



Evaluación de la respuesta inmune inducida por la proteína recombinante NH36 producida por *Escherichia coli* y *Pichia pastoris* en ratones BALB/c.

Raúl Arjona-Sabido, Pedro Martínez-Vega, Julio Cruz-Chan, María Ramírez-Sierra, Miguel Rosado-Vallado, Eric Dumonteil. Centro de Investigaciones Regionales "Dr. Hideyo Noguchi" UADY, Lab. Parasitología. Mérida, 97225. raul.arjo.sa@gmail.com.

Palabras clave: *Leishmania mexicana*, *Pichia pastoris*, *Escherichia coli*.

Introducción. La Leishmaniosis cutánea es una de las enfermedades desatendidas y es causada por el parásito intracelular *Leishmania mexicana*. Hasta el momento no existe tratamiento efectivo, por lo que surge la necesidad de desarrollar una vacuna. El candidato a vacuna de proteína recombinante NH36 producida en *E. coli* (1) ha dado resultados prometedores por lo que en un esfuerzo de optimizar se ha realizado el cambio de sistema de expresión. Se escogió *P. pastoris* por las ventajas que esta ofrece, así como la vía de administración intradérmica que ha demostrado ofrecer ventajas en comparación a otras vías de administración convencionales como la subcutánea (2).

Objetivo. Evaluar la respuesta inmune humoral y celular provocada por las vacunas de proteína recombinantes producidas en *E. coli* y *P. pastoris*. ratones BALB/c.

Metodología. Se inmunizaron vía ID a ratones BALB/c (n=5). Se usaron las siguientes formulaciones en combinación con el adyuvante Glucopiranosil Lipido A (GLA) que es un agonista del TLR-4. NH36E.coli+GLA, NH36P.pastoris+GLA, Nh36E.coli, NH36P.pastoris, GLA y sol. salina. Se administraron 2 refuerzos con 15 días de diferencia. Los ratones se sacrificaron 15 días después del último refuerzo. Se utilizó el suero de los ratones para la determinación de los niveles de IgG totales e isotipos (IgG1 e IgG2a) mediante la técnica de ELISA indirecto usando como recubrimiento proteína recombinante o NH36 o antígeno soluble de *L. Mexicana* (ASL). Para determinar el tipo de respuesta celular, se aislaron los esplenocitos de los ratones inmunizados, se re-estimularon *in-vitro* con NH36 o ASL y se marcaron con anticuerpos monoclonales (Superficie: anti-CD3, -CD4, -CD8. Intracelular: anti-IFN- γ e IL-4).

Resultados. En el análisis de la respuesta inmune humoral, los niveles plasmáticos más elevados de IgG totales, IgG1 e IgG2a específicos contra NH36 se encontró en el suero de los ratones inmunizados con NH36 producida en *P. pastoris*. Una diferencia significativa ($p < 0.05$) se observó en los niveles plasmáticos de IgG2a en los ratones inmunizados con NH36P.pastoris+GLA. Sin embargo no se encontró diferencia significativa en los niveles de IgG totales e isotipos contra ASL. En la respuesta inmune celular específica contra NH36, se encontró un porcentaje significativamente mayor ($p < 0.03$) de células con el fenotipo CD8⁺IFN- γ ⁺ en esplenocitos aislados de ratones

inmunizados con NH36P.pastoris+GLA. Cuando se estimuló *in-vitro* con ASL, se observó que el porcentaje más alto de células CD8⁺IFN- γ ⁺ pertenecía a los ratones que fueron inmunizados con la NH36 producida en *P.pastoris*. No se encontró diferencia significativa.

Conclusiones. La proteína obtenida en *P. pastoris* mostró ser más inmunogénica que la obtenida en *E. coli*, cuando se administra vía intradérmica. Esto podría deberse que al estar altamente glicosilada es reconocida con facilidad por las CPA residentes de la piel, en especial las células de Langerhans que reconocen estos sitios glicosilados mediante los receptores de lectina tipo C por lo que facilita su endocitosis para posteriormente presentar vía MHC-I preferentemente a células TCD8⁺ del tipo I que son productores de IFN- γ , la cual esta ligada a la protección contra parásitos intracelulares como *L. mexicana*.(2,3)

Agradecimiento. Iniciativa Slim para el desarrollo de vacunas contra la pobreza.

Bibliografía.

1. Kumar A. (2013) "*Leishmania and Leishmaniasis*" Springer, London. Pag 2-25.
2. Apostolopoulos V. (2013) "Targeting antigens to dendritic cell receptors for vaccine development." *J Drug Deliv* Vol. 2013 pag. 32.
3. Li K, Gao H, Gao Y, Qin L, et al. (2012) "Recombinant gp90 protein expressed in *Pichia pastoris* induce a protective immune response against reticuloendotheliosis virus in chickens" *Vaccine*, vol 30, pag 81.


M. en C. Pedro Martínez Vega


Dr. Julio Cruz Chan


Dr. Miguel Rosado Vallado


QFB. María Ramírez Sierra


IBQ. Raúl Arjona Sabido


Dr. Eric Dumonteil