidos por células mononucleares sanguíneas periféricas estimulados por la proteína purificada rF17 y componentes estructurales del vector inactivado. Las barras representan la media  $\pm$  SEM

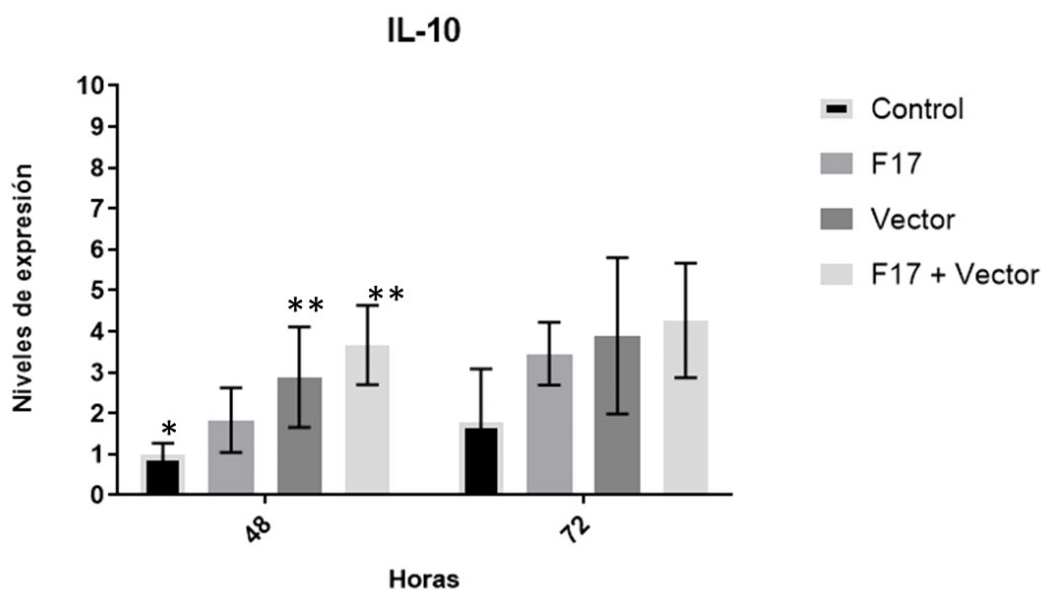


Figura 8. Niveles de expresión relativa de IL-10 producidos por células mononucleares sanguíneas periféricas estimulados por la proteína purificada rF17 y componentes estructurales del vector inactivado. Las barras representan la media  $\pm$  SEM

control, mientras que a las 72 h solo la combinación Vector + rF17 ( $5.12 \pm 0.93$ ) expresaron niveles significativamente mayores (Figura 7).

La expresión de la interleucina 10 (IL-10) evidenció a las 48 h de la exposición que solo los grupos Vector ( $2.88 \pm 1.23$ ) y la combinación Vector + rF17 ( $3.67 \pm 0.97$ ) alcanzaron niveles significativamente mayores con relación al grupo control, mientras que a las 72 h no hubo diferencias significativas entre grupos (Figura 8).

## DISCUSIÓN

Se llevó a cabo la expresión de la proteína recombinante F17 (rF17) utilizando el vector BL21, el cual es uno de los más usados para la síntesis de proteínas recombinantes (Rosano y Ceccarelli, 2014). La producción

de la proteína fimbrial rF17 se obtuvo utilizando el vector pET-28a, obteniéndose un producto de 35 Kda en promedio (Figura 1). Utilizando las colas de histidina se pudo purificar la proteína (Figura 2), y para corroborar la purificación se realizó un Western Blot obteniéndose bandas únicas de 35 Kda en todas las eluciones (Figura 3), como resultado de procedimientos estandarizados que han sido utilizados para la expresión y purificación de otras proteínas fimbriales de *E. coli*, como son las fimbrias de ETEC, CFA/I y CS4 (Curtis *et al.*, 2016), F9 de EHEC del serotipo O157:H7 (Mohawk *et al.*, 2010), e inclusive hasta la expresión de varias adhesinas fusionadas, dímeros y trímeros en *E. coli* uropatogénica (UPEC) (Luna-Pineda *et al.*, 2016).

La evaluación de citoquinas y su producción frente a estímulos es una de las herramientas para la evaluación del sistema in-

mune, siendo una de las alternativas la medición directa en suero. Sin embargo, el suero posee gran cantidad de inhibidores (proteínas dianas o receptores antagonistas y anticuerpos) (Heney y Whicher, 1995). Así, la evaluación en células mononucleares de sangre periférica (PBMC), es un método que ofrece ventajas para la evaluación de la inmunocompetencia o el estado de respuesta específica (Friberg *et al.*, 1994; Whiteside, 1994). Este método ha sido utilizado en la evaluación de la respuesta inmune en camellos y alpacas, tanto para la evaluación de la respuesta inmune frente a inmunógenos bacterianos o proteínas simples como para la evaluación de vacunas (More *et al.*, 2013; Tambillo *et al.*, 2014; Watanabe *et al.*, 2014; Sulabh *et al.*, 2019). En bovinos, utilizando la misma metodología se ha evaluado la capacidad de resistencia y/o susceptibilidad a enfermedades de algunas razas (Sulabh *et al.*, 2019).

En el presente estudio, la expresión de IFN- $\gamma$  a las 48 h de la exposición el grupo Vector ( $3.87 \pm 0.57$ ) fue el único que presentó niveles significativamente mayores con relación al grupo control ( $2.13 \pm 0.58$ ); respuesta que podría estar relacionada al lipopolisacárido (LPS) que recubre la pared externa del vector (*E. coli*), el cual ha mostrado ser un componente que estimula la respuesta de esta citoquina (Tizard, 2013; Kleiveland, 2015). Si bien, la proteína recombinante rF17, por sí sola, no mostró tener la capacidad suficiente para estimular la producción de IFN- $\gamma$ , al menos, hasta las 72 h, tanto el Vector como la combinación Vector + rF17, mostraron niveles mayores que los controles. Estas respuestas podrían explicarse a la naturaleza de respuesta de los linfocitos, los cuales producen una mejor respuesta frente a moléculas complejas (la combinación proteína purificada con el LPS del vector). Similares respuestas de incremento de la expresión de IFN- $\gamma$  *in vitro* en alpacas se ha reportado usando proteínas purificadas P6 like de *Pasteurella* y antígenos clostridiales (More *et al.*, 2013; Maximiliano *et al.*, 2018).

La producción de TNF- $\alpha$  a las 48 y 72 h presentaron niveles relativamente similares al control frente a la proteína rF17, vector y su combinación; y aumentando a las 72 h por encima del control, aunque sin llegar a mostrar diferencias significativas. Si bien, TNF- $\alpha$  es una citoquina proinflamatoria, es una citoquina producida principalmente por células de la inmunidad innata, como son los polimorfonucleares (Tizard, 2013). Sin embargo, se debe considerar que en células de PBMC, utilizadas en este tipo de evaluaciones, se han separado a los granulocitos, siendo la respuesta obtenida por Linfocitos T y B, que son células que expresan otro perfil de citoquinas (Tizard, 2013; Kleiveland, 2015). Además, su expresión puede ser inhibida por la IL-10 (Schandené *et al.*, 1994), citoquina que fue expresada en niveles significativamente mayores en el presente estudio. Patrones similares fueron observados utilizando la proteína P6 like (Maximiliano *et al.*, 2018) y frente a antígenos clostridiales (Tambillo *et al.*, 2014).

La expresión de la interleucina 2 (IL-2) a las 48 h de la exposición de las proteínas rF17, vector y su combinación mostraron niveles significativamente mayores con relación al control, siendo el vector ( $6.54 \pm 1.44$ ) el de mayor expresión por encima de rF17 ( $3.42 \pm 0.96$ ) y la combinación Vector +rF17 ( $3.71 \pm 0.94$ ). Sin embargo, a las 72 h, solo el vector ( $5.32 \pm 1.77$ ) presentó niveles significativamente mayores. Esta respuesta podría ser explicada debido a que IL-2 es el principal activador de Linfocitos T, los cuales expresan el receptor de IL-2. El PBMC está compuesto hasta por 85% por linfocitos, lo que generaría los niveles observados (Malek, 2003; Tizard, 2013; Kleiveland, 2015). Los niveles obtenidos son comparables a los expresados utilizando antígenos clostridiales y de pasteurelas frente a la evaluación de la expresión *in vitro* (More *et al.*, 2013; Watanabe *et al.*, 2014; Maximiliano *et al.*, 2018).

Con relación a la respuesta Th2, la expresión de la interleucina 4 (IL-4) a las 48 h de la exposición, solo los grupos Vector ( $5.62 \pm 1.12$ ) y la combinación Vector + rF17 ( $4.67 \pm 0.42$ ), mostraron niveles significativamente mayores con relación al control ( $2.82 \pm 0.54$ ), mientras que a las 72 h solo la combinación Vector + rF17 ( $5.12 \pm 0.93$ ) expresó niveles significativamente mayores. Estos niveles fueron similares a los obtenidos por Maximiliano *et al.* (2018), quienes entre las 24 y 48 h obtienen niveles de hasta ocho veces la expresión. No obstante, la proteína rF17 no mostró niveles significativamente mayores, resultado similar al obtenido con el estímulo de antígenos clostridiales (More *et al.*, 2013). IL-4 tiene como función la polarización de linfocitos T vírgenes hacia Th2, lo cual estimula su expansión y activación, siendo producida por Linfocitos T, principalmente (Tizard, 2013). Liu *et al.* (2009), utilizando un sistema *in vivo*, obtuvieron niveles de IL-4 predominantes sobre IFN- $\gamma$ , expresados en bazo y placas de Peyer al inmunizar ratones BALB/c, utilizando *Lactobacillus casei* expresando F41 de *E. coli* enterotoxigénica (ETEC).

La expresión de la interleucina 10 (IL-10), en PBMC de alpaca, a las 48 h de la exposición evidenció que los grupos Vector ( $2.88 \pm 1.23$ ) y la combinación Vector + rF17 ( $3.67 \pm 0.97$ ) mostraron niveles significativamente mayores con relación al control ( $0.98 \pm 0.28$ ), mientras que a las 72 h no hubo expresiones significativas. Esta expresión podría explicarse debido a que esta citoquina tiene como función principal la inmunoregulación, y permite la inhibición de macrófagos y células asesinas naturales o NK, disminuyendo la respuesta Th1, actuando frente a niveles altos de IFN- $\gamma$  (Schandené *et al.*, 1994; Tizard, 2013). Se ha demostrado tendencias similares utilizando antígenos clostridiales (More *et al.*, 2013; Tambillo *et al.*, 2014), así como con P6-like de *Pasteurella* (Maximiliano *et al.*, 2018).

## CONCLUSIONES

El Vector con la proteína recombinante rF17 estimulan la producción de citoquinas de Th1 y Th2, principalmente INT- $\gamma$  y IL-4 en células mononucleares de sangre periférica (PBMC) de alpaca.

## Agradecimientos

Los autores agradecen el financiamiento del Fondo Nacional de Desarrollo Científico, Tecnológico y de Innovación Tecnológica (FONDECYT) por el Programa Doctoral en Medicina Veterinaria (Convenio de Subvención N,° 215-2014-FONDECYT).

## LITERATURA CITADA

1. **Bihannic M, Ghanbarpour R, Auvray F, Cavalié L, Châtre P, Boury M, Brugère H, et al. 2014.** Identification and detection of three new F17 fimbrial variants in *Escherichia coli* strains isolated from cattle. *Vet Res* 45: 1-12. doi: 10.1186/s13567-014-0076-9
2. **Cid D, Martín-Espada C, Maturrano L, García A, Luna L, Rosadio R. 2012.** Diarrheagenic *Escherichia coli* strains isolated from young Peruvian alpacas (*Vicugna pacos*) with diarrhea. In: Perez-Cabal MA, et al. (eds). *Production in South American camelids and other fibre animals*. p 223-228.
3. **Cox E, Melkebeek V, Devriendt B, Goddeeris BM. 2014.** Vaccines against enteric coli infections in animals. Caister Academic Press. 304 p.
4. **Curtis B, Grassel C, Laufer RS, Sears KT, Pasetti MF, Barry EM, Simon R. 2016.** Simple method for purification of enterotoxigenic *Escherichia coli* fimbriae. *Protein Expr Purif* 119: 130-135. doi: 10.1016/j.pep.2015.11.007

5. **Francis DH, Willgohs JA. 1991.** Evaluation of a live avirulent *Escherichia coli* vaccine for K88+, LT+ enterotoxigenic colibacillosis in weaned pigs. *Am J BVet Res* 52: 1051-1055.
6. **Friberg D, Bryant J, Shannon W, Whiteside TL. 1994.** *In vitro* cytokine production by normal human peripheral blood mononuclear cells as a measure of immunocompetence or the state of activation. *Clin Diagn Lab Immunol* 1: 261-268.
7. **Gomes-Solecki MJC, Brisson DR, Dattwyler RJ. 2006.** Oral vaccine that breaks the transmission cycle of the Lyme disease spirochete can be delivered via bait. *Vaccine* 24: 4440–4449. doi: 10.1016/j.vaccine.2005.08.089
8. **Heney D, Whicher JT, 1995.** Factors affecting the measurement of cytokines in biological fluids: Implications for their clinical measurement. *Ann Clin Biochem* 32: 358-368. doi: 10.1177/0004563295-03200402
9. **Hur J, Stein BD, Lee JH. 2012.** A vaccine candidate for post-weaning diarrhea in swine constructed with a live attenuated *Salmonella* delivering *Escherichia coli* K88ab, K88ac, FedA, and FedF fimbrial antigens and its immune responses in a murine model. *Can J Vet Res* 76: 186-194.
10. **Kleiveland CR. 2015.** Peripheral blood mononuclear cells. In: *The impact of food bioactives on health*. Springer. p 161-167.
11. **Liu JK, Hou XL, Wei CH, Yu LY, He XJ, Wang GH, Lee JS, Kim CJ. 2009.** Induction of immune responses in mice after oral immunization with recombinant *Lactobacillus casei* strains expressing enterotoxigenic *Escherichia coli* F41 fimbrial protein. *Appl Environ Microbiol* 75 :4491-4497. doi: 10.1128/AEM.02672-08
12. **Luna-Pineda VM, Reyes-Grajeda JP, Cruz-Córdova A, Saldaña-Ahuactzi Z, Ochoa SA, Maldonado-Bernal C, Cázares-Domínguez V, et al. 2016.** Dimeric and trimeric fusion proteins generated with fimbrial adhesins of uropathogenic *Escherichia coli*. *Front Cell Infect Microbiol* 6: 135. doi: 10.3389/fcimb.2016.00135
13. **Luna L, Rivera H, Zanabria V, Rosadio R. 2012.** Genotipificación, evaluación toxigénica *in vitro* y sensibilidad a antibióticos de cepas de *Escherichia coli* aisladas de casos diarreicos y fatales en alpacas neonatas. *Rev Inv Vet Perú* 23: 280-288. doi: 10.15381/rivep.v23i3.910
14. **Malek TR. 2003.** The main function of IL-2 is to promote the development of T regulatory cells. *J Leukoc Biol* 74: 961-965. doi: 10.1189/jlb.0603272
15. **Maximiliano J, Maturrano HL, Luna EL, Hurtado CR, Chero OA, Rosadio AR. 2018.** Evaluación de la inmunogenicidad de una proteína recombinante de una *Pasteurella multocida* aislada de alpacas con neumonía. *Rev Inv Vet Perú* 29: 339-348. doi: 10.15381/rivep.v29i1.14197
16. **Mohawk KL, Melton-Celsa AR, Zangari T, Carroll EE, O'Brien AD. 2010.** Pathogenesis of *Escherichia coli* O157:H7 strain 86-24 following oral infection of BALB/c mice with an intact commensal flora. *Microb Pathog* 48: 131-142. doi: 10.1016/j.micpath.2010.01.003
17. **Morales S, Paredes D, Pezo D. 2007.** Asociación de Rotavirus y *Escherichia coli* fimbriada como agentes causales de infecciones entéricas en alpacas y enteropatógena. *Rev Inv Vet Perú* 18: 150-153. doi: 10.15381/rivep.v18i2.1486
18. **More J, Manchego A, Rivera H, Sandoval N, Ramírez M, Kim Lam C, Lazaro R, Bardález C. 2013.** Expression of cytokines that regulate immune responses in alpaca (*Vicugna pacos*) blood leukocytes stimulated by clostridial antigens and retinoic acid. *Front Immunol* 4. doi: 10.3389/conf.fimmu.2013.02.00318
19. **Mori L, Perales R, Rodríguez J, Shiva C, Koga Y, Choquehuanca G, Palacios C. 2014.** Molecular identification of Shiga-toxin producing and enteropathogenic *Escherichia coli* (STEC and EPEC) in diarrheic and healthy young

- alpacas. *Adv Microbiol* 04: 360-364. doi: 10.4236/aim.2014.47043
20. **Nagy B, Fekete PZ. 1999.** Enterotoxigenic *Escherichia coli* (ETEC) in farm animals. *Vet Res* 30: 259-284. doi: 10.1016/S0928-4249(99)80020-0
  21. **Odbileg R, Konnai S, Usui T, Ohashi K, Onuma M. 2005.** Quantification of llama inflammatory cytokine mRNAs by real-time RT-PCR. *J Vet Med Sci* 67: 195-198. doi: 10.1292/jvms.67.195
  22. **Rosadio A, Maturrano H, Pérez J, Luna E. 2012.** El complejo entérico neonatal en alpacas andinas. *Rev Inv Vet Perú* 23: 261-271. doi: 10.15381/rivep.v23i3.908
  23. **Rosano GL, Ceccarelli EA. 2014.** Recombinant protein expression in *Escherichia coli*: advances and challenges. *Front Microbiol* 5: 172. doi: 10.3389/fmicb.2014.00172
  24. **Schandené L, Alonso-Vega C, Willems F, Gérard C, Delvaux A, Velu T, Devos R, de Boer M, Goldman M. 1994.** B7/CD28-dependent IL-5 production by human resting T cells is inhibited by IL-10. *J Immunol* 152: 4368-4374. doi: 10.4049/jimmunol.180.9.5771
  25. **Sulabh S, Panigrahi M, Kumar S, Varshney R, Verma A, Baba NA, Gupta JP, et al. 2019.** Differential cytokine response of *Escherichia coli* lipopolysaccharide stimulated peripheral blood mononuclear cells in crossbred cattle, Tharparkar cattle and Murrah buffalo - An *in vitro* study. *Spa J Agric Res* 17: e0501. doi: 10.5424/sjar/2019-171-12599
  26. **Tambillo GL, Manchego SA, Chiok CKL, Sandoval CN, More BJ, Rivera GH. 2014.** Evaluación *in vitro* de la respuesta leucocitaria de alpacas (*Vicugna pacos*) en presencia de antígenos clostridiales. *Rev Inv Vet Perú* 24: 510-523. doi: 10.15381/rivep.v24i4.2742
  27. **Tiels P, Verdonck F, Coddens A, Goddeeris B, Cox E. 2008.** The excretion of F18 + *E. coli* is reduced after oral immunisation of pigs with a FedF and F4 fimbriae conjugate 2154-2163. *Vaccine* 26: 2154-2163. doi: 10.1016/j.vaccine.2008.01.054
  28. **Tizard IR. 2013.** *Veterinary immunology.* Elsevier/Saunders. 568 p.
  29. **Watanabe R, Manchego A, Rivera H. 2014.** Expresión *in vitro* de las interleucinas 2 y 10 de linfocitos de alpacas (*Vicugna pacos*) en presencia de antígenos clostridiales. *Rev Inv Vet Perú* 25: 419-429. doi: 10.15381/rivep.v25i3.10121
  30. **Whitehead CE, Anderson DE. 2006.** Neonatal diarrhea in llamas and alpacas. *Small Ruminant Res* 61: 207-215. doi: 10.1016/j.smallrumres.2005.07.012
  31. **Whiteside TL. 1994.** Cytokines and cytokine measurements in a clinical laboratory. *Clin Diagn Lab Immunol* 1: 257-260.
  32. **Zhang H, Xu Y, Zhang Z, You J, Yang Y, Li X. 2018.** Protective immunity of a multivalent vaccine candidate against piglet diarrhea caused by enterotoxigenic *Escherichia coli* (ETEC) in a pig model. *Vaccine* 36: 723-728. doi: 10.1016/j.vaccine.2017.12.026