



Establecimiento de un proceso productivo a escala de laboratorio para la obtención de antígenos recombinantes contra *Lawsonia intracellularis*, causante de la enteropatía proliferativa porcina, en *Escherichia coli*.

Salazar Guamán, Santiago Alberto

Departamento de Ciencias de la Vida y de la Agricultura

Carrera de Ingeniería en Biotecnología

Trabajo de titulación, previo a la obtención del título de Ingeniero en Biotecnología

Dra. Ramos Gómez, Thelvia Isabel, M.Sc.

11 de agosto del 2020



Document Information

Analyzed document Salazar Guamán Santiago Alberto.docx (D77871482)
Submitted 8/17/2020 8:19:00 PM
Submitted by
Submitter email sasalazar7@espe.edu.ec
Similarity 0%
Analysis address tiramos.espe@analysis.arkund.com

Sources included in the report

Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE / TESIS_PAEZ ESPINOZA VANESSA MARGARITA_arkund.docx
SA Document TESIS_PAEZ ESPINOZA VANESSA MARGARITA_arkund.docx (D54106120)
Submitted by: vmpaez1@espe.edu.ec
Receiver: tiramos.espe@analysis.arkund.com



2



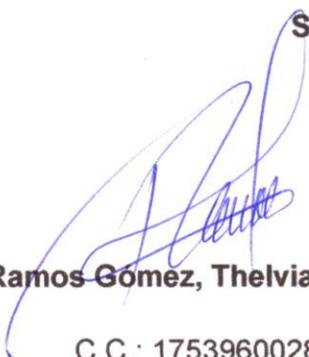
DEPARTAMENTO DE CIENCIAS DE LA VIDA Y DE LA AGRICULTURA

CARRERA DE INGENIERÍA EN BIOTECNOLOGÍA

CERTIFICACIÓN

Certifico que el trabajo de titulación, "**Establecimiento de un proceso productivo a escala de laboratorio para la obtención de antígenos recombinantes contra *Lawsonia intracellularis*, causante de la enteropatía proliferativa porcina, en *Escherichia coli*"** fue realizado por el señor **Salazar Guamán, Santiago Alberto** el cual ha sido revisado y analizado en su totalidad por la herramienta de verificación de similitud de contenido; por lo tanto cumple con los requisitos legales, teóricos, científicos, técnicos y metodológicos establecidos por la Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE, razón por la cual me permito acreditar y autorizar para que lo sustente públicamente.

Sangolquí, 20 de agosto del 2020



Ramos Gómez, Thelvia Isabel

C.C.: 1753960028



DEPARTAMENTO DE CIENCIAS DE LA VIDA Y DE LA AGRICULTURA

CARRERA DE INGENIERÍA EN BIOTECNOLOGÍA

RESPONSABILIDAD DE AUTORÍA

Yo, **Salazar Guamán, Santiago Alberto**, con cédula de ciudadanía n° 1726749771, declaro que el contenido, ideas y criterios del trabajo de titulación: **Establecimiento de un proceso productivo a escala de laboratorio para la obtención de antígenos recombinantes contra *Lawsonia intracellularis*, causante de la enteropatía proliferativa porcina, en *Escherichia coli*** es de mi autoría y responsabilidad, cumpliendo con los requisitos legales, teóricos, científicos, técnicos, y metodológicos establecidos por la Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE, respetando los derechos intelectuales de terceros y referenciando las citas bibliográficas.

Sangolquí, 11 de agosto del 2020

Salazar Guamán, Santiago Alberto

C.C.: 1726749771



DEPARTAMENTO DE CIENCIAS DE LA VIDA Y DE LA AGRICULTURA

CARRERA DE INGENIERÍA EN BIOTECNOLOGÍA

AUTORIZACIÓN DE PUBLICACIÓN

Yo **Salazar Guamán, Santiago Alberto**, con cédula de ciudadanía n°1726749771, autorizo a la Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE publicar el trabajo de titulación: **Establecimiento de un proceso productivo a escala de laboratorio para la obtención de antígenos recombinantes contra *Lawsonia intracellularis*, causante de la enteropatía proliferativa porcina, en *Escherichia coli***, en el Repositorio Institucional, cuyo contenido, ideas y criterios son de mi responsabilidad.

Sangolquí, 11 de agosto del 2020

Salazar Guamán, Santiago Alberto

C.C.:1726749771

Dedicatoria

Dedicado a mi familia, quienes siempre creyeron en mí.

Santiago Alberto Salazar Guamán

Agradecimientos

Un sincero agradecimiento a mi tutora de tesis, Dra. Raquel Montesino. Ella permitió que este trabajo fuera fruto de mi esfuerzo, guiándome en la dirección correcta cada vez que lo necesitaba. Su paciencia y conocimiento contribuyeron enormemente en la etapa de laboratorio y escritura del proyecto.

La contribución técnica y teórica de Eduardo Ramos en este proyecto es realmente apreciada. Sin embargo, el apoyo, consejo y confianza brindada durante mi estancia en el laboratorio me facilitaron desarrollar mi potencial y con ello crecer personal y profesionalmente.

Un merecido agradecimiento a mi directora de tesis, Dra. Thelvia Ramos, quien con sus enseñanzas y experiencias en el campo de biofármacos me animó a expandir mis horizontes. Sin su ayuda no hubiese sido posible mi estancia de investigación en la Universidad de Concepción.

Una especial mención al Dr. Jorge Toledo, por brindarme la oportunidad de unirme a su laboratorio como pasante y posteriormente tesista. Su buena disposición y calidad humana hicieron que la estancia en el laboratorio fuera confortable.

Una eterna gratitud a mi familia, especialmente a mis padres, Nelly y Julio, por su apoyo inagotable, amor y sacrificios durante todos mis años de estudio. Su cariño y aliento fueron parte fundamental en la elaboración de este trabajo, pero sobre todo en mi formación personal.

Un incuantificable agradecimiento a mis amigos y compañeros de laboratorio, Fernando, Bryan, Luis y Carlos, por todos los años de amistad durante mi etapa universitaria.

Un especial sentimiento de gratitud a mis entrañables amigas Carlita y Angy, quienes con su compañía hicieron más amena y divertida mi estancia en el Chile.

Índice de Contenidos

Portada.....	1
Verificación de similitud de contenido.....	2
Certificación.....	3
Autoría de Responsabilidad.....	4
Autorización.....	5
Dedicatoria	6
Agradecimientos.....	7
Índice de Contenidos.....	8
Índice de Tablas.....	13
Índice de Figuras.....	15
Abreviaturas	17
Resumen.....	18
Abstract.....	19
Capítulo 1	20
Introducción.....	20
Formulación del problema y antecedentes.....	20
Justificación del problema.....	23
Objetivos del proyecto	24
Objetivo general	24

Objetivos específicos.....	24
Capítulo 2.....	25
Marco Teórico	25
<i>Lawsonia intracellularis</i>	25
Enteropatía proliferativa.....	25
Patogénesis.....	26
Respuesta inmune.....	27
Diagnóstico	28
Tratamiento y control.....	29
Vacunas contra patógenos intracelulares.....	29
Vacunas contra <i>L. intracellularis</i>	30
<i>Escherichia coli</i>	32
Bioprocesos en la producción de proteínas recombinantes.....	33
Capítulo 3.....	35
Metodología	35
Establecimiento del inóculo.....	35
Preinóculo.....	35
Inóculo.....	36
Preparación del medio de cultivo Terrific Broth modificado para crecimiento en fermentador.....	36
Inoculación del fermentador.....	36

	10
Crecimiento celular y determinación de biomasa seca.....	37
Monitoreo de las condiciones de crecimiento en fermentador.....	37
Alimentación del cultivo.....	38
Adición de isopropil- β -D-1-tiogalactopiranosido.....	38
Análisis de la estabilidad del plásmido.....	38
Ruptura celular en prensa francesa.....	38
Ruptura celular en molino de bolas.....	39
Aislamiento de cuerpos de inclusión.....	39
Electroforesis en geles de poliacrilamida SDS-PAGE.....	40
Western blot.....	40
Ensayo de estabilidad.....	41
Determinación de la calidad microbiológica.....	41
Capítulo 4.....	42
Resultados.....	42
Determinación de condiciones de cultivo para la expresión de los antígenos recombinantes.....	42
Establecimiento de condiciones del preinóculo en tubos de 50 mL.....	42
Estudio de condiciones del inóculo en matraces de 500 mL.....	44
Análisis de crecimiento en medio TB sin inducción.....	45
Análisis de crecimiento celular en medio TB con 3% de glicerol (TB- modificado) sin inducción.....	47

Influencia de la adición de extracto de levadura y glicerol en el crecimiento celular.	49
Análisis de la expresión de antígenos recombinantes de <i>L. intracelullaris</i>	50
Efecto de la concentración de IPTG en la expresión de los antígenos recombinantes.....	51
Relación entre la concentración celular a la inducción y la expresión de antígenos.	53
Estabilidad del plásmido durante la fermentación.....	55
Validación del proceso de producción de antígenos utilizando glucosa como fuente de carbono.....	57
Aislamiento y purificación de los antígenos recombinantes.....	59
Eficiencia de ruptura celular.	59
Aislamiento de cuerpos de inclusión.....	60
Ensayos de estabilidad de los antígenos a temperatura de conservación.....	62
Calidad Microbiológica.....	63
Capítulo 5.....	66
Discusión.....	66
Capítulo 6.....	73
Conclusiones.....	73
Recomendaciones.....	73
Capítulo 8.....	75

	12
Bibliografía	75
Anexos	92

Índice de Tablas

<i>Tabla 1. Crecimiento celular de E. coli SHuffle transformada con el vector pLawVac en tubos de polipropileno de 50 mL con 10 mL de medio LB (preinóculo)..</i>	43
<i>Tabla 2. Crecimiento celular de E. coli SHuffle T7 transformada con el vector pLawVac en matraces de 500 mL con 100 mL de medio LB (inóculo).....</i>	45
<i>Tabla 3. Crecimiento celular de E. coli SHuffle T7 transformada con el vector pLawVac en medio TB sin inducción.</i>	46
<i>Tabla 4. Crecimiento celular de E. coli SHuffle T7 que expresa antígenos de L. intracellularis en medio TB modificado (3% glicerol) sin inducción.....</i>	48
<i>Tabla 5. Crecimiento celular de E. coli SHuffle T7, transformada con el vector pLawVac, en medio TBM suplementado con glicerol 3 % (concentración final) y extracto de levadura 2,4 % (concentración final) a las 6 horas..</i>	50
<i>Tabla 6. Efecto de la concentración de IPTG en el rendimiento de los antígenos recombinantes de L. intracellularis en E. coli SHuffle T7.....</i>	51
<i>Tabla 7. Dependencia entre la concentración celular en la inducción y el rendimiento volumétrico de antígenos recombinantes.....</i>	54
<i>Tabla 8. Comparación del rendimiento volumétrico de antígenos recombinantes de L. intracellularis, utilizando glucosa y glicerol como fuente de carbono en la fase de pre-inducción.</i>	57

<i>Tabla 9. Recuperación y lavados del pellet de ruptura que contienen los antígenos recombinantes de L. intracellularis.....</i>	<i>61</i>
<i>Tabla 10. Cuantificación de la concentración de antígenos recombinantes de L. intracellularis almacenados a 4 °C y -20 °C a través del tiempo.....</i>	<i>63</i>

Índice de Figuras

<i>Figura 1. Curva de crecimiento de E. coli SHuffle T7 transformada con el vector pLawVac en tubos de polipropileno de 50 mL con 10 mL de cultivo, partiendo de un stock de glicerol (preinóculo).....</i>	<i>44</i>
<i>Figura 2. Curva de crecimiento de E. coli SHuffle T7, transformada con el vector pLawVac, en matraces de 500 mL con 100 mL de medio LB, partiendo del preinóculo (inóculo).....</i>	<i>45</i>
<i>Figura 3. Curva de crecimiento de E. coli SHuffle T7 transformada con el vector pLawVac en medio TB sin inducción.</i>	<i>47</i>
<i>Figura 4. Curva de crecimiento de E. coli SHuffle T7 transformada con el vector pLawVac en medio TB modificado (3% glicerol) sin inducción.</i>	<i>48</i>
<i>Figura 5. Curva de crecimiento de E. coli SHuffle T7 transformada con el vector pLawac en medio TBM suplementado con glicerol 3 % y extracto de levadura 2,4 %. 50</i>	<i>50</i>
<i>Figura 6. Efecto de la concentración de IPTG en el crecimiento celular.</i>	<i>52</i>
<i>Figura 7. Análisis de la expresión de los antígenos inducida con diferentes concentraciones de IPTG luego de ruptura celular mediante.</i>	<i>52</i>
<i>Figura 8. Curva de crecimiento de E. coli SHuffle T7 que expresa antígenos recombinantes contra L. intracellularis. Inducción a 11,76 g/L (Fermentación 1) y 5,02 g/L (Fermentación 2).</i>	<i>54</i>
<i>Figura 9. Análisis de la expresión de los antígenos mediante inducida a diferentes concentraciones celulares.....</i>	<i>55</i>

- Figura 10. Estabilidad del plásmido en un cultivo alimentado, utilizando glicerol y glucosa como fuente de carbono en la fase de preinducción..56*
- Figura 11. Curva de crecimiento de E. coli SHuffle T7 que expresa antígenos recombinantes contra L. intracellularis utilizando glucosa como fuente se carbono en la fase de pre-inducción en cultivos de alta densidad celular.58*
- Figura 12. Análisis de la expresión de los antígenos recombianes utilizando glucosa como fuente se carbono en la fase de pre-inducción.58*
- Figura 13. Evaluación de la eficiencia de ruptura celular mediante Molino de Bolas y Prensa Francesa.....59*
- Figura 14. Sedimentación de los cuerpos de inclusión a 4400 G en el tiempo.....61*
- Figura 15. Lavados de los cuerpos de inclusión.62*
- Figura 16. Ensayos de estabilidad de los antígenos recombinantes de L. intracellularis a diferentes temperaturas de almacenamiento.63*
- Figura 17. Ensayo de calidad microbiológica en medios Agar Triptona, Agar Sabouraud incubados y Tioglicolato.....64*

Abreviaturas

ADN	Ácido desoxirribonucleico
CMH-I	Complejo mayor de histocompatibilidad de clase I
EP	Enteropatía proliferativa
G	gravedades
g	gramos
IgA	Inmunoglobulina A
IgG	Inmunoglobulina G
IFN- γ	Interferón gamma
pIFN- α	Interferón alfa porcino
IL-6	Interleucina-6
INVAS	Invasina
INVASc	Invasina quimérica
IPTG	Isopropil- β -D-1-tiogalactopiranosido.
kDa	Kilodaltons
L	Litros
LB	Luria Bertani
M	Molar
mg	Miligramos
mL	Mililitros
mM	Milimolar
OMP1	Proteína de membrana externa 1
OMP1c	Proteína de membrana externa 1 quimérica
OMP2	Proteína de membrana externa 2
OMP2c	Proteína de membrana externa 2 quimérica
pLawVac	Plásmido con antígenos de <i>L. intracellularis</i>
TB	Terrific broth
TBM	Terrific broth modificado
μ	Velocidad de crecimiento
μ g	Microgramos
μ L	Microlitros

Resumen

Lawsonia intracellularis es el agente causal de la enteropatía proliferativa porcina, y se asocia a la ocurrencia de grandes pérdidas económicas en el sector a nivel mundial. La alternativa más viable para la prevención de esta enfermedad infecciosa es la vacunación. En la actualidad existen vacunas comerciales basadas en la bacteria viva atenuada e inactivada, sin embargo, no existe una vacuna recombinante. Tres antígenos quiméricos de *L. intracelullaris* desarrollados previamente OMP1c, OMP2c e INVASc otorgaron protección a cerdos contra la infestación del patógeno, posterior a la inmunización con el candidato vacunal en ensayos en condiciones controladas. En el presente trabajo se desarrolló un proceso productivo a escala de laboratorio para la producción de los antígenos quiméricos expresados como cuerpos de inclusión en la bacteria transformada de *Escherichia coli*. La biosíntesis de los antígenos recombinantes se desarrolló en un cultivo por lote alimentado en un fermentador de 2 L. Las condiciones de cultivo establecidas permitieron obtener un rendimiento volumétrico de antígenos mayor a 0,5 g/L. Mientras que los procesos de recuperación y purificación realizados mediante centrifugación y lavados, resultaron en una recuperación del 63,7% y una pureza del 73,6%. Los antígenos mostraron ser estables durante 60 días en condiciones de almacenamiento de 4°C y -20°C. Además, la adición de preservantes a la solución de antígenos es importante para garantizar la calidad microbiológica del producto final.

Palabras clave:

- **ANTÍGENOS RECOMBINANTES**
- ***ESCHERICHIA COLI***
- **CULTIVO ALIMENTADO**
- **CUERPOS DE INCLUSIÓN**

Abstract

Lawsonia intracellularis is the causative agent of porcine proliferative enteropathy, and it is associated with the occurrence of large economic losses in the sector worldwide. The most viable alternative to prevent this infectious disease is vaccination. At present day there are commercial vaccines based on live attenuated and inactivated bacteria, however, there is no a recombinant vaccine. Three chimeric antigens of *L. intracellularis* previously developed OMP1c, OMP2c and INVASc granted protection to pigs against the infestation of the pathogen, after immunization with the vaccine candidate in controlled conditions trials. In the present work a productive process was developed on a laboratory scale for the production of the chimeric antigens expressed as inclusion bodies in a transformed *Escherichia coli*. The biosynthesis of the recombinant antigens was carried out in a fed-batch culture in a 2 L fermenter. The established culture conditions allowed to obtain a volumetric yield of antigens greater than 0,5 g/L. While the recovery and purification processes performed by centrifugation and washing, resulted in a recovery of 63,7% and a purity of 73,6%. The antigens were stable for 60 days under storage conditions of 4 °C and -20 °C. In addition, the addition of preservatives to the antigen solution is important to ensure the microbiological quality of the final product.

Key words:

- **RECOMBINANT ANTIGENS**
- ***ESCHERICHIA COLI***
- **FED-BATCH**
- **INCLUSION BODIES**

Capítulo 1

Introducción

Formulación del problema y antecedentes

La enteropatía proliferativa (EP) o ileítis es una enfermedad infecciosa, endémica de cerdos, caracterizada por el engrosamiento de la mucosa intestinal (Vannucci, Gebhart y McOrist, 2019). El primer reporte de la enteropatía proliferativa se realizó en 1931, descrito como un adenoma intestinal porcino (Biester y Schwarte, 1931). En 1973 con la ayuda del microscopio electrónico se logró observar a una bacteria curva intracelular en las lesiones adenomatosas relacionándolo con un vibrio (Rowland et al., 1973). La bacteria causante de la patología fue aislada en sistema de cultivo celular con enterocitos de rata por primera vez en 1993 (Lawson et al., 1993) y luego de su caracterización fue nombrada *Lawsonia intracellularis* (McOrist, Gebhart, Boid y Barns, 1995).

La enfermedad puede presentarse de forma clínica o subclínica. Los animales infectados de forma clínica presentan diarrea y crecimiento reducido, lo que resulta en mayores gastos hasta llegar a su comercialización (Jacobson et al., 2010). En los adultos jóvenes, la infección puede llevar a una forma hemorrágica aguda de la enfermedad y posteriormente la muerte (Jacobson et al., 2010; Vannucci et al., 2019). Los animales infectados de forma subclínica, no tienen signos clínicos claros, solamente se observa una disminución de la velocidad de crecimiento (Vannucci et al., 2019).

Las pérdidas económicas causada por la enteropatía proliferativa dependen de la cantidad de animales infectados y de la gravedad del cuadro clínico (Jansen et al., 2019). Un estudio realizado por Pérez (2016) en Argentina, estimó que las pérdidas económicas debido a la reducción del crecimiento de los cerdos, en granjas donde se detectó *L. intracellularis*, fue alrededor de 1,3 a 4,66 dólares por cerdo. Mientras que en Australia se estimó que las pérdidas económicas eran entre 6,5 a 12 dólares por cerdo, sin tomar en cuenta la forma subclínica de la enfermedad (Collins, 2013).

La enteropatía proliferativa porcina se encuentra extendida alrededor del mundo (Arnold et al., 2019; Hossain et al., 2016; Resende et al., 2015). En Europa se estimó que entre el 70 y 100 % de los rebaños eran infectados con el patógeno (Arnold et al., 2019). En Estados Unidos se informó que el 75% de los rebaños habían sido infectados (Marsteller et al., 2003). En Sudamérica se han reportado infecciones por *L. intracellularis* con prevalencias mayores al 30%. Estudios realizados en rebaños de Perú reportaron una seroprevalencia del 38,5% (Calle et al., 2006), en Colombia se determinó una prevalencia del 56% (Jiménez et al., 2014) y en Argentina 80% (Corrales et al., 2009) lo que indica su amplia difusión en la región.

Las técnicas de tinción histoquímicas e inmunohistoquímica post-mortem son la prueba de referencia para el diagnóstico de la enteropatía proliferativa (McOrist, Boid, Lawson y McConnell, 1987). En la actualidad se han desarrollados técnicas moleculares de diagnóstico que incluyen pruebas serológicas (Hassenin et al., 2017) y de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) (Burrough, 2015). Sin embargo, los títulos positivos solo indican una exposición previa al patógeno, y la PCR tiene una sensibilidad y especificidad variable dependiendo de la forma de la enfermedad que puede llevar a sobreestimar el número de cerdos infectados (Pedersen et al., 2010; Wattanaphansak

et al., 2008). Por lo que aún no se ha encontrado una técnica de diagnóstico comparable con los ensayos histológicos (Jacobson et al., 2010).

El tratamiento actual para la EP está basado en la administración de antibióticos. Tiamulina, tilosina, lincomicina-espectinomicina y clortetraciclina han sido empleados para el tratamiento y prevención de la enteropatía proliferativa con efectos clínicos positivos (McOrist, Muller Wager, Kratze y Sjösten, 2000; Otoni et al., 2019) . Sin embargo, el uso de antibióticos puede llevar a que se desarrollen bacterias resistentes, complicando el tratamiento y siendo un problema de salud pública (Shrivastava et al., 2018). Además, suspender el antibiótico el animal queda expuesto a una posible infección por *L. intracellularis* ya que la bacteria no es reconocida por el sistema inmunológico (Collins, 2013).

La alternativa más viable al uso de antibióticos ha demostrado ser la vacunación (Obradovic y Wilson, 2020). En el mercado existen dos vacunas disponibles. La vacuna basada en la bacteria viva atenuada Enterisol Ileitis, administrada por vía oral, aunque la vacuna no logró eliminar por completo las bacteria patógenas expulsadas a través de las heces, demostró levantar una respuesta inmune mediada por células, reduciendo los signos clínicos provocados por *L. intracellularis*, (Riber et al., 2015). No obstante, el uso de vacunas vivas atenuadas tiene riesgos potenciales, como la virulencia en animales susceptibles y la posible reversión de la atenuación (Nascimento y Leite, 2012). La vacuna inactivada Porcilis Ileitis, administrada por vía intramuscular, levanta principalmente una respuesta inmune humoral y demostró reducir la colonización del patógeno y la gravedad de la enfermedad (Roerink et al., 2018). Sin embargo, se necesita más estudios sobre el mecanismo de acción, ya que se ha demostrado la

protección debería estar mediado por una respuesta inmune celular (Cordes, Riber, Jensen y Jungersen, 2012).

Justificación del problema

Aunque en el mercado existen dos vacunas disponibles para la prevención de la Enteropatía proliferativa, una vacuna de subunidad podría competir con ellas, ya que las vacunas actuales necesitan cultivar el patógeno en células eucariotas, siendo costoso de producir (Plotkin et al., 2017). Las vacunas de subunidad por otro lado, son relativamente más baratas de producir y seguras, sin riesgo de reversión a la virulencia (Obradovic y Wilson, 2020).

Un candidato vacunal basado en subunidades recombinantes fue desarrollado por Montesino et al., (2019). Tres proteínas de *L. intracelullaris* como cuerpos de inclusión se usaron como antígenos de la vacuna: dos proteínas de la membrana externa de 63 kDa y 35 kDa (OMP1c, OMP2c) y una proteína secretora conocida como invasina de 25 kDa (INVASc). Los antígenos fueron modificados insertándoles epítopes de unión a linfocitos T (Montesino et al., 2019). La vacuna adjuvada con pIFN- α fue administrada en cerdos por vía intramuscular y provocó una respuesta inmune humoral y celular, protegiendo al animal contra el patógeno. (Montesino et al., 2019).

Aunque los antígenos recombinantes parecen ser ideales para una vacuna contra *L. intracelullaris*, la expresión de estas proteínas aún es muy baja (Montesino et al., 2019). Los antígenos desarrollados por Montesino et al., (2019) se expresaron en *E. coli* utilizando medio LB obteniéndose un rendimiento volumétrico de 5,6 mg Ag/L cultivo, lo que resulta ser muy bajo si se quiere obtener una vacuna económicamente

factible que puede competir en el mercado. Por lo tanto, este trabajo busca establecer procesos *upstream* y *downstream* a escala de laboratorio que permitan aumentar el rendimiento, además de garantizar la calidad de los antígenos recombinantes para ser usados en la formulación de una vacuna contra *L. intracellularis*.

Objetivos del proyecto

Objetivo general

Establecer un proceso productivo para la obtención de antígenos recombinantes contra *Lawsonia intracellularis*, causante de la enteropatía proliferativa porcina, en *Escherichia coli*.

Objetivos específicos

1. Definir las condiciones óptimas de cultivo para lograr más de 0,5 gr de antígeno por litro de cultivo.
2. Definir procedimiento de recuperación de antígenos con rendimiento mayor de 85%.
3. Realizar ensayos de estabilidad acelerados de los antígenos.
4. Redactar Procedimiento de Operación Estándar (POE) para cada etapa del proceso de producción.

Capítulo 2

Marco Teórico

Lawsonia intracellularis.

L. intracellularis es una bacteria intracelular obligada, Gram-negativa y sin fimbrias o esporas, perteneciente a la familia Desulfovibrionaceae (McOrist et al., 1995). La bacteria tiene 1,25-1,75 μm de largo, 0,25-0,43 μm de ancho y en su exterior una capa trilaminar (McOrist et al., 1995). Un flagelo unipolar se ha observado, pero solo cuando la bacteria se encuentra extracelular (Lawson y Gebhart, 2000). La bacteria tiene un genoma único y tres plásmidos, con un total de 1,72 millones de pb y 1.324 regiones codificantes de proteínas (Vannucci, Gebhart y McOrist 2019). *L. intracellularis* no puede ser cultivada *in vitro* en medios bacteriológicos convencionales, requiere de la división de células eucariotas crecidas en una atmósfera de 82,2% nitrógeno, 8,8% dióxido de carbono y 8% oxígeno (Lawson et al., 1993).

Enteropatía proliferativa.

La enteropatía proliferativa (EP), también llamada ileitis, es una enfermedad infecciosa causada por *L. intracellularis* (McOrist et al., 1995). Esta es una enfermedad endémica de cerdos, también se ha diagnosticado la enfermedad en caballos, hámsters, conejos, ratas, perros, gatos, focas, ovejas, ciervos, pollos, emús, cuyes y primates no humanos (Bohlin, Olsen, Laursen, Öhman y Van Galen, 2019; Hwang, Seo y Yeh, 2017; Resende et al., 2019; Ohta et al., 2017; Vannucci et al., 2019) . La forma crónica de la enfermedad se observa en cerdos de 6 a 20 semanas de edad y a menudo se caracterizan por diarrea leve, reducido consumo de alimento y baja ganancia de peso

(Vannucci et al., 2019). En la infección subclínica solo se observan tasas de crecimiento disminuidas (Vannucci, Gebhart y McOrist, 2019).

La forma aguda de la enfermedad se caracteriza por diarrea de intensidad variable y ocasionalmente heces alquitranadas negras que pueden progresar a diarrea acuosa con sangre franca (Vannucci et al., 2019). Otras observaciones comunes incluyen palidez, debilidad y muerte rápida (Jacobson et al., 2010).

Patogénesis.

La enteropatía proliferativa ha sido estudiada en modelos animales como cerdos y ratones. La invasión de *L. intracellularis* a enterocitos maduros diferenciados en el yeyuno, íleon, ciego y colon ocurre a las 12 horas de la inoculación oral en cerdos (Boutrup et al., 2010). A los 5 días existe la formación de grupos discretos de microcolonias en el epitelio y la lámina propia (Guedes et al., 2017). A partir del día 5 existe una infección generalizada en criptas individuales, con una diseminación en la lámina propia adyacente (Boutrup et al., 2010). La presencia de *L. intracellularis* en las células de la cripta intestinal, ubicadas en la base del epitelio, indica un tropismo hacia los enterocitos inmaduros constantemente en división (Vannucci et al., 2019). Esto puede deberse a que la bacteria tiene un mejor crecimiento en cultivos de células que se dividen rápidamente (McOrist, Jasni, et al., 1995; Resende, Pereira, et al., 2019). Por otro lado, se ha encontrado que *L. intracellularis* puede internalizarse y sobrevivir en el entorno fagolisosómico de los macrófagos del cerdo, pudiendo estar relacionado con la persistencia del patógeno en el huésped, que lleva a la forma crónica de la enfermedad (Pereira et al., 2020).

Respuesta inmune.

Aunque durante los primeros 7 días de la infección se observa la infiltración de neutrófilos entre las células de la cripta no hay signos evidentes de inflamación de las células epiteliales (Guedes et al., 2017; Macintyre et al., 2003). Mediante un mecanismo, aún desconocido, *L. intracellularis* provoca un estado de inmunosupresión retrasando el efecto inmediato de las células inmunes innatas y las citoquinas. Este mecanismo ayuda al patógeno a sobrevivir, multiplicarse y diseminarse dentro de las criptas intestinales (Obradovic y Wilson, 2020).

A los 15 días de la infección se ha informado que existe un aumento significativo en el número de macrófagos que han capturado el antígeno bacteriano (MacIntyre et al., 2003). Esto conduce a la secreción de citoquinas, primero TNF α a los 5-10 días de infección, seguido de IFN γ e IL-6 a los 10-20 días de infección. Las citoquinas tienen un rol importante en la activación de las células inmunes adaptativas (Yeh y Ga, 2018).

La producción de interferón gamma (IFN- γ) por linfocitos T activados fue reportado en cerdos inoculados con *L. intracellularis* (Guedes y Gebhart, 2003). IFN- γ secretado por células T CD8+ tiene la función de activar macrófagos (Charles A Janeway et al., 2001). Un estudio en ratones knockout carentes del receptor para IFN- γ (IFN- γ R-) se demostró que la infección por *L. intracellularis* fue sustancialmente mayor que en los ratones de tipo silvestre. Por lo que, los investigadores concluyeron que IFN- γ es crucial para la limitar la proliferación de la bacteria (Smith et al., 2000).

La respuesta humoral específica contra *L. intracellularis* está dada por grandes acumulaciones de inmunoglobulinas A (IgA) en la mucosa intestinal, la lámina propia y en el citoplasma apical de los enterocitos infectados que ocurre entre los 15 y 29 días

de infección (Guedes y Gebhart, 2010). IgA tiene un importante papel en la protección contra la invasión de *L. intracellularis* y la proliferación intracelular (Obradovic et al., 2019).

Por último, a partir de los 20 días de infección se ha observado un aumento sérico de TGF β , IL-10 e IL-8 (Yeh y Ga, 2018). Estas moléculas promueven la homeostasis de la respuesta inmune disminuyendo el efecto de las citoquinas proinflamatorias. IL-8 estimula a fagocitosis y la angiogénesis ayudando a la reparación de la mucosa intestinal (Obradovic y Wilson, 2020).

Diagnóstico

La prueba de referencia (gold standard) para el diagnóstico de la enteropatía proliferativa consta de un análisis histológico post-mortem de las lesiones intestinales causadas por el patógeno mediante técnicas de tinción histoquímicas e inmunohistoquímica (Jacobs et al., 2019; McOrist, Boid, Lawson, y McConnell, 1987). En la actualidad se han desarrollado técnicas moleculares de diagnóstico ante-mortem, las que incluyen pruebas serológicas y de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) (Draskovic et al., 2018). La detección de anticuerpos específicos en el suero puede identificar rebaños infectados (Barrera-Zarate et al., 2019; Wattanaphansak et al., 2008); no obstante, los títulos positivos de anticuerpos solo indican una exposición previa al patógeno. La PCR tiene una sensibilidad y especificidad variable dependiendo de la forma de la enfermedad que puede llevar a sobreestimar el número de cerdos infectados (Pedersen et al., 2010).

Tratamiento y control.

Dado que la transmisión de *L. intracellularis* es a través de la ingesta de heces contaminadas, la limpieza de las granjas utilizando desinfectantes es una de las medidas más simples que pueden implementarse para prevenir infecciones en los rebaños. El estudio de Collins et al., (2000) encontró que cetrimida 3% (amonio cuaternario) y yodopovidona 1% eran efectivos para la inactivación de la bacteria. Otros desinfectantes comerciales como el Stalosan[®] F y el Virkon[®] S también han demostrado inactivar el patógeno (Collins, Fell y Barchia, 2013; Wattanaphansak et al., 2009; Karuppannan y Opriessnig, 2018).

Una vez que se ha diagnosticado la EP en el rebaño, usualmente se administra antibióticos en el agua o comida de los cerdos como tratamiento de la enfermedad. Varios antibióticos como tiamulin y lincomicina-espectinomicina y clortetraciclina han demostrado ser eficaces en controlar y prevenir la enfermedad (McOrist, Muller Wager, Kratzer y Sjösten, 2000; Otoni et al., 2019). Sin embargo, el continuo uso de antibióticos puede llevar a desarrollar bacterias resistentes (Shrivastava et al., 2018). En el contexto actual de preocupación pública por el desarrollo de bacterias resistentes ha llevado a buscar estrategias alternativas para controlar la EP y reducir el uso profiláctico de antibióticos (Jansen et al., 2019).

Vacunas contra patógenos intracelulares.

El desarrollo de vacunas eficaces contra patógenos intracelulares generalmente se centra en producir principalmente una respuesta inmune mediada por células T (Hohman y Peters, 2019; Pham et al., 2017). Aunque el rol de las células B frente a muchas infecciones de patógenos intracelulares aún es debatido, está claro que la

protección que ofrecen es bajo (Fulop et al., 2001; Torrado et al., 2013). Sin embargo, el enfoque actual es la búsqueda de una respuesta inmune celular y humoral sinérgica, ya que estos tipos de respuestas están estrechamente interconectados (Casadevall, 2018). Estudios demuestran que una respuesta inmune celular y humoral conjunta produce una mejor protección contra patógenos intracelulares como en el caso de *Mycobacterium tuberculosis* (Prados-Rosales et al., 2017).

En las infecciones de cerdos con *L. intracellularis* se ha encontrado evidencia que existe una respuesta inmune protectora luego que los cerdos son infectados con una cepa virulenta de *L. intracellularis*, que evita que el patógeno recolonice el intestino del animal (Collins y Love, 2007). Estudios reportan que el IFN- γ secretado por células T CD4⁺ y CD8⁺ y la IgA secretada por células plasmáticas tienen un rol importante en la protección contra *L. intracellularis* (Cordes et al., 2012; Guedes y Gebhart, 2010; Nogueira, Collins, Dunlop y Emery, 2015). Por lo tanto, una vacuna ideal debería ser capaz de provocar una respuesta inmune equilibrada tanto celular como humoral.

Vacunas contra *L. intracellularis*

Una de las formas más eficaces para la prevención de la EP es la vacunación (Obradovic y Wilson, 2020). En la actualidad dos vacunas comerciales se encuentran disponibles para la prevención de la EP, la primera en ser desarrollada fue la vacuna basada en la cepa de *L. intracellularis* B3909 viva atenuada denominada Enterisol Ileitis (Kroll et al., 2004). El estudio de vacunación en cerdos con la bacteria atenuada mediante el agua de bebida con una dosis de 10^5 bacterias mostró una reducción de las lesiones intestinales, eliminación de síntomas clínicos y una mayor ganancia de peso en comparación con el grupo control no vacunado. No obstante, los animales vacunados aún arrojaban un gran número de bacterias en las heces, por lo

que la dosis no fue suficiente para levantar una fuerte respuesta inmune (Kroll et al., 2004). En otro estudio realizado por Riber et al., (2015), informó que los cerdos vacunados con la cepa atenuada tenían baja respuesta inmune celular y humoral en comparación con cerdos infectados con la cepa virulenta. Por lo tanto, la vacuna viva atenuada no garantiza una protección completa contra *L. intracellularis* (Obradovic y Wilson, 2020).

La segunda vacuna disponible en el mercado es la basada en el patógeno inactivado junto con un adjuvante (aceite mineral-tocoferol) denominada Porcilis *Lawsonia* (Roerink et al., 2018). La vacuna administrada por vía intramuscular demostró reducir la severidad de los signos clínicos, además de disminuir la colonización y la cantidad de bacterias en las heces del animal (Roerink et al., 2018). La protección de Porcilis demostró ser superior que la vacuna viva atenuada, mostrando un aumento en los títulos de anticuerpo luego de la vacunación y del reto frente al patógeno (Jacobs et al., 2019). Se necesitan más estudios que puedan ayudar a determinar si la protección contra el patógeno está vinculada con la respuesta inmune mediada por células.

A diferencia de las vacunas atenuadas, las vacunas de subunidades recombinantes son más seguras ya que solo toman una parte del microorganismo infeccioso para levantar la respuesta inmune, además de que su producción suele ser más barata (Obradovic y Wilson, 2020). Existe un candidato vacunal basado en proteínas recombinantes de *L. intracellularis* desarrollado por Montesino et al., (2019). La vacuna consiste en tres proteínas recombinantes a las que se les ha insertado epítopes de unión de linfocitos T, dos de estas proteínas pertenecen a la membrana externa (OMP1c y OMP2c), y la tercera es una proteína secretora denominada invasiva

(INVASc). La vacuna consistía en una formulación oleosa de las tres proteínas recombinantes como cuerpos de inclusión adjuvados con Montanide. La respuesta inmune y la protección de la vacuna se estudió en cerdos, Montesino et al., (2019) describe que luego del refuerzo, a los 21 días, hubo un aumento significativo en los títulos de IgG totales, en comparación con los controles no inmunizados. Además, la inmunización con la vacuna recombinante junto con pIFN- α como adyuvante provocó una respuesta inmune celular, evidenciado como un aumento en los niveles de expresión de los genes *il12a*, *CD4* y *oas2* en linfocitos de sangre periférica. El estudio inmunohistoquímico del grupo vacunado, mostró una protección del tejido intestinal sin lesiones macroscópicas luego del desafío bacteriano (Montesino et al., 2019).

Escherichia coli.

E. coli es uno de los organismos huésped más utilizados para la expresión de proteínas recombinantes debido a su capacidad para alcanzar altas densidades celulares rápidamente, simplicidad y bajo costo de producción (Fathi-Roudsari et al., 2016; Rosano et al., 2019). Proteínas terapéuticas como antígenos, anticuerpos, enzimas y complejos proteicos han sido sintetizados en *E. coli* (Tripathi, 2016). Aunque *E. coli* es utilizada comúnmente para la expresión de proteínas de bajo peso molecular, existen informes que reportan la expresión de proteínas de 90-95 kDa (Rosano y Ceccarelli, 2014).

Generalmente las cepas *E. coli* B y *E. coli* K12 son usadas para la expresión de proteínas recombinantes. Empero, las cepas B como la BL21 son preferidas ya que tiene un mejor rendimiento en comparación con las cepas K (Kim et al., 2018). BL21(DE3) es una cepa deficiente de las proteasas Lon y Omp, además expresa la ARN polimerasa T7 bajo el control del promotor *lacUV5*, que conduce a una alta

expresión de genes bajo el control del promotor *T7* (Ahmad et al., 2018). La cepa SHuffle T7 es derivada de la cepa B en la que se ha modificado el ambiente citoplasmático haciéndolo reductivo, para mejorar el correcto plegamiento de las proteínas (Lobstein et al., 2012).

Bioprocesos en la producción de proteínas recombinantes.

El desarrollo de bioprocesos tiene como objetivo final la producción rentable de biofármacos a gran escala, para satisfacer la demanda actual de productos biofarmacéuticos (Narayanan et al., 2020). Los procesos para la producción industrial de proteínas recombinantes de importancia terapéutica y profiláctica requieren de estandarización y optimización (Tripathi y Shrivastava, 2019). Los bioprocesos pueden ser divididos en dos etapas denominadas *upstream* y *downstream* (Jozala et al., 2016).

Los procesos *upstream* involucran la selección de sistema de expresión, selección de clones, medio de cultivo, preparación del inóculo y optimización de parámetros de crecimiento celular y producción biofarmacéutica (Jozala et al., 2016). Varios parámetros de cultivo, como la composición del medio, pH, agitación, aeración, temperatura, densidad celular, concentración del inductor, momento de la inducción y estrategias de alimentación al cultivo se pueden optimizar a escala de laboratorio en biorreactores pequeños para aumentar la productividad de proteínas recombinantes antes de pasar a la producción a gran escala (Chhetri et al., 2015). El éxito del establecimiento de los procesos *upstream* a escala de laboratorio es que puedan llevar a cabo a gran escala, siendo el principal reto mantener la misma productividad y calidad del producto (Tripathi, 2016).

Los procesos *downstream* incluyen todos los pasos para purificar un producto, desde el cultivo celular hasta el producto final purificado (Jozala et al., 2016). Las proteínas recombinantes expresadas de manera intracelular requieren de ruptura celular, los métodos más comúnmente usados a gran escala incluyen homogeneizador de alta presión y molino de bolas (Mevada et al., 2019). Los métodos que más son utilizados para la separación del producto de los restos celulares son la centrifugación y la filtración de flujo tangencial (Jozala et al., 2016).

El desarrollo de proceso de purificación es muy importante para lograr los niveles de pureza requeridos del producto. Las proteínas producidas de manera solubles generalmente se purifican por pasos de cromatografía (Adamíková et al., 2019). Basados en el nivel de pureza requerido varias técnicas de cromatografía están disponibles tales como la cromatografía de afinidad, intercambio iónico, interacción hidrofóbica y de exclusión molecular (Tripathi, 2016; Wingfield, 2015). Por otro lado, las proteínas expresadas como cuerpos de inclusión lado requiere de un paso de solubilización antes de pasar por cromatografía, y posteriormente un paso de replegamiento (Esmaili et al., 2018; Hadj Sassi et al., 2017). Sin embargo, los cuerpos de inclusión requerir menos pasos de purificación ya que generalmente son estructuras relativamente puras (Slouka et al., 2019).

Capítulo 3

Metodología

La obtención de un proceso productivo de las proteínas recombinantes puede ser dividido en tres etapas según los objetivos planteados. En la primera etapa se estableció las condiciones del inóculo partiendo de un stock de glicerol de *E. coli* transformada y la determinación de las mejores condiciones de cultivo para la fermentación. La segunda fase se enfocó en la recuperación y aislamiento de los antígenos recombinantes expresados como cuerpos de inclusión. Por último, en la tercera etapa se caracterizó el producto mediante ensayos de estabilidad y calidad microbiológica. El procedimiento de operación estándar se redactó para cada uno de los procesos establecidos para la obtención de los antígenos recombinantes.

Establecimiento del inóculo.

Preinóculo.

El preinóculo se preparó en dos tubos de 50 mL con 10 mL cada uno de medio de cultivo Luria Bertani (LB) (Liofilchem, Italia) y ampicilina a una concentración final de 100 µg/mL (USBiological, EE.UU). Los tubos se inocularon con 100 µL de un stock de glicerol de *E. coli* SHuffle T7 (New England Biolabs, Reino Unido) transformada con el plásmido pLawVac (Montesino et al., 2019), proveniente del banco de células de trabajo del Laboratorio de Fisiopatología de la Universidad de Concepción (BCTLAW1801). Los tubos se incubaron a 37 °C en agitación constante de 150 rpm durante 14 horas.

Inóculo.

Tres matraces de 500 mL que contenían 100 mL de caldo LB cada uno y ampicilina a una concentración final de 100 µg/mL se inocularon con 1 mL o 2 mL de preinóculo. Los matraces se incubaron a 37 °C en agitación constante de 150 rpm durante 12 horas. La densidad óptica se midió a diferentes tiempos, por absorbancia a 600 nm en un espectrofotómetro (UV-2505, Labomed, Inc., EE.UU).

Preparación del medio de cultivo Terrific Broth modificado para crecimiento en fermentador.

El medio de cultivo Terrific Broth (TB) se preparó según lo publicado por Tartoff y Hobbs (1987) añadiendo mayor cantidad de glicerol (3% v/v). El medio TB modificado contenía 24 g de triptona, 48 g de extracto de levadura (Becton Dickinson, EE.UU) y 70,6 mL de glicerol al 85% (v/v) disuelto en agua destilada en un volumen final de 1,6 L se añadió al fermentador de 5 L (Winpact FS-06, EE.UU). Las sales del medio TB se prepararon por separado, disolviendo 4,62 g de KH_2PO_4 (Merk, Alemania) y 25,08 g de K_2HPO_4 (Merk, Alemania) en agua destilada en un volumen final de 200 mL. El medio TB y las sales se esterilizaron por 15 minutos a 121 °C. Luego las sales y 2 mL de ampicilina (100 mg/mL) se añadieron al medio de cultivo. El medio TB además se modificó sustituyendo el glicerol por glucosa 2% (m/v) (Sigma, EE.UU).

Inoculación del fermentador.

Dos matraces con 100 mL de *inóculo* de 10 horas de cultivo, preparado como se describió previamente, se utilizaron para inocular el fermentador. Las condiciones

iniciales de temperatura a 37 °C, agitación a 200 rpm y pH de 7,0 se establecieron en el equipo.

Crecimiento celular y determinación de biomasa seca.

El crecimiento celular se midió por densidad óptica a 600 nm en el espectrofotómetro (UV-2.505, Labomed, Inc., EE.UU) durante la fase de crecimiento e inducción de la expresión de los antígenos. Las muestras de cultivo tomadas durante la fermentación fueron centrifugadas a 4.400 G por 10 minutos y luego los pellets se resuspendieron en una solución de NaCl 0,85% (Merck, Alemania). El blanco y las diluciones de las muestras se hicieron con NaCl 0,85%.

El peso seco se determinó centrifugando una muestra de cultivo de entre 1 y 10 mL a 4.400 G por 10 minutos. El sobrenadante se descartó, mientras que el pellet se resuspendió en 1 mL de agua destilada y se secó sobre una bandeja de aluminio en una balanza infrarroja de secado (Radwag, Radom, Polonia) a 90 °C hasta peso constante. La concentración de biomasa se calculó dividiendo el peso seco obtenido por el volumen de la muestra (g/L). La curva de calibración entre densidad óptica y peso seco, permitió conocer que una unidad de densidad óptica a 600 nm es equivalente a 0,49 gramos de biomasa seca por litro de cultivo (g/L).

Monitoreo de las condiciones de crecimiento en fermentador.

Durante la fermentación se monitoreó las condiciones de crecimiento: temperatura, agitación, pH y oxígeno disuelto. El oxígeno disuelto se controló variando la agitación del cultivo para que permaneciera sobre el 20%. El ajuste de pH a 7,0 se realizó mediante adición de NH₃OH al 30% (v/v) y H₃PO₄ al 20% (v/v).

Alimentación del cultivo.

Una solución estéril de 17,6% (m/m) de extracto de levadura y 22,1% (v/v) de glicerol se adicionó al cultivo a las 6 horas de crecimiento, mediante flujo constante de 2,5 mL/min, durante 2 horas.

Adición de isopropil- β -D-1-tiogalactopiranosido.

La expresión de los antígenos recombinantes se indujo añadiendo isopropil- β -D-1-tiogalactopiranosido (IPTG) al cultivo a una concentración final de 0,75 mM o 1,5 mM cuando la concentración de biomasa seca fue cercana a 5 o 11 g/L.

Análisis de la estabilidad del plásmido.

La estabilidad del plásmido se evaluó durante la fermentación. Las muestras de cultivo se diluyeron en una solución de NaCl al 0,85% hasta una dilución apropiada que genere entre 30 y 300 colonias. 0,1 mL de las diluciones realizadas se sembraron en placas con agar LB con y sin ampicilina. La retención del plásmido se calculó como el porcentaje de colonias que crecieron en agar LB con ampicilina respecto al total de colonias que crecieron en agar LB sin ampicilina.

Ruptura celular en prensa francesa.

50 mL de cultivo en diferentes tiempos de inducción se centrifugaron a 4.400 G por 20 minutos. El sobrenadante se descartó y el pellet se resuspendió en un volumen de buffer de ruptura 1 (Tris HCl 50 mM, NaCl 300 mM, EDTA 5 mM a pH 7,0) para obtener una suspensión celular de 20 g/L. La suspensión se recirculó 8 veces por la prensa francesa (Avestin, Canadá) a una presión de 12.000 psi. Luego el equipo se lavó

con el mismo volumen de buffer de ruptura 1 para obtener una crema de 10 g/L (relativo a la suspensión celular anterior). La crema se centrifugó a 4.400 G por 30 minutos. El sobrenadante se recolectó y guardó a -20 °C. El pellet se resuspendió en el mismo volumen con buffer fosfato 100 mM pH 7,0. Las muestras del sobrenadante y pellet de ruptura se analizaron mediante SDS-PAGE y Western blot.

Ruptura celular en molino de bolas.

Terminada la fermentación, el cultivo se centrifugó a 4.400 G durante 20 minutos. El sobrenadante se descartó y el pellet se resuspendió con el homogenizador (Velp Scientifica, Italia) en un volumen de buffer de ruptura 2 (PBS, Tritón X-100 0,1%) para obtener una suspensión celular de 20 g/L. La suspensión celular se pasó 10 veces a través del molino de bolas (DynoMill Multilab, Suiza) con perlas de vidrio 0,4 mm, con un tiempo de retención de 0,8 minutos cada pase. Luego el equipo se lavó con el mismo volumen de buffer de ruptura 2 para obtener una crema de 10 g/L (relativo a la suspensión celular anterior). La crema se centrifugó a 11.000 G por 30 minutos. El sobrenadante se recolectó y guardó a -20 °C. El pellet se resuspendió en buffer PBS con homogenizador. Las muestras del sobrenadante y pellet de ruptura se analizaron mediante SDS-PAGE y Western blot.

Aislamiento de cuerpos de inclusión.

La recuperación de los cuerpos de inclusión a partir de la crema rota fue evaluada mediante diferentes tiempos de centrifugación (10, 20 y 30 minutos) a una velocidad de 4.400 G. Luego seis diferentes condiciones de lavado con PBS, Tritón X-100, NaCl, Urea y Na₂HPO₄ se utilizaron para aumentar la pureza de los antígenos:

- PBS, pH 7,4
- Tritón 0,1%, Urea 1M
- Buffer Fosfato 0,1 M, pH 7,0
- Tritón 0,1%, Urea 2M
- Na₂HPO₄ 0,1 M, pH 12,0
- Tritón 1%, NaCl 1M

Electroforesis en geles de poliacrilamida SDS-PAGE.

La expresión de los antígenos se analizó mediante electroforesis SDS-PAGE en geles de poliacrilamida al 12,5%, 1,5 mm de espesor. La electroforesis se corrió a 90 V durante 3 horas. Las bandas de proteínas se visualizaron mediante tinción con azul de Coomassie durante 1 hora, luego el gel se destiñó con solución de distinción (20% metanol, 10% ácido acético). El gel se escaneó por el sistema de imágenes Odyssey (LI-COR, EE. UU). La cuantificación de los antígenos se realizó por densitometría en el software Image Studio, utilizando BSA como estándar para la curva de calibración.

Western blot.

Una vez separadas las proteínas en SDS-PAGE se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa utilizando un aparato de transferencia semiseco (BioRad, EE.UU) a 0,3 A, 25 V durante 45 minutos. La membrana se bloqueó con leche descremada al 5% en TBS durante toda la noche a 4 °C y agitación constante. Posteriormente, se incubó con el anticuerpo monoclonal anti-Histidina de ratón (Clontech, EE.UU) diluido 1:5.000 en leche descremada al 5% en TBS durante 2 horas a temperatura ambiente y agitación constante. Luego de tres lavados con TBS de 10 minutos cada uno, la membrana se incubó con el anticuerpo secundario anti-ratón Alexa fluor 680 de cabra (Jackson ImmunoResearch, EE.UU) diluido 1:10.000 en leche descremada al 5% en TBS durante 1 hora a temperatura ambiente con agitación

constante. Luego de tres lavados con TBS de 10 minutos cada uno, la membrana se analizó con el sistema de imágenes Odyssey (LI-COR, EE.UU).

Ensayo de estabilidad.

Los antígenos de *L. intracellularis* como cuerpos de inclusión se resuspendieron en PBS hasta una concentración de 523,4 µg/mL, luego se dispensaron 10 mL en tubos cónicos de 1mL y se dividieron en dos lotes. El primer lote se almacenó a -20 °C. Al segundo lote se le añadió timerosal 100 µg/mL (Sigma, España) y gentamicina 60 µg/mL (Sigma, EE.UU) y se almacenó a 4 °C. Cada 15 días se analizó la estabilidad de antígenos de un tubo de cada lote al azar mediante electroforesis SDS-PAGE y Western blot hasta los 60 días.

Determinación de la calidad microbiológica.

Alícuotas de 1 mL de solución de antígenos y de una dilución de 1/10 se sembraron en los diferentes medios de cultivo: agar triptona soja (Merk, Alemania), agar Sabouraud (Merk, Alemania) y caldo Tioglicolato (Becton Dickinson, Francia) (US Pharmacopeia, 2009). Las placas con agar triptona soja y los tubos con caldo Tioglicolato se incubaron a 35 °C. Las placas con agar Sabouraud se incubaron a 25 °C. Los ensayos se realizaron por triplicado. Luego de 7 días se observó si existía crecimiento de microorganismos en los diferentes cultivos.

Capítulo 4

Resultados

El establecimiento de los procesos de producción de los antígenos recombinantes trae consigo beneficios en términos de costo y tiempo de producción, además de garantizar reproducibilidad y la calidad del producto final. La primera parte de este trabajo se enfocó en el estudio de varios parámetros de cultivo como, el medio de cultivo, densidad celular, estrategia de alimentación, concentración del inductor, momento de inducción y estabilidad del plásmido que conllevaron al desarrollo de un bioproceso efectivo. En la segunda parte del trabajo, los procesos de aislamiento y purificación cuerpos de inclusión se realizaron utilizando técnicas simples para minimizar costos y tiempo de producción.

Determinación de condiciones de cultivo para la expresión de los antígenos recombinantes.

Establecimiento de condiciones del preinóculo en tubos de 50 mL.

Previo al estudio de las condiciones de fermentación se establecieron las condiciones del preinóculo e inóculo con el objetivo de garantizar el mismo cultivo de partida en todas las fermentaciones para que puedan ser comparables entre sí con respecto a la concentración de biomasa en un tiempo determinado.

La primera fase del proceso productivo de los antígenos recombinantes de *L. intracellularis* fue la definición de las condiciones de cultivo del preinóculo partiendo de un stock de glicerol con la finalidad de activar metabólicamente a la bacteria y obtener la mayor cantidad de células viables. Tubos con 10 mL de medio LB se inocularon a partir

de un stock de glicerol. El crecimiento celular se evaluó a través de la medición de la densidad óptica a 600 nm (Tabla 1). A partir de los valores de densidad óptica se calculó la velocidad de crecimiento (μ) y el tiempo de duplicación (g) utilizando las ecuaciones: $\mu = \frac{\ln DO_2 - \ln DO_1}{t_2 - t_1}$, $g = \frac{\ln 2}{\mu}$ (Widdel, 2010).

Tabla 1

Crecimiento celular de E. coli SHuffle transformada con el vector pLawVac en tubos de polipropileno de 50 mL con 10 mL de medio LB (preinóculo).

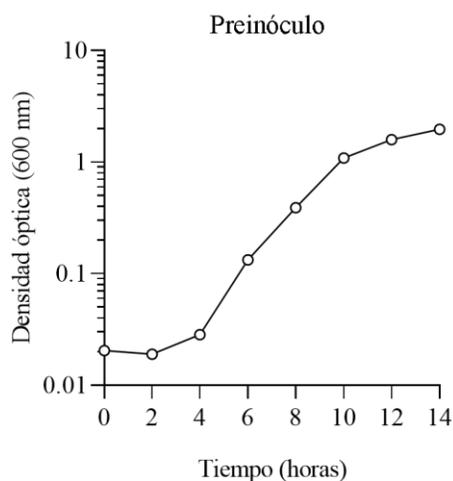
Tiempo (horas)	Densidad óptica (600 nm)	μ (horas ⁻¹)	g (horas)
0	0,020	-	-
2	0,020	0	-
4	0,028	0,164	4,233
6	0,131	0,775	0,894
8	0,395	0,553	1,254
10	1,103	0,513	1,351
12	1,584	0,181	3,827
14	1,991	0,114	6,055

Nota: Velocidad de crecimiento (μ), tiempo de duplicación (g).

El crecimiento del cultivo mostró un periodo de latencia de 4 horas, en el que la bacteria posiblemente se adaptó a las condiciones del medio de cultivo. La fase exponencial comenzó cerca de las 6 horas y duró hasta las 10 horas de cultivo (Tabla 1, Figura 1). A partir de este tiempo la velocidad de crecimiento disminuyó. De acuerdo a los resultados se estableció que el preinóculo se crecería hasta las 10 horas para obtener un cultivo de alta viabilidad celular que garantice la reproducibilidad en las etapas posteriores del proceso de producción de los antígenos.

Figura 1

Curva de crecimiento de *E. coli* SHuffle T7 transformada con el vector pLawVac en tubos de polipropileno de 50 mL con 10 mL de cultivo, partiendo de un stock de glicerol (preinóculo).



Estudio de condiciones del inóculo en matraces de 500 mL.

Matraces de 500 mL se inocularon con el preinóculo, crecido en las condiciones pre-establecidas (epígrafe 4.1), para aumentar la cantidad de células viables que entrarán al biorreactor. Durante 12 horas se evaluó el crecimiento celular, a través de la medición de densidad óptica a 600 nm y se calculó la velocidad de crecimiento y el tiempo de duplicación (Tabla 2, Figura 2). Los datos muestran que el cultivo no tuvo fase de latencia. La bacteria empezó su crecimiento desde la fase exponencial, que se mantuvo hasta la hora 6 del cultivo, a partir de ese tiempo se llegó a la fase estacionaria. El cultivo de 10 horas con una densidad óptica de aproximadamente 2,4 se tomó como inóculo para las fermentaciones posteriores.

Tabla 2

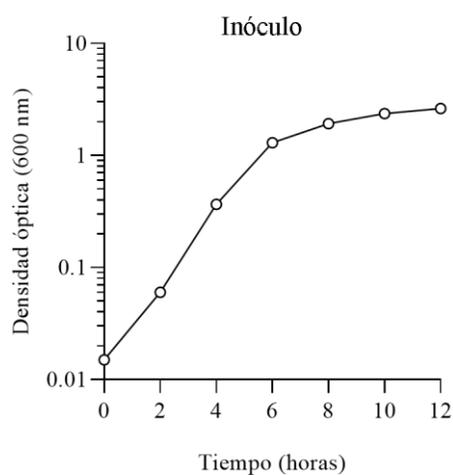
Crecimiento celular de E. coli SHuffle T7 transformada con el vector pLawVac en matraces de 500 mL con 100 mL de medio LB (inóculo).

Tiempo (horas)	Densidad óptica (600 nm)	μ (horas ⁻¹)	g (horas)
0	0,015	-	-
2	0,06	0,693	1,000
4	0,367	0,906	0,765
6	1,3	0,632	1,096
8	1,923	0,196	3,543
10	2,36	0,103	6,761
12	2,618	0,052	13,387

Nota: Velocidad de crecimiento (μ), tiempo de duplicación (g).

Figura 2

Curva de crecimiento de E. coli SHuffle T7, transformada con el vector pLawVac, en matraces de 500 mL con 100 mL de medio LB, partiendo del preinóculo (inóculo).



Análisis de crecimiento en medio TB sin inducción.

El medio Terrific Broth (TB) fue utilizado como medio de cultivo para el crecimiento de *E.coli* SHuffle T7 transformada con el vector pLawVac en fermentador. Este experimento se realizó sin inducir la expresión de los antígenos recombinantes,

para determinar las características de crecimiento de la bacteria en este medio. Los resultados mostraron que el cultivo empezó en la fase exponencial de crecimiento con una velocidad de crecimiento promedio de $0,77 \text{ horas}^{-1}$, prolongándose hasta las 6 horas de cultivo (Tabla 3, Figura 3). A partir de las 7 horas el cultivo comenzó en la fase estacionaria, observando una disminución en la velocidad de crecimiento. La máxima concentración celular alcanzada fue de $12,25 \text{ g/L}$ a las 7 horas de cultivo. Los resultados indican que la mitad de la fase exponencial se alcanza a las 4 horas en donde se obtiene una concentración de biomasa de $3,31 \text{ g/L}$. Aunque la inducción de la expresión de los antígenos se podría realizar en este punto, se buscó obtener una mayor cantidad de biomasa enriqueciendo el medio y con esto aumentar el rendimiento volumétrico.

Tabla 3

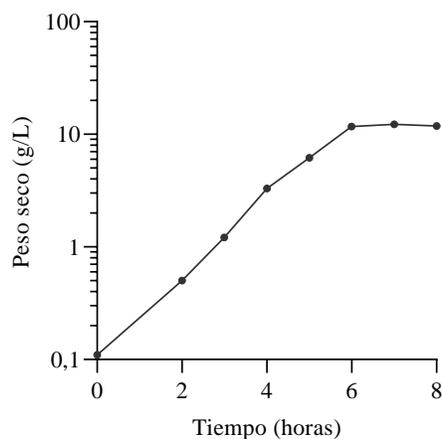
Crecimiento celular de E. coli SHuffle T7 transformada con el vector pLawVac en medio TB sin inducción.

Tiempo (horas)	Densidad óptica (600 nm)	Peso seco (g/L)	μ (horas^{-1})	g (horas)
0	0,225	0,11	-	-
2	1,206	0,59	0,84	0,83
3	2,468	1,21	0,72	0,97
4	6,750	3,31	1,01	0,69
5	12,65	6,20	0,63	1,10
6	23,90	11,71	0,64	1,09
7	25,00	12,25	0,04	15,40
8	24,25	11,88	-0,03	-22,76

Nota: Velocidad de crecimiento (μ), tiempo de duplicación (g).

Figura 3

Curva de crecimiento de E. coli SHuffle T7 transformada con el vector pLawVac en medio TB sin inducción.



Análisis de crecimiento celular en medio TB con 3% de glicerol (TB-modificado) sin inducción.

Mediante la hipótesis de que la inducción de la expresión de los antígenos en cultivos de alta densidad celular aumenta el rendimiento volumétrico se buscó incrementar la cantidad de biomasa obtenida subiendo la concentración de glicerol al 3% en el medio TB, llamado en el documento TB modificado (TBM). El crecimiento de la bacteria se realizó en un fermentador de 2 L, sin inducción. Similar a lo obtenido en el medio TB, el cultivo comenzó en la fase exponencial desde la inoculación observándose un rápido aumento en la concentración celular con un tiempo de duplicación de aproximadamente 1 hora (Tabla 4, Figura 4). A partir de las 7 horas de cultivo, comenzó la fase estacionaria, identificada por una disminución en la velocidad de crecimiento.

Tabla 4

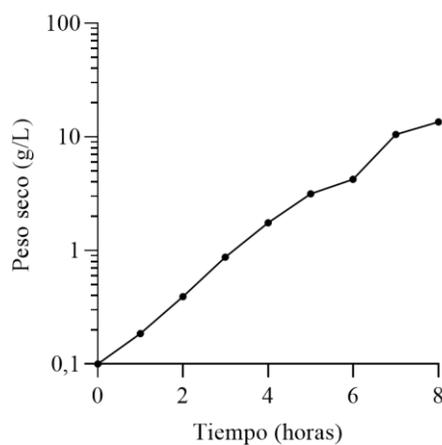
Crecimiento celular de E. coli SHuffle T7 que expresa antígenos de L. intracellularis en medio TB modificado (3% glicerol) sin inducción.

Tiempo (horas)	Densidad óptica (600 nm)	Peso seco (g/L)	μ (horas ⁻¹)
0	0,202	0,01	-
1	0,379	0,19	0,629
2	0,801	0,39	0,748
3	1,78	0,87	0,799
4	3,605	1,77	0,706
5	6,43	3,15	0,579
6	11,25	5,51	0,559
7	21,39	10,48	0,643
8	27,6	13,52	0,255

Nota: Velocidad de crecimiento (μ)

Figura 4

Curva de crecimiento de E. coli SHuffle T7 transformada con el vector pLawVac en medio TB modificado (3% glicerol) sin inducción.



Al final del cultivo se obtuvo un incremento de la biomasa celular en comparación con el experimento anterior, alcanzándose aproximadamente 14 g/L de

biomasa seca. Además, la adición de glicerol al 3 % en el medio TBM resultó en un aumento en la velocidad de crecimiento. A las 8 horas de cultivo la velocidad de crecimiento fue de $0,255 \text{ horas}^{-1}$, siendo mayor que la velocidad de crecimiento de las células en el medio TB ($-0,03 \text{ horas}^{-1}$). El estudio de la curva de crecimiento del cultivo por lote permitió determinar que aproximadamente a las 7 horas, la bacteria consume los nutrientes, por tanto, un aumento de la biomasa a partir de este tiempo se alcanzaría en un cultivo alimentado.

Influencia de la adición de extracto de levadura y glicerol en el crecimiento celular.

Una mayor cantidad de biomasa se logra añadiendo nutrientes durante la fermentación. El crecimiento celular fue estudiado en un cultivo alimentado por adición de extracto de levadura y glicerol, durante la fase exponencial. La adición del suplemento se realizó a las 6 horas, cuando el cultivo se encontraba en fase exponencial tardía (Tabla 5, Figura 5). Se estima que la adición de los nutrientes, en esta fase, no resulta en una concentración inhibitoria para el crecimiento por exceso de sustrato, sino que permite prolongarla. Las nuevas condiciones de crecimiento permitieron extender la fase exponencial hasta las 8 horas de cultivo y a partir de ese tiempo empezó la fase estacionaria. La máxima concentración de biomasa se alcanzó a las 12 horas de cultivo siendo de aproximadamente 30 g/L, el doble de lo obtenido en un cultivo por lote. A partir de los resultados obtenidos todas las fermentaciones realizadas posteriormente se hicieron suplementando el medio TBM.

Tabla 5

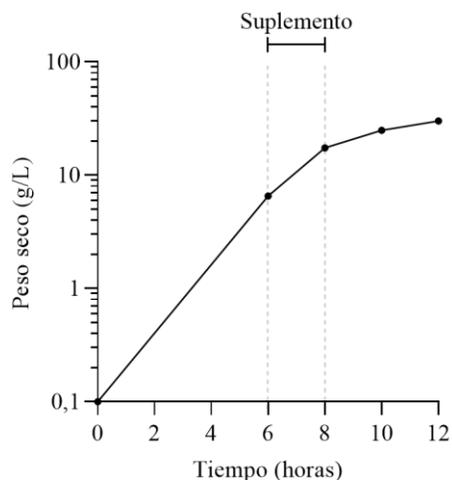
Crecimiento celular de *E. coli* SHuffle T7, transformada con el vector pLawVac, en medio TBM suplementado con glicerol 3 % (concentración final) y extracto de levadura 2,4 % (concentración final) a las 6 horas.

Tiempo (horas)	Densidad óptica (600 nm)	Peso seco (g/L)	μ (horas ⁻¹)
0	0,175	0,086	-
6	13,4	6,57	0,723
8	35,5	17,40	0,487
10	50,8	24,89	0,179
12	61,3	30,04	0,094

Nota: Velocidad de crecimiento (μ).

Figura 5

Curva de crecimiento de *E. coli* SHuffle T7 transformada con el vector pLawac en medio TBM suplementado con glicerol 3 % (concentración final) y extracto de levadura 2,4 % (concentración final) a las 6 horas.



Análisis de la expresión de antígenos recombinantes de *L. intracellularis*.

El rendimiento de la expresión de antígenos recombinantes depende en gran medida de la estrategia de inducción ya que el inductor puede resultar tóxico o en su

defecto no tener efecto sobre las células. En este trabajo se evaluó la concentración de IPTG como inductor y el momento de la inducción determinando la mejor estrategia de inducción en base al rendimiento volumétrico de antígenos.

Efecto de la concentración de IPTG en la expresión de los antígenos recombinantes.

La expresión de los antígenos de *L. intracellularis* en *E. coli* SHuffle T7 fue evaluada usando IPTG como inductor a concentraciones de 0,75 y 1,5 mM. La inducción se realizó cuando la concentración de biomasa fue alrededor de 5 g/L. La inducción con IPTG produjo una disminución en la velocidad de crecimiento y en la cantidad final de biomasa, comparada con el crecimiento celular sin inducción (Figura 5). Este comportamiento fue independiente de la concentración de IPTG utilizada. En ambos casos se alcanzó una biomasa final de aproximadamente 18 g/L luego de 12 horas de cultivo (Tabla 6, Figura 6).

Tabla 6

Efecto de la concentración de IPTG en el rendimiento de los antígenos recombinantes de L. intracellularis en E. coli SHuffle T7.

Concentración de IPTG (mM)	Biomasa a la inducción (g/L)	Biomasa final (g/L)	Rendimiento de antígenos (mg/L)
0,75	5,02	18,70	536,06
1,5	5,23	17,20	292,45

Figura 6

Curva de crecimiento de *E. coli* SHuffle T7 transformada en un cultivo alimentado. Efecto de la concentración de IPTG en el crecimiento celular.

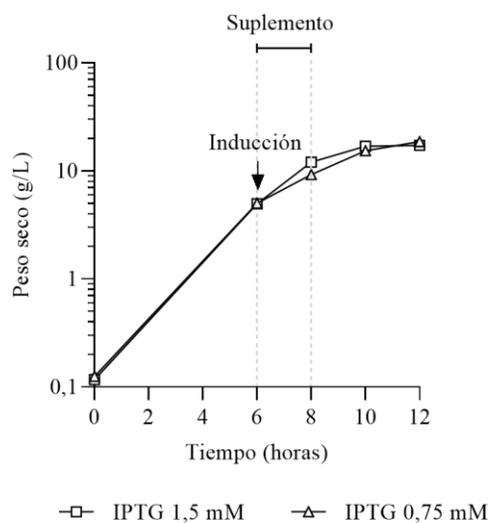
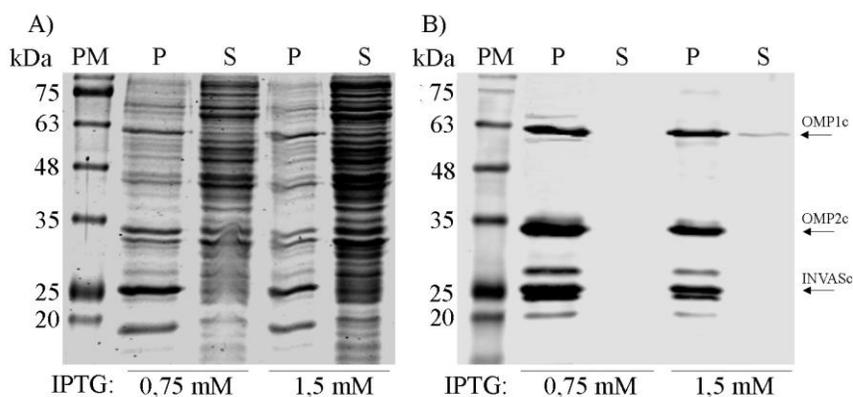


Figura 7

Análisis de la expresión de los antígenos inducida con diferentes concentraciones de IPTG luego de ruptura celular.



Nota: A) Electroforesis SDS-PAGE, B) Western blot. Carriles PM: Peso molecular, P: pellet de ruptura, S: Sobrenadante de ruptura.

Análisis de los lisados celulares mediante electroforesis SDS-PAGE y Western blot permitieron conocer que los antígenos OMP1c, OMP2c e INVASc se expresaron de manera insoluble, independientemente de la concentración de IPTG utilizada (Figura 7), por lo que solo los pellets de ruptura se utilizaron para cuantificar la expresión y rendimiento volumétricos de los antígenos recombinantes por densitometría. El rendimiento de antígenos fue mayor cuando se indujo la expresión con IPTG 0,75 mM (536 mg Ag/L), en comparación a la inducción con IPTG 1,5 mM (292,45 mg Ag/L). Por lo tanto, la concentración de IPTG usada en los siguientes ensayos fue de 0,75 mM.

Relación entre la concentración celular a la inducción y la expresión de antígenos.

La expresión de los antígenos recombinantes se realizó induciendo con IPTG 0,75 mM a diferentes concentraciones de biomasa: 11,76 g/L (Fermentación 1) y 5,02 g/L (Fermentación 2). Similar a los resultados obtenidos anteriormente al final de las fermentaciones se obtuvo una concentración de biomasa aproximadamente 18 g/L, independientemente del momento de la inducción (Tabla 7, Figura 8).

La evaluación de la expresión de los antígenos se realizó luego de ruptura celular en el sobrenadante y pellet de ruptura (Figura 9). En ambas fermentaciones se observó que los antígenos se acumularon en la fracción insoluble por lo que solamente el pellet de ruptura se utilizó para cuantificar la expresión volumétrica de los antígenos.

El mayor rendimiento se obtuvo cuando la inducción se realizó a una concentración de biomasa de 11,76 g/L obteniéndose 602,5 mg de antígenos por litro de cultivo (mg/L), luego de 4 horas de inducción (Tabla 7). No obstante, la fermentación 2, que se indujo a menor biomasa (5,02 g/L) mostró menor rendimiento (536,06 mg/L) a las 6 horas de inducción. Los resultados indican que la inducción a mayor densidad

celular incrementa la expresión de los antígenos recombinantes (Fermentación 1). Por lo tanto, la mejor estrategia de inducción que se encontró es añadir IPTG 0,75 mM cuando la concentración de biomasa es alrededor de 12 g/L.

Tabla 7

Dependencia entre la concentración celular en la inducción y el rendimiento volumétrico de antígenos recombinantes.

Fermentación	Concentración celular en la inducción (g/L)	Tiempo de inducción (horas)	Biomasa final (g/L)	Rendimiento de antígenos (mg/L)
Fermentación 1	11,76	4	17,08	602,50
Fermentación 2	5,02	6	18,72	536,06

Figura 8

Curva de crecimiento de E. coli SHuffle T7 que expresa antígenos recombinantes contra L. intracellularis. Inducción a 11,76 g/L (Fermentación 1) y 5,02 g/L (Fermentación 2).

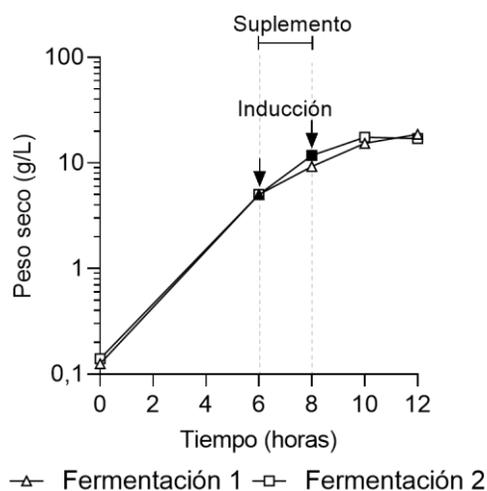
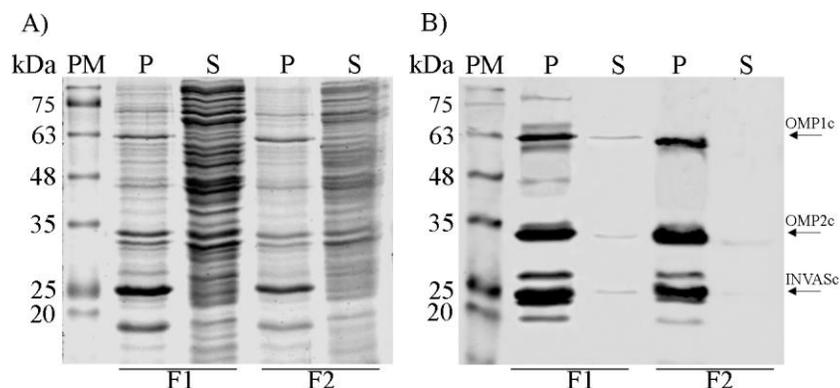


Figura 9

Análisis de la expresión de los antígenos mediante inducida a diferentes concentraciones celulares.



Nota: A) SDS-PAGE y B) western blot de las fermentaciones 1 (F1) y fermentación 2 (F2). Carriles PM: peso molecular, P: pellet de ruptura, S: sobrenadante de ruptura.

Estabilidad del plásmido durante la fermentación.

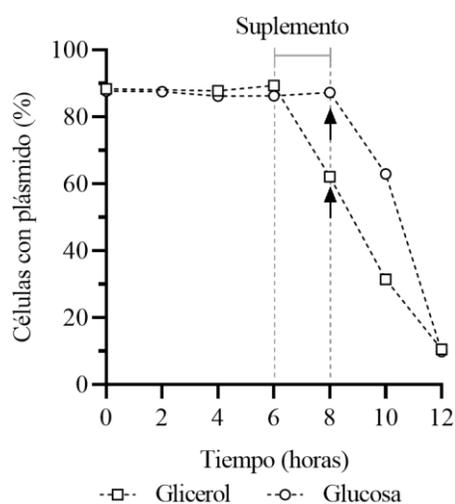
Durante el presente trabajo una de las estrategias evaluadas para obtener mayor cantidad de antígenos recombinantes consistió en obtener cultivos de alta densidad celular al momento de la inducción (Figura 8). No obstante, se ha observado que durante la fermentación el número de células que retienen el plásmido disminuyen con el tiempo. Este efecto se estudió en la fermentación 1, donde la inducción se realizó a mayor densidad celular (~ 12 g/L). Al momento de la inducción el 62% de las células del cultivo contenían el plásmido. Sin embargo, este valor disminuyó al 11% luego de 4 horas de inducción (Figura 10).

La primera evidencia de pérdida del plásmido ocurrió entre las 6 a 8 horas de cultivo, al final de la fase exponencial, donde se alcanzó una alta densidad celular. Durante esta etapa además ocurrió una expresión basal de los antígenos lo que pudiera ocasionar un desgaste de energía innecesario. Este efecto negativo se pudiera

disminuir empleando glucosa, en vez de glicerol, como fuente de carbono en la fase de preinducción o crecimiento, para prevenir la expresión basal de los antígenos.

Figura 10

Estabilidad del plásmido en un cultivo alimentado, utilizando glicerol y glucosa como fuente de carbono en la fase de preinducción.



Nota: Las flechas indican el momento de la inducción con IPTG 0,75 mM.

Teniendo en cuenta lo anterior, se realizó un cultivo utilizando glucosa al 2% como fuente de carbono en la fase de preinducción y posterior adición de glicerol en la etapa post-inducción (alimentación del cultivo). La utilización de glucosa al 2%, mostró un valor de retención del plásmido de un 87% al momento de inducción, superior al obtenido en la fermentación que utilizó glicerol en la etapa pre-inducción. A pesar de ello, 4 horas posteriores este valor disminuyó hasta un 10%. Por lo tanto, una inducción de más de 4 horas, independientemente de la fuente de carbono utilizada previo a la inducción, conduce a una pérdida del 90% de las células con plásmido.

Validación del proceso de producción de antígenos utilizando glucosa como fuente de carbono.

Tres fermentaciones utilizando glucosa como fuente de carbono en la etapa de pre-inducción se realizó para validar el proceso de producción de los antígenos recombinantes. Coincidiendo con los resultados previos obtenidos, la cantidad de biomasa producida en la fase inicial del cultivo, previo a la inducción, fue mayor cuando se utilizó glucosa como fuente de carbono respecto al cultivo que utiliza glicerol (Tabla 8, Figura 11).

Tabla 8

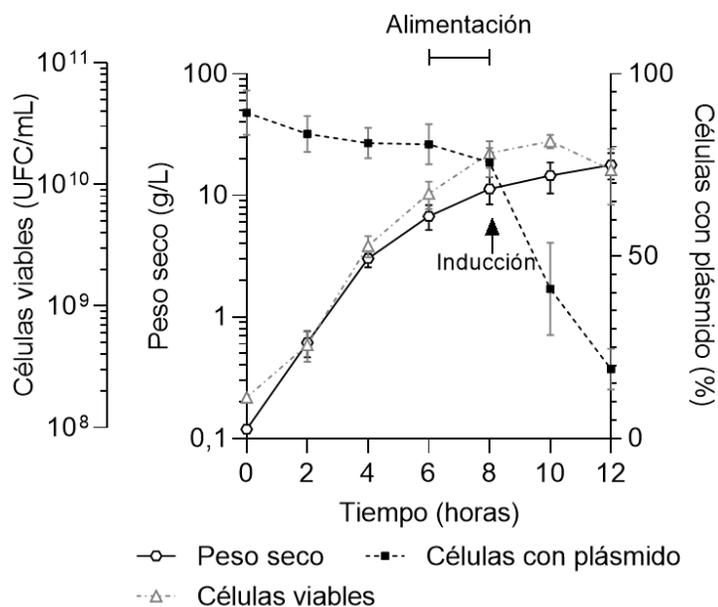
Comparación del rendimiento volumétrico de antígenos recombinantes de L. intracellularis, utilizando glucosa y glicerol como fuente de carbono en la fase de pre-inducción.

Fuente de carbono inicial	Biomasa en la inducción (g/L)	Tiempo de inducción (horas)	Biomasa final (g/L)	Rendimiento de antígenos (mg/L)
Glicerol	11,76	4	17,08	602,50
Glucosa	10,24	4	17,88	627,00

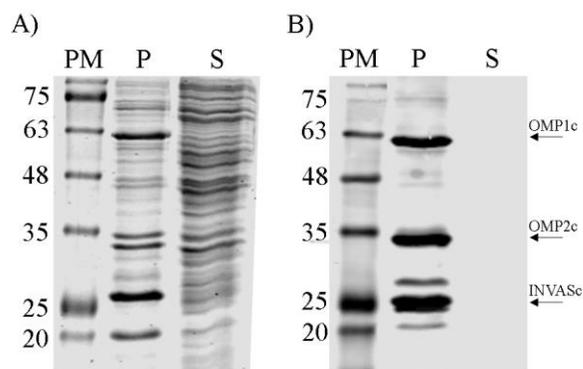
Además, el empleo de glucosa al 2% mejoró la estabilidad del plásmido al momento de la inducción, lo que conduce a tener una mayor cantidad de biomasa que expresa los antígenos recombinantes. Consecuentemente, el rendimiento volumétrico de los antígenos recombinantes aumentó, alcanzando un valor promedio de 627 mg/L (Tabla 8). Por lo tanto, la estrategia productiva para aumentar la cantidad de antígenos recombinantes sería obtener un cultivo de alta densidad celular en la fase exponencial final, usando glucosa e induciéndolo cuando la glucosa se haya consumido.

Figura 11

Curva de crecimiento de *E. coli* SHuffle T7 que expresa antígenos recombinantes de *L. intracellularis* utilizando glucosa como fuente de carbono en la fase de pre-inducción.

**Figura 12**

Análisis de la expresión de los antígenos recombinantes utilizando glucosa como fuente de carbono en la fase de pre-inducción mediante



Nota: A) SDS-PAGE y B) western blot. P: pellet de ruptura y S: sobrenadante de ruptura.

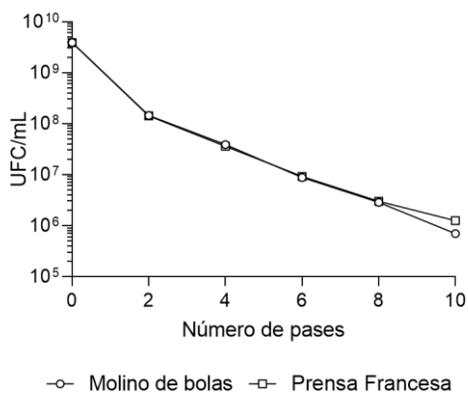
Aislamiento y purificación de los antígenos recombinantes.

Eficiencia de ruptura celular.

El establecimiento de las condiciones de ruptura celular tiene como propósito garantizar la liberación de los antígenos como cuerpos de inclusión de las células. La recuperación de los antígenos recombinantes se realizó usando dos métodos mecánicos de ruptura celular: prensa francesa y molino de bolas. La eficiencia de la ruptura se evaluó por la medición de unidades formadoras de colonia por mL (UFC/mL) cada dos pases en cada equipo. Cada pase por el molino de bolas fue equivalente a 0,8 minutos de retención. La eficiencia de la ruptura fue similar con ambos métodos, mostrando ser un proceso de primer orden (Figura 13). Luego de 8 pases en la prensa francesa y 6,4 minutos de retención en el molino de bolas, el 99,9% de las células vivas resultaron rotas.

Figura 13

Evaluación de la eficiencia de ruptura celular mediante Molino de Bolas y Prensa Francesa.



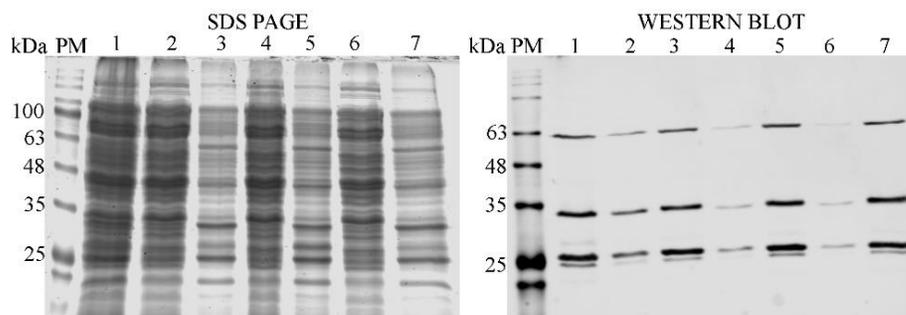
Aislamiento de cuerpos de inclusión.

Teniendo en cuenta resultados previos, que informaron que los antígenos están en el pellet de ruptura se evaluó diferentes tiempos de centrifugación como método para separar selectivamente los antígenos de otros contaminantes luego de la ruptura celular. El ensayo de sedimentación se realizó manteniendo constante la fuerza centrífuga de 4.400 G y variando el tiempo de sedimentación de los cuerpos de inclusión a 10, 20 y 30 minutos. El análisis por SDS-PAGE y Western blot permitió conocer que la mayor cantidad de antígenos se obtiene centrifugado durante 30 minutos (Figura 14). Luego, disminuir el tiempo de centrifugación podría representar una pérdida de antígenos durante el proceso de producción. Otro criterio que se evaluó en el ensayo fue la relación pureza: recuperación. La pureza de los cuerpos de inclusión estimada por densitometría fue similar a los 10, 20 y 30 minutos de centrifugación (~ 38 %). Por tanto, una disminución del tiempo de centrifugación no se corresponde con un aumento de la pureza.

Los cuerpos de inclusión obtenidos luego de centrifugación a 10, 20 y 30 minutos se lavaron dos veces con PBS para eliminar contaminantes como lípidos, ADN y proteínas de membrana. La pureza de la muestra inicial, y la obtenida en cada lavado se evaluó mediante SDS-PAGE. En estas condiciones, no se logró aumentar la pureza de los antígenos con respecto a las demás proteínas del pellet. Por tanto, se evaluaron otras condiciones de lavado que no comprometieran la recuperación de los antígenos. Estos ensayos se realizaron manteniendo constante la fuerza de centrifugación de 4400 G y tiempo de 30 minutos.

Figura 14

Sedimentación de los cuerpos de inclusión a 4400 G en el tiempo.



Nota: PM: peso molecular; 1: fracción inicial; 2, 4 y 6: sobrenadantes de ruptura a los 10, 20 y 30 minutos respectivamente; 3, 5 y 7: pellet de ruptura a los 10, 20 y 30 minutos

Los lavados se realizaron utilizando combinaciones de Tritón X-100 0,1% y urea 1M o 2M. Adicionalmente se realizaron lavados con NaCl 1M y tritón X-100 1% al pellet de ruptura; Los resultados obtenidos mostraron que ninguna de las condiciones de lavado evaluadas aumentó la pureza de los antígenos significativamente. Finalmente se ensayó un lavado con buffer Na_2HPO_4 pH 12,0 y se logró aumentar la pureza hasta un 73,6% (Figura 15). Sin embargo, el 36,3% de los antígenos se perdió luego del lavado (Tabla 9).

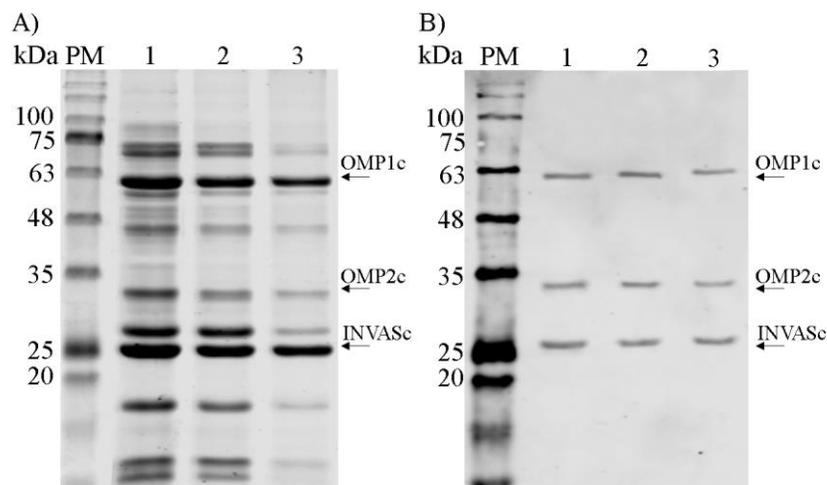
Tabla 9

*Recuperación y lavados del pellet de ruptura que contienen los antígenos recombinantes de *L. intracellularis*.*

Etapas	Pureza respecto a proteínas (%)	Recuperación (%)	Concentración (mg/L)
Pellet inicial	38,5	100	627,0
Lavados NaCl 1M y Tritón 1%	42,9	75,5	473,9
Lavado buffer pH 12	73,6	63,7	399,4

Figura 15

Lavados de los cuerpos de inclusión.



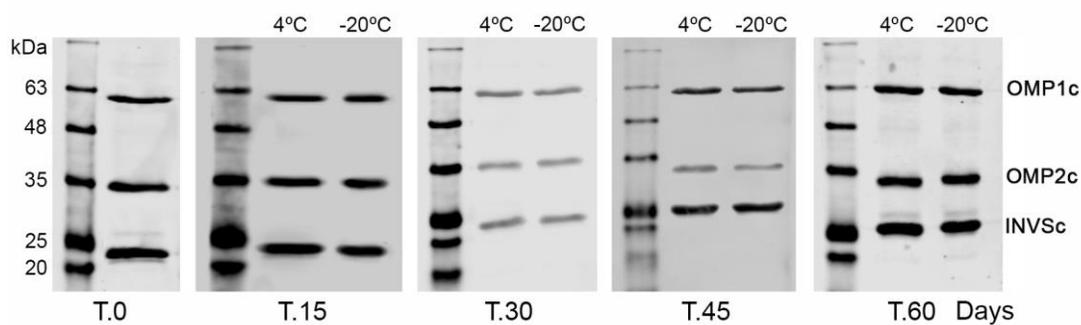
Nota: PM: Peso Molecular, 1) Pellet de ruptura, 2) Lavado del pellet con NaCl 1M tritón 1%, 3) Lavado pellet con buffer pH 12. A) SDS-PAGE; B) Western blot.

Ensayos de estabilidad de los antígenos a temperatura de conservación.

La estabilidad del producto deberá ser estudiada con el fin de que garantice que los antígenos pueden ser almacenados por largos periodos de tiempo sin sufrir degradación. La estabilidad de los antígenos recombinantes a temperaturas de conservación de 4 °C y -20 °C, mediante SDS-PAGE y Western blot. Los resultados mostraron que los antígenos eran estables luego de los 60 días que duró el ensayo (Figura 16). Sin embargo, a la temperatura de -20 °C los antígenos recombinantes se conservan mejor, manteniendo el 80% de la concentración inicial (Tabla 10).

Figura 16

Ensayos de estabilidad de los antígenos recombinantes de L. intracellularis a diferentes temperaturas de almacenamiento.

**Tabla 10**

Cuantificación de la concentración de antígenos recombinantes de L. intracellularis almacenados a 4 °C y -20 °C a través del tiempo.

Concentración de antígenos (µg/mL)					
Temperatura de almacenamiento	Día 0	Día 15	Día 30	Día 45	Día 60
4°C	523,4	423,0	418,6	384,9	379,2
-20 °C	523,4	486,8	478,4	419,0	417,5

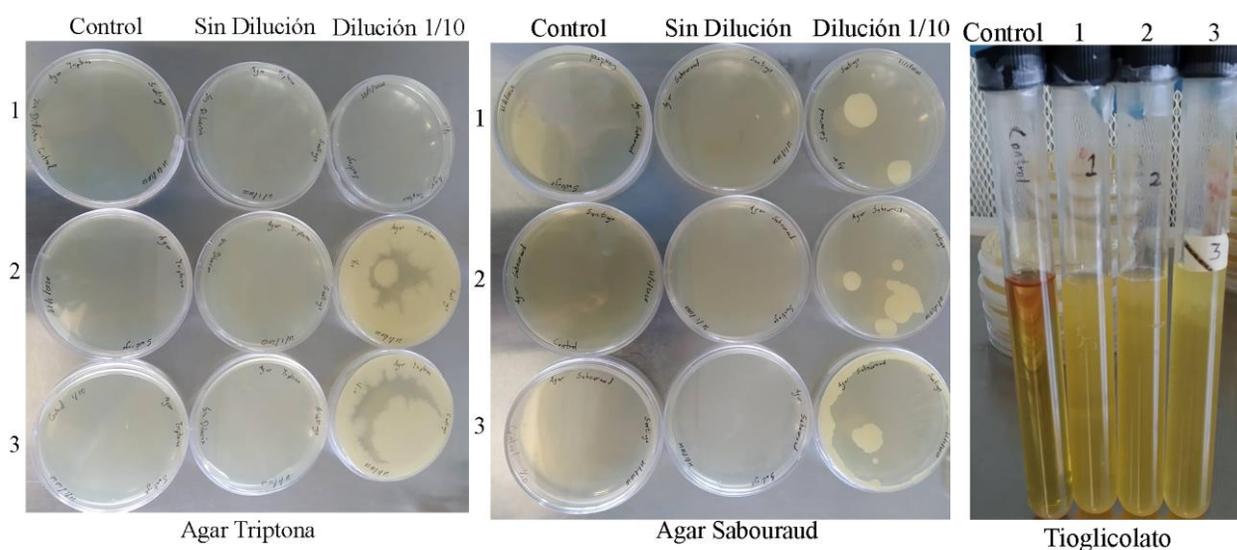
Calidad Microbiológica.

La calidad microbiológica se realizó para determinar la eficacia de los preservantes utilizados para evitar la contaminación de los antígenos. Timerosal 100 ug/mL y gentamicina 60 ug/mL como preservantes añadidos a la solución de antígenos en PBS, se estudiaron utilizando diferentes medios de cultivo. Alícuotas de 1 mL de la solución de antígenos y 1 mL de una dilución de 1/10 se sembraron en placas de agar triptona soja y Sabouraud. Luego de 7 días de incubación se observó que las placas sembradas directamente con 1mL de la solución de antígenos no presentaba

crecimiento de microorganismos. No obstante, las placas sembradas con la dilución de 1/10 si mostraron crecimiento (Figura 17). Además, 1 mL de la solución de antígenos se inocularon en tubos con medio tioglicolato, los cuales luego de 7 días mostraron crecimiento de microorganismos (Figura 17).

Figura 17

Ensayo de calidad microbiológica en medios sólidos. Agar Triptona incubados a 35 °C, Agar Sabouraud incubados a 25 °C y Tioglicolato a 35 °C por 7 días.



Los resultados demuestran que la utilización de un cultivo de alta densidad celular logrado mediante cultivo alimentado permitieron obtener un rendimiento de antígenos mayor de 0,6 gramos de antígenos por litro de cultivo cumpliendo con el primer objetivo planteado. Sin embargo, la producción de antígenos recombinantes en un cultivo de alta densidad celular también resultó en una mayor cantidad de proteínas contaminantes, probablemente provenientes de las células sin plásmido, que co-precipitaron junto con los cuerpos de inclusión, lo que llevó a la utilización de fuertes condiciones de lavado obteniéndose una recuperación de solo el 63,7 % de los

antígenos. El producto resultante permaneció estable durante los 60 días de ensayo a temperaturas de conservación. Además, la concentración de preservantes utilizada inhibe el crecimiento de microorganismos en la solución de antígenos.

Capítulo 5

Discusión

El establecimiento de un proceso de producción de biofármacos recombinantes incluye la estandarización de todas las etapas del cultivo y el aislamiento de las moléculas (Tripathi y Shrivastava, 2019). Conocer las fases de crecimiento celular durante las etapas de pre-inóculo e inóculo del fermentador del microorganismo modificado permite utilizar inóculos viables que reduzcan la fase estacionaria del cultivo (Stanbury et al., 2017). Las variaciones entre diferentes fermentaciones, a menudo, están relacionadas a la utilización de inóculos de baja viabilidad (Gnoth et al., 2007). Por tanto, conocer la curva de crecimiento del microorganismo en las primeras etapas del proceso permite la reproducibilidad en las fermentaciones (Doran, 2013).

Un elemento importante en el proceso de producción de biofármacos es el medio de cultivo que se utiliza en la etapa de expresión de las moléculas de interés (Jozala et al., 2016). A pesar de ello, debido a que la biosíntesis del producto de interés no ocurre durante el cultivo que se utilizará como inóculo, medios diferentes pueden ser usados para el inóculo y la fermentación (Busso et al., 2008). En el presente trabajo el medio Luria Bertani (LB) se utilizó para el crecimiento del microorganismo durante el pre-inóculo e inóculo del fermentador, pues contiene los nutrientes para lograr el crecimiento en estas etapas.

El estudio de la cinética de crecimiento del pre-inóculo mostró que la fase exponencial terminó a las 10 horas de cultivo, donde alcanzó una densidad óptica a 600 nm de 1,1. Sezonov, Joseleau-Petit, y D'Ari (2007) afirma que la fase exponencial en

cultivos de *E. coli* en medio LB usualmente termina cuando se alcanza una densidad óptica a 600 nm entre 0,6 y 1, debido al consumo total de las fuentes de carbono del medio de cultivo. Por lo tanto, la transferencia del cultivo a un medio fresco de mayor volumen ayuda a prolongar fase exponencial y aumentar la cantidad de células (Matteau et al., 2015). El estudio de la cinética de crecimiento del inóculo mostró que el cultivo comenzó en fase exponencial desde la hora cero y se mantuvo por 6 horas. La transferencia al fermentador se realizó a las 10 horas, cuando el cultivo se encontraba en la fase estacionaria. En este caso el criterio de transferencia fue la estabilidad del plásmido. Sabatié et al., (1991) demostró que el número de copias de plásmido era mayor cuando se usaba un inóculo en fase estacionaria, en cepas recombinantes de *E. coli* productoras de biotina. Por otro lado, a pesar de utilizar un inóculo en fase estacionaria no se observó fase de latencia en el cultivo en el fermentador.

La producción de proteínas recombinantes a gran escala requiere el crecimiento de las células transformadas bajo condiciones controladas de temperatura, pH y oxígeno disuelto, ya que en esta etapa se realiza la conversión de compuestos orgánicos simples para la formación de productos de interés, en este caso antígenos recombinantes, a través de la maquinaria enzimática de *E. coli* (Bernard y Payton, 1995). El medio de cultivo debe suplementar los elementos necesarios para la producción de energía y material celular para el funcionamiento, mantenimiento y reproducción; además de la biosíntesis de la proteína heteróloga (Kampen, 2014). El medio TB fue seleccionado para la fermentación, ya que produce mayor cantidad de biomasa en comparación con otros medios como el LB (Hori et al., 2019; Kram y Finkel, 2015). Luego el medio TB fue modificado enriqueciéndolo con glicerol al 3% (TBM), para aumentar la concentración celular final. A las 8 horas del cultivo sin inducción con

el medio TBM se observó un aumento en el oxígeno disuelto, relacionándolo con un agotamiento de los nutrientes (Huang et al., 2012). Por lo que se decidió alimentar el cultivo con fuentes de carbono y nitrógeno para lograr un cultivo de alta densidad celular.

La alimentación del medio TBM con glicerol y extracto de levadura permitió duplicar la concentración celular logrando 30 g/L a las 12 horas. Resultados similares fueron informados logrando cultivos de alta densidad celular a través de la alimentación con glicerol y extracto de levadura conduciendo a un aumento la productividad volumétrica (Shiloach y Fass, 2005; J. Zhang et al., 2015). La alimentación con nutrientes complejos como el extracto de levadura o triptona en el momento de la inducción ha demostrado aumentar el rendimiento volumétrico de la proteína recombinante (Krause et al., 2010).

La expresión de los antígenos recombinantes de *L. intracellularis* se evaluó induciendo con 0,75 y 1,5 mM de IPTG. Una mayor expresión se observó a menor concentración de IPTG. La baja expresión al inducir con 1,5 mM de IPTG puede estar relacionado a los efectos tóxicos del inductor sobre la fisiología celular, atribuido al sobreconsumo de metabolitos precursores para la síntesis de proteínas foráneas no esenciales (Dvorak et al., 2015; Ramchuran et al., 2005). Las estrategias de inducción de la expresión de la proteína recombinante varían en cada caso, por lo que el momento de inducción se debe determinar para cada proteína (Coelho et al., 2019; Restaino et al., 2013). En este trabajo se pudo determinar que los mayores rendimientos volumétricos de antígenos se obtuvieron al inducir a mayores concentraciones de biomasa.

Otro aspecto importante para incrementar el rendimiento de antígenos es la estabilidad del plásmido. Las células que contenían plásmido en el cultivo con glicerol fueron de aproximadamente un 60% al momento de la inducción. La carga metabólica que representa la expresión de proteínas foráneas hacen que el crecimiento de la bacteria con plásmido sea más lento (Dvorak et al., 2015; Summers, 1991). Además, la degradación de la ampicilina por beta-lactamasa liberada de las células, hace que el cultivo pierda la presión selectiva, favoreciendo la propagación de células sin plásmido (Sieben et al., 2016; Y. Zhang et al., 2003). De manera similar estudios han informado la reducción de la población celular con plásmido luego la inducción en cultivos de lote alimentados (Goyal et al., 2009; Park et al., 2018; Sohoni et al., 2015).

La glucosa como fuente de carbono se ha usado para aumentar la estabilidad del plásmido (Goyal et al., 2009; Sohoni et al., 2015). La glucosa reprime la expresión basal de la polimerasa T7 en la cepa de *E. coli* SHuffle T7, debido a que su expresión está controlada por un operón lac (Lobstein et al., 2012), evitando la expresión de las proteínas recombinantes. El reemplazo de glicerol por glucosa como fuente de carbono condujo a un aumento de la estabilidad del plásmido al momento de la inducción hasta un 75% lo que llevó a un aumento del rendimiento volumétrico de los antígenos (627 mg/L). Un resultado similar informó Sohoni et al., (2015) mejorando la estabilidad del plásmido del 47% al 70% añadiendo 1% de glucosa al medio SB. Con el objetivo de aumentar el rendimiento de los antígenos recombinantes el cultivo se realizó en dos etapas. La primera etapa de crecimiento, donde se obtuvo un cultivo de alta densidad celular, con la mayor cantidad de células con plásmido y una segunda etapa, donde ocurrió la expresión de los antígenos, que no excedió las 4 horas para minimizar el efecto tóxico del inductor.

Los procesos de separación y purificación del producto suelen ser las etapas más costosas de un bioproceso (Rasala y Mayfield, 2015). Los costos asociados a la caracterización de las biomoléculas como la determinación de pureza y estabilidad del producto son criterios importantes a tomar en cuenta en los procesos productivos (Oliveira y Domingues, 2018; Weuster-Botz et al., 2006). Debido a que los antígenos recombinantes se acumulan como cuerpos de inclusión en el citoplasma de la bacteria, los métodos de ruptura celular deben permitir la recuperación de la mayor cantidad de producto intracelular. A pesar de que existen varios métodos mecánicos de ruptura celular el molino de bolas y la prensa francesa son los métodos más usados en la ruptura celular a escala industrial (Ho, Tan, Yap, Ling y Tey, 2008). Específicamente, el molino de bolas tiene ventajas frente a la prensa francesa, debido a que permite trabajar con volúmenes más grandes a menor costo de operación (Costa-Silva, Flores-Santos, Freire, Vitolo y Pessoa-Jr, 2018; Ho et al., 2008).

En el presente trabajo, ambos métodos fueron utilizados para evaluar la ruptura celular de *E. coli* SHuffle T7. Peternel y Komel, (2010) determinó que dos pases por la prensa francesa a 80 MPa (11603 psi) era suficiente para la liberación de las proteínas solubles. Sin embargo, la extracción de los cuerpos de inclusión necesita al menos de 4 pases. En este estudio se determinó que luego de cuatro pases por ambos métodos la viabilidad celular se redujo al 1% lo que sugiere alta eficiencia de ruptura. Según nuestros resultados 6 pases serían suficientes para romper el 99,9% de las células viables.

La diferencia de densidades de los cuerpos de inclusión y las células permite que puedan ser separados por centrifugación a velocidades moderadas (Hwang, 1996; Margreiter, Messner, Caldwell y Bayer, 2008). Reportes de la literatura informan que

ciertas proteínas como el factor de elongación EF-Tu, proteínas de membrana celular o pequeñas proteínas de choque térmico pueden co-precipitar junto con los cuerpos de inclusión (Fahnert et al., 2004). No obstante, las células sin romper o parcialmente rotas constituyen la mayoría de los contaminantes en los cuerpos de inclusión aislados (Fahnert et al., 2004).

Para aumentar la pureza de los antígenos se evaluaron diferentes condiciones de lavados utilizando Tritón X-100 y urea. Solo lavados con 1M NaCl y 1% Tritón X-100 produjo un ligero aumento en la pureza (45%), eliminándose principalmente contaminantes como ADN y lípidos de la membrana (Singhvi et al., 2020). La inclusión de un paso de lavado con buffer pH 12,0 permitió aumentar la pureza de los antígenos en el 74% a expensas de perder el 37,3%. Lavados a altos pH junto a agentes caotrópicos han sido utilizados para la solubilización de los cuerpos de inclusión (Chung et al., 2015; Singh et al., 2008).

Finalmente, estudios de estabilidad y calidad microbiológica son de crucial importancia en los procesos de fabricación. Ensayos de estabilidad realizados informaron que los antígenos permanecieron estables durante los 60 días a temperaturas de almacenamiento de 4 °C y -20 °C. Los cuerpos de inclusión son estructuras muy estables mecánica y térmicamente, que pueden permanecer durante largos periodos de tiempo sin ser degradados. García-Fruitós et al., (2009) informaron que los cuerpos de inclusión de GFP mantenían actividad durante 180 días a temperaturas de almacenamiento. Respecto a la calidad microbiológica del producto generado en condiciones de laboratorio, no hubo crecimiento de microorganismos al sembrar directamente alícuotas de antígenos en los medios seleccionados. Solo se observó crecimiento al diluir la solución de antígenos, resultado este posiblemente

relacionado a la disminución de la concentración de timerosal y gentamicina en la muestra de partida, reduciendo su capacidad antimicrobiana. La concentración de timerosal de 100 µg/mL en la solución de antígenos está aprobada por la FDA (Food and Drug Administration), siendo adecuada para impedir el crecimiento de microorganismos en una vacuna multidosis.

Los cuerpos de inclusión han sido propuestos como antígenos en la formulación de vacunas, debido a sus características como moderadores del sistema inmune contra enfermedades infecciosas (Schetters et al., 2019; Torrealba et al., 2016). En un estudio anterior se demostró que los antígenos recombinantes de *L. intracellularis* como cuerpos de inclusión permitían la protección de los animales vacunados frente al patógeno (Montesino et al., 2019). El proceso de producción descrito en el presente trabajo está enfocado en obtener antígenos de *L. intracellularis* con un alto rendimiento volumétrico, ayudando a reducir los costos de producción que permita continuar con el desarrollo de una vacuna de subunidades rentable que pueda competir con las vacunas para prevención de la enteropatía proliferativa porcina existentes en el mercado actual. Sin embargo, aún quedan cuestiones por resolver, principalmente la búsqueda de un adyuvante adecuado que potencie la respuesta inmune del animal.

Capítulo 6

Conclusiones

1. El uso de glucosa como fuente de carbono en la fase de pre-inducción e inducción a altas concentraciones celulares logran un rendimiento volumétrico de los antígenos recombinantes de *L. intracelullaris* mayor a 500 mg/L, producidos en la cepa *E. coli* SHuffle T7.

2. Un producto final con una pureza del 73,6% con respecto a proteínas y una recuperación del 63,7% se consiguió mediante procesos “downstream” que involucraron disrupción mecánica, centrifugación a velocidades moderadas y etapas de lavado.

3. Los antígenos recombinantes de *L. intracelullaris* producidos fueron estables a temperatura de conservación por 60 días. Además, el uso de timerosal como preservante permitió garantizar la calidad microbiológica del producto final.

Recomendaciones

1. El IPTG es un inductor fuerte que provoca grandes cambios metabólicos en *E. coli* SHuffle T7 que puede ser tóxico, mientras que la lactosa al ser un inductor más débil y metabolizable puede inducir la expresión de las proteínas recombinantes de manera más lenta y controlada siendo menos estresante para la célula que inducir con IPTG. Por lo tanto, se recomienda evaluar el uso de pulsos de lactosa como estrategia de inducción y el rendimiento volumétrico alcanzado.

2. Recomiendo cuantificar el consumo de fuente de carbono y nitrógeno durante el proceso de fermentación. Estos datos permitirán optimizar el medio de cultivo

y la estrategia de alimentación, lo que pudiera reducir el uso de reactivos durante este proceso.

3. Aunque la inmunogenicidad y protección de los antígenos como cuerpos de inclusión fue comprobado en un estudio anterior, es recomendable realizar un nuevo ensayo en ratones y cerdos utilizando los antígenos producidos mediante los métodos descritos en este trabajo para garantizar su inmunogenicidad.

4. Debido a que hubo una pérdida de antígenos durante los procesos *downstream* mayor al planteado en los objetivos, se recomienda mejorar o usar otras las condiciones de lavado que permitan aumentar la recuperación del producto, sin disminuir la pureza alcanzada en este trabajo.

Capítulo 8

Bibliografía

- Adamíková, J., Antošová, M. y Polakovič, M. (2019). Chromatographic purification of recombinant human erythropoietin. *Biotechnology Letters*, 41 (4–5), 483–493. <https://doi.org/10.1007/s10529-019-02656-8>
- Ahmad, I., Nawaz, N., Darwesh, N. M., Rahman, S., Mustafa, M. Z., Khan, S. B. y Patching, S. G. (2018). Overcoming challenges for amplified expression of recombinant proteins using *Escherichia coli*. *Protein Expression and Purification* 144, 12–18. <https://doi.org/10.1016/j.pep.2017.11.005>
- Arnold, M., Crienen, A., Swam, H., Von Berg, S., Jolie, R. y Nathues, H. (2019). Prevalence of *Lawsonia intracellularis* in pig herds in different European countries. *Porcine Health Management*, 5(1), 31. <https://doi.org/10.1186/s40813-019-0137-6>
- Barrera-Zarate, J. A., Andrade, M. R., Pereira, C. E., Vasconcellos, A., Wagatsuma, M. M., Sato, J. P. H., Daniel, A. G., Rezende, L. A., Otoni, L. A., Laub, R. P., Macedo, N. R., Costa, C. M., Haddad, J. P. y Guedes, R. M. (2019). Oral fluid for detection of exposure to *Lawsonia intracellularis* in naturally infected pigs. *Veterinary Journal*, Vol. 244, pp. 34–36. <https://doi.org/10.1016/j.tvjl.2018.12.003>
- Bernard, A. y Payton, M. (1995). Fermentation and Growth of *Escherichia coli* for Optimal Protein Production. *Current Protocols in Protein Science*, 1(5.3), pp.1-18. [https://doi.org/10.1002/0471140864.PS0503S00@10.1002/\(ISSN\)1934-3663.PRODUCTIONOFRECOMBINANTPROTEINS](https://doi.org/10.1002/0471140864.PS0503S00@10.1002/(ISSN)1934-3663.PRODUCTIONOFRECOMBINANTPROTEINS)
- Biester, H. E. y Schwarte, L. H. (1931). Intestinal Adenoma in Swine. *The American journal of pathology*, 7(2), 175-185.6. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19969959>
- Bohlin, A. M., Olsen, S. N., Laursen, S. H., Öhman, A. y Van Galen, G. (2019). *Lawsonia intracellularis* associated equine proliferative enteropathy in Danish weanling foals. *Acta Veterinaria Scandinavica*, 61(1), 1–8. <https://doi.org/10.1186/s13028-019->

0447-3

- Boutrup, T. S., Boesen, H. T., Boye, M., Agerholm, J. S. y Jensen, T. K. (2010). Early pathogenesis in porcine proliferative enteropathy caused by *Lawsonia intracellularis*. *Journal of Comparative Pathology*, 143(2–3), 101–109. <https://doi.org/10.1016/j.jcpa.2010.01.006>
- Burrough, E. R. (2015). Correlation of *Lawsonia intracellularis* semi-quantitative fecal polymerase chain reaction assay results with the presence of histologic lesions of proliferative enteropathy and positive immunohistochemical staining. *Journal of Swine Health and Production*, 23(4), 204–207.
- Busso, D., Stierlé, M., Thierry, J. C. y Moras, D. (2008). A comparison of inoculation methods to simplify recombinant protein expression screening in *Escherichia coli*. *BioTechniques*, 44(1), 101–106. <https://doi.org/10.2144/000112632>
- Calle, S. E., Chavera, A. C., Sandoval Ch, N., Falcón, N. P., Torres, M. A. y Valdez, M. C. (2006). Detección de Ileitis Necrótica causada por *Lawsonia intracelullaris* en porcinos de granjas tecnificadas de la zona de Lima. *Rev Inv Vet Perú*. <http://www.scielo.org.pe/pdf/rivep/v17n1/a12v17n1.pdf>
- Casadevall, A. (2018). Antibody-based vaccine strategies against intracellular pathogens. *Current Opinion in Immunology*, 53, 74–80. Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.coi.2018.04.011>
- Charles A Janeway, J., Travers, P., Walport, M. y Shlomchik, M. J. (2001). *Macrophage activation by armed CD4 TH1 cells*.
- Chhetri, G., Kalita, P. y Tripathi, T. (2015). An efficient protocol to enhance recombinant protein expression using ethanol in *Escherichia coli*. *MethodsX*, 2, 385–391. <https://doi.org/10.1016/j.mex.2015.09.005>
- Chung, W. J., Huang, C. L., Gong, H. Y., Ou, T. Y., Hsu, J. L. y Hu, S. Y. (2015). Recombinant production of biologically active giant grouper (*Epinephelus lanceolatus*) growth hormone from inclusion bodies of *Escherichia coli* by fed-batch culture. *Protein Expression and Purification*, 110, 79–88.

<https://doi.org/10.1016/j.pep.2015.02.012>

- Coelho, B., Migliavacca, V. F., Okano, F. Y., Grafulin, V. Y., Lunardi, J., Roth, G., de Souza, C. F. V., Santos, D. S., Chies, J. M., Renard, G. y Volpato, G. (2019). Production of recombinant β -galactosidase in bioreactors by fed-batch culture using DO-stat and linear control. *Biocatalysis and Biotransformation*, 37(1), 3–9. <https://doi.org/10.1080/10242422.2018.1493105>
- Collins, A. (2013). Advances in Ileitis Control, Diagnosis, Epidemiology and the Economic Impacts of Disease in Commercial Pig Herds. *Agriculture*, 3(3), 536–555. <https://doi.org/10.3390/agriculture3030536>
- Collins, A., Love, R. J., Pozo, J., Smith, S. H., McOrist, S. y Ecvp, D. (2000). Studies on the ex vivo survival of *Lawsonia intracellularis*. *Swine Health Prod*, 8(5), 211–215. <http://www.aasp.org/shap.html>.
- Collins, A. M., Fell, S. A. y Barchia, I. M. (2013). Cleaning and disinfection with Virkon S significantly reduces *Lawsonia intracellularis* survival and transmission to naive pigs. *Journal of Swine Health and Production*, 21(3), 144–147. <http://www.aasv.org/shap.html>.
- Cordes, H., Riber, U., Jensen, T. K. y Jungersen, G. (2012). Cell-mediated and humoral immune responses in pigs following primary and challenge-exposure to *Lawsonia intracellularis*. *Veterinary research*, 43(1), 9. <https://doi.org/10.1186/1297-9716-43-9>
- Corrales, P. J., Pelliza B.R., Tamiozzo P.J., Carranza A.I., Illanes N., Bertone J. y Ambrogi A. (2009). Perfil serológico y por PCR de *Lawsonia intracellularis* en cerdos de distintas edades en granjas porcinas de la República Argentina. *Revista Médica Veterinaria (Buenos Aires)*, 90 (4), 34-38. https://www.researchgate.net/profile/Pj_Tamiozzo/publication/265844316_Perfil_serologico_y_por_PCR_de_Lawsonia_intracellularis_en_cerdos_de_distintas_edades_en_granjas_porcinas_de_la_Republica_Argentina/links/541ce6f70cf2218008cef8c3/Perfil-serologico-y-p
- Costa-Silva, T. A., Flores-Santos, J. C., Freire, R. K. B., Vitolo, M. y Pessoa-Jr, A.

- (2018). Microbial cell disruption methods for efficient release of enzyme L-asparaginase. *Preparative Biochemistry and Biotechnology*, 48(8), 707–717. <https://doi.org/10.1080/10826068.2018.1487850>
- Doran, P. M. (2013). Homogeneous Reactions. *Bioprocess Engineering Principles* (pp. 599–703). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-220851-5.00012-5>
- Draskovic, V., Bosnjak-Neumuller, J., Vasiljevic, M., Petrujkic, B., Aleksic, N., Kukolj, V. y Stanimirovic, Z. (2018). Influence of phytogetic feed additive on *Lawsonia intracellularis* infection in pigs. *Preventive Veterinary Medicine*, 151, 46–51. <https://doi.org/10.1016/j.prevetmed.2018.01.002>
- Dvorak, P., Chrast, L., Nickel, P. I., Fedr, R., Soucek, K., Sedlackova, M., Chaloupkova, R., Lorenzo, V., Prokop, Z. y Damborsky, J. (2015). Exacerbation of substrate toxicity by IPTG in *Escherichia coli* BL21(DE3) carrying a synthetic metabolic pathway. *Microbial Cell Factories*, 14(1), 1–15. <https://doi.org/10.1186/s12934-015-0393-3>
- Esmaili, I., Mohammad Sadeghi, H. y Akbari, V. (2018). Effect of buffer additives on solubilization and refolding of reteplase inclusion bodies. *Research in Pharmaceutical Sciences*, 13(5), 413. <https://doi.org/10.4103/1735-5362.236834>
- Fahnert, B., Lilie, H. y Neubauer, P. (2004). Inclusion bodies: formation and utilisation. *Advances in biochemical engineering/biotechnology*, 89, 93–142. <https://doi.org/10.1007/b93995>
- Fathi-Roudsari, M., Akhavian-Tehrani, A. y Maghsoudi, N. (2016). Comparison of three *Escherichia coli* strains in recombinant production of reteplase. *Avicenna Journal of Medical Biotechnology*, 8(1), 16–22.
- Fulop, M., Mastroeni, P., Green, M. y Titball, R. W. (2001). Role of antibody to lipopolysaccharide in protection against low- and high-virulence strains of *Francisella tularensis*. *Vaccine*, 19(31), 4465–4472. [https://doi.org/10.1016/S0264-410X\(01\)00189-X](https://doi.org/10.1016/S0264-410X(01)00189-X)
- García-Fruitós, E., Rodríguez-Carmona, E., Díez-Gil, C., Ferraz, R. M., Vázquez, E.,

- Corchero, J. L., Cano-Sarabia, M., Ratera, I., Ventosa, N., Veciana, J. y Villaverde, A. (2009). Surface Cell Growth Engineering Assisted by a Novel Bacterial Nanomaterial. *Advanced Materials*, 21(42), 4249–4253.
<https://doi.org/10.1002/adma.200900283>
- Gnoth, S., Jenzsch, M., Simutis, R. y Lübbert, A. (2007). Process Analytical Technology (PAT): Batch-to-batch reproducibility of fermentation processes by robust process operational design and control. *Journal of Biotechnology*, 132(2), 180–186.
<https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2007.03.020>
- Goyal, D., Sahni, G. y Sahoo, D. K. (2009). Enhanced production of recombinant streptokinase in *Escherichia coli* using fed-batch culture. *Bioresource Technology*, 100(19), 4468–4474. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2009.04.008>
- Guedes, R. M. y Gebhart, C. J. (2003). Onset and duration of fecal shedding, cell-mediated and humoral immune responses in pigs after challenge with a pathogenic isolate or attenuated vaccine strain of *Lawsonia intracellularis*. *Veterinary Microbiology*, 91(2–3), 135–145. [https://doi.org/10.1016/S0378-1135\(02\)00301-2](https://doi.org/10.1016/S0378-1135(02)00301-2)
- Guedes, R. M. y Gebhart, C. J. (2010). Evidence of cell-mediated immune response and specific local mucosal immunoglobulin (Ig) A production against *Lawsonia intracellularis* in experimentally infected swine. *Canadian journal of veterinary research*, 74(2), 97–101. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20592838>
- Guedes, R. M., Machuca, M. A., Quiroga, M. A., Pereira, C. E. R., Resende, T. P. y Gebhart, C. J. (2017). *Lawsonia intracellularis* in Pigs: Progression of Lesions and Involvement of Apoptosis. *Veterinary pathology*, 54(4), 620–628.
<https://doi.org/10.1177/0300985817698206>
- Hadj Sassi, A., Trigui-Lahiani, H., Abdeljalil, S. y Gargouri, A. (2017). Enhancement of solubility, purification and inclusion-bodies-refolding of an active pectin lyase from *Penicillium occitanis* expressed in *Escherichia coli*. *International Journal of Biological Macromolecules*, 95, 256–262.
<https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2016.11.036>

- Hassenin, A., Gebhart C. y Goyal S. (2017). Development of a Universal IPMA Test to Detect *Lawsonia* Antibodies in Multiple Species Using Protein A and G. *Journal of Applied Life Sciences International*, 14(1), 1–7.
<https://journaljalsi.com/index.php/JALSI/article/view/6175/10960>
- Ho, C. W., Tan, W. S., Yap, W. B., Ling, T. C. y Tey, B. T. (2008). Comparative evaluation of different cell disruption methods for the release of recombinant hepatitis B core antigen from *Escherichia coli*. *Biotechnology and Bioprocess Engineering*, 13(5), 577–583. <https://doi.org/10.1007/s12257-008-0020-9>
- Hohman, L. S. y Peters, N. C. (2019). CD4+ T Cell-Mediated Immunity against the Phagosomal Pathogen *Leishmania*: Implications for Vaccination. *Trends in Parasitology*, 35(6), 423–435. Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.pt.2019.04.002>
- Hori, C., Yamazaki, T., Ribordy, G., Takisawa, K., Matsumoto, K., Ooi, T., Zinn, M. y Taguchi, S. (2019). High-cell density culture of poly(lactate-co-3-hydroxybutyrate)-producing *Escherichia coli* by using glucose/xylose-switching fed-batch jar fermentation. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 127(6), 721–725.
<https://doi.org/10.1016/j.jbiosc.2018.11.006>
- Hossain, M. M., Oh, Y. y Cho, H. S. (2016). Prevalence of antibody to and DNA of *Lawsonia intracellularis* in samples from wild animals in Korea. *Journal of Wildlife Diseases*, 52(4), 803–808. <https://doi.org/10.7589/2015-08-209>
- Huang, C. J., Lin, H. y Yang, X. (2012). Industrial production of recombinant therapeutics in *Escherichia coli* and its recent advancements. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 39(3), 383–399. <https://doi.org/10.1007/s10295-011-1082-9>
- Hwang, J. M., Seo, M. J. y Yeh, J. Y. (2017). *Lawsonia intracellularis* in the feces of wild rodents and stray cats captured around equine farms. *BMC Veterinary Research*, 13(1), 1–10. <https://doi.org/10.1186/s12917-017-1155-8>
- Hwang, S. O. (1996). Effect of inclusion bodies on the buoyant density of recombinant *Escherichia coli*. *Biotechnology Techniques*, 10(3), 157–160.
<https://doi.org/10.1007/BF00158938>

- Jacobs, A. A., Harks, F., Hazenberg, L., Hoeijmakers, M. J. H., Nell, T., Pel, S. y Segers, R. P. (2019). Efficacy of a novel inactivated *Lawsonia intracellularis* vaccine in pigs against experimental infection and under field conditions. *Vaccine*, 37(15), 2149–2157. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2019.02.067>
- Jacobson, M., Fellström, C. y Jensen-Waern, M. (2010). Porcine proliferative enteropathy: An important disease with questions remaining to be solved. *Veterinary Journal*, 184 (3), 264–268. <https://doi.org/10.1016/j.tvjl.2009.05.010>
- Jansen, T., Weersink, A., von Massow, M. y Poljak, Z. (2019). Assessing the Value of Antibiotics on Farms: Modeling the Impact of Antibiotics and Vaccines for Managing *Lawsonia intracellularis* in Hog Production. *Frontiers in Veterinary Science*, 6, 364. <https://doi.org/10.3389/fvets.2019.00364>
- Jiménez, Á., Cortes, L. S., Martínez, M., Silva, Y., Florez, C., Mendez, M. y Anderson, G. (2014). Estandarización de una PCR anidada para la identificación de *Lawsonia intracellularis* en porcinos. *Spei Domus*, 10(20), 23–29. <https://doi.org/10.16925/sp.v10i20.887>
- Jozala, A. F., Geraldés, D. C., Tundisi, L. L., Feitosa, V. de A., Breyer, C. A., Cardoso, S. L., Mazzola, P. G., de Oliveira-Nascimento, L., Rangel-Yagui, C., Magalhães, P. de O., de Oliveira, M. A., y Pessoa, A. (2016). Biopharmaceuticals from microorganisms: from production to purification. *Brazilian Journal of Microbiology*, 47(1), 51–63. Elsevier Editora Ltda. <https://doi.org/10.1016/j.bjm.2016.10.007>
- Kampen, W. H. (2014). Nutritional Requirements in Fermentation Processes. *Fermentation and Biochemical Engineering Handbook* (pp. 37–57). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-1-4557-2553-3.00004-0>
- Karuppanan, A. K. y Opriessnig, T. (2018). *Lawsonia intracellularis*: Revisiting the Disease Ecology and Control of This Fastidious Pathogen in Pigs. *Frontiers in Veterinary Science*, 5, 181. <https://doi.org/10.3389/fvets.2018.00181>
- Kim, H., Kim, S. y Yoon, S. H. (2018). Metabolic network reconstruction and phenome analysis of the industrial microbe, *Escherichia coli* BL21(DE3). *PLOS ONE*, 13(9),

e0204375. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0204375>

Kram, K. E. y Finkel, S. E. (2015). Rich medium composition affects *Escherichia coli* survival, glycation, and mutation frequency during long-term batch culture. *Applied and Environmental Microbiology*, 81(13), 4442–4450.

<https://doi.org/10.1128/AEM.00722-15>

Krause, M., Ukkonen, K., Haataja, T., Ruottinen, M., Glumoff, T., Neubauer, A., Neubauer, P. y Vasala, A. (2010). A novel fed-batch based cultivation method provides high cell-density and improves yield of soluble recombinant proteins in shaken cultures. *Microbial Cell Factories*, 9(1), 11. <https://doi.org/10.1186/1475-2859-9-11>

Kroll, J. J., Roof, M. B. y McOrist, S. (2004). Evaluation of protective immunity in pigs following oral administration of an avirulent live vaccine of *Lawsonia intracellularis*. *American Journal of Veterinary Research*, 65(5), 559–565.

<https://doi.org/10.2460/ajvr.2004.65.559>

Lawson, G. H. y Gebhart, C. J. (2000). *Proliferative Enteropathy*. 122, 77–100.

<https://doi.org/10.1053/jcpa.1999.0347>

Lawson, G. H., McOrist, S., Jasni, S. y Mackie, R. A. (1993). Intracellular bacteria of porcine proliferative enteropathy: Cultivation and maintenance in vitro. *Journal of Clinical Microbiology*, 31(5), 1136–1142.

Lobstein, J., Emrich, C. A., Jeans, C., Faulkner, M., Riggs, P. y Berkmen, M. (2012). SHuffle, a novel *Escherichia coli* protein expression strain capable of correctly folding disulfide bonded proteins in its cytoplasm. *Microbial Cell Factories*, 11.

<https://doi.org/10.1186/1475-2859-11-56>

Macintyre, N., Smith, D. G. E., Shaw, D. J., Thomson, J. R. y Rhind, S. M. (2003). Immunopathogenesis of Experimentally Induced Proliferative Enteropathy in Pigs. *Veterinary Pathology*, 40(4), 421–432. <https://doi.org/10.1354/vp.40-4-421>

Margreiter, G., Messner, P., Caldwell, K. D. y Bayer, K. (2008). Size characterization of inclusion bodies by sedimentation field-flow fractionation. *Journal of Biotechnology*,

138(3–4), 67–73. <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2008.07.1995>

- Marsteller, T. A., Abvp, D., Armbruster, G., Bane, D. P., Connie, ;, Gebhart, J., Muller, R., Weatherford, J. y Thacker, B. (2003). Monitoring the prevalence of *Lawsonia intracellularis* IgG antibodies using serial sampling in growing and breeding swine herds. *Journal of Swine Health and Production*, 11(3).
<http://www.aasv.org/shap.html>.
- Matteau, D., Baby, V., Pelletier, S. y Rodrigue, S. (2015). A Small-Volume, Low-Cost, and Versatile Continuous Culture Device. *PLOS ONE*, 10(7), e0133384.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0133384>
- McOrist, S., Boid, R., Lawson, G. y McConnell, I. (1987). Monoclonal antibodies to intracellular campylobacter-like organisms of the porcine proliferative enteropathies. *Veterinary Record*, 121, 421–422. 10.1136/vr.121.18.421
- McOrist, S., Gebhart, C. J., Boid, R. y Barns, S. M. (1995). Characterization of *Lawsonia intracellularis* gen. nov., sp. nov., the obligately intracellular bacterium of porcine proliferative enteropathy. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 45(4), 820–825. <https://doi.org/10.1099/00207713-45-4-820>
- McOrist, S., Jasni, S., Mackie, R. A., Berschneider, H. M., Rowland, A. C. y Lawson, G. H. (1995). Entry of the bacterium ileal symbiont intracellularis into cultured enterocytes and its subsequent release. *Research in Veterinary Science*, 59(3), 255–260. [https://doi.org/10.1016/0034-5288\(95\)90013-6](https://doi.org/10.1016/0034-5288(95)90013-6)
- McOrist, S., Muller Wager, A., Kratzer, D. y Sjösten, C. G. (2000). Therapeutic efficacy of water-soluble lincomycin-spectinomycin powder against porcine proliferative enteropathy in a European field study. *Veterinary Record*, 146(3), 61–68.
<https://doi.org/10.1136/vr.146.3.61>
- Mevada, J., Devi, S. y Pandit, A. (2019). Large scale microbial cell disruption using hydrodynamic cavitation: Energy saving options. *Biochemical Engineering Journal*, 143, 151–160. <https://doi.org/10.1016/j.bej.2018.12.010>
- Montesino, R., Gutiérrez, N., Camacho, F., Farnós, O., Andrades, S., González, A.,

- Acosta, J., Cortez-San Martín, M., Sánchez, O., Ruiz, A. y Toledo, J. R. (2019). Multi-antigenic recombinant subunit vaccine against *Lawsonia intracellularis*: The etiological agent of porcine proliferative enteropathy. *Vaccine*, 37(10), 1340–1349. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2019.01.029>
- Narayanan, H., Luna, M. F., Stosch, M., Cruz Bournazou, M. N., Polotti, G., Morbidelli, M., Butté, A. y Sokolov, M. (2020). Bioprocessing in the Digital Age: The Role of Process Models. *Biotechnology Journal*, 15(1), 1900172. <https://doi.org/10.1002/biot.201900172>
- Nascimento, I. P. y Leite, L. C. C. (2012). Recombinant vaccines and the development of new vaccine strategies. *Brazilian journal of medical and biological research. Revista brasileira de pesquisas medicas e biologicas*, 45(12), 1102–1111. <https://doi.org/10.1590/s0100-879x2012007500142>
- Nogueira, M., Collins, A., Dunlop, R. y Emery, D. (2015). Effect of the route of administration on the mucosal and systemic immune responses to *Lawsonia intracellularis* vaccine in pigs. *Australian Veterinary Journal*, 93(4), 124–126. <https://doi.org/10.1111/avj.12305>
- Obradovic, M., Pasternak, J. A., Hon Ng, S., Allan, B., Brownlie, R. y Wilson, H. L. (2019). Immunoproteomic analysis of *Lawsonia intracellularis* identifies candidate neutralizing antibody targets for use in subunit vaccine development. *Veterinary Microbiology*, 235, 270–279. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2019.07.014>
- Obradovic, M. R. y Wilson, H. L. (2020). Immune response and protection against *Lawsonia intracellularis* infections in pigs. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 219, 109959. Elsevier B.V. <https://doi.org/10.1016/j.vetimm.2019.109959>
- Ohta, T., Kimura, K., Katsuda, K., Kobayashi, H., Mikami, O., Haritani, M. y Onodera, T. (2017). Proliferative Enteropathy caused by *Lawsonia intracellularis* in Chickens. *Journal of Comparative Pathology*, 156(2–3), 158–161. <https://doi.org/10.1016/j.jcpa.2016.11.274>

- Oliveira, C. y Domingues, L. (2018). Guidelines to reach high-quality purified recombinant proteins. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 102, (1), 81–92. Springer Verlag. <https://doi.org/10.1007/s00253-017-8623-8>
- Otoni, L. V., Gabardo, M. P., Macêdo, N. R., Wagatsuma, M. M., Pereira, M. M. y Guedes, R. M. (2019). Tylosin injectable for the treatment of porcine proliferative enteropathy in experimentally inoculated pigs. *Pesquisa Veterinaria Brasileira*, 39(3), 168–174. <https://doi.org/10.1590/1678-5150-PVB-6066>
- Park, S. Y., Binkley, R. M., Kim, W. J., Lee, M. H. y Lee, S. Y. (2018). Metabolic engineering of *Escherichia coli* for high-level astaxanthin production with high productivity. *Metabolic Engineering*, 49, 105–115. <https://doi.org/10.1016/j.ymben.2018.08.002>
- Pedersen, K. S., Holyoake, P., Stege, H. y Nielsen, J. P. (2010). Diagnostic Performance of Different Fecal *Lawsonia intracellularis* —Specific Polymerase Chain Reaction Assays as Diagnostic Tests for Proliferative Enteropathy in Pigs: A Review. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, 22(4), 487–494. <https://doi.org/10.1177/104063871002200401>
- Pereira, C. E. R., Resende, T. P., Armien, A. G., Laub, R. P., Vannucci, F. A., Santos, R. L., Gebhart, C. J. y Guedes, R. M. (2020). Survival of *Lawsonia intracellularis* in porcine peripheral blood monocyte-derived macrophages. *PLOS ONE*, 15(7), e0236887. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0236887>
- Pérez, E. (2016). *Estudio clínico , anatomopatológico y de biología molecular de cuadros entéricos en cerdos de crecimiento y terminación. Tesis Doctoral* Universidad Nacional de La Plata.
- Peternel, Š., y Komel, R. (2010). Isolation of biologically active nanomaterial (inclusion bodies) from bacterial cells. *Microbial Cell Factories*, 9(1), 66. <https://doi.org/10.1186/1475-2859-9-66>
- Pham, O. H., O'Donnell, H., Al-Shamkhani, A., Kerrinnes, T., Tsohis, R. M. y McSorley, S. J. (2017). T cell expression of IL-18R and DR3 is essential for non-cognate

- stimulation of Th1 cells and optimal clearance of intracellular bacteria. *PLoS Pathogens*, 13(8). <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1006566>
- Plotkin, S., Robinson, J. M., Cunningham, G., Iqbal, R. y Larsen, S. (2017). The complexity and cost of vaccine manufacturing – An overview. *Vaccine*, 35 (33), 4064–4071. Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2017.06.003>
- Prados-Rosales, R., Carreño, L., Cheng, T., Blanc, C., Weinrick, B., Malek, A., Lowary, T. L., Baena, A., Joe, M., Bai, Y., Kalscheuer, R., Batista-Gonzalez, A., Saavedra, N. A., Sampedro, L., Tomás, J., Anguita, J., Hung, S. C., Tripathi, A., Xu, J., ... Casadevall, A. (2017). Enhanced control of *Mycobacterium tuberculosis* extrapulmonary dissemination in mice by an arabinomannan-protein conjugate vaccine. *PLoS Pathogens*, 13(3). <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1006250>
- Ramchuran, S. O., Holst, O. y Karlsson, E. N. (2005). Effect of postinduction nutrient feed composition and use of lactose as inducer during production of thermostable xylanase in *Escherichia coli* glucose-limited fed-batch cultivations. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 99(5), 477–484. <https://doi.org/10.1263/jbb.99.477>
- Rasala, B. A. y Mayfield, S. P. (2015). Photosynthetic biomanufacturing in green algae; Production of recombinant proteins for industrial, nutritional, and medical uses. *Photosynthesis Research* 123 (3), 227–239. Kluwer Academic Publishers. <https://doi.org/10.1007/s11120-014-9994-7>
- Resende, T. P., Medida, R. L., Guo, Y., Vannucci, F. A., Saqui-Salces, M. y Gebhart, C. (2019). Evaluation of mouse enteroids as a model for *Lawsonia intracellularis* infection. *Veterinary Research*, 50(1), 57. <https://doi.org/10.1186/s13567-019-0672-9>
- Resende, T. P., Pereira, C. E. R., Daniel, A. G. de S., Vasquez, E., Saqui-Salces, M., Vannucci, F. A. y Gebhart, C. J. (2019). Effects of *Lawsonia intracellularis* infection in the proliferation of different mammalian cell lines. *Veterinary Microbiology*, 228, 157–164. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2018.11.029>
- Resende, T. P., Pereira, C. E. R., Gabardo, M. de P., Haddad, J. P. A., Lobato, Z. I. P. y

- Guedes, R. M. (2015). Serological profile, seroprevalence and risk factors related to *Lawsonia intracellularis* infection in swine herds from Minas Gerais State, Brazil. *BMC Veterinary Research*, 11(1), 1–6. <https://doi.org/10.1186/s12917-015-0618-z>
- Restaino, O. F., Bhaskar, U., Paul, P., Li, L., De Rosa, M., Dordick, J. S. y Linhardt, R. J. (2013). High cell density cultivation of a recombinant *E. coli* strain expressing a key enzyme in bioengineered heparin production. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 97(9), 3893–3900. <https://doi.org/10.1007/s00253-012-4682-z>
- Riber, U., Heegaard, P. M. H., Cordes, H., Ståhl, M., Jensen, T. K. y Jungersen, G. (2015). Vaccination of pigs with attenuated *Lawsonia intracellularis* induced acute phase protein responses and primed cell-mediated immunity without reduction in bacterial shedding after challenge. *Vaccine*, 33(1), 156–162. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2014.10.084>
- Roerink, F., Morgan, C. L., Knetter, S. M., Passat, M., Archibald, A. L., Ait-ali, T. y Strait, E. L. (2018). A novel inactivated vaccine against *Lawsonia intracellularis* induces rapid induction of humoral immunity , reduction of bacterial shedding and provides robust gut barrier function. *Vaccine*, 36(11), 1500–1508. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2017.12.049>
- Rosano, G. L. y Ceccarelli, E. A. (2014). Recombinant protein expression in *Escherichia coli*: Advances and challenges. *Frontiers in Microbiology*, 5, Número APR. Frontiers Research Foundation. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2014.00172>
- Rosano, G. L., Morales, E. S. y Ceccarelli, E. A. (2019). New tools for recombinant protein production in *Escherichia coli*: A 5-year update. *Protein Science*, 28(8), 1412–1422. <https://doi.org/10.1002/pro.3668>
- Rowland, A. C., Lawson, G. H. y Maxwell, A. (1973). Intestinal adenomatosis in the Pig: Occurrence of a bacterium in affected cells. *Nature*, 243(5407), 417. <https://doi.org/10.1038/243417a0>
- Sabatié, J., Speck, D., Reymund, J., Hebert, C., Caussin, L., Weltin, D., Gloeckler, R., O'Regan, M., Bernard, S., Ledoux, C., Ohsawa, I., Kamogawa, K., Lemoine, Y. y

- Brown, S. W. (1991). Biotin formation by recombinant strains of *Escherichia coli*: influence of the host physiology. *Journal of Biotechnology*, 20(1), 29–49.
[https://doi.org/10.1016/0168-1656\(91\)90033-R](https://doi.org/10.1016/0168-1656(91)90033-R)
- Schettters, S. T. T., Jong, W. S. P., Kruijssen, L. J. W., Saparoea, H. B. van den B. van, Engels, S., Unger, W. W. J., Houben, D., den Haan, J. M. M., Luirink, J. y Kooyk, Y. (2019). Bacterial inclusion bodies function as vehicles for dendritic cell-mediated T cell responses. *Cellular and Molecular Immunology*. Chinese Soc Immunology.
<https://doi.org/10.1038/s41423-019-0298-x>
- Sezonov, G., Joseleau-Petit, D. y D'Ari, R. (2007). *Escherichia coli* physiology in Luria-Bertani broth. *Journal of Bacteriology*, 189(23), 8746–8749.
<https://doi.org/10.1128/JB.01368-07>
- Shiloach, J. y Fass, R. (2005). Growing *E. coli* to high cell density - A historical perspective on method development. *Biotechnology Advances*, 23(5), 345–357.
<https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2005.04.004>
- Shrivastava, S., Shrivastava, P. y Ramasamy, J. (2018). World health organization releases global priority list of antibiotic-resistant bacteria to guide research, discovery, and development of new antibiotics. *Journal of Medical Society*, 32(1), 76. https://doi.org/10.4103/jms.jms_25_17
- Sieben, M., Steinhorn, G., Müller, C., Fuchs, S., Ann Chin, L., Regestein, L. y Büchs, J. (2016). Testing plasmid stability of *Escherichia coli* using the Continuously Operated Shaken BIOreactor System. *Biotechnology Progress*, 32(6), 1418–1425.
<https://doi.org/10.1002/btpr.2341>
- Singh, S. M., Upadhyay, A. K. y Panda, A. K. (2008). Solubilization at high pH results in improved recovery of proteins from inclusion bodies of *E. coli*. *Journal of Chemical Technology & Biotechnology*, 83(8), 1126–1134. <https://doi.org/10.1002/jctb.1945>
- Singhvi, P., Saneja, A., Srichandan, S. y Panda, A. K. (2020). Bacterial Inclusion Bodies: A Treasure Trove of Bioactive Proteins. *Trends in Biotechnology*.
<https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2019.12.011>

- Slouka, C., Kopp, J., Spadiut, O. y Herwig, C. (2019). Perspectives of inclusion bodies for bio-based products: curse or blessing? *Applied Microbiology and Biotechnology*, 103(3), 1143–1153. <https://doi.org/10.1007/s00253-018-9569-1>
- Smith, D. G. E., Mitchell, S. C., Nash, T. y Rhind, S. (2000). Gamma Interferon Influences Intestinal Epithelial Hyperplasia Caused by *Lawsonia intracellularis*. *Infection in Mice*. 68(12), 6737–6743.
- Sohoni, S. V., Nelapati, D., Sathe, S., Javadekar-Subhedar, V., Gaikawai, R. P. y Wangikar, P. P. (2015). Optimization of high cell density fermentation process for recombinant nitrilase production in *E. coli*. *Bioresource Technology*, 188, 202–208. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2015.02.038>
- Stanbury, P. F., Whitaker, A. y Hall, S. J. (2017). Culture preservation and inoculum development. *Principles of Fermentation Technology* (pp. 335–399). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/b978-0-08-099953-1.00006-5>
- Summers, D. K. (1991). The kinetics of plasmid loss. *Trends in Biotechnology*, 9(1), 273–278. [https://doi.org/10.1016/0167-7799\(91\)90089-Z](https://doi.org/10.1016/0167-7799(91)90089-Z)
- Tartoff, K., y Hobbs, C. (1987). Improved media for growing plasmid and cosmid clones. *Bethesda Res Lab Focus*, 9–12.
- Torrado, E., Fountain, J. J., Robinson, R. T., Martino, C. A., Pearl, J. E., Rangel-Moreno, J., Tighe, M., Dunn, R. y Cooper, A. M. (2013). Differential and Site Specific Impact of B Cells in the Protective Immune Response to *Mycobacterium tuberculosis* in the Mouse. *PLoS ONE*, 8(4). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0061681>
- Torrealba, D., Seras-Franzoso, J., Mamat, U., Wilke, K., Villaverde, A., Roher, N. y Garcia-Fruitoas, E. (2016). Complex particulate biomaterials as immunostimulant-delivery platforms. *PLoS ONE*, 11(10). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0164073>
- Tripathi, N. K. (2016). Production and Purification of Recombinant Proteins from *Escherichia coli*. *ChemBioEng Reviews*, 3(3), 116–133. <https://doi.org/10.1002/cben.201600002>

- Tripathi, N. K. y Shrivastava, A. (2019). Recent Developments in Bioprocessing of Recombinant Proteins: Expression Hosts and Process Development. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology* (Vol. 7). Frontiers Media S.A.
<https://doi.org/10.3389/fbioe.2019.00420>
- Vannucci, F. A., Gebhart, C. J. y McOrist, S. (2019). Proliferative Enteropathy. *Diseases of Swine* (898–911). John Wiley & Sons, Inc.
<https://doi.org/10.1002/9781119350927.ch58>
- Wattanaphansak, S., Asawakarn, T., Gebhart, C. J. y Deen, J. (2008). Development and validation of an enzyme-linked immunosorbent assay for the diagnosis of porcine proliferative enteropathy. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, 20(2), 170–177. <https://doi.org/10.1177/104063870802000205>
- Wattanaphansak, S., Singer, R. S., Isaacson, R. E., Deen, J., Gramm, B. R. y Gebhart, C. J. (2009). In vitro assessment of the effectiveness of powder disinfectant (Stalosan® F) against *Lawsonia intracellularis* using two different assays. *Veterinary Microbiology*, 136(3–4), 403–407.
<https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2008.12.002>
- Weuster-Botz, D., Hekmat, D., Puskeiler, R. y Franco-Lara, E. (2006). Enabling technologies: Fermentation and downstream processing. *Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology*, 105, 205–247. https://doi.org/10.1007/10_2006_034
- Widdel, F. (2010). Theory and Measurement of Bacterial Growth. *Bremen: University Bremen*.
- Wingfield, P. T. (2015). Overview of the Purification of Recombinant Proteins. *Current Protocols in Protein Science*, 80(1), 6.1.1-6.1.35.
<https://doi.org/10.1002/0471140864.ps0601s80>
- Yeh, J. y Ga, A. (2018). Systemic cytokine response in pigs infected orally with a *Lawsonia intracellularis* isolate of South Korean origin. *Journal of Veterinary Medical Science*, 80(1), 13–19. <https://doi.org/10.1292/jvms.17-0036>
- Zhang, J., Suflita, M., Fiaschetti, C. M., Li, G., Li, L., Zhang, F., Dordick, J. S. y Linhardt,

R. J. (2015). High cell density cultivation of a recombinant *Escherichia coli* strain expressing a 6-O-sulfotransferase for the production of bioengineered heparin. *Journal of Applied Microbiology*, 118(1), 92–98. <https://doi.org/10.1111/jam.12684>

Zhang, Y., Taiming, L. y Liu, J. (2003). Low temperature and glucose enhanced T7 RNA polymerase-based plasmid stability for increasing expression of glucagon-like peptide-2 in *Escherichia coli*. *Protein Expression and Purification*, 29(1), 132–139. [https://doi.org/10.1016/S1046-5928\(03\)00002-0](https://doi.org/10.1016/S1046-5928(03)00002-0)

Anexos