



**“Estudio de la expresión de antígenos quiméricos contra *Lawsonia intracellularis*,  
causante de la enteropatía proliferativa porcina”**

Villegas Villegas, Milton Fernando

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.

5 de enero del 2021

## Hoja de resultados de la herramienta Urkund



### Document Information

Analyzed document	Trabajo de Titulación_Milton Fernando Villegas Villegas.docx (D91175681)
Submitted	1/6/2021 10:21:00 PM
Submitted by	
Submitter email	mfvillegas1@espe.edu.ec
Similarity	8%
Analysis address	tiramos.espe@analysis.arkund.com

### Sources included in the report

<b>SA</b>	<b>Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE / Salazar Guamán Santiago Alberto.docx</b> Document Salazar Guamán Santiago Alberto.docx (D77871482) Submitted by: sasalazar7@espe.edu.ec Receiver: tiramos.espe@analysis.arkund.com		21
<b>SA</b>	<b>Ileítis porcina.pptx</b> Document Ileítis porcina.pptx (D40612928)		1
<b>SA</b>	<b>Memoria Benjamín Arancibia y Macarena Huerta.docx</b> Document Memoria Benjamín Arancibia y Macarena Huerta.docx (D78853395)		1
<b>W</b>	URL: <a href="https://patents.google.com/patent/ES2236698T3/es">https://patents.google.com/patent/ES2236698T3/es</a> Fetched: 1/6/2021 10:22:00 PM		1
<b>SA</b>	<b>Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE / Carla Villavicencio Urkund.docx</b> Document Carla Villavicencio Urkund.docx (D78008264) Submitted by: cjvillavicencio@espe.edu.ec Receiver: tiramos.espe@analysis.arkund.com		2

THELVIA  
ISABEL  
RAMOS  
GOMEZ

Firmado digitalmente por THELVIA ISABEL RAMOS GOMEZ  
Fecha: 2021.01.06 18:30:17 -05'00'



**Departamento de Ciencias de la Vida y de la Agricultura**

**Carrera de Ingeniería en Biotecnología**

**Certificación**

Certifico que el trabajo de titulación, denominado “**Estudio de la expresión de antígenos quiméricos contra *Lawsonia intracellularis*, causante de la enteropatía proliferativa porcina**” fue realizado por el señor **Villegas Villegas, Milton Fernando** el mismo que ha sido revisado en su totalidad, analizado por la herramienta de verificación de similitud de contenido; por lo tanto, cumple con los requisitos teóricos, científicos, técnicos, metodológicos y legales establecidos por la Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE, razón por la cual me permito acreditar y autorizar para que lo sustente públicamente.

Sangolquí, 5 de enero del 2021

THELVIA  
ISABEL RAMOS  
GOMEZ

Firmado digitalmente  
por THELVIA ISABEL  
RAMOS GOMEZ  
Fecha: 2021.01.07  
15:12:56 -05'00'

.....  
**Ramos Gómez, Thelvia Isabel**

C.C.: 1753960028



**ESPE**  
UNIVERSIDAD DE LAS FUERZAS ARMADAS  
INNOVACIÓN PARA LA EXCELENCIA

**Departamento de Ciencias de la Vida y de la Agricultura**

**Carrera de Ingeniería en Biotecnología**

**Responsabilidad de autoría**

Yo, **Villegas Villegas, Milton Fernando**, con C.C.: 0928606136, declaro que el contenido, ideas y criterios del trabajo de titulación: **“Estudio de la expresión de antígenos quiméricos contra *Lawsonia intracellularis*, causante de la enteropatía proliferativa porcina”** es de mi autoría y responsabilidad, cumpliendo con los requisitos teóricos, científicos, técnicos, metodológicos y legales establecidos por la Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE, respetando los derechos intelectuales de terceros y referenciando las citas bibliográficas.

Sangolquí, 5 de enero del 2021

Una firma manuscrita en tinta azul sobre una línea punteada.

**Villegas Villegas, Milton Fernando**

C.C.: 0928606136



**Departamento de Ciencias de la Vida y de la Agricultura**

**Carrera de Ingeniería en Biotecnología**

**Autorización de publicación**

Yo, **Villegas Villegas, Milton Fernando**, con C.C.: 0928606136, autorizo a la Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE publicar el trabajo de titulación: “**Estudio de la expresión de antígenos quiméricos contra *Lawsonia intracellularis*, causante de la enteropatía proliferativa porcina**” en el Repositorio Institucional, cuyo contenido, ideas y criterios son de mi responsabilidad.

Sangolquí, 5 de enero del 2021

A handwritten signature in blue ink, consisting of several overlapping loops and strokes, is written over a horizontal dotted line.

**Villegas Villegas, Milton Fernando**

C.C.: 0928606136

## Dedicatoria

*Este estudio está dedicado de todo corazón a mis queridos padres, que han sido mi fuente de inspiración y fortaleza, quienes continuamente me han brindado su apoyo moral, emocional y financiero.*

*A mi hermano, hermanas, mentores, amigos, compañeros de clase y laboratorio que compartieron sus palabras de consejo y aliento para terminar este estudio.*

**Milton Fernando Villegas Villegas**

## **Agradecimientos**

*A lo largo de la investigación y redacción de esta tesis he recibido una gran cantidad de apoyo y asistencia.*

*En primer lugar, quiero agradecer a la Dra. Raquel Montesino por sus innumerables horas de reflexión, enseñanza, ánimo y, sobre todo, paciencia durante todo el proceso. Sus valiosos comentarios me impulsaron a agudizar mi pensamiento y llevaron mi trabajo a un nivel superior.*

*Un agradecimiento especial a la Dra. Thelvia Ramos por su guía, confianza y constante enseñanza en sus clases y durante el desarrollo de esta tesis. Su apoyo me permitió viajar y realizar la investigación otro país, donde las experiencias vividas cambiaron mi forma de pensar, mejorando mi visión personal y profesional.*

*Un agradecimiento al Dr. Jorge Toledo por la confianza brindada al permitirme unir a su laboratorio como pasante y posteriormente como tesista. Sin lugar a duda la investigación que realicé no habría sido posible sin su apoyo.*

*Mi eterna gratitud a mis padres, Jenny y Milton, por todo su infinito apoyo, amor y sacrificios durante toda mi vida en este mundo. Sus consejos y enseñanzas me hicieron la persona que soy ahora y la que seré, pues siempre estarán en mi corazón. A mis hermanos, Enrique, Jeanette y Jennifer, a quienes no recuerdo momento en mi vida en el que no estuviera presente su apoyo.*

*Finalmente me gustaría agradecer a todos mis amigos, Daniel Acuña, Liseth Salazar, Carla Villavicencio, Luis Salvatierra, Bryan Mangui y Angy Ñacato, quienes han hecho mis días en la Universidad más alegres. En especial a Santiago Salazar por toda su ayuda en el laboratorio y a Sebastián Gómez por siempre apoyarme en las locas ideas de proyectos que tenemos. Gracias a todos de corazón.*

## Índice de Contenido

Hoja de resultados de la herramienta Urkund .....	2
Certificación .....	3
Responsabilidad de autoría.....	4
Autorización de publicación.....	5
Dedicatoria.....	6
Agradecimientos .....	7
Índice de Contenido .....	8
Índice de Tablas.....	12
Índice de Figuras .....	13
Abreviaturas.....	15
Resumen .....	18
Abstract.....	19
Capítulo 1 .....	20
Introducción .....	20
Formulación del problema.....	20
Justificación del problema .....	22
Objetivos de la investigación .....	24
<i>Objetivo general</i> .....	24
<i>Objetivo específico</i> .....	24
Capítulo 2 .....	25
Marco Teórico.....	25
<i>Lawsonia intracellularis</i> .....	25
Enteropatía proliferativa .....	26
<i>Crónica</i> .....	26



<i>Aguda</i> .....	27
<i>Subclínica</i> .....	28
Mecanismo de infección.....	28
<i>Colonización</i> .....	29
<i>Ingreso a la célula huésped</i> .....	29
<i>Escape de las vacuolas intracelulares</i> .....	30
<i>Proliferación celular</i> .....	30
Respuesta inmune .....	31
<i>Inmunidad humoral</i> .....	31
<i>Inmunidad celular</i> .....	32
<i>Inmunidad materna</i> .....	33
Diagnóstico .....	34
<i>Histopatología e inmunohistoquímica</i> .....	34
<i>Serología</i> .....	35
<i>PCR</i> .....	36
Control y medidas de prevención .....	36
<i>Dieta</i> .....	37
<i>Desinfectantes</i> .....	37
<i>Antibióticos</i> .....	37
<i>Vacunas</i> .....	38
<i>Vacunas recombinantes</i> .....	39
<i>Escherichia coli</i> .....	41
Capítulo 3 .....	43
Metodología.....	43

Confección del banco primario y de trabajo de <i>E. coli</i> SHuffle® que expresa los antígenos de <i>L. intracellularis</i> .....	43
<i>Chequeo de la expresión de los antígenos</i> .....	44
<i>Elaboración del banco primario y de trabajo</i> .....	45
<i>Preparación de los controles</i> .....	45
Preparación del medio de cultivo Terrific Broth para la fermentación .....	47
Preparación del inóculo del cultivo en fermentador .....	48
Fermentación a escala de 2 L .....	48
Recuperación de la biomasa celular.....	49
Ruptura en prensa francesa .....	49
Lavado de los antígenos .....	50
Determinación de concentración .....	50
Solubilización de los cuerpos de inclusión.....	50
SDS-PAGE y Western blot.....	51
Capítulo 4 .....	53
Resultados.....	53
Banco primario y de trabajo de los antígenos recombinantes de <i>L. intracellularis</i> .....	53
Expresión de los antígenos en fermentador .....	57
Recuperación de antígenos .....	61
Lavado de los cuerpos de inclusión.....	63
Rendimiento de la expresión de los antígenos .....	65
Solubilización de los antígenos .....	68
Capítulo 5 .....	73
Discusión .....	73
Capítulo 6 .....	76

	11
Conclusiones .....	76
Recomendaciones .....	77
Capítulo 7 .....	78
Bibliografía.....	78

### Índice de Tablas

Tabla 1. <i>Clasificación taxonómica de L. intracellularis</i> .....	25
Tabla 2. <i>Características de las vacunas vivas atenuadas, inactivadas y recombinantes para el control de la enteropatía proliferativa porcina</i> .....	40
Tabla 3. <i>Condiciones de solubilización utilizadas</i> .....	51
Tabla 4. <i>Análisis de la fermentación de E. coli SHuffle® que expresa OMP1q</i> .....	58
Tabla 5. <i>Análisis de la fermentación de E. coli SHuffle® que expresa OMP2q</i> .....	59
Tabla 6. <i>Análisis de la fermentación de E. coli SHuffle® que expresa INVASq</i> .....	61
Tabla 7. <i>Rendimiento de expresión de OMP1q</i> .....	67
Tabla 8. <i>Rendimiento de expresión de OMP2q</i> .....	67

## Índice de Figuras

Figura 1. <i>Plásmidos de expresión con genes de interés de Lawsonia intracellularis</i> .....	44
Figura 2. <i>Diagrama de flujo para el chequeo de la producción de los antígenos en E. coli SHuffle® transformada con los vectores para la expresión de los genes de interés</i> ...	46
Figura 3. <i>Diagrama de flujo para la elaboración del banco celular primario de E. coli SHuffle® productora de proteínas de interés</i> .....	47
Figura 4. <i>Análisis de la expresión de INVASq mediante SDS-PAGE</i> .....	54
Figura 5. <i>Análisis de la expresión de OMP2q</i> .....	54
Figura 6. <i>Análisis de la expresión de OMP1q</i> .....	55
Figura 7. <i>Chequeo del banco celular primario de INVASq</i> .....	56
Figura 8. <i>Chequeo del banco celular primario de OMP2q</i> .....	56
Figura 9. <i>Chequeo del banco celular primario de OMP1q</i> .....	57
Figura 10. <i>Curva de crecimiento de E. coli SHuffle® que expresa OMP1q en medio TBMA</i> .....	59
Figura 11. <i>Curva de crecimiento de E. coli SHuffle® que expresa OMP2q en medio TBMA</i> .....	60
Figura 12. <i>Curva de crecimiento de E. coli SHuffle® que expresa INVASq en medio TBMA</i> ....	61
Figura 13. <i>Recuperación del antígeno OMP1q</i> .....	62
Figura 14. <i>Recuperación del antígeno OMP2q</i> .....	62
Figura 15. <i>Análisis de los lavados de OMP1q</i> .....	63
Figura 16. <i>Análisis de los lavados de OMP2q</i> .....	64
Figura 17. <i>Cuerpos de inclusión de OMP1q y OMP2q lavados</i> .....	65
Figura 18. <i>Cuantificación con BSA de OMP1q</i> .....	66
Figura 19. <i>Cuantificación con BSA de OMP2q</i> .....	68
Figura 20. <i>Lavado de OMP2q a temperatura ambiente (21 °C) con urea 8 M</i> .....	69
Figura 21. <i>Lavado de OMP2 a 37 °C con urea 8 M</i> .....	70
Figura 22. <i>Lavado de OMP2 a 45 °C con urea 8 M</i> .....	70

Figura 23. *Lavado de OMP2 a 60 °C con urea 8 M*.....71

Figura 24. *Lavado de OMP2 con urea 8 M y 20 mM de  $\beta$ -mercaptoetanol*.....72

### Abreviaturas

6xHis	Etiqueta de poli-histidina
ADN	Ácido desoxirribonucleico
ADNr	ADN ribosómico
AIP	Adenomatosis intestinal porcina
ARN	Ácido ribonucleico
BME	$\beta$ -mercaptoetanol
BSA	Albumina de suero bobino
CI	Cuerpos de inclusión
D	Factor de dilución
DsbC	Disulfuro isomerasa citoplasmática
ELISA	Ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas
ELISPOT	Ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas de puntos
EN	Enteritis necrótica
EP	Enteropatía proliferativa
EPH	Enteropatía proliferativa hemorrágica
EPP	Enteropatía proliferativa porcina
FAO	Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura
gor-	Glutación reductasa
GRAS	Sustancia generalmente reconocida como segura
IFA	Ensayo de inmunofluorescencia
IFAT	Anticuerpos fluorescentes indirectos
IFN- $\gamma$	Interferón gamma
IgA	Inmunoglobulina A

IgG	Inmunoglobulina G
IgM	Inmunoglobulina M
IHC	Inmunohistoquímica
INVAS	Invasina
INVASq	Invasina quimérica
IPTG	Isopropil- $\beta$ -D-1-tiogalactopiranosido
IR	Ileítis regional
LB	Medio Luria Bertani
LBA	Medio Luria Bertani con ampicilina
LPS	Liposacáridos
MHC	Complejo mayor de histocompatibilidad
OD	Densidad óptica
OMP1	Proteína de membrana externa 1
OMP1q	Proteína de membrana externa 1 quimérica
OMP2	Proteína de membrana externa 2
OMP2q	Proteína de membrana externa 2 quimérica
ORF	Marcos de lectura abierta
PBS	Buffer fosfato salino
PCR	Reacción en Cadena de la Polimerasa
SDS	Dodecilsulfato sódico
SDS-PAGE	Electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecilsulfato sódico
T7RNAP	ARN polimerasa del fago T7
TB	Medio Terrific Broth
TBM	Medio Terrific Broth modificado
TBMA	Medio Terrific Broth modificado con ampicilina



TBS	Buffer tris salino
TBST	Buffer tris salino con Tween
trxB-	Tiorredoxina reductasa
Y	Rendimiento

## Resumen

*Lawsonia intracellularis* es una bacteria intracelular obligada, causante de la enteropatía proliferativa porcina, que afecta las granjas de cerdos en todos los países. Esta enfermedad se caracteriza por la proliferación de células epiteliales en el intestino delgado de los cerdos, provocando problemas diarreicos intermitentes, aumento del índice de conversión alimentaria y disminución de las tasas de concepción. Las vacunas convencionales existentes son efectivas pero difíciles de obtener y escalar por las exigentes condiciones de cultivo bacteriano. Previamente, se desarrolló una subunidad candidata a vacuna recombinante contra *L. intracellularis* que utiliza tres antígenos quiméricos OMP1q, OMP2q e INVASq. En este estudio el plásmido con los tres antígenos se separó en tres plásmidos individuales. Con cada plásmido por separado se elaboró bancos celulares para evaluar la expresión de los antígenos quiméricos en cultivos alimentados a escala de 2 L. Las condiciones de cultivo produjeron cuerpos de inclusión, con rendimientos de aproximadamente 500 mg de antígeno por litro de cultivo. Además, se determinó que los cuerpos de inclusión obtenidos en cultivos celulares a 37 °C presentan propiedades físicas que los hacen resistentes a la solubilización. Con este estudio se da otro paso para el desarrollo de una vacuna recombinante contra *L. intracellularis*.

### Palabras clave:

- **ENTEROPATÍA PROLIFERATIVA PORCINA**
- **LAWSONIA INTRACELLULARIS**
- **CUERPOS DE INCLUSIÓN**
- **ANTÍGENOS RECOMBINANTES**

### Abstract

*Lawsonia intracellularis* is an obligately intracellular bacterium, cause of porcine proliferative enteropathy, which affects pig farms in all countries. This disease is characterized by the proliferation of epithelial cells in the small intestine of pigs, causing intermittent diarrheal problems, increased food conversion rate, and decreased conception rates. Existing conventional vaccines are effective but difficult to obtain and scale due to the demanding conditions of bacterial culture. Previously, a recombinant vaccine candidate subunit against *L. intracellularis* was developed using three chimeric antigens OMP1q, OMP2q and INVASq. In this study the plasmid with the three antigens was separated into three individual plasmids. With each plasmid separately, cell banks were prepared to evaluate the expression of chimeric antigens in a Fed-Batch system at a 2 L scale. The culture conditions produced inclusion bodies, with yields of approximately 500 mg of antigen per liter of culture. In addition, it was determined that the inclusion bodies obtained in cell cultures at 37 °C have physical properties that make them resistant to solubilization. This study takes another step towards the development of a recombinant vaccine against *L. intracellularis*.

#### Keywords:

- **PORCINE PROLIFERATIVE ENTEROPATHY**
- ***LAWSONIA INTRACELLULARIS***
- **INCLUSION BODIES**
- **RECOMBINANT ANTIGENS**

## Capítulo 1

### Introducción

#### Formulación del problema

La enteropatía proliferativa (EP) es una patología que ha sido reconocida durante varias décadas (Lawson & Gebhart, 2000). Sin embargo, el agente causante *Lawsonia intracellularis*, fue formalmente identificado en 1995 (McOrist, Gebhart, Boid, & Barns, 1995). La EP se caracteriza por la proliferación de las células epiteliales y engrosamiento de la pared del intestino delgado (Berardo et al., 2004) acompañado por lesiones causadas por la bacteria en el intestino, especialmente en el íleon (Peixoto, França, Ribeiro, Bezerra Jr, & Driemeier, 2008).

Reportes de la literatura informan que la bacteria *L. intracellularis* se encuentra distribuida por todo el mundo (Arnold et al., 2019; Hossain, Oh, & Cho, 2016; Resende et al., 2015) y que produce lesiones proliferativas de las células epiteliales intestinales en cerdos, hámsteres, ratones y caballos; siendo los cerdos los más susceptibles y en menor grado los hámsteres (Vannucci, Gebhart, & McOrist, 2019). Como consecuencia de la infección por *L. intracellularis* existen pérdidas económicas significativas en la industria porcina debido a los problemas diarreicos intermitentes, aumento del índice de conversión alimentaria (Kg de alimento/Kg de peso) hasta un 50 %, reducción del peso promedio de 17 % a 84 % y disminución de las tasas de concepción, en comparación con los cerdos no afectados (Montesino et al., 2019; Peixoto et al., 2008).

En Reino Unido las pérdidas económicas por la enteropatía proliferativa porcina (EPP) se estiman de \$3-11 dólares estadounidenses (USD) por cerdo. Mientras, en Estados Unidos se cree que llegan a \$20 millones de dólares anualmente (Jansen, 2018; Kroll, Roof, Hoffman, Dickson, & Hank Harris, 2005). En Sudamérica existen reportes con prevalencia de EPP mayor al 30 %, específicamente en países como Argentina (Pérez, 2016), Brasil (Peixoto et al., 2008; Resende et al., 2015), Chile (Alvarez C., 2002; Montesino et al., 2019), Colombia (Jiménez et

al., 2018), Perú (Espinoza Calle, Chavera Carrión, & Sandoval Chaupe, 2019) y Uruguay (García et al., 2017). En Ecuador no existen estudios sobre la prevalencia de la EPP; aunque, estudios indican la presencia de lesiones en el intestino de los cerdos de los camales, las cuales puede ser atribuida a infección por *L. intracellularis* (Eras Cardenas, 2016). Además, el país ha tenido una historia de importación de cerdos de países vecinos, siendo muy probable que la enfermedad se encuentre presente en las granjas de producción ecuatoriana (Ecuador Inmediato, 2018; Zumba, 2018).

Existen métodos directos e indirectos para el diagnóstico de la EPP (Berardo et al., 2004). Los métodos indirectos más utilizados son las técnicas de inmunofluorescencia indirecta e inmunoensayo de ELISA. No obstante, la enfermedad genera una baja respuesta de anticuerpos ante las pruebas serológicas (Berardo et al., 2004; Dittmar et al., 2003). En las técnicas directas se encuentra el análisis inmunohistoquímico (inmunoperoxidasa con anticuerpos monoclonales específicos), coloraciones histoquímicas (tinción Warthin-Starry) y la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) (Berardo et al., 2004; Cooper, Swanson, & Gebhart, 1997; McOrist, Gebhart, & Lawson, 1994). Cada una de estas pruebas nos proporciona información útil de la enfermedad. Las pruebas serológicas nos brindan información sobre la exposición a *L. intracellularis*, la histología nos puede demostrar la presencia de *L. intracellularis* o lesiones macro y microscópicas en el epitelio intestinal relacionadas con la enfermedad y la PCR fecal nos confirma la presencia del patógeno en heces (Berardo et al., 2004; Guedes et al., 2002).

Antibióticos como la tiamulina, tilosina, clortetraciclina y olaquinox se utilizan para controlar la EPP, reduciendo los signos clínicos, las lesiones histológicas y la diarrea de los cerdos (Collins, 2013). Las dosis altas de estos medicamentos pueden prevenir la infección de *L. intracellularis* si se administran de forma continua en la alimentación (Collins, 2013; McOrist, Morgan, Veenhuizen, Lawrence, & Kroger, 1997). Sin embargo, una vez que se detiene la

administración de los antibióticos, los cerdos se vuelven susceptibles a la infección por *L. intracellularis*. Además, el uso continuo de antibióticos puede provocar que otras bacterias desarrollen resistencia (Collins, 2013; McOrist et al., 1996). Así mismo, se conoce que medicamentos como el olaquinox son genotóxicos, es decir, que pueden causar daño al material genético (Ihsan et al., 2013). Lo anterior ha condicionado la necesidad de realizar análisis de los suelos donde se administran los medicamentos, ya que podría causar contaminación de acuíferos y por consiguiente afectar a las poblaciones contiguas (Rabølle & Spliid, 2000).

Las preocupaciones de contaminación y resistencia bacteriana han motivado el uso de vacunas para tratar la EPP (Karuppanan & Opriessnig, 2018; Shrivastava & Ramasamy, 2018). En la actualidad, las vacunas comerciales contra *L. intracellularis* se basan en la bacteria viva atenuada o inactivada (Karuppanan & Opriessnig, 2018). La vacuna viva atenuada (Enterisol® Ileitis), administrada por vía oral a través del agua de bebida o por alimento líquido, requiere la suspensión de antibióticos 3 días antes y después de la vacunación (Karuppanan & Opriessnig, 2018; Proyma Ganadera S. L., 2019). Mientras la vacuna inactivada (Porcilis® Ileitis) no interfiere con la administración de antibióticos y es administrada por vía intramuscular (Karuppanan & Opriessnig, 2018; Merck Animal Health USA, 2019).

### **Justificación del problema**

*Lawsonia intracellularis* es una bacteria Gram-negativa e intracelular obligada que infecta las células epiteliales del intestino (enterocitos) (García et al., 2017). Su desarrollo a nivel macroscópico se caracteriza por la proliferación de células epiteliales inmaduras y engrosamiento de la pared del intestino delgado (Berardo et al., 2004). Causante de la EP en caballos, ciervos, avestruces, macacos, ratones, hámsteres y cerdos. Siendo los cerdos

afectados los que más pérdidas económicas provocan (García et al., 2017; Karuppanan & Opriessnig, 2018; Riber et al., 2015).

La EPP se puede presentar en forma crónica, aguda o subclínica (Rubio Nistal & Carvajal, 2007). En todas las formas clínicas se observa una reducción de peso corporal y un aumento del índice de conversión alimenticia (Dittmar et al., 2003; Montesino et al., 2019; Rubio Nistal & Carvajal, 2007). Las manifestaciones más severas de la enfermedad pueden llegar a la muerte del animal (Vannucci et al., 2019).

En el mundo, la carne de mayor producción es el pescado, llegando a 190,9 millones de toneladas por año, seguido por la porcina con 110,4 millones (FAO, 2016). De acuerdo con la Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación (2016), la producción comercial de cerdos se ha intensificado significativamente en las últimas décadas (Lassaletta et al., 2019). Más cerdos de las mismas razas se mantienen en menos granjas. En consecuencia, la EP al ser una enfermedad que afecta el peso corporal de los cerdos, provoca pérdidas económicas a ganaderos de todo el mundo (FAO, 2016; Pérez, 2016).

La administración de antibióticos se ha utilizado con regularidad para el control de determinadas enfermedades (Friedman, Temkin, & Carmeli, 2016; Visscher et al., 2018). Jansen y colaboradores en el 2018, estimaron ganancias superiores \$86000 al utilizar antibióticos en granjas productivas. Sin embargo, se ha descrito las consecuencias negativas medioambientales que produce el uso reiterado de antibióticos (Friedman et al., 2016).

Las vacunas proporcionan otra manera de combatir enfermedades, al utilizar al patógeno como su compuesto activo (Kroll et al., 2005). El uso de vacunas es una alternativa viable, ya que puede proteger a los cerdos ante la infección al inducir una respuesta inmune humoral y celular (Collins, 2013; Montesino et al., 2019; Riber et al., 2015). En la actualidad, para combatir la EPP, se usa la vacuna basada en el patógeno viva atenuada Enterisol® Ileitis (Riber et al., 2015) y la inactivada Porcilis® Ileitis (Jacobs et al., 2019; Roerink et al., 2018). Sin

embargo, la producción de vacunas requiere de procesos altamente complejos y poseen un alto riesgo de producción, siendo necesario exigentes medias de seguridad (Jansen, Weersink, von Massow, & Poljak, 2019).

Las vacunas recombinantes son la nueva alternativa contra las enfermedades. A diferencia de las vacunas convencionales poseen una fabricación rápida, simple y segura. Además, no presentan riesgos para el personal ni el medio ambiente y se pueden coadministrar con antibióticos (Cox, 2012; Derakhshani et al., 2019; Nascimento & Leite, 2012). Por tal motivo, se propone el uso de vacunas recombinantes basadas en proteínas de la membrana externa (OMP1, OMP2) y de secreción (INVAS) de la bacteria *L. intracellularis* para combatir la EPP.

## **Objetivos de la investigación**

### ***Objetivo general***

Evaluar la expresión de antígenos quiméricos contra *Lawsonia intracellularis*, causante de la Enteropatía Proliferativa Porcina, en cultivo alimentado a escala de 2 L.

### ***Objetivo específico***

- Establecer los bancos primario y de trabajo de las células transformadas que expresan los antígenos quiméricos contra *Lawsonia intracellularis*.
- Obtener los antígenos quiméricos contra *Lawsonia intracellularis* a escala de fermentación de 2 L.
- Estandarizar las condiciones de solubilización de los antígenos quiméricos contra *Lawsonia intracellularis* dependiente de: temperatura, tiempo, concentración de urea y  $\beta$ -mercaptoetanol.



## Capítulo 2

### Marco Teórico

#### ***Lawsonia intracellularis***

*L. intracellularis* es una bacteria Gram-negativa, intracelular obligada, cuya propagación ocurre en las células epiteliales intestinales mediante un proceso de “parasitismo energético”, que le permite defenderse del estrés oxidativo celular y aprovechar las reservas de energía de la célula huésped (García et al., 2017). De igual manera requiere de una atmósfera microaerófila compuesta por un 82,2 % de nitrógeno, 8,8 % de dióxido de carbono y 8 % de oxígeno, a una temperatura de 37 °C, no posee fimbrias, ni esporas (McOrist et al., 1995). Estas exigencias para su crecimiento han limitado el cultivo acelular de la bacteria y por tanto pocos laboratorios tienen la tecnología para producir las vacunas basadas en el patógeno. Sus dimensiones son 1,25 a 1,75 µm de largo y 0,25 a 0,43 µm de ancho con aspecto de un bastón vibrioide, curvado o recto y de extremos agudos o romos. Posee un genoma circular y tres plásmidos sumando un total de 1,72 millones de pares de bases de ADN, dentro del cual se encuentra 1324 marcos de lectura abierta (ORF) (Vannucci et al., 2019).

La infección por esta bacteria produce, en el huésped, la proliferación de células epiteliales inmaduras y engrosamiento de la pared del intestino delgado (Berardo et al., 2004). No ha sido posible cultivar esta bacteria en un medio de cultivo acelular, posiblemente por su metabolismo dependiente de trifosfatos formados en las mitocondrias o fuentes similares dentro de las células (McOrist et al., 1995).

#### **Tabla 1**

*Clasificación taxonómica de L. intracellularis*

<b>Clasificación taxonómica</b>	
Reino	Bacteria
Filo	Proteobacteria

<b>Clasificación taxonómica</b>	
Clase	Deltaproteobacteria
Orden	Desulfovibrionales
Familia	Desulfovibrionaceae
Género	<i>Lawsonia</i>
Especie	<i>L. intracellularis</i>

*Nota.* McOrist et al. (1995).

### **Enteropatía proliferativa**

La EP es una enfermedad que afecta las células epiteliales del intestino delgado, en particular el íleon y, a veces, el ciego y el colon (Lawson & Gebhart, 2000). La mucosa afectada por la EP muestran un engrosamiento de la pared del intestino delgado debido a la proliferación de enterocitos inmaduros infectados por *L. intracellularis* (Obradovic & Wilson, 2020).

La forma de presentación de la enfermedad depende del nivel de infección y la respuesta individual del hospedero (Rubio Nistal & Carvajal, 2007). La EPP se presenta en forma crónica, aguda o subclínica (Knittel, 1997). La forma crónica de la enfermedad se presenta como adenomatosis intestinal porcina (AIP), enteritis necrótica (EN) e ileítis regional (IR); mientras la enteropatía proliferativa hemorrágica (EPH), corresponde a la forma clínica (García et al., 2017; Rubio Nistal & Carvajal, 2007).

### **Crónica**

La forma crónica de la enfermedad se manifiesta a partir de los 14 a 28 días post infección, dependiente de la dosis de ingesta oral de *L. intracellularis* y edad de los cerdos (Rubio Nistal & Carvajal, 2007). Los cerdos de 8 a 20 semanas de edad tienen una mayor frecuencia de manifestación de la enfermedad. Los animales enfermos muestran una reducción de peso de 5 a 30 % y un aumento de la tasa de conversión alimenticia de 5 a 33 % (Montesino et al., 2019). La mortalidad de esta forma clínica no supera el 5 %; no obstante, los síntomas se

pueden agravar por infecciones recurrentes de *Salmonella enterica*, *Brachyspira hyodysenteriae*, *B. pilosicoli*, *E. coli* o *Campylobacter* spp. (Dittmar et al., 2003; Rubio Nistal & Carvajal, 2007).

- **Adenomatosis intestinal porcina:** Es la forma de lesión más frecuente entre los lechones que atraviesan su fase de destete (Rubio Nistal & Carvajal, 2007). A nivel histológico se observa la hiperplasia de los enterocitos inmaduros de las criptas de Lieberkühn. Estas normalmente se encuentran cubiertas por una sola capa celular pero debido a esta enfermedad las criptas se cubren por varias capas celulares, lo que las vuelve alargadas y ramificadas (Rubio Nistal & Carvajal, 2007; Smith & Lawson, 2001).
- **Enteritis necrótica:** En esta forma clínica se observa una necrosis coagulativa, la cual se exhibe por la presencia de células inflamatorias, fibrina y en ciertos casos se puede observar tejido granular (Machuca et al., 2010; Rubio Nistal & Carvajal, 2007).
- **Ileítis regional:** Es caracterizada por el engrosamiento de las paredes intestinales mayores a 0,5 cm y úlceras en la mucosa que la recubre, lo que le confiere una consistencia dura (Collins, 2013; Rubio Nistal & Carvajal, 2007).

### **Aguda**

La forma aguda de la enteropatía proliferativa se presenta con menor frecuencia que la crónica; a pesar de ello, posee una mortalidad de aproximadamente 50 % y llegando a 70 % dependiendo del cuidado de los ganaderos (Rubio Nistal & Carvajal, 2007). No se conoce la causa de aparición de la forma aguda en lugar de la crónica, pero se cree que ocurre cuando cerdos adultos, que nunca han sido infectados por *L. intracellularis*, entran en contacto con una alta dosis del patógeno (Rubio Nistal & Carvajal, 2007; Vannucci et al., 2019).

- **Enteropatía proliferativa hemorrágica:** El principal signo clínico es la diarrea con sangre en las heces; al igual que en las demás formas clínicas el intestino se muestra engrosado, pero con hemorragia y edema subseroso (Rubio Nistal & Carvajal, 2007). En

algunos casos los cerdos que sobreviven la EPH quedan debilitados siendo necesario sacrificarlos (Karuppanan & Opriessnig, 2018).

### **Subclínica**

Esta forma clínica se encuentra en debate puesto que algunos autores como Rubio Nistal et al., (2007) indican que la EPP nunca ocurre de forma inaparente, ya que *L. intracellularis* siempre causa enfermedad. Sin embargo, autores como Peixoto et al., (2008) mencionan esta forma clínica debido a la ausencia de síntomas y porque en algunos casos solo es detectada mediante técnicas moleculares (Vannucci et al., 2019). La EPP subclínica es inaparente; pese aquello disminuye las tasas de preñez e incrementa el tiempo de los cerdos para llegar a faena por la reducción de peso, debido al aumento del índice de conversión de alimenticia (Montesino et al., 2019; Peixoto et al., 2008). Durante la necropsia de estos animales, solo se encontrarían lesiones leves en el intestino (Rubio Nistal & Carvajal, 2007).

### **Mecanismo de infección**

La especie más susceptible de ser infectado por *L. intracellularis* es el cerdo y el hámster (McOrist et al., 1994; Smith & Lawson, 2001). La existencia de *L. intracellularis* en lechones nos revela que la infección puede ocurrir previo al destete, por contaminación en el ambiente que viven o contacto con cerdos infectados u otras especies de animales como aves, roedores e insectos (Collins, 2013). La capacidad de las madres para proteger a sus crías contra la EP depende del nivel de anticuerpos que posee y de su transferencia (Pozo, Collins, Rubio, & Love, 2000). En un estudio de Pozo et al., (2000) se observa que lechones con tres semanas de edad que se amamantan de una cerda recientemente infectada con *L. intracellularis*, logran desarrollar inmunidad contra el patógeno. En contraste, los lechones que han sido destetados o amamantados de una cerda que no ha sido infectada, no logran obtener esta inmunidad (Collins, 2013).

En conclusión, la principal forma de infección es a través de la ingesta de heces contaminadas, siendo necesario el correcto cumplimiento de las condiciones sanitarias de las granjas. Así mismo, se ha identificado que la mezcla frecuente de cerdos o la introducción de cerdos de granjas donde haya prevalencia de la infección, son considerados factores de riesgo (Collins, 2013).

### **Colonización**

La motilidad es una herramienta fundamental para muchos patógenos y, en ciertas bacterias como *Salmonella* spp., *Bordetella* spp., *Vibrio cholerae*, *Helicobacter* spp., *Campylobacter jejuni*, *Legionella pneumophila*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Borrelia burgdorferi* y *Treponema* spp, es esencial para una patogenia completa (Chaban, Hughes, & Beeby, 2015). Aunque inicialmente se pensaba que el flagelo contribuía a la virulencia únicamente como un dispositivo de motilidad, investigaciones recientes han revelado que los flagelos desempeñan un papel central en muchos otros procesos de infección como adhesión, formación de biopelículas, secreción de moléculas efectoras y modulación del sistema inmunológico (Barrera-Zarate et al., 2019; Chaban et al., 2015).

La existencia de flagelos en *L. intracellularis*, demostró ser la forma en la que la bacteria atraviesa la mucosa y coloniza el tracto intestinal (Lawson & Gebhart, 2000). A pesar de esto, no se ha observado el flagelo en la bacteria cuando se encuentra en la superficie de la membrana plasmática ni de forma intracelular. Esto puede sugerir que el flagelo se encuentra regulado para ser perdido al finalizar el acoplamiento y no ser sintetizado hasta después de la liberación de las células huésped (Smith & Lawson, 2001).

### **Ingreso a la célula huésped**

La unión de la bacteria a receptores específicos de los enterocitos es fundamental para el ingreso a la célula (Vannucci et al., 2019). Esta unión está asociada con cambios morfológicos en la superficie celular. Las bacterias parecen ingresar individualmente

produciendo engrosamiento y rupturas del borde celular, además de pérdida de microvellosidades (Jasni, McOrist, & Lawson, 1994; Lawson & Gebhart, 2000; Smith & Lawson, 2001). Aunque los receptores no han sido caracterizados aún, la unión y la entrada parecen requerir una interacción específica entre la bacteria y la célula huésped (Barrera-Zarate et al., 2019; Smith & Lawson, 2001).

### ***Escape de las vacuolas intracelulares***

Durante la infección, *L. intracellularis* es observada viviendo libremente en el citoplasma celular (Lawson & Gebhart, 2000). En un estudio realizado por McOrist et al., (1995) en cultivo celular, se observó el escape de *L. intracellularis* de la vacuola unida a la membrana, el cual es facilitado por las toxinas líticas (citolisinas o hemolisinas) (Smith & Lawson, 2001). Otros microorganismos intracelulares realizan el mismo escape para evitar daños por los fagolisosomas, entre ellos están *Shigella*, *Listeria*, *Rickettsia* spp., y *Clostridium piliforme* (Gyles, Prescott, Songer, & Thoen, 2010; Smith & Lawson, 2001).

### ***Proliferación celular***

La proliferación celular en la EP solo afecta a las células infectadas por la bacteria. Por otro lado, solo las células proliferativas producen zonas celulares con hiperplasia en lugar del epitelio normal (McOrist et al., 1996). Jasni et al., (1994) propone en sus experimentos en hámsteres que las células de las criptas de Lieberkühn comienzan a dividirse a un ritmo de hasta cuatro veces mayor después de 2 días de la infección bacteriana. Este aumento de la mitosis incrementa la población de células hasta tres veces más de lo normal (Kroll et al., 2005), lo que crea columnas de células que forman prolongaciones dactiliformes o vellosidades que se proyectan hacia la luz intestinal (Roof, Kroll, & Gebhart, 2007). A pesar de la presencia constante de *L. intracellularis*, la estimulación de la división celular no persiste una vez que la lesión se desarrolla completamente (McOrist et al., 1996). La manifestación de la bacteria provoca la pérdida de proteínas y aminoácidos en la luz intestinal y la absorción reducida de

nutrientes por parte de la mucosa intestinal (Jasni et al., 1994). Probablemente esto sea la causa de la reducción del aumento de peso y la variación de la eficiencia de conversión alimenticia observada en cerdos afectados con lesiones de enteropatía proliferativa (Kroll et al., 2005; McOrist & Gebhart, 1999).

### **Respuesta inmune**

La respuesta inmune ante la infección de *L. intracellularis* aún se encuentra en investigación. Se cree que al ser un patógeno intracelular obligado, es crucial una respuesta inmunitaria celular para eliminar la bacteria y células infectadas (Roof et al., 2007).

### **Inmunidad humoral**

Estudios como el de Lawson et al., (2000) y Holyoake et al., (1994) emplearon preparados de tejido lesionado de la EP para extraer *L. intracellularis* y obtener, mediante ELISA, sus antígenos con la finalidad de medir la respuesta de anticuerpos séricos a la infección (Casadevall, 2018; Holyoake, Cutler, Caple, & Monckton, 1994). En el estudio de Lawson et al., (2000) se halló que en cerdos en crecimiento la respuesta inmunitaria estaba mediada predominantemente por inmunoglobulina M (IgM) de corta duración, esta respuesta fue relacionada con la enfermedad en lugar de la infección (Lawson & Gebhart, 2000). Por otro lado, Holyoake et al., (1994) determinó una débil respuesta anti-*Lawsonia* mediada por IgG tras 3 semanas de inocular los cerdos de experimentación. Knittel et al., (1997) en su ensayo empleó inmunofluorescencia para detectar y cuantificar la respuesta IgG en un cultivo de enterocitos de ratón infectados con *L. intracellularis*, determinando a los 14 días un inicio de respuesta inmunitaria y apenas a los 21 días una respuesta detectable en el 80 % de los animales expuestos. Con esto se concluyó que la detección serológica no tenía relación con el desarrollo de lesiones en los tejidos, por lo que los animales podían ser seropositivos sin necesidad de presentar lesiones macroscópicas (Casadevall, 2018; Knittel, 1997).

Referente a la inmunidad de mucosas, no se dispone de suficiente información, pero se ha detectado la acumulación de IgA en las células de la cripta de Lieberkühn y en los restos celulares de la luz intestinal de cerdos afectados por EP (Holyoake et al., 1994; Knittel, 1997). De esta forma, se plantea que IgA también está involucrada en una respuesta inmune protectora. Adicionalmente, se ha encontrado que las IgA presentes en las secreciones participan en el bloqueo de la interacción bacteria-célula huésped (Obradovic & Wilson, 2020; Roof et al., 2007). Como indica Roof et al., (2007), al momento no existen datos que avalen el empleo de la respuesta serológica como indicador de la respuesta inmunitaria o de la eficacia de una vacuna, por lo que se plantea aún como un tema a elucidar.

### ***Inmunidad celular***

La inmunidad celular no tiene una respuesta definida contra la EP (Smith & Lawson, 2001). Se ha observado que cerdos sacrificados en las primeras etapas de EP poseen una respuesta inflamatoria muy limitada (Guedes et al., 2017; Jasni et al., 1994). Vannucci et al., (2019) nos indica que, en varias evaluaciones inmunocitológicas de cortes intestinales de cerdos afectados con EP, la respuesta inmune celular inicial se constituye de una leve infiltración de células T citotóxicas y supresoras, macrófagos y linfocitos B que contienen motivos de MHC de clase II. Sin embargo, se determinó una correlación entre la presencia de *L. intracellularis* y la población reducida de células T y células B en los cerdos afectados, pues las células T tendían a disminuir a medida que aumentaba la infección por *L. intracellularis* (Macintyre, Smith, Shaw, Thomson, & Rhind, 2003). Esto sugiere la presencia de un mecanismo “inmunosupresor” en animales altamente infectados (Macintyre et al., 2003). Para el caso de animales afectados por la forma hemorrágica de la enfermedad, se ha observado que existe una mayor respuesta y presencia de células B (Macintyre et al., 2003; Smith & Lawson, 2001; Vannucci et al., 2019).



Conociendo que *L. intracellularis* es una bacteria intracelular estricta, es imprescindible que la respuesta celular sea mediada por el IFN- $\gamma$ . Esta citoquina de Th1 está a cargo de dirigir la respuesta inmune de la célula huésped cuando es atacada por patógenos intracelulares (Macintyre et al., 2003; Smith & Lawson, 2001). El rol del IFN- $\gamma$  ha sido estudiado en modelos de ratón expuestos a *L. intracellularis* demostrando que los ratones que tienen inactivados el receptor de IFN- $\gamma$  tienden a ser más susceptibles y desarrollar mayor nivel de infección por *L. intracellularis* ante los ratones wild type (Smith & Lawson, 2001).

En otro estudio, Guedes & Gebhart (2003) analizaron el tiempo de inicio y de duración de respuesta celular al evaluar mediante ELISPOT la producción de IFN- $\gamma$  en cerdos expuestos a una vacuna comercial y en cerdos expuestos a una cepa patógena de *L. intracellularis*. A los 9 días de la vacunación y del desafío con la cepa patógena, se evidenció respuesta inmunitaria celular inicial. Luego de 28 días la respuesta fue detectable. Finalmente, en los 49 días se expresó en los niveles máximos para los dos grupos evaluados, siendo detectable hasta 13 semanas tras la exposición. Con los estudios mencionados, los investigadores han demostrado la importancia del IFN- $\gamma$  como parámetro de evaluación de la respuesta inmunitaria celular en el control de la infección por *L. intracellularis* (Guedes & Gebhart, 2003; Roof et al., 2007).

### ***Inmunidad materna***

En cerdos de engorde, la EP se presenta en las etapas avanzadas de su ciclo vital. Tal evento ha llevado a interpretar que la inmunidad materna en cerdos puede verse implicada en el control de las infecciones de *L. intracellularis* durante los periodos de lactancia (Roof et al., 2007). Varios autores han reportado la presencia de anticuerpos específicos frente a *L. intracellularis* en calostro de cerdas que daban de lactar (Kroll et al., 2005) y en lechones recién destetados (Holyoake et al., 1994). Kroll et al., (2005) reportó altos niveles de IgA e IgG y, en menor medida, de IgM en el calostro de cerdas hiperinmunizadas, indicando con ello la

transferencia pasiva de anticuerpos maternos anti-*Lawsonia* a los lechones durante sus primeros días de vida.

Tras el destete, empleando suero de lechones, se detectó la presencia de IgG en niveles bajos de titulación. A pesar de ello, fue registrado como la primera detección de anticuerpos adquiridos por la madre. Así mismo, obtuvo seropositividad de cerdas cuando sus lechones de 3 semanas de edad fueron expuestos a *L. intracellularis*, evidenciando inmunidad materna protectora (Holyoake et al., 1994). También se ha demostrado que, en la mayoría de los casos, el nivel de anticuerpos en el suero de los lechones después del destete se reduce precipitadamente (Holyoake et al., 1994; Kroll et al., 2005). A partir de esto, se avaló la existencia de una transferencia pasiva (Roof et al., 2007). Por otro lado, la duración efectiva de la protección brindada por la inmunidad materna para los cerdos no ha sido establecida, pues hay la posibilidad de que los lechones que adquirieron protección de anticuerpos maternos eliminen *L. intracellularis* en períodos de tiempo más corto a comparación de lechones nacidos con falta de inmunidad maternal (Guedes & Gebhart, 2003).

### **Diagnóstico**

Durante años, el diagnóstico de EPP era especulativo debido a que los síntomas clínicos, como la diarrea o el examen macroscópico y microscópico de los intestinos, eran la única forma de determinar si los cerdos se encontraban infectados con *L. intracellularis* (Kroll et al., 2005). Con el avance de la tecnología, se han obtenido nuevos métodos de diagnóstico más sensibles y específicos (Roof et al., 2007). De esta manera, los productores pueden determinar con mayor precisión la prevalencia de la enfermedad en sus granjas e implementar las medidas de control y prevención necesarias (Kroll et al., 2005; Roof et al., 2007).

### **Histopatología e inmunohistoquímica**

Mediante esta técnica se puede confirmar la EP (Lawson & Gebhart, 2000). Al utilizar la tinción con hematoxilina y eosina en las secciones de tejido con EP severa, se puede observar

la proliferación de los enterocitos de los intestinos (Kroll et al., 2005; Lawson & Gebhart, 2000). Otros tipos de tinciones, como la de plata de Warthin Starry, permiten la detección de bacterias intracelulares con forma de bastón. A pesar de ello, esta técnica de tinción no es específica y tiene limitaciones cuando se aplica a muestras autolizadas o necróticas (Alvarez C., 2002; Kroll et al., 2005).

Los procedimientos de inmunohistoquímica (IHC) e inmunofluorescencia (IFA) permiten la detección específica de *L. intracellularis* en secciones de tejido afectadas con EP (Knittel, 1997). Asimismo, el uso de anticuerpos monoclonales específicos de *Lawsonia* permiten la identificación bacteriana en frotis fecales de casos que involucran altos niveles de desprendimiento activo de la bacteria (Guedes et al., 2002; Jasni et al., 1994).

### **Serología**

El primer diagnóstico serológico, para detectar anticuerpos IgM e IgA específicos de *Lawsonia* en cerdos, utilizó una prueba de anticuerpos fluorescentes indirectos (IFAT). Así se logró determinar que la IgM y, en menor medida, la IgA son los anticuerpos predominantes en las infecciones tempranas (aproximadamente 8 semanas) por *L. intracellularis* en cerdos (Lawson & Gebhart, 2000). Por otra parte, la primera detección de anticuerpos adquiridos por la madre fue expuesta por Holyoake et al., (1994). En esta prueba se empleó un ELISA utilizando células purificadas de tejido afectado por EPH como antígeno primario en el sistema de prueba. Mediante esta técnica se logró detectar IgG específica a *Lawsonia* en cerdos infectados a las 3 semanas de edad (Hassenin, Gebhart, & Goyal, 2017; Holyoake et al., 1994).

El método de diagnóstico deseado para detectar *L. intracellularis* en cerdos es el ELISA, por ser económico, fácil de usar, no requerir de mucha muestra, permitir la automatización del proceso de diagnóstico y poseer alta especificidad y sensibilidad (Collins, 2013; Dittmar et al., 2003; Knittel, 1997; Kroll et al., 2005). En la actualidad, se conoce de un ELISA desarrollado por Kroll et al., (2005) para detectar experimentalmente IgG anti-*Lawsonia* en cerdos que han sido

infectados previamente con *L. intracellularis*. En este sistema se utiliza un ELISA indirecto que requiere de un componente de lipopolisacárido (LPS) de un aislado cultivo puro de *L. intracellularis* como antígeno primario. Al comparar con el IFAT, el ELISA basado en LPS detectó significativamente ( $P < 0,05$ ) más cerdos anti-*Lawsonia* IgG positivos después de la vacunación. La sensibilidad (99,5 %) y la especificidad (100 %) de este ensayo fueron ligeramente más altas que las de la IFAT, lo que sugiere que este ensayo puede ser mejor para detectar el inicio temprano de la exposición de *L. intracellularis* en cerdos (Kroll et al., 2005).

### **PCR**

Esta técnica es altamente sensible y específica para el diagnóstico de patógenos (Vannucci et al., 2019). Ha sido utilizada con éxito para la detección de *L. intracellularis* en muestras de heces, mucosas (Draskovic et al., 2018; McOrist et al., 1994), íleon, ciego, colon, amígdala, hígado y ganglios linfáticos (Jensen & Svensmark, 2000). Los cebadores se han diseñado para dirigirse a secuencias de ADN únicas y específicas basadas en 16S ADNr que se encuentran conservadas entre todos los organismos de *L. intracellularis* (Cooper et al., 1997; McOrist et al., 1995). La PCR presenta una desventaja, ya que solo se puede utilizar para identificar cerdos que presentan diarrea pero no puede detectar cerdos colonizados por *Lawsonia* que no la presenten (Lawson & Gebhart, 2000). El uso de otras técnicas, como la PCR en tiempo real, nos permitiría combatir las desventajas de la PCR convencional, además de eliminar la necesidad de visualizar los amplicones mediante electroforesis en gel. Asimismo, esta reduce el tiempo, trabajo y posibles problemas de contaminación cruzada (Kroll et al., 2005).

### **Control y medidas de prevención**

Medidas de control, como el uso de antimicrobianos contra *Lawsonia*, han sido implementadas en sistemas de producción, logrando una reducción de infecciones por *L. intracellularis* (Karuppanan & Opriessnig, 2018). Cambios en las dietas, uso de vacunas y

desinfectantes son alternativas prometedoras para reducir y eliminar *L. intracellularis* en cerdos sin el uso continuo de antimicrobianos (Roerink et al., 2018).

### **Dieta**

En estudios como el de Boesen (2004), se observa modificaciones en la dieta de los cerdos que ayudan a combatir *L. intracellularis*. Entre las modificaciones encontramos molido fino y granulado, molido grueso y no granulado, alimento líquido fermentado, adición de 1,8 % de ácido fórmico y adición de 2,4 % de ácido láctico. Concluyendo que la dieta líquida fermentada retrasa la excreción de *L. intracellularis* y que cerdos alimentados con una dieta suplementada con ácido láctico al 2,4 % muestran signos de lesiones patológicas limitadas al momento de examinar los tejidos luego de 4 semanas (Boesen et al., 2004; Opriessnig et al., 2019).

### **Desinfectantes**

Dado que *L. intracellularis* se transmite de cerdo a cerdo por las heces, reducir la contaminación cruzada entre grupos de cerdos ayudaría a disminuir los niveles de infección e incidencia de EP (Karuppanan & Opriessnig, 2018). El uso de desinfectantes puede ser implementado como medida de bioseguridad para evitar el transporte de heces contaminadas en botas, ropa y equipo sucios (Kroll et al., 2005). Existen diferentes tipos de desinfectantes disponibles en el mercado, como amonio cuaternario (Roccal-D Plus®, DC & R®, Synergize™), aldehído (DC & R®, Synergize™), agentes oxidantes (Virkon® S), biguaninde (solución de Nolvasan®), fenol (Tek -Trol®), yodo (cetridina), cloro, peroximonosulfato de potasio, compuestos de fosfato (Stalosan® F) y compuestos de sulfato (Karuppanan & Opriessnig, 2018).

### **Antibióticos**

La incapacidad de mantener a *L. intracellularis in vitro* ralentiza la obtención de pruebas de susceptibilidad antimicrobiana. No obstante, McOrist et al., (1995) proporciona una lista de

antibióticos, en la cual se encuentra los macrólidos (eritromicina y tilosina), tetraciclinas, pleuromulinas (tiamulina), penicilinas y fluoroquinolonas. Además, nos menciona los antibióticos que no tienen actividad contra *L. intracellularis*, como los aminoglucósidos y los aminociclitolos (neomicina, gentamicina y apramicina) (Kroll et al., 2005). Entre los más usados, por reducir los signos clínicos, las lesiones histológicas y la diarrea de los cerdos, encontramos la tiamulina, tilosina, clortetraciclina y olaquinox (Collins, 2013).

### **Vacunas**

Las vacunas pueden estar compuestas por una bacteria inactivada, avirulenta viva, subunidades u otros tipos (Hohman & Peters, 2019; Kroll et al., 2005). Son el principal factor en el control y prevención de *L. intracellularis*. Dentro de las vacunas conocidas tenemos la Enterisol® Ileítis y Porcilis® Ileítis. La vacuna viva atenuada se administra por vía oral a través del agua de bebida o por alimento líquido, requiriendo la suspensión de antibióticos 3 días antes y después de la vacunación (Karuppanan & Opriessnig, 2018; Kroll et al., 2005; Nogueira, Collins, Dunlop, & Emery, 2015; Proyma Ganadera S. L., 2019). En comparación, la vacuna inactivada no necesita la suspensión de antibióticos y es administrada por vía intramuscular (Cordes, Riber, Jensen, & Jungersen, 2012; Karuppanan & Opriessnig, 2018; Kroll et al., 2005; Merck Animal Health USA, 2019).

En la actualidad, se conoce que la bacteria de interés es un organismo monotípico, de cepa única, sin variación antigénica conocida. Estudios realizados por Cordes (2012) proponen que la inmunidad inducida por la vacuna viva atenuada de *L. intracellularis* es menos eficaz que la inmunidad conferida por una infección de la versión patógena debido a la rápida inducción de una respuesta de IFN $\gamma$ -T. Una respuesta similar ocurre con las IgG cuando la vacuna viva atenuada es administrada vía oral, intramuscular o intraperitoneal (Cordes et al., 2012; Karuppanan & Opriessnig, 2018). Sin embargo, la administración oral o intraperitoneal de la

vacuna viva atenuada induce una respuesta IgA significativamente mayor que la vía intramuscular de vacunación (Nogueira et al., 2015).

A manera de resumen la aplicación de vacunas convencionales (Enterisol Ileítis y Porcilis Ileítis) han contribuido al control de la infección. Sin embargo, poseen las desventajas características de estas vacunas, entre las que se encuentran la posible reversión de la virulencia, la imposibilidad de diferenciar animales vacunados de infectados, la poca representación de los antígenos dominantes para la inducción de la respuesta inmune, la necesidad de manipular directamente el patógeno y la lenta producción, asociada al sistema específico de crecimiento y amplificación del patógeno (Li, Yi, Yin, Zhang, & Liu, 2008; Thomas & Luxon, 2013). Además, existen pocos laboratorios en el mundo que cuentan con la tecnología adecuada para el cultivo de este patógeno, debido a la alta exigencia del proceso de cultivo del microorganismo (Lawson & Gebhart, 2000) (Tabla 2). Lo anterior ha motivado el desarrollo de vacunas de subunidades.

### ***Vacunas recombinantes***

Las vacunas recombinantes inducen una respuesta inmune contra el patógeno, utilizando uno o varios antígenos definidos (Jozala et al., 2016). La elaboración de una vacuna recombinante requiere de varios genes de diferentes agentes etiológicos, los cuales son clonados, expresados y purificados. Para la producción de vacunas basadas en la tecnología del ADN recombinante se utilizan diferentes sistemas de expresión, como bacterias, levaduras, células de mamíferos y células de insectos. Sin embargo, se debe tener en cuenta los factores que interfieren en la eficacia de la producción de antígenos recombinantes (Rosano, Morales, & Ceccarelli, 2019). Los factores que deben tenerse en cuenta son: nivel de expresión con cada vector de expresión, promotores específicos, marcadores de selección y la presencia o ausencia de modificación postraduccional por el vector recombinante (Nascimento & Leite, 2012).

En el caso de bacterias intracelulares, como *L. intracellularis*, es necesario diseñar vacunas que produzcan el tipo adecuado de respuesta inmunitaria. Para esto, se debe estudiar en detalle los antígenos altamente conservados involucrados en la patogénesis y los mecanismos inmunitarios (Nascimento & Leite, 2012). Se conoce que *L. intracellularis* posee dos proteínas de membrana externa (OMP1, OMP2) y una proteína de secreción (INVAS) que actúan como detonantes de una respuesta inmune y que son posibles candidatos para la creación de una vacuna recombinante (Montesino et al., 2019).

Resumiendo podemos destacar algunas ventajas de las vacunas recombinantes respecto a las vacunas convencionales, tales como: i) fabricación rápida, simple, segura y costo factible; ii) no presenta riesgos para el personal y el medio ambiente porque no se trabaja directamente con el patógeno; iii) se potencia la respuesta inmune específica contra los antígenos deseados; iv) no se induce respuesta inmune contra antígenos no deseados; v) se pueden diferenciar animales vacunados de infectados; vi) se pueden coadministrar con antibióticos, evitando infecciones mientras se induce la respuesta inmune, entre otras (Cox, 2012; Derakhshani et al., 2019; Narayanan et al., 2020; Nascimento & Leite, 2012).

## Tabla 2

*Características de las vacunas vivas atenuadas, inactivadas y recombinantes para el control de la enteropatía proliferativa porcina*

<b>Características</b>	<b>Enterisol ileítis (Boehringer Ingelheim)</b>	<b>Porcilis ileítis (Intervet Merck)</b>	<b>Vacuna recombinante, Propuesta UdeC</b>
<b>Ingrediente Farmacéutico Activo</b>	Bacteria Atenuada	Bacteria Inactivada	Antígenos sintéticos multiepítopes
<b>Riesgo de reversión de virulencia</b>	Posible	Ninguno	Ninguno
<b>Ventana libre de antibióticos</b>	Requiere 5 días antes y 5 después de la inmunización	No requiere	No requiere



Características	Enterisol ileítis (Boehringer Ingelheim)	Porcilis ileítis (Intervet Merck)	Vacuna recombinante, Propuesta UdeC
Duración de la inmunidad	13 semanas posteriores a la inmunización	20 semanas posteriores a la inmunización	Mantenida hasta el último día del ensayo (60 días)
Riesgos en la producción	Alto riesgo, requiere medidas de seguridad		No presenta riesgo, GRAS*
Complejidad del proceso productivo	Altamente complejo		Proceso sencillo, con técnicas tradicionales de producción de proteínas recombinantes
Transferencia de la tecnología	Compleja		Factible
Generación de anticuerpos	Los animales producen anticuerpos no esenciales para su defensa ante la infección, estimulados por la presencia de toda la bacteria en la formulación vacunal		Producción de anticuerpos específicos

*Nota.* \*Generally Regarded as Safe - Sustancia generalmente reconocida como segura.

### ***Escherichia coli***

La bacteria *E. coli* es uno de los organismos más utilizados para la producción de proteínas recombinantes debido a su crecimiento rápido, fácil manipulación y bajo costo de producción (Fathi-Roudsari, Akhavian-Tehrani, & Maghsoudi, 2016; Rosano et al., 2019). En la actualidad, cerca del 30 % de las proteínas terapéuticas aprobadas son expresadas en *E. coli* (Baeshen et al., 2015). Entre las variedades de *E. coli* más utilizadas se encuentra las líneas celulares B y K, de las cuales surgieron las cepas BL21 y K-12, respectivamente (Rosano et al., 2019).

La principal característica de la cepa K-12 es que carecen de todos los genes de virulencia conocidos de *E. coli*, lo que las convierte en prototipos de cepas bacterianas seguras y no patógenas (Rosano et al., 2019; Son, Phue, Trinh, Lee, & Shiloach, 2011). Mientras que la cepa BL21 es deficiente de la proteasa Lon, OmpT y de la mutación hsdSB, lo que facilita que las proteínas expresadas se mantengan intactas y así evitar la pérdida de plásmidos (Yoon, Jeong, Kwon, & Kim, 2009). En comparación con K-12, *E. coli* BL21 produce menor cantidad de

acetato al utilizar glucosa como única fuente de carbono y tienen un menor tiempo de duplicación de aproximadamente 20 minutos (Rosano et al., 2019; Yoon et al., 2009).

Además de las características mencionadas, las cepas BL21 y K-12 poseen la versión DE3 (Kim, Kim, & Yoon, 2018; Rosano et al., 2019). Las cuales llevan una copia de la ARN polimerasa del fago T7 (T7RNAP) bajo el control del promotor lacUV5 (Son et al., 2011). Los genes de interés se clonan bajo el promotor T7 en el plásmido de expresión y la producción de proteínas comienza tras la adición del inductor isopropil  $\beta$ -D1-tiogalactopiranosido (IPTG). Este sistema proporciona al usuario un control total de la inducción para la expresión de proteínas (Chhetri, Kalita, & Tripathi, 2015; Rosano et al., 2019).

En algunas proteínas se requiere de un entorno citoplasmático oxidativo para mejorar su solubilidad por el contenido de enlaces disulfuro (Jalomo-Khayrova et al., 2018). Para solucionarlo, New England BioLab comercializa una *E. coli* BL21 (DE) modificada genéticamente llamada SHuffle® T7 Express (SHuffle®). Esta cepa tiene deleciones de glutatión reductasa (gor-) y tiorredoxina reductasa (trxB-) que proporcionan el ambiente oxidativo en el citoplasma (Seras-Franzoso et al., 2012). Además, sobre expresa la disulfuro isomerasa citoplasmática (DsbC), lo que conduce a menor cantidad de cuerpos de inclusión (Ahmadzadeh, Farshdari, Nematollahi, Behdani, & Mohit, 2020; Safarpour et al., 2017).

## Capítulo 3

### Metodología

Las proteínas recombinantes requieren, para su producción, de un vector de expresión y sistema biológico diseñados específicamente para la proteína que se requiere expresar. En este estudio, el vector de expresión fue un plásmido, diseñado y proporcionado por la Universidad de Concepción, que contenía tres proteínas de *L. intracellularis*. Individualmente para las tres proteínas, la primera etapa del estudio consistió en el chequeo y elaboración de los bancos primarios y de trabajo en el sistema biológico de *E. coli*. En la segunda etapa se realizó la expresión de las proteínas y recuperación de la biomasa celular. Por último, en la tercera etapa se efectuó la ruptura celular, lavados y solubilización de los cuerpos de inclusión.

#### **Confección del banco primario y de trabajo de *E. coli* SHuffle® que expresa los antígenos de *L. intracellularis***

La construcción del banco primario y de trabajo fue elaborado para contar con cepas de *E. coli* SHuffle® T7 Express (New England Biolabs, Reino Unido) que expresen individualmente las proteínas OMP1q, OMP2q e INVASq, los cuales poseen una secuencia de reconocimiento de linfocitos T para potenciar la respuesta inmunogénica celular y la etiqueta de poli-histidina (6xHis) para facilitar la purificación (Montesino et al., 2019). El plásmido que contiene los tres casetes de expresión y los controles fueron proporcionados por el Laboratorio de Fisiopatología de la Universidad de Concepción, Chile (Figura 1).



ampicilina, a una concentración final de 100 µg/mL (LBA) (USBiological, EE. UU), y se incubó a 37 °C durante 15 horas (Hori et al., 2019; Tripathi, 2016). Las colonias obtenidas de cada transformación se inocularon en matraces de 500 mL con 50 mL de medio de cultivo LBA. Los matraces se incubaron a 37 °C en agitación constante de 150 rpm (revoluciones por minuto) hasta llegar a una densidad óptica (OD) de 0,6 medida a una longitud de onda ( $\lambda$ ) de 600 nm en un espectrofotómetro (UV-2505, Labomed, Inc., EE. UU). La inducción de los antígenos (OMP1q, OMP2q e INVASq) se realizó mediante la adición de 0,75 mM, concentración final, de IPTG. El cultivo se mantuvo durante 4 horas en las mismas condiciones de crecimiento. Finalmente, se recuperaron los antígenos y se comprobó su expresión mediante gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) y Western blot (Figura 2) (Jashandeep, Arbind, & Jagdeep, 2018; Salazar, Montesino, & Ramos, 2020).

### ***Elaboración del banco primario y de trabajo***

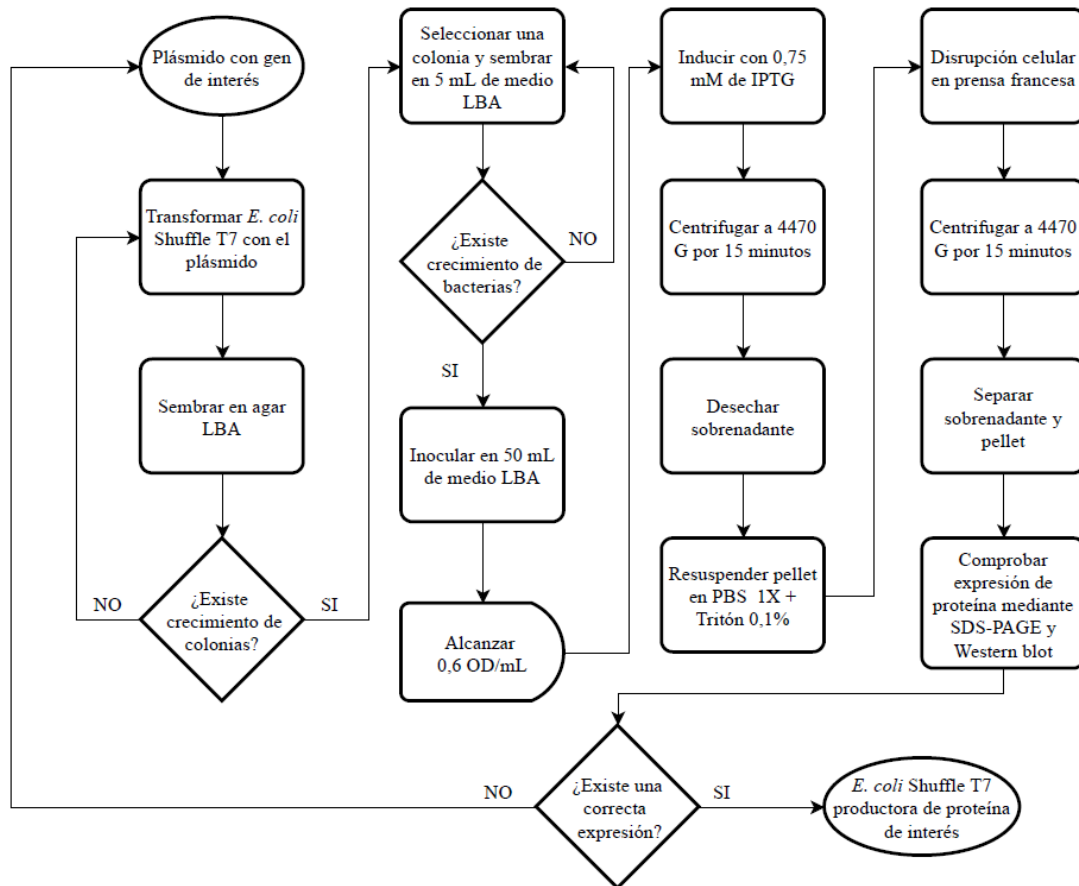
El cultivo fue centrifugado a 1500 G por 10 minutos y las células se resuspendieron en 20 mL de glicerol al 60 %. Se hicieron alícuotas de 1 mL/vial en crioviales (Winkler, Chile) y se conservaron a -80 °C. A partir de tres viales se realizó el chequeo de viabilidad del banco, expresada en UFC/mL, realizando diluciones seriadas y contando las células (Figura 3).

### ***Preparación de los controles***

El control positivo corresponde a colonias de E. coli SHuffle®, transformadas con el plásmido (Figura 1) para la producción de las proteínas OMP1q, OMP2q e INVASq. Mientras, el control negativo fueron colonias de E. coli SHuffle® sin transformar. Los controles fueron obtenidos bajo las mismas condiciones de crecimiento que las proteínas de interés (Salazar et al., 2020).

Figura 2

Diagrama de flujo para el chequeo de la producción de los antígenos en *E. coli* SHuffle® transformada con los vectores para la expresión de los genes de interés

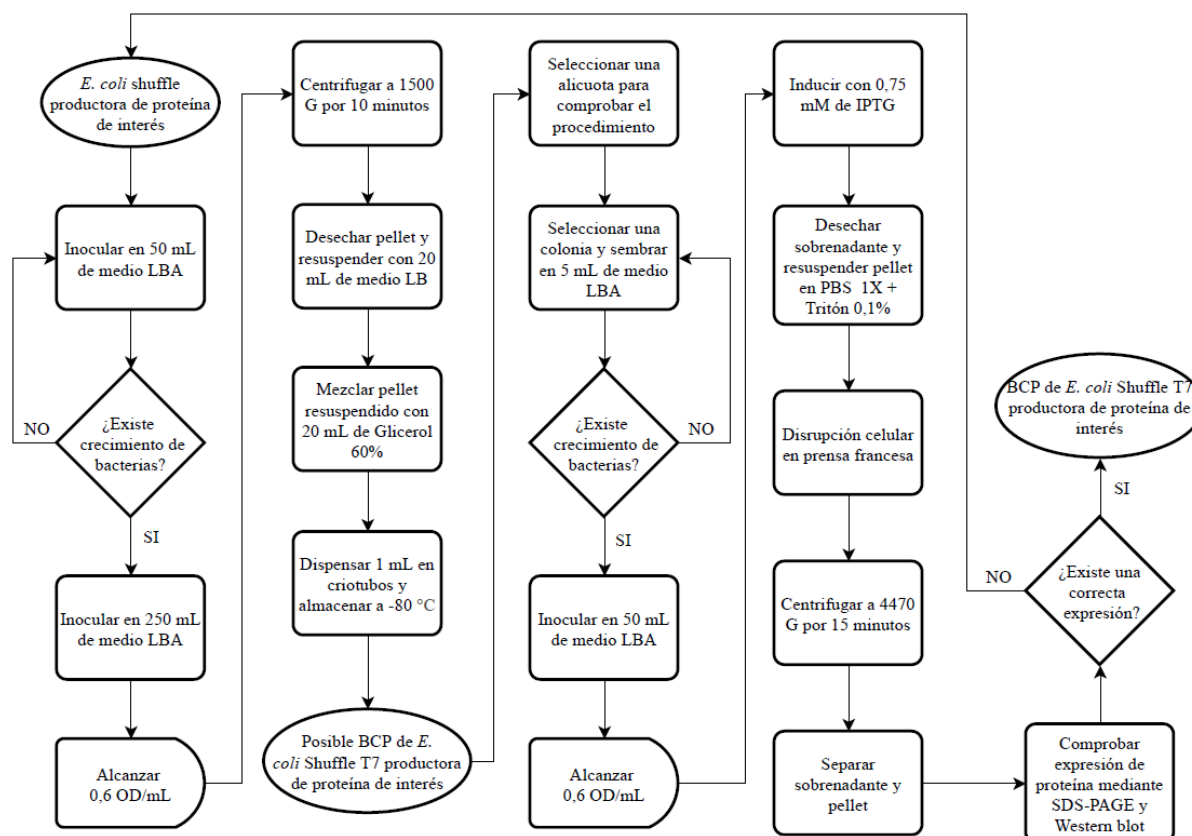


Nota. LBA: Medio LB con Ampicilina 1X. OD: Unidad de densidad óptica a 600 nm. G: Fuerza

G.

Figura 3

Diagrama de flujo para la elaboración del banco celular primario de *E. coli* SHuffle® productora de proteínas de interés



Nota. LBA: Medio LB con Ampicilina 1X. OD: Unidad de densidad óptica a 600 nm. G: Fuerza G. BCP: Banco celular primario.

### Preparación del medio de cultivo Terrific Broth para la fermentación

El medio de cultivo Terrific Broth (TB) se preparó según lo publicado por Tartoff et al., (1987) con la variación de la fuente de carbono, utilizando glucosa en lugar de glicerol, TB modificado (TBM). El medio TBM contenía 40 g de glucosa (Sigma, EE. UU), 24 g de triptona (Becton Dickinson, EE. UU) y 48 g de extracto de levadura (Becton Dickinson, EE. UU). Todos los compuestos se disolvieron en un volumen final de 1,6 L de agua destilada y se vertieron en

un fermentador de 5 L de volumen efectivo (Winpact FS-06, EE. UU). Las sales de fosfato, utilizadas como tampones para regular cambios de pH, se prepararon a una concentración de 10 X disolviendo 4,62 g de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  (Merk, Alemania) y 25,08 g de  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  (Merk, Alemania) aforado con agua destilada a 200 mL. El medio TBM y las sales fueron esterilizadas a 121 °C por 15 minutos. Luego, el fermentador fue armado y se agregó los 200 mL de sales y 2 mL de ampicilina (volumen final de 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , TBMA). Finalmente, el inóculo se añadió para comenzar la fermentación (Oliveira & Domingues, 2018; Tartoff & Hobbs, 1987).

### **Preparación del inóculo del cultivo en fermentador**

Los procesos descritos a continuación fueron realizados para cada uno de los antígenos estudiados OMP1q, OMP2q e INVASq. El preinóculo del fermentador se realizó a partir de una alícuota del banco de trabajo. Se inoculó, por duplicado, 100  $\mu\text{L}$  del banco de trabajo de *E. coli* SHuffle® (New England Biolabs, Reino Unido) en tubos de 50 mL con 10 mL de caldo LBA. Los tubos se incubaron a 37 °C a 150 rpm de agitación durante 10 horas (Montesino et al., 2019; Salazar et al., 2020; Tripathi, 2016).

El inóculo del fermentador se preparó en dos matraces de 500 mL que contenían 100 mL de caldo LBA, los cuales se inocularon con 1 mL de preinóculo. Los matraces se incubaron a 37 °C en agitación constante de 150 rpm durante 10 horas (Salazar et al., 2020; Tripathi, 2016).

### **Fermentación a escala de 2 L**

200 mL del inóculo previamente preparado se añadieron en el fermentador de 2 L de volumen final de cultivo con medio TBMA (ver epígrafe 3.2) y se estableció como condiciones iniciales la temperatura a 37 °C, agitación a 200 rpm y pH 7,0. Durante todo el proceso de fermentación se monitoreó las condiciones de crecimiento. La temperatura fue fijada por el intercambiador de calor del equipo, el pH se reguló mediante adición de  $\text{NH}_3\text{OH}$  al 30 % (v/v) y  $\text{H}_3\text{PO}_4$  al 20 % (v/v) y el oxígeno disuelto se controló con variaciones de la agitación para



mantenerlo sobre el 20 %. Muestras del cultivo fueron tomadas cada hora para evaluar el crecimiento celular y la expresión de los antígenos de interés (Oliveira & Domingues, 2018; Salazar et al., 2020; Tripathi, 2016).

A las 6 horas de fermentación se adicionó 300 mL de un suplemento que contiene glicerol al 2 % y extracto de levadura 1,38 % como concentración final. El suplemento, que constituye nueva fuente de carbono para las bacterias, fue adicionado a un flujo constante de 60 mL/min. Finalmente, se realizó la inducción cuando la biomasa alcanzó una concentración entre 5-11 g/L, adicionando IPTG a una concentración final de 0,75 mM. El cultivo se mantuvo por 4 horas (Chhetri et al., 2015; Montesino et al., 2019; Salazar et al., 2020).

### **Recuperación de la biomasa celular**

La biomasa celular se centrifugó a 4470 G por 15 minutos a 4 °C, para luego ser resuspendida en buffer de ruptura que contiene PBS 1 X (Buffer fosfato salino) y Tritón X-100 al 0,1 %. La suspensión celular fue lisada mediante disrupción mecánica en prensa francesa (Avestin, Canadá). El sobrenadante y el pellet de ruptura fueron separados mediante centrifugación a 15000 G por 30 minutos. La expresión fue analizada mediante SDS-PAGE y Western blot (Jashandeep et al., 2018; Salazar et al., 2020; Tripathi, 2016).

### **Ruptura en prensa francesa**

La biomasa celular disuelta en buffer de ruptura, a una concentración de 20 g/L se rompió en prensa francesa (Avestin, Canadá). La suspensión se recirculó 6 veces por la prensa francesa a una presión de 12000 psi. Posteriormente, el equipo se lavó con el mismo volumen de buffer de ruptura para obtener una solución a 10 g/L. La crema rota se centrifugó a 15000 G por 30 minutos y se separó el sobrenadante del pellet. El sobrenadante se recolectó y guardó a -20 °C. Mientras, el pellet se resuspendió en el mismo volumen (concentración final de 10 g/L) con PBS 1 X a pH 7,4 (Salazar et al., 2020; Tripathi, 2016).

### **Lavado de los antígenos**

Los antígenos fueron semipurificados como cuerpos de inclusión siguiendo el procedimiento descrito por Promdonkoy, Warit, y Panyim (2004). Para lo cual, la solución final obtenida de la lisis celular se centrifugó a 15000 G por 30 minutos. El precipitado fue lavado dos veces durante 30 minutos en agitación (300 rpm) con NaCl 1 M y Tritón X-100 al 1 % y dos veces con PBS 1 X. Después de cada lavado se separó el pellet mediante centrifugación a 15000 G por 30 minutos. Finalmente, los cuerpos de inclusión se resuspendieron en buffer PBS 1 X a pH 7,4 y se almacenaron a -20 °C (Esmaili, Mohammad Sadeghi, & Akbari, 2018; Oliveira & Domingues, 2018).

### **Determinación de concentración**

La concentración de los antígenos se determinó luego de aplicar las muestras en SDS-PAGE utilizando como patrón externo cantidades conocidas de albúmina de suero bovino (por sus siglas en inglés, BSA) (0,125; 0,25; 0,5; y 1 mg/mL). En el mismo gel se aplicó 20 y 10 µL de la suspensión de los antígenos. A partir del análisis de intensidad de banda en el software AzureSpot 2.0 (Azure Biosystems, EE. UU) se obtuvo la ecuación de la recta necesaria para el cálculo de la concentración de cada antígeno (Salazar et al., 2020).

### **Solubilización de los cuerpos de inclusión**

Se utilizó 20 mL de los antígenos disueltos en buffer PBS 1 X, pH 7,4. La solución fue centrifugada a 15000 G por 30 minutos. El pellet se resuspendió en 20 mL de urea 8 M, en buffer fosfato 100 mM a pH 7,0. La incubación se efectuó a diferentes temperaturas por diferentes periodos de tiempo con agitación constante de 300 rpm. Posteriormente, se centrifugó a 15000 G por 30 minutos y mediante SDS-PAGE y Western blot se analizó el sobrenadante y pellet de cada ensayo (Esmaili et al., 2018; Tripathi, 2016).

**Tabla 3***Condiciones de solubilización utilizadas*

Solvente	Temperatura		Tiempo		
		90 °C	30 min	60 min	90 min
Urea 8 M	21 °C	60 min			
	37 °C	1 h	2 h	3 h	
	45 °C	1 h	2 h	3 h	
	60 °C	1 h	2 h	3 h	
	60 °C	1 h	2 h		
Urea 8 M + BME 20 mM	75 °C	1 h	2 h		
	90 °C	1 h	2 h		

**SDS-PAGE y Western blot**

Los geles de poliacrilamida se prepararon a 12,5 % y 1,5 mm de espesor según el procedimiento descrito por Laemmli (1970). El buffer de corrida se preparó con agentes desnaturalizantes mediante la adición de 1 g de SDS, 14,4 g de glicina y 3 g de Tris-base, aforado en 1 L de agua destilada. La electroforesis se corrió a 90 V durante 3 horas. Las bandas de proteínas se visualizaron incubando el gel en una solución de tinción, que contiene 2,5 g/L de azul brillante Coomassie R-250, 45 % de metanol y 10 % de ácido acético glacial, durante 1 hora. Luego el gel se destiñó con solución de distinción (20 % metanol, 10 % ácido acético glacial).

Una vez separadas las muestras en SDS-PAGE las proteínas se transfirieron, a una membrana de nitrocelulosa BA-85 (Schleicher & Schuell, Alemania) en un equipo de transferencia semihúmedo (TransBlot-Turbo, BioRad, EE. UU). La transferencia se realizó a 0,3 A y 25 V durante 30 minutos. La membrana se bloqueó con leche descremada al 5 % en TBS 1 X (Tris buffer salino) durante toda la noche a 4 °C y agitación constante. Como primer anticuerpo se usó anti-histidina en ratón (6x monoclonal antibody, Clontech Laboratories, EE. UU) diluido 1:5000 en leche descremada al 5 % en TBS 1 X durante 2 horas a temperatura ambiente y agitación constante. Se realizaron tres lavados, de 10 minutos cada uno, con el

buffer de lavado que contiene TBS 1 X con Tween 20 al 0,1 % (TBST). Posteriormente, la membrana se incubó con el anticuerpo anti-ratón (Alexa Fluor 680, Jackson, EE. UU) diluido 1:10000 en leche descremada al 5 % y TBS 1 X durante 1 hora a temperatura ambiente con agitación constante. Finalmente se realizaron tres lavados con TBST de 10 minutos cada uno (Salazar et al., 2020; Tripathi, 2016).

Las bandas, del gel de poliacrilamida y la membrana de nitrocelulosa, se visualizaron utilizando el equipo de captura de imagen Odyssey System (LI-COR Biosciences, EE. UU).

## Capítulo 4

### Resultados

La producción de proteínas recombinantes requiere de la optimización de los procesos productivos para disminuir costos, tiempo y garantizar la calidad. Por lo tanto, la primera etapa del estudio se enfocó en obtener una fermentación efectiva, comprobando la expresión de los antígenos de los bancos celulares y monitoreando las condiciones de fermentación. Mientras, en la segunda etapa se optimizó la obtención de los antígenos mediante el análisis de su recuperación, rendimiento de la expresión, lavados y solubilización de los cuerpos de inclusión.

#### **Banco primario y de trabajo de los antígenos recombinantes de *L. intracellularis***

Los plásmidos que contienen los genes codificantes para los antígenos recombinantes OMP1q, OMP2q e INVASq fueron diseñados y construidos por el Laboratorio de Fisiopatología de la Universidad de Concepción. En la Figura 1 se observa el plásmido utilizado a partir del cual se extrajeron las secuencias de cada gen para ser expresadas independientemente. La metodología seguida para la expresión de cada antígeno se describe en la Figura 2. Las colonias obtenidas luego de la transformación de *E. coli* SHuffle® se sembraron en medio líquido y se analizó la expresión de los antígenos. Luego de la ruptura mecánica de la biomasa celular, el pellet de ruptura fue analizado en SDS-PAGE y Western blot para comprobar la expresión de los antígenos.

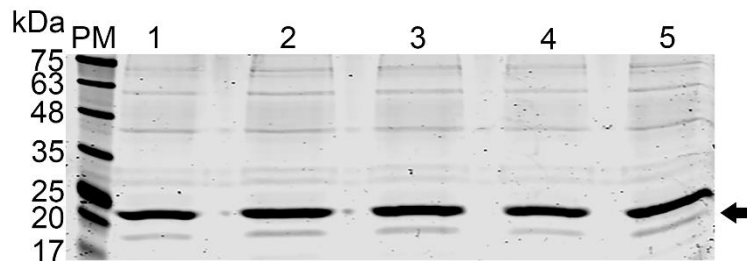
Una vez corroborada la expresión del antígeno se realizó un banco de trabajo que fue utilizado para los estudios posteriores. El banco de trabajo se realizó a partir de la colonia donde se obtuvo la mayor expresión de antígeno. Las Figura 4-Figura 6 muestran bandas a la altura de 25, 60 y 30 kDa, aproximadamente, correspondiente a la expresión de los antígenos INVASq, OMP2q y OMP1q, respectivamente.

La expresión de INVASq, luego de tinción con azul de Coomassie, fue similar en todas las colonias analizadas (Figura 4). Para la confección del banco se seleccionó la colonia 5.

Siguiendo el mismo análisis para OMP2q se seleccionó la colonia 4 (Figura 5), mientras para OMP1q fue seleccionada la colonia 1 (Figura 6).

#### Figura 4

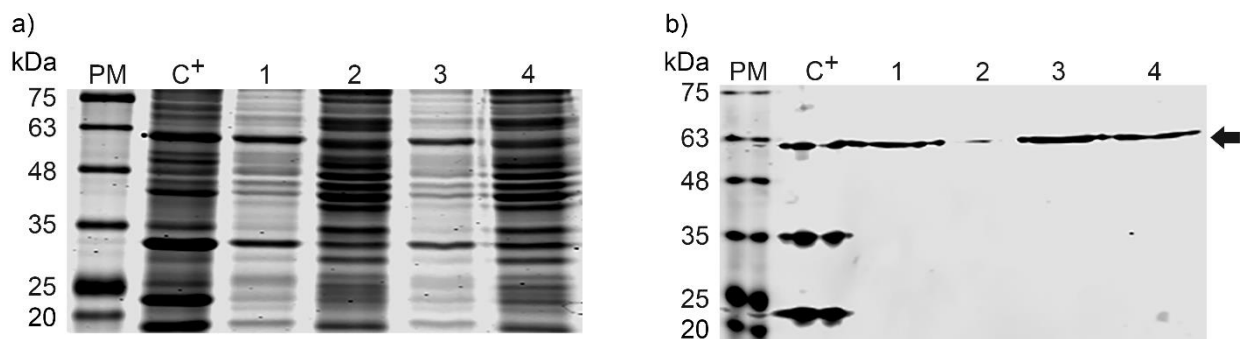
*Análisis de la expresión de INVASq mediante SDS-PAGE*



*Nota.* PM: Marcador de Peso; Colonias numeradas del 1-5.

#### Figura 5

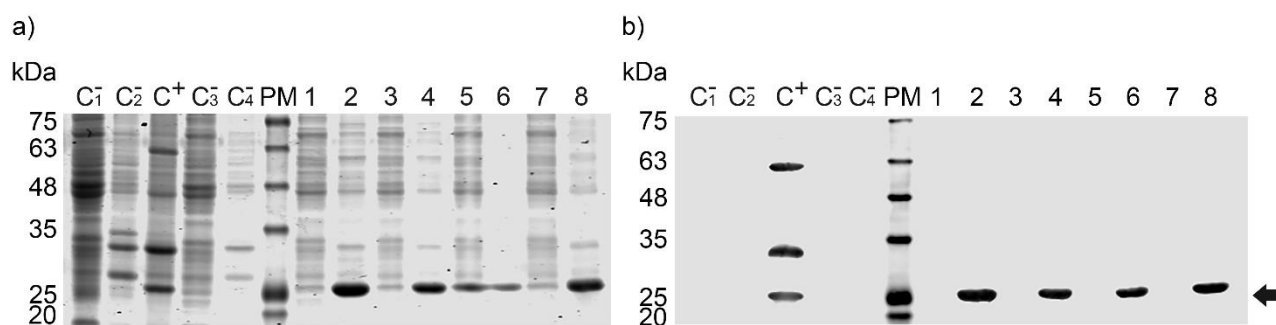
*Análisis de la expresión de OMP2q*



*Nota.* a) Separación en SDS-PAGE. b) Western blot. PM: Marcador de Peso; C<sup>+</sup>: Control positivo (bacteria transformada que expresa los tres antígenos); Colonias numeradas del 1-4.

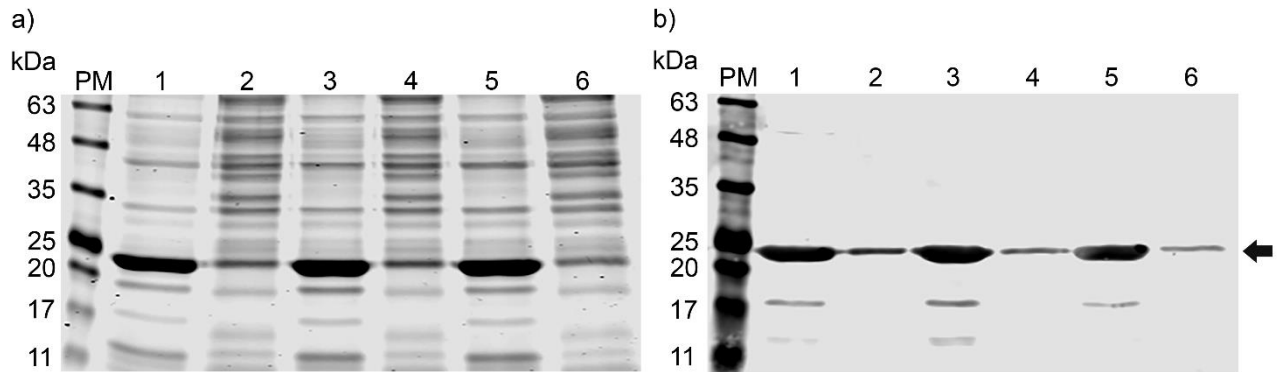
## Figura 6

### Análisis de la expresión de OMP1q

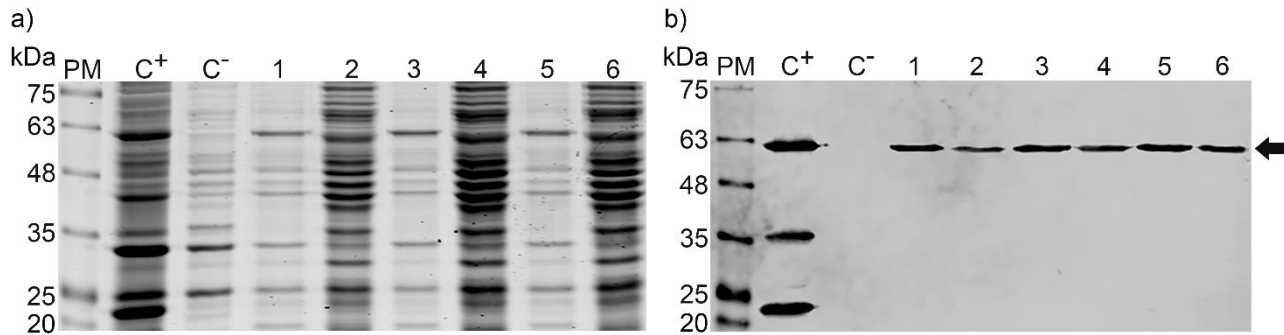


*Nota.* a) Separación en SDS-PAGE. b) Western blot. PM: Marcador de Peso; C<sup>-</sup>: Control negativo (bacteria sin transformar); C<sup>+</sup>: Control positivo (bacteria con expresión de los tres antígenos); Colonias numeradas del 1-8.

Con el objetivo de chequear los bancos primarios realizados se tomaron al azar tres alícuotas y se realizó el mismo procedimiento descrito anteriormente para comprobar la expresión de los antígenos (Figura 3). Los sobrenadantes y lisados celulares obtenidos luego de la ruptura celular se analizaron mediante separación en SDS-PAGE y western blot. Los resultados mostraron la presencia de bandas a las tallas moleculares esperadas 25, 60 y 30 kDa, que corresponden con los antígenos INVASq, OMP2q y OMP1q respectivamente (Figura 7-Figura 9). Los antígenos se encuentran mayoritariamente formando cuerpos de inclusión. Luego se conocer que los bancos expresaban correctamente los antígenos se dividió a la mitad, constituyendo una mitad el banco maestro o primario y la otra el banco de trabajo. Ambas cajas se identificaron adecuadamente y se guardaron a -80 °C en diferentes freezers.

**Figura 7***Chequeo del banco celular primario de INVASq*

*Nota.* a) Separación en SDS-PAGE. b) Western blot. PM: Marcador de Peso; 1: Pellet de ruptura 1; 2: Sobrenadante de ruptura 1; 3: Pellet de ruptura 2; 4: Sobrenadante de ruptura 2; 5: Pellet de ruptura 3; 6: Sobrenadante de ruptura 3.

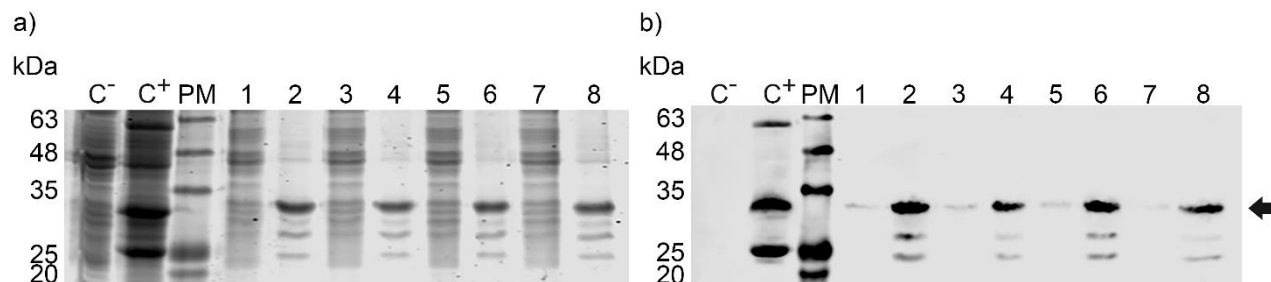
**Figura 8***Chequeo del banco celular primario de OMP2q*

*Nota.* a) Separación en SDS-PAGE. b) Western blot. PM: Marcador de Peso; C<sup>+</sup>: Control Positivo; C<sup>-</sup>: Control negativo; 1: Pellet de ruptura 1; 2: Sobrenadante de ruptura 1; 3: Pellet de ruptura 2; 4: Sobrenadante de ruptura 2; 5: Pellet de ruptura 3; 6: Sobrenadante de ruptura 3.



## Figura 9

### Chequeo del banco celular primario de OMP1q



*Nota.* a) Separación en SDS-PAGE. b) Western blot. PM: Marcador de Peso; C<sup>+</sup>: Control Positivo; C<sup>-</sup>: Control negativo; 1: Sobrenadante de ruptura 1; 2: Pellet de ruptura 1; 3: Sobrenadante de ruptura 2; 4: Pellet de ruptura 2; 5: Sobrenadante de ruptura 3; 6: Pellet de ruptura 3; 7: Sobrenadante de ruptura 4; 8: Pellet de ruptura 4.

### Expresión de los antígenos en fermentador

La expresión de los antígenos se realizó en fermentador a escala de 2 L siguiendo el procedimiento descrito previamente (epígrafe 3.4). Las condiciones establecidas en el laboratorio han mostrado rendimientos volumétricos en el orden de 600 mg/L para la expresión de los antígenos de *L. intracellularis* utilizando medio TBM en un cultivo a lote incrementado (Tesis de grado, Santiago Salazar, 2020). Estos rendimientos se alcanzaron en una cepa de *E. coli* que expresa los tres antígenos a partir de tres unidades trascipciones independientes. Ensayos realizados en el mismo trabajo 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). Esta información fue utilizada para el cálculo de la biomasa celular en los cultivos realizados en el presente trabajo. Mientras, la velocidad de crecimiento ( $\mu$ ) y el tiempo de duplicación ( $g$ ) se calcularon con las Ecuaciones 1 y 2 (Widdel, 2010).

$$\mu = \frac{\ln DO_2 - \ln DO_1}{t_2 - t_1} \quad (1)$$

$$g = \frac{\ln 2}{\mu} \quad (2)$$

El cultivo para la expresión de OMP1q comenzó en fase exponencial desde la inoculación. Esta fase se mantuvo por casi 6 horas donde se alcanzó una biomasa celular de 7,03 g/L (Tabla 4, Figura 10). Posterior a la alimentación (6-8 horas de cultivo) se obtuvo casi una duplicación de la biomasa alcanzando los 12,52 g/L. La obtención de cultivos de alta densidad es deseable para garantizar mayor expresión de las proteínas. A partir de las 8 horas, luego de la inducción con 0,75 mM de IPTG, se observó una disminución de la velocidad de crecimiento a 0,13 horas<sup>-1</sup>. A las 12 horas el cultivo alcanzó la fase estacionaria caracterizada por un tiempo de duplicación de 12,20 horas ( $\mu=0,02$  horas<sup>-1</sup>). Al final de la fermentación se obtuvo una concentración de biomasa de 20,07 g/L.

**Tabla 4**

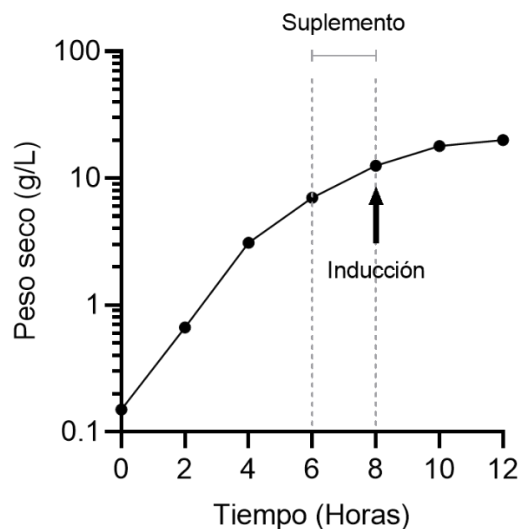
*Análisis de la fermentación de E. coli SHuffle® que expresa OMP1q*

Tiempo (horas)	Densidad óptica (600 nm)*	Peso seco (g/L)	$\mu$ (horas <sup>-1</sup> )	g (horas)
0	0,31	0,15	-	-
2	1,36	0,66	0,32	0,93
4	6,34	3,11	0,33	0,90
6	14,34	7,03	0,18	1,70
8	25,55	12,52	0,13	2,40
10	36,55	17,91	0,08	3,87
12	40,95	20,07	0,02	12,20

*Nota.* \*Es la media de dos determinaciones.

**Figura 10**

Curva de crecimiento de *E. coli* SHuffle® que expresa OMP1q en medio TBMA



Las condiciones de cultivos para la expresión de los antígenos OMP2q e INVASq fueron las mismas que las utilizadas para la expresión de OMP1q. La curva de crecimiento de la fermentación para la obtención de OMP2q mostró un comportamiento similar a OMP1q. El cultivo mantuvo una fase exponencial desde tiempo cero hasta las 6 horas donde alcanzó aproximadamente una biomasa de 6,28 g/L. Sin embargo, a partir de la inducción se observó una disminución de la biomasa a las 10 horas en comparación con OMP1q (12,96 g/L) que se mantuvo hasta finalizar la fermentación. A las 12 horas la velocidad de crecimiento ( $-0,02 \text{ horas}^{-1}$ ) y el tiempo de duplicación ( $-19,67 \text{ horas}$ ) indicaba que el cultivo comenzaba una etapa de muerte celular (Tabla 5, Figura 11).

**Tabla 5**

Análisis de la fermentación de *E. coli* SHuffle® que expresa OMP2q

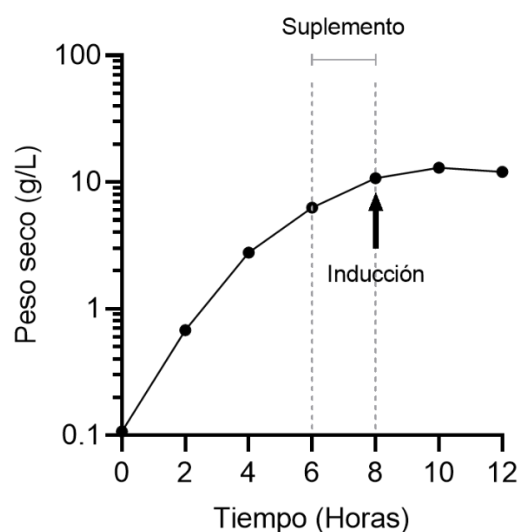
Tiempo (horas)	Densidad óptica (600 nm)*	Peso seco (g/L)	$\mu$ (horas <sup>-1</sup> )	g (horas)
0	0,22	0,11	-	-
2	1,39	0,68	0,40	0,75
4	5,68	2,78	0,31	0,98

Tiempo (horas)	Densidad óptica (600 nm)*	Peso seco (g/L)	$\mu$ (horas <sup>-1</sup> )	g (horas)
6	12,83	6,28	0,18	1,70
8	21,90	10,73	0,12	2,59
10	26,45	12,96	0,04	7,34
12	24,65	12,08	-0,02	-19,67

Nota. \*Es la media de dos determinaciones.

### Figura 11

Curva de crecimiento de *E. coli* SHuffle® que expresa OMP2q en medio TBMA



El cultivo celular en fermentador de 2 L para la producción de INVASq, mostró un comportamiento muy similar a la expresión de OMP1q (Figura 10). El cultivo alimentado a las 6 horas con 6,46 g/L duplicó la biomasa, en 1,67 horas, luego de la adición del incremento (12,53 g/L,  $\mu$  0,14). Aunque se observó un decrecimiento de la velocidad de crecimiento, ( $\mu$  0,02) posterior a la inducción, se obtuvo una densidad celular de 20,63 g/L, a las 12 horas de cultivo, similar al rendimiento obtenido para OMP1q (Tabla 6, Figura 12).

**Tabla 6**

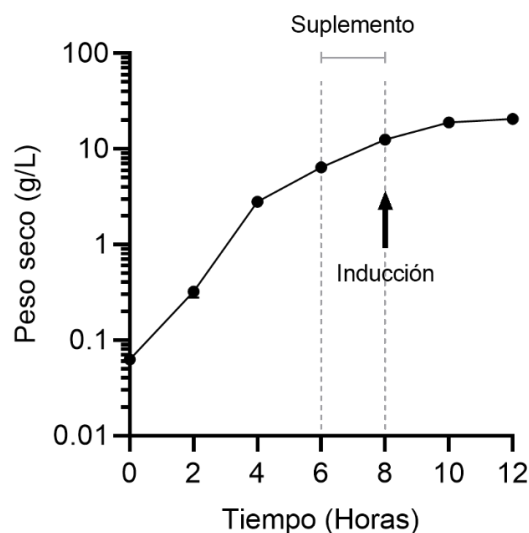
*Análisis de la fermentación de E. coli SHuffle® que expresa INVASq*

Tiempo (horas)	Densidad óptica (600 nm)*	Peso seco (g/L)	$\mu$ (horas <sup>-1</sup> )	g (horas)
0	0,13	0,06	-	-
2	0,66	0,32	0,36	0,85
4	5,74	2,81	0,47	0,64
6	13,18	6,46	0,18	1,67
8	25,58	12,53	0,14	2,09
10	38,85	19,04	0,09	3,32
12	42,10	20,63	0,02	17,26

*Nota.* \*Es la media de dos determinaciones.

**Figura 12**

*Curva de crecimiento de E. coli SHuffle® que expresa INVASq en medio TBMA*



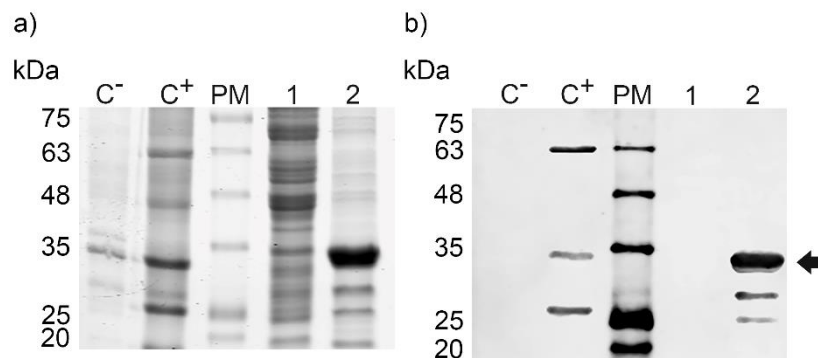
### Recuperación de antígenos

La biomasa obtenida en los cultivos de OPM1q y OPM2q en fermentador de 2 L, se rompieron mediante disrupción mecánica utilizando prensa francesa (epígrafe 3.3 de Metodología). El análisis del sobrenadante y del lisado celular mediante SDS-PAGE y Western blot mostraron bandas a un peso molecular aproximado a 35 kDa (Figura 13) y 63 kDa (Figura

14) correspondientes a las proteínas OMP1q y OMP2q respectivamente. En ambos casos las proteínas se encuentran en el pellet de ruptura, sin detectarse de forma soluble en el sobrenadante de ruptura.

### Figura 13

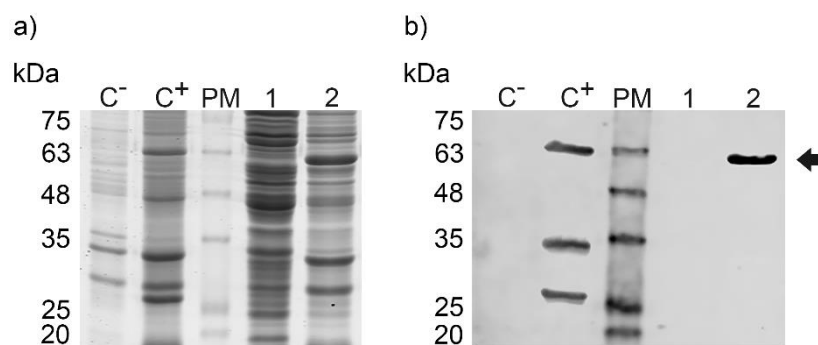
#### Recuperación del antígeno OMP1q



*Nota.* a) Separación en SDS-PAGE. b) Western blot. C<sup>-</sup>: Control negativo; C<sup>+</sup>: Control positivo; PM: Marcador de peso; 1: Sobrenadante de ruptura; 2: Pellet de ruptura.

### Figura 14

#### Recuperación del antígeno OMP2q



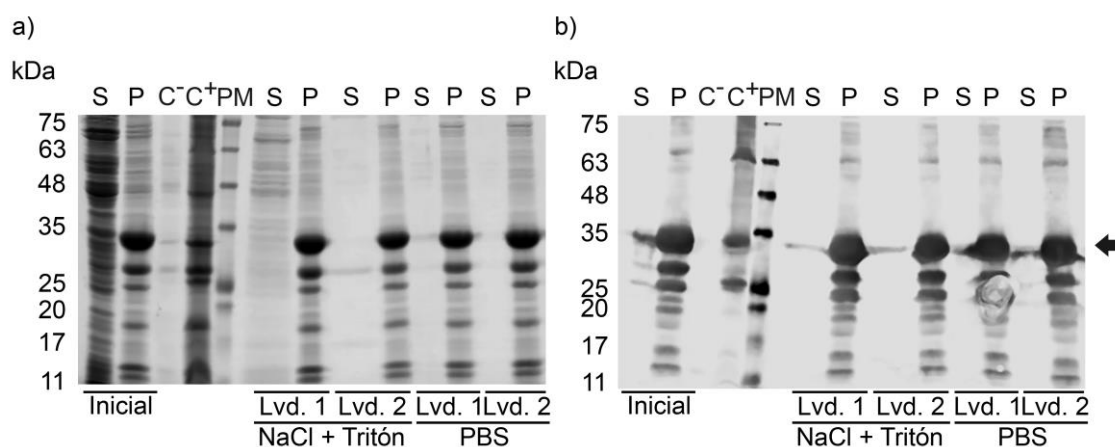
*Nota.* a) Separación en SDS-PAGE. b) Western blot. C<sup>-</sup>: Control negativo; C<sup>+</sup>: Control positivo; PM: Marcador de peso; 1: Sobrenadante de ruptura; 2: Pellet de ruptura.

### Lavado de los cuerpos de inclusión

Los cuerpos de inclusión obtenidos se lavaron dos veces con NaCl 1 M y Tritón X-100 al 1 % y dos veces con PBS 1 X, para eliminar contaminantes como lípidos, ADN y proteínas de membrana. En la Figura 15 muestra que luego del primer lavado con NaCl 1 M y Tritón X-100 al 1 % se eliminan proteínas contaminantes que acompañan los cuerpos de inclusión. Los lavados posteriores no contribuyeron a un aumento de la pureza del antígeno OMP1q. El mismo procedimiento fue aplicado para eliminar contaminantes de los cuerpos de inclusión de OPM2q (Figura 16). Aunque se observa la remoción de impurezas luego de los lavados, es necesario aplicar otros métodos que logren el aislamiento de los antígenos presentes en los cuerpos de inclusión.

### Figura 15

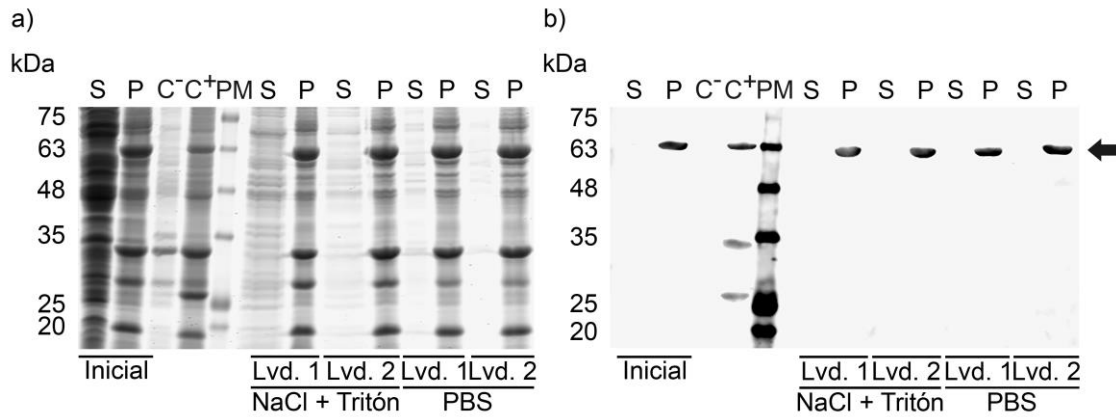
#### Análisis de los lavados de OMP1q



*Nota.* a) Separación en SDS-PAGE. b) Western blot. S: Sobrenadante de ruptura P: Pellet de ruptura. C<sup>-</sup>: Control negativo. C<sup>+</sup>: Control positivo. PM: Marcador de peso; Lvd. 1: Primer lavado. Lvd. 2: Segundo lavado. Las soluciones de lavado fueron NaCl 1 M + Tritón X-100 al 1 % y PBS 1 X.

## Figura 16

### Análisis de los lavados de OMP2q



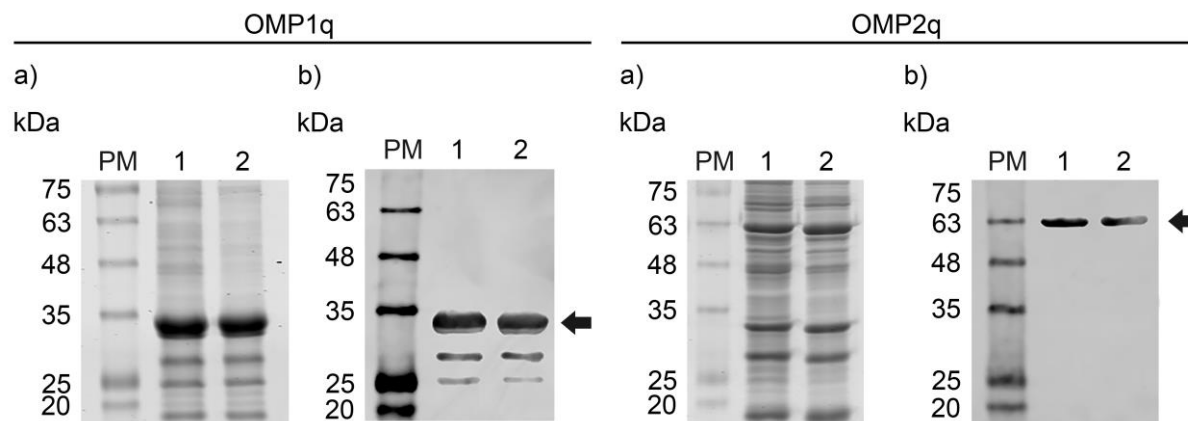
*Nota.* a) Separación en SDS-PAGE. b) Western blot. S: Sobrenadante de ruptura P: Pellet de ruptura. C<sup>-</sup>: Control negativo. C<sup>+</sup>: Control positivo. PM: Marcador de peso; Lvd. 1: Primer lavado. Lvd. 2: Segundo lavado. Las soluciones de lavado fueron NaCl 1 M + Tritón X-100 al 1 % y PBS 1 X.

A partir de los resultados anteriores se procedió a realizar un análisis utilizando las muestras luego de la ruptura (sin lavados) y posterior a los lavados, volviendo más visible la diferencia entre los cuerpos de inclusión iniciales y lavados (Figura 17).



## Figura 17

### Cuerpos de inclusión de OMP1q y OMP2q lavados



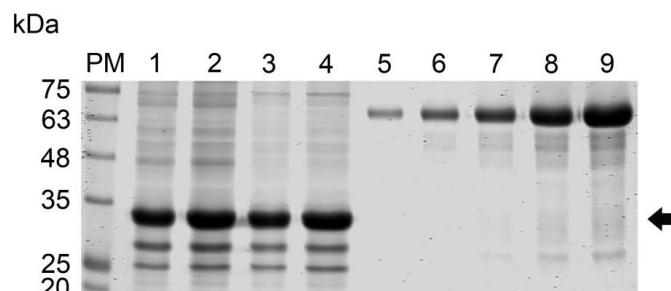
*Nota.* a) Separación en SDS-PAGE. b) Western blot. PM: Marcador de peso; 1: Pellet de ruptura; 2: Pellet de ruptura lavado.

### Rendimiento de la expresión de los antígenos

La cuantificación del rendimiento de los antígenos se realizó aplicando en SDS-PAGE concentraciones conocidas de BSA y los antígenos de interés. Además, se aplicaron muestras previas y posteriores a los lavados para calcular la eficiencia de esta etapa del proceso (Figura 18). Aunque ocurrió degradación de la proteína BSA no se consideró representativa al momento de realizar el análisis de cuantificación de la curva con el programa AzureSpot 2.0, el mismo que se utilizó para realizar la cuantificación de los antígenos.

## Figura 18

### Cuantificación con BSA de OMP1q



*Nota.* PM: Marcador de peso; 1: 10  $\mu\text{L}$  pellet ruptura; 2: 20  $\mu\text{L}$  pellet ruptura. 3: 10  $\mu\text{L}$  pellet ruptura lavado; 4: 20  $\mu\text{L}$  pellet ruptura lavado 5: 0,0625 mg/mL BSA; 6: 0,125 mg/mL BSA; 7: 0,25 mg/mL BSA; 8: 0,5 mg/mL BSA; 9: 1 mg.

A partir de los datos obtenidos se realizó el cálculo del rendimiento, del antígeno OMP1q, luego de los lavados realizados. Los datos recogidos en la Tabla 7-Tabla 8 corresponden a la masa ( $\mu\text{g}$  de antígenos), proporcionada por el software, el volumen cargado en el gel ( $\mu\text{L}$ ) y el factor de dilución ( $D$ ) que es la relación entre la concentración de biomasa al finalizar la fermentación y la concentración de biomasa obtenida posterior a la ruptura. Para el antígeno OMP1q se usó la relación de la Ecuación 3:

$$D = 20,07 \frac{\text{g Biomasa}}{\text{L Cultivo}} \div 10 \frac{\text{g Biomasa}}{\text{L Solución}} = 2,01 \frac{\text{L Solución}}{\text{L Cultivo}} \quad (3)$$

Mientras, para el cálculo del rendimiento ( $Y$ ) se aplicó la siguiente Ecuación 4, donde  $x$  es la concentración de la proteína y  $D$  el factor de dilución. Finalmente, La Ecuación 5 se usó para el cálculo de los porcentajes de recuperación.

$$Y \left( \frac{\text{mg Proteína}}{\text{L Cultivo}} \right) = x \left( \frac{\text{mg Proteína}}{\text{L Solución}} \right) \times D \left( \frac{\text{L Solución}}{\text{L Cultivo}} \right) \quad (4)$$

$$\% \text{ Recuperación} = \frac{\text{Rendimiento final (mg/L)}}{\text{Rendimiento inivial (mg/L)}} \times 100 \quad (5)$$

El análisis realizado muestra que solo un 0,6 % de OMP1q se pierde en el proceso de lavado, por tanto, la recuperación de los cuerpos de inclusión que se obtienen desde la fermentación es del 99,4 %.

**Tabla 7**

*Rendimiento de expresión de OMP1q*

OMP1q						
Muestra	Masa (µg)	Volumen (µL)	Concentración (µg/µL)	Factor de dilución	Rendimiento (µg/µL)	Rendimiento (mg/L)
Inicial (Sin lavar)	4,99	10,00	0,50	2,01	1,00	1001,49
	7,17	20,00	0,36	2,01	0,72	719,51
Final (Lavados NaCl y Tritón)	4,96	10,00	0,50	2,01	1,00	995,47
	7,24	20,00	0,36	2,01	0,73	726,53
<b>Peso seco fermentación (g)</b>	<b>20,07</b>					

Análisis similar se realizó para cuantificar la recuperación del antígeno OMP2q (Figura 19). Los valores de la Tabla 8 se obtuvieron aplicando la misma metodología, con la diferencia del factor de dilución (*D*). Para OMP2q este valor fue:

$$D = 12,08 \frac{g \text{ Biomasa}}{L \text{ Cultivo}} \div 10 \frac{g \text{ Biomasa}}{L \text{ Solución}} = 1,21 \frac{L \text{ Solución}}{L \text{ Cultivo}} \quad (6)$$

Los cálculos realizados indican que OMP2q disminuye su concentración de proteína al realizar los lavados, pasando de 525,44 mg/L a 380,39 mg/L. Consiguiendo una recuperación de los cuerpos de inclusión de 72,4 %.

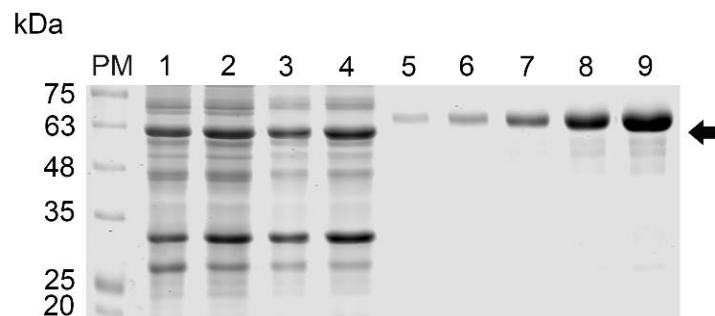
**Tabla 8**

*Rendimiento de expresión de OMP2q*

OMP2q						
Muestra	Masa (µg)	Volumen (µL)	Concentración (µg/µL)	Factor de dilución	Rendimiento (µg/µL)	Rendimiento (mg/L)
Inicial (Sin lavar)	4,35	10,00	0,44	1,21	0,53	525,44
	5,04	20,00	0,25	1,21	0,30	304,39
Final (Lavados NaCl y Tritón)	3,15	10,00	0,32	1,21	0,38	380,49
	5,20	20,00	0,26	1,21	0,31	314,05
<b>Peso seco fermentación (g)</b>	<b>12,08</b>					

## Figura 19

### Cuantificación con BSA de OMP2q



*Nota.* PM: Marcador de peso; 1: 10  $\mu$ L pellet ruptura; 2: 20  $\mu$ L pellet ruptura. 3: 10  $\mu$ L pellet ruptura lavado; 4: 20  $\mu$ L pellet ruptura lavado 5: 0,0625 mg/mL BSA; 6: 0,125 mg/mL BSA; 7: 0,25 mg/mL BSA; 8: 0,5 mg/mL BSA; 9: 1 mg.

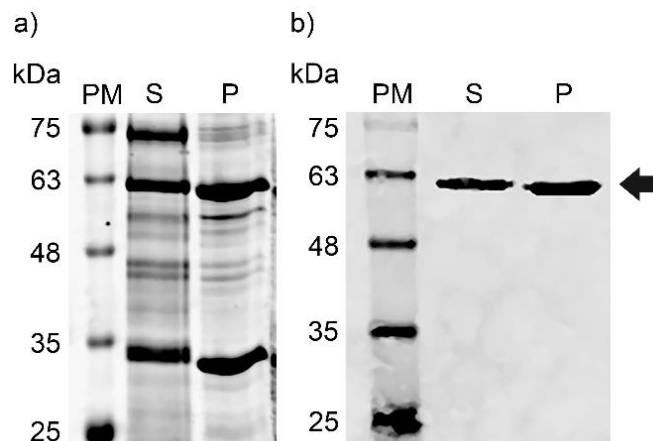
### Solubilización de los antígenos

En nuestro trabajo se realizaron varios protocolos para optimizar la solubilización de los cuerpos de inclusión y en posteriores estudios realizar la purificar de los antígenos en cromatografía líquida.

El antígeno de OMP2q, con concentración de 380,39 mg/L, fue seleccionado para realizar el primer ensayo de solubilización. 20 mL del antígeno disuelto en buffer PBS 1 X se incubó en urea 8 M, preparada en una solución de buffer fosfato 100 mM a pH 7, temperatura ambiente (21 °C), por 1 hora y agitación constante de 300 rpm (Figura 20). Los resultados muestran solubilización parcial del antígeno de interés, manteniéndose la mayor concentración de la proteína en el pellet.

## Figura 20

*Lavado de OMP2q a temperatura ambiente (21 °C) con urea 8 M*

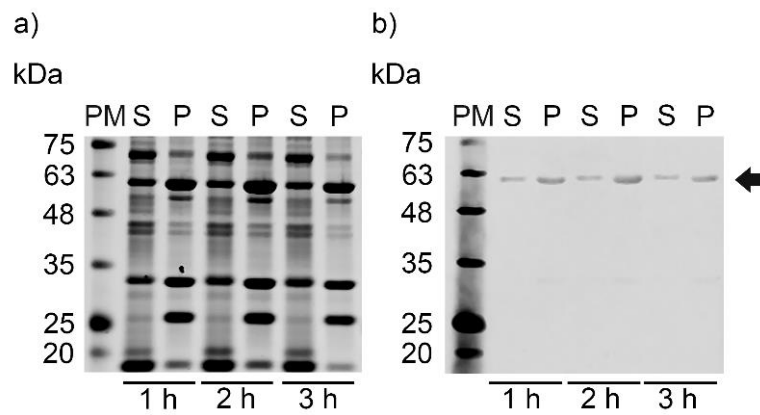


*Nota.* a) Separación en SDS-PAGE. b) Western blot. PM: Marcador de peso; S: Sobrenadante; P: Pellet.

Con la finalidad de optimizar el proceso se realizaron nuevos ensayos que consistían en utilizar urea 8 M a temperaturas de 37, 45 y 60 °C por diferentes periodos de tiempo manteniendo la agitación constante (300 rpm). La solubilización del antígeno de interés se observó a partir de la hora 1 de incubación sin cambio evidente durante el ensayo. En la fracción soluble se obtuvo un incremento de proteínas contaminantes. Este aumento es directamente proporcional al tiempo de incubación, como se observa en las proteínas de peso molecular: 75, 48, 35 y 20 kDa (Figura 21-Figura 23). La solubilización de OMP2q no varía con el aumento de la temperatura, sin embargo, mientras mayor es la temperatura y el tiempo de incubación es mayor la cantidad de contaminantes que pasan a la fracción soluble, aumentando la pureza de OMP2q en el pellet.

**Figura 21**

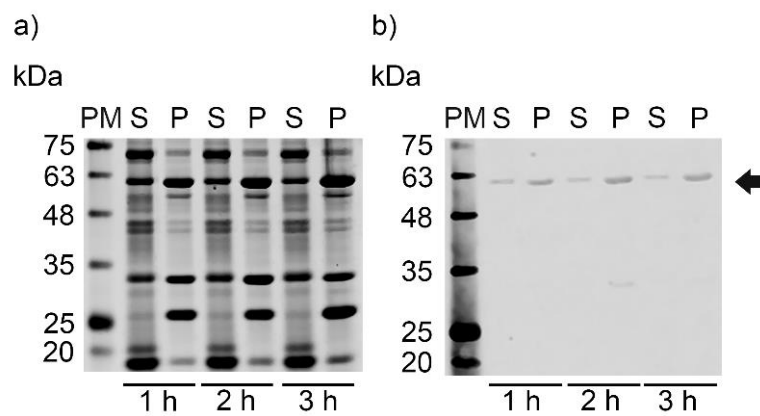
*Lavado de OMP2 a 37 °C con urea 8 M*



*Nota.* a) Separación en SDS-PAGE. b) Western Blot. PM: Marcador de peso; S: Sobrenadante; P: Pellet.

**Figura 22**

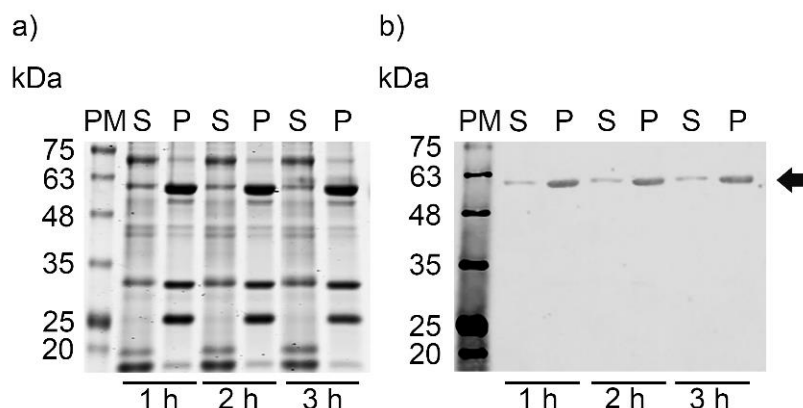
*Lavado de OMP2 a 45 °C con urea 8 M*



*Nota.* a) Separación en SDS-PAGE. b) Western Blot. PM: Marcador de peso; S: Sobrenadante; P: Pellet.

**Figura 23**

*Lavado de OMP2 a 60 °C con urea 8 M*



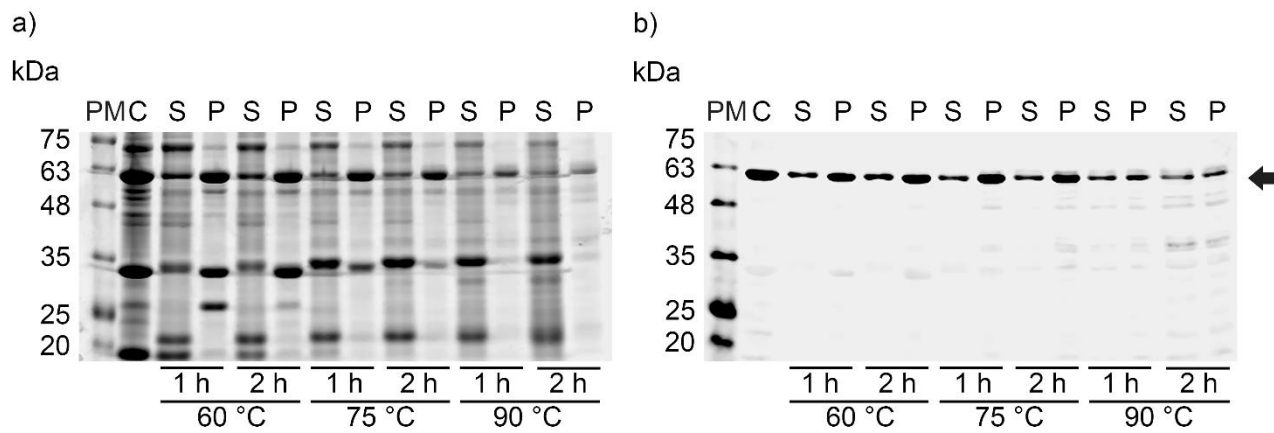
*Nota.* a) Separación en SDS-PAGE. b) Western Blot. PM: Marcador de peso; S: Sobrenadante; P: Pellet.

Teniendo en cuenta que nuestro propósito era la solubilización del antígeno y los resultados obtenidos mostraban que el antígeno se mantenía mayoritariamente en el pellet se consideró utilizar un agente caotrópico,  $\beta$ -mercaptoetanol (BME), para mejorar la solubilización.

Los experimentos de solubilización se realizaron en urea 8 M con 20 mM de BME a diferentes temperaturas (60, 75 y 90 °C) y agitación constante (300 rpm). En la Figura 24 se observa que la solubilización de OMP2q ocurrió desde la primera hora del ensayo. Al aumentar la temperatura durante la incubación se consiguió mayor solubilización de las proteínas totales, pero no hubo un incremento visible del antígeno en esta fracción. En las condiciones experimentales se obtuvo, contrario a lo deseado, un aumento de la pureza de OMP2q en la fracción insoluble, a las 2 horas de incubación a 75 °C. Es destacable que a temperatura de 90 °C se observó una degradación del antígeno tanto en la fracción soluble como en el pellet.

## Figura 24

*Lavado de OMP2 con urea 8 M y 20 mM de  $\beta$ -mercaptoetanol*



*Nota.* a) Separación en SDS-PAGE. b) Western Blot. PM: Marcador de peso; C: Pellet inicial; S: Sobrenadante; P: Pellet.



## Capítulo 5

### Discusión

Las pérdidas económicas por la enteropatía proliferativa porcina, solo en Estados Unidos, alcanza los 20 millones de dólares (Jansen, 2018), por lo que el desarrollo de métodos eficaces para combatir a *L. intracellularis* es esencial. Montesino y colaboradores (2019) desarrollaron un candidato vacunal quimérico que contiene dos proteínas de membrana externa OMP1q, OMP2q y una proteína de secreción INVASq, ingenierizadas mediante la adición de secuencias de epítopes T, que generó una respuesta inmune a partir de los 21 días de inmunización. Los resultados obtenidos también demostraron protección durante un ensayo de inmunización y reto con el patógeno. Además, el mismo grupo de investigación ha publicado resultados que demuestran haber establecido las condiciones de crecimiento celular en cultivo a lote-incrementado a escala de 2 L, para la expresión de los tres antígenos (Salazar, 2020). A pesar de estos resultados, no se conoce la potencialidad que tiene cada antígeno en la inducción de una respuesta inmune efectiva. Para demostrar la antigenicidad de cada antígeno es importante expresarlos independiente y posteriormente hacer los ensayos en animales.

Los antígenos expresados en la cepa de bacteria *E. coli* SHuffle® se obtuvieron como cuerpos de inclusión. Esta cepa presenta mutaciones (*trxB*- y *gor*-) que proporciona un ambiente citoplasmático oxidativo, permitiendo la formación de enlaces disulfuro (Seras-Franzoso et al., 2012). Además, de la enzima DsbC que actúa como chaperona oxidoreductasa, mejorando el plegamiento oxidativo de proteínas que se expresan tanto en el compartimento periplásmico como en el citoplasma (Joseph et al., 2015; Safarpour et al., 2017). Con estos antecedentes se esperaría que al utilizar la *E. coli* SHuffle® las proteínas OMP1q, OMP2q e INVASq se expresaran de forma soluble, sin embargo, se obtuvieron como cuerpos de inclusión (CI).

La obtención de antígenos como CI para la generación de un candidato vacunal presenta gran relevancia. Las proteínas en forma de CI son más resistentes a la degradación por las proteasas de la célula huésped y los CI son menos propensos a ejercer efectos tóxicos (Singhvi, Saneja, Srichandan, & Panda, 2020). El aislamiento de los CI se puede realizar a partir de la centrifugación diferencial del lisado debido a su alta densidad, lo que permite un proceso de obtención rápido, robusto y costo-efectivo (García-Fruitós et al., 2012). La aplicación de antígenos como CI está ampliamente documentada. La administración subcutánea de los CI con direccionamiento a tumores ha liberado la proteína al torrente sanguíneo y se ha acumulado en el tumor por períodos sostenidos (Unzueta et al., 2018). Los CI pueden generar una respuesta celular T mediada por células dendríticas (Schetters et al., 2020; Singhvi et al., 2020). Además, varios estudios han informado el uso de los CI como candidatos vacunales veterinarios (Kęsik, Sączyńska, Szewczyk, & Płucienniczak, 2004; Wedrychowicz et al., 2007). Sin embargo, Rosano y Ceccarelli (2019) sugiere que se puede reducir la formación de CI, en caso de que se desee, realizando el cultivo celular a temperaturas menores (15 a 25 °C). En esta condición los niveles de expresión serían menores (Safarpour et al., 2017).

La expresión de los tres antígenos se logró de forma reproducible a partir de tres procesos de producción (fermentaciones fed-batch) utilizando medio rico TBM, lo cual permitió el rendimiento antigénico de 5.6 mg/L (medio LB) a 400 mg/L (Salazar et al., 2020). La alimentación con glucosa antes de la inducción aumentó la estabilidad del plásmido reprimiendo la expresión basal de la polimerasa T7 en la cepa de *E. coli* SHuffle® y consecuentemente se obtuvo un aumento del rendimiento volumétrico de los antígenos (75%) (Salazar et al., 2020).

Varios métodos se han utilizado para la solubilización de los cuerpos de inclusión y posterior purificación de las proteínas contenidos en estos (Panda, 2003). Los desnaturalizantes fuertes o agentes caotrópicos como el GuHCl 6 M y la urea 8 M solubilizan completamente los cuerpos de inclusión (QIAexpressionist, 2003). Además, ayudan a mantener los residuos de

cisteínas en un estado reducido evitando la formación de enlaces sulfuros no nativos en soluciones de proteínas altamente concentradas (Panda, 2003). Se pueden utilizar otros desnaturalizantes o detergentes, pero la elección de estos reactivos y las concentraciones específicas deben establecerse empíricamente (Fischer, Sumner, & Goodenough, 1993). En nuestra investigación se utilizó BME y urea 8 M a diferentes temperaturas y tiempo de solubilización

La eficiencia de la solubilización fue mayor al incubar las muestras a altas temperaturas. Resultados similares fueron obtenidos por Umetsu y colaboradores (2005), donde se solubilizaron cuerpos de inclusión de microglobulina  $\beta 2$  en un rango de temperatura de 4 a 80 °C. La entalpía de despliegue de proteínas es menor a temperatura ambiente pero aumenta rápidamente con la temperatura (Baldwin, 1986). Además, cada proteína es diferente y su solubilidad depende de muchos factores: la naturaleza de la proteína, la composición, la temperatura y el pH del solvente, entre otros (Zhuravko, Kononova, & Bobruskin, 2015). Sin embargo, temperaturas extremas (90 °C) puede producir degradación proteica, por lo que se sugiere realizar este proceso a menores temperaturas.

A pesar de las diferentes condiciones de solubilización analizadas para OMP2q no se obtuvo alta eficiencia de solubilización. Esto sugiere que las fermentaciones realizadas a 37 °C provocan que la maquinaria celular de *E. coli* SHuffle® exprese los antígenos quiméricos aceleradamente, evitando la acción de la chaperona oxido-reductasa DsbC (Jevševar et al., 2008; Safarpour et al., 2017). Se deben realizar ensayos de solubilización con otros agentes caotrópicos en función de la temperatura (QIAexpressionist, 2003). Además, se debe estudiar la relación entre medio de cultivo y la formación de los CI. El TB sin modificar podría disminuir la formación de los cuerpos de inclusión al reducir la velocidad de crecimiento y expresión (Bentley, Mirjalili, Andersen, Davis, & Kompala, 1990).

## Capítulo 6

### Conclusiones

- La creación de bancos de trabajo en los procesos biotecnológicos asegura la robustez de la etapa de cultivo celular dentro del proceso de producción de las biomoléculas.
- La inducción de cultivos de alta densidad (sistemas Fed-Batch) conduce altos rendimientos de aproximadamente 500 mg de antígeno por litro de cultivo.
- Al finalizar los lavados de los cuerpos de inclusión se obtuvo un rendimiento de la expresión de los antígenos mayor a 70 %.
- La expresión de los antígenos quiméricos contra *Lawsonia intracellularis*, en cultivos celulares, se obtuvieron como cuerpos de inclusión con propiedades resistentes a la solubilización.

### Recomendaciones

- Analizar la formación de cuerpos de inclusión para los tres antígenos, expresados en *E. coli* SHuffle®, utilizando un rango de temperatura de 15 a 30 °C.
- Verificar la solubilización de los cuerpos de inclusión de OMP1q, OMP2q e INVASq utilizando GuHCl 6 M como solvente.
- Evaluar la expresión de los antígenos en la cepa BL21, teniendo en cuenta que resultados preliminares indican que no hay formación de puentes disulfuros en las proteínas OMP1q, OMP2q e INVASq, por tanto, no habría ventaja en utilizar *E. coli* SHuffle®.

## Capítulo 7

### Bibliografía

- Ahmadzadeh, M., Farshdari, F., Nematollahi, L., Behdani, M., & Mohit, E. (2020). Anti-HER2 scFv Expression in Escherichia coli SHuffle®T7 Express Cells: Effects on Solubility and Biological Activity. *Molecular Biotechnology*, 62(1), 18–30. <https://doi.org/10.1007/s12033-019-00221-2>
- Alvarez C., P. E. (2002). *Utilizacion de nuevas tecnicas para el diagnostico de enteropatía proliferativa porcina* (Universidad de Concepcion). Retrieved from <http://www.sidalc.net/cgi-bin/wxis.exe/?IsisScript=BIBACL.xis&method=post&formato=2&cantidad=1&expresion=mfn=030051>
- Arnold, M., Crienen, A., Swam, H., Von Berg, S., Jolie, R., & 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>
- Baeshen, M. N., Al-Hejin, A. M., Bora, R. S., Ahmed, M. M. M., Ramadan, H. A. I., Saini, K. S., ... Redwan, E. M. (2015, July 1). Production of biopharmaceuticals in E. Coli: Current scenario and future perspectives. *Journal of Microbiology and Biotechnology*, Vol. 25, pp. 953–962. <https://doi.org/10.4014/jmb.1412.12079>
- Baldwin, R. L. (1986). Temperature dependence of the hydrophobic interaction in protein folding. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 83(21), 8069–8072. <https://doi.org/10.1073/pnas.83.21.8069>
- Barrera-Zarate, J. A., Andrade, M. R., Pereira, C. E. R., Vasconcellos, A., Wagatsuma, M. M., Sato, J. P. H., ... Guedes, R. M. C. (2019). Oral fluid for detection of exposure to Lawsonia intracellularis in naturally infected pigs. *Veterinary Journal*, 244, 34–36. <https://doi.org/10.1016/j.tvjl.2018.12.003>
- Bentley, W. E., Mirjalili, N., Andersen, D. C., Davis, R. H., & Kompala, D. S. (1990). Plasmid-

encoded protein: The principal factor in the “metabolic burden” associated with recombinant bacteria. *Biotechnology and Bioengineering*, 35(7), 668–681.

<https://doi.org/10.1002/bit.260350704>

Berardo, R., Diego, A., Giraldo, G. E., Alvarez, L. C., Cano, E. M., & Isaza, B. (2004).

Prevalencia de enteropatía proliferativa porcina y caracterización histopatológica de las lesiones asociadas en cerdos sacrificados en el Matadero Municipal de Medellín, Colombia. *Revista Colombiana de Ciencias Pecuarias*, 17(1), 11–19. Retrieved from <https://aprendeenlinea.udea.edu.co/revistas/index.php/rccp/article/view/323919>

Boesen, H. T., Jensen, T. K., Schmidt, A. S., Jensen, B. B., Jensen, S. M., & Møller, K. (2004).

The influence of diet on *Lawsonia intracellularis* colonization in pigs upon experimental challenge. *Veterinary Microbiology*, 103(1–2), 35–45.

<https://doi.org/10.1016/J.VETMIC.2004.06.008>

Casadevall, A. (2018). Antibody-based vaccine strategies against intracellular pathogens.

*Current Opinion in Immunology*, 53, 74–80. <https://doi.org/10.1016/j.coi.2018.04.011>

Chaban, B., Hughes, H. V., & Beeby, M. (2015). The flagellum in bacterial pathogens: For motility and a whole lot more. *Seminars in Cell and Developmental Biology*, 46, 91–103.

<https://doi.org/10.1016/j.semcdb.2015.10.032>

Chhetri, G., Kalita, P., & 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>

Collins, A. M. (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>

Cooper, D. M., Swanson, D. L., & Gebhart, C. J. (1997). Diagnosis of proliferative enteritis in frozen and formalin-fixed, paraffin-embedded tissues from a hamster, horse, deer and

- ostrich using a *Lawsonia intracellularis*-specific multiplex PCR assay. *Veterinary Microbiology*, 54(1), 47–62. [https://doi.org/10.1016/S0378-1135\(96\)01264-3](https://doi.org/10.1016/S0378-1135(96)01264-3)
- Cordes, H., Riber, U., Jensen, T. K., & 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>
- Cox, M. M. J. (2012, February 27). Recombinant protein vaccines produced in insect cells. *Vaccine*, Vol. 30, pp. 1759–1766. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2012.01.016>
- Derakhshani, A., Farajkhah, K. K., Barzegari Banadkoki, S., Shirazi, F. H., Barati, M., Fereidouni, M., & Safarpour, H. (2019). Optimization of induction parameters, structure quality assessment by ATR-FTIR and in silico characterization of expressed recombinant polcalcine in three different strains of *Escherichia coli*. *International Journal of Biological Macromolecules*, 138, 97–105. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2019.07.078>
- Dittmar, M., Hoelzle, L. E., Hoelzle, K., Sydler, T., Corboz, L., Miserez, R., & Wittenbrink, M. M. (2003). Diagnosis of Porcine Proliferative Enteropathy: Detection of *Lawsonia intracellularis* by Pathological Examinations, Polymerase Chain Reaction and Cell Culture Inoculation. *Journal of Veterinary Medicine Series B*, 50(7), 332–338. <https://doi.org/10.1046/j.1439-0450.2003.00691.x>
- Draskovic, V., Bosnjak-Neumuller, J., Vasiljevic, M., Petrujkic, B., Aleksic, N., Kukolj, V., & Stanimirovic, Z. (2018). Influence of phyto-genic feed additive on *Lawsonia intracellularis* infection in pigs. *Preventive Veterinary Medicine*, 151, 46–51. <https://doi.org/10.1016/j.prevetmed.2018.01.002>
- Ecuador Inmediato. (2018, February 20). Preocupación por posible importación de carne desde Colombia. *Economía*, p. 1. Retrieved from [http://www.ecuadorinmediato.com/index.php?module=Noticias&func=news\\_user\\_view&id=2818832921](http://www.ecuadorinmediato.com/index.php?module=Noticias&func=news_user_view&id=2818832921)



- Eras Cardenas, G. E. (2016). *Evaluación anatómo-patológica de cerdos faenados en el camal municipal del cantón Chimbo, Provincia de Bolívar* (Universidad Estatal de Bolívar). Retrieved from [http://www.dspace.ueb.edu.ec/bitstream/123456789/1594/1/glen\\_eras\\_te.pdf](http://www.dspace.ueb.edu.ec/bitstream/123456789/1594/1/glen_eras_te.pdf)
- Esmaili, I., Mohammad Sadeghi, H., & 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>
- Espinoza Calle, S., Chavera Carrión, A., & Sandoval Chaupe, N. (2019). Primer reporte de lleitis necrótica causado por *Lawsonia intracellularis* mediante la prueba de inmunofluorescencia y estudios anatomohistopatológicos en porcinos de granjas de Lima-Perú. *Revista ECIPeru*, 1, 43–45. <https://doi.org/10.33017/reveciperu2004.0013/>
- FAO. (2016, April 25). FAO's Animal Production and Health Division: Pigs and... Retrieved January 2, 2021, from Agriculture and Consumer Protection Department website: <http://www.fao.org/ag/againfo/themes/en/pigs/home.html>
- Fathi-Roudsari, M., Akhavian-Tehrani, A., & Maghsoudi, N. (2016). Comparison of three *Escherichia coli* strains in recombinant production of reteplase. *Avicenna Journal of Medical Biotechnology*, 8(1), 16–22. Retrieved from [/pmc/articles/PMC4717461/?report=abstract](http://pmc/articles/PMC4717461/?report=abstract)
- Fischer, B., Sumner, I., & Goodenough, P. (1993). Isolation, renaturation, and formation of disulfide bonds of eukaryotic proteins expressed in *Escherichia coli* as inclusion bodies. *Biotechnology and Bioengineering*, 41(1), 3–13. <https://doi.org/10.1002/bit.260410103>
- Friedman, N. D., Temkin, E., & Carmeli, Y. (2016, May 1). The negative impact of antibiotic resistance. *Clinical Microbiology and Infection*, 22(5), 416–422. <https://doi.org/10.1016/j.cmi.2015.12.002>
- García-Fruitós, E., Vázquez, E., Díez-Gil, C., Corchero, J. L., Seras-Franzoso, J., Ratera, I., ... Villaverde, A. (2012, February 1). Bacterial inclusion bodies: Making gold from waste. *Trends in Biotechnology*, Vol. 30, pp. 65–70. <https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2011.09.003>

- García, J. A., Quiroga, M. A., Pérez, E., Romero, A., Domínguez, R., Streitenberger, N., & Dutra, F. (2017). Porcine proliferative enteropathy by *Lawsonia intracellularis* and coinfection with *Trichuris suis* and *Balantidium coli* in a pig in Uruguay. *SciELO*, *53*(207), 23–31. Retrieved from [http://www.scielo.edu.uy/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S1688-48092017000300023](http://www.scielo.edu.uy/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1688-48092017000300023)
- Guedes, R. M. C., & 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. C., Gebhart, C. J., Winkelman, N. L., Mackie-Nuss, R. A. C., Marsteller, T. A., & Deen, J. (2002). Comparison of different methods for diagnosis of porcine proliferative enteropathy. *Canadian Journal of Veterinary Research = Revue Canadienne de Recherche Veterinaire*, *66*(2), 99–107. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11989741>
- Guedes, R. M. C., Machuca, M. A., Quiroga, M. A., Pereira, C. E. R., Resende, T. P., & 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>
- Gyles, C. L., Prescott, J. F., Songer, G., & Thoen, C. O. (2010). *Pathogenesis of Bacterial Infections in Animals* (Fourth Edi). Retrieved from [https://s3.amazonaws.com/academia.edu.documents/34680202/Pathogenesis\\_of\\_Bacterial\\_Infections\\_in\\_Animals\\_4th\\_Ed\\_1\\_.pdf?response-content-disposition=inline%3Bfilename%3DPathogenesis\\_of\\_Bacterial\\_Infections\\_in.pdf&X-Amz-Algorithm=AWS4-HMAC-SHA256&X-Amz-C](https://s3.amazonaws.com/academia.edu.documents/34680202/Pathogenesis_of_Bacterial_Infections_in_Animals_4th_Ed_1_.pdf?response-content-disposition=inline%3Bfilename%3DPathogenesis_of_Bacterial_Infections_in.pdf&X-Amz-Algorithm=AWS4-HMAC-SHA256&X-Amz-C)
- Hassenin, A., Gebhart, C., & 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://doi.org/10.9734/jalsi/2017/32366>

Hohman, L. S., & Peters, N. C. (2019). CD4+ T Cell-Mediated Immunity against the Phagosomal Pathogen *Leishmania*: Implications for Vaccination. *Trends in Parasitology*, 35(6), 423–435. <https://doi.org/10.1016/j.pt.2019.04.002>

Holyoake, P. K., Cutler, R. S., Caple, I. W., & Monckton, R. P. (1994). Enzyme-linked immunosorbent assay for measuring ileal symbiont intracellularis-specific immunoglobulin G response in sera of pigs. *Journal of Clinical Microbiology*, 32(8), 1980–1985. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7989553>

Hori, C., Yamazaki, T., Ribordy, G., Takisawa, K., Matsumoto, K., Ooi, T., ... 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., & 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>

Ihsan, A., Wang, X., Zhang, W., Tu, H., Wang, Y., Huang, L., ... Yuan, Z. (2013). Genotoxicity of quinocetone, cyadox and olaquinox in vitro and in vivo. *Food and Chemical Toxicology*, 59, 207–214. <https://doi.org/10.1016/J.FCT.2013.06.008>

Jacobs, A. A. C., Harks, F., Hazenberg, L., Hoeijmakers, M. J. H., Nell, T., Pel, S., & Segers, R. P. A. M. (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>

Jalomo-Khayrova, E., Mares, R. E., Muñoz, P. L. A., Meléndez-López, S. G., Rivero, I. A., & Ramos, M. A. (2018). Soluble expression of an amebic cysteine protease in the cytoplasm of *Escherichia coli* SHuffle Express cells and purification of active enzyme. *BMC*

- Biotechnology*, 18(1). <https://doi.org/10.1186/s12896-018-0429-y>
- Jansen, T. (2018). *A Research Framework for Evaluating the Economic Benefits of Antibiotics in Livestock Production: Lawsonia Intracellularis in Canadian Pig Production as an Example* (University of Guelph). Retrieved from <http://atrium.lib.uoguelph.ca/xmlui/handle/10214/14216>
- Jansen, T., Weersink, A., von Massow, M., & 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>
- Jashandeep, K., Arbind, K., & Jagdeep, K. (2018). Strategies for optimization of heterologous protein expression in *E. coli*: Roadblocks and reinforcements. *International Journal of Biological Macromolecules*, 106, 803–822. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2017.08.080>
- Jasni, S., McOrist, S., & Lawson, G. H. (1994). Reproduction of proliferative enteritis in hamsters with a pure culture of porcine ileal symbiont *intracellularis*. *Veterinary Microbiology*, 41(1–2), 1–9. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7801512>
- Jensen, T. K., & Svensmark, B. (2000). Unusual detection sites of *Lawsonia intracellularis*: in cases of peritonitis and in the liver. *16th International Pig Veterinary Society Congress*, 16. Retrieved from [http://orbit.dtu.dk/en/publications/unusual-detection-sites-of-lawsonia-intracellularis-in-cases-of-peritonitis-and-in-the-liver-of-a-pig\(674128cf-13e4-4cbf-8782-de3ac67efad4\).html](http://orbit.dtu.dk/en/publications/unusual-detection-sites-of-lawsonia-intracellularis-in-cases-of-peritonitis-and-in-the-liver-of-a-pig(674128cf-13e4-4cbf-8782-de3ac67efad4).html)
- Jevševar, S., Gaberc-Porekar, V., Fonda, I., Podobnik, B., Grdadolnik, J., & Menart, V. (2008). Production of Nonclassical Inclusion Bodies from Which Correctly Folded Protein Can Be Extracted. *Biotechnology Progress*, 21(2), 632–639. <https://doi.org/10.1021/bp0497839>
- Jiménez, A. P., Duarte, L. Z., Cortez, L. S., Granados, M., Florez, C., Villamizar, A., & Parra-Martin, J. A. (2018). Association to positivity of *Lawsonia intracellularis* with the clinical and

- pathologic expression of infection in swine from the metropolitan area of Bucaramanga (Santander, Colombia). *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinaria e Zootecnia*, 70(1), 181–186. <https://doi.org/10.1590/1678-4162-9182>
- Joseph, B. C., Pichaimuthu, S., Srimeenakshi, S., Murthy, M., Selvakumar, K., Ganesan, M., & Manjunath, S. R. (2015). An overview of the parameters for recombinant protein expression in *Escherichia coli*. *Journal of Cell Science & Therapy*, 6(5), 1.
- Jozala, A. F., Geraldles, D. C., Tundisi, L. L., Feitosa, V. de A., Breyer, C. A., Cardoso, S. L., ... Pessoa, A. (2016). Biopharmaceuticals from microorganisms: from production to purification. *Brazilian Journal of Microbiology*, 47, 51–63. <https://doi.org/10.1016/j.bjm.2016.10.007>
- Karuppanan, A. K., & 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>
- Kęsik, M., Sączyńska, V., Szewczyk, B., & Płucienniczak, A. (2004). Inclusion bodies from recombinant bacteria as a novel system for delivery of vaccine antigen by the oral route. *Immunology Letters*, 91(2–3), 197–204. <https://doi.org/10.1016/j.imlet.2003.12.001>
- Kim, H., Kim, S., & 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>
- Knittel, J. P. (1997). *Diagnosis of infection with Lawsonia intracellularis in swine* (Iowa State University). Retrieved from <https://lib.dr.iastate.edu/rtd>
- Kroll, J. J., Roof, M. B., Hoffman, L. J., Dickson, J. S., & Hank Harris, D. L. (2005). Proliferative enteropathy: a global enteric disease of pigs caused by *Lawsonia intracellularis*. *Animal Health Research Reviews*, 6(2), 173–197. <https://doi.org/10.1079/AHR2005109>
- Laemmli, U. K. (1970). Cleavage of Structural Proteins during the Assembly of the Head of

- Bacteriophage T4. *Nature*, 227(5259), 680–685. <https://doi.org/10.1038/227680a0>
- Lassaletta, L., Estellés, F., Beusen, A. H. W., Bouwman, L., Calvet, S., van Grinsven, H. J. M., ... Westhoek, H. (2019). Future global pig production systems according to the Shared Socioeconomic Pathways. *Science of the Total Environment*, 665, 739–751. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2019.02.079>
- Lawson, G. H., & Gebhart, C. J. (2000). Proliferative Enteropathy. *Journal of Comparative Pathology*, 122(2–3), 77–100. <https://doi.org/10.1053/JCPA.1999.0347>
- Li, Z., Yi, Y., Yin, X., Zhang, Z., & Liu, J. (2008). Expression of Foot-and-Mouth Disease Virus Capsid Proteins in Silkworm-Baculovirus Expression System and Its Utilization as a Subunit Vaccine. *PLoS ONE*, 3(5), e2273. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0002273>
- Machuca, M. A., Quiroga, M. A., Cappuccio, J. A., Barragán, A., Cáncer, J. L., & Perfumo, C. J. (2010). *Enteropatía proliferativa porcina asociada a enteritis granulomatosa en cerdos en confinamiento*. Retrieved from [http://www.produccionbovina.com.ar/produccion\\_porcina/00-X\\_congreso/56-enteropatia.pdf](http://www.produccionbovina.com.ar/produccion_porcina/00-X_congreso/56-enteropatia.pdf)
- Macintyre, N., Smith, D. G. E., Shaw, D. J., Thomson, J. R., & 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>
- McOrist, S., & Gebhart, C. J. (1999). Porcine proliferative enteropathies. *Diseases of Swine*, 8(Iowa State University Press), 521–534.
- McOrist, S., Gebhart, C. J., Boid, R., & 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., Gebhart, C. J., & Lawson, G. H. (1994). Polymerase chain reaction for diagnosis of porcine proliferative enteropathy. *Veterinary Microbiology*, 41(3), 205–212.

[https://doi.org/10.1016/0378-1135\(94\)90101-5](https://doi.org/10.1016/0378-1135(94)90101-5)

McOrist, S., Morgan, J., Veenhuizen, M. F., Lawrence, K., & Kroger, H. W. (1997). Oral administration of tylosin phosphate for treatment and prevention of proliferative enteropathy in pigs. *American Journal of Veterinary Research*, *58*(2), 136–139. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9028475>

McOrist, S., Smith, S. H., Shearn, M. F., Carr, M. M., Shearn, M. F., & Miller, D. J. (1996). Treatment and prevention of porcine proliferative enteropathy with oral tiamulin. *The Veterinary Record*, *139*(25), 615–618. <https://doi.org/10.1136/VR.139.25.615>

Merck Animal Health USA. (2019). Porcilis® Ileitis | Merck Animal Health USA. Retrieved June 15, 2019, from <https://www.merck-animal-health-usa.com/product/swine/Porcilis-Ileitis/2>

Montesino, R., Gutiérrez, N., Camacho, F., Farnós, O., Andrades, S., González, A., ... 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., ... 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., & Leite, L. C. (2012). Recombinant vaccines and the development of new vaccine strategies. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, *45*(12), 1102–1111. <https://doi.org/10.1590/S0100-879X2012007500142>

Nogueira, M. G., Collins, A. M., Dunlop, R. H., & 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. R., & Wilson, H. L. (2020, January 1). Immune response and protection against

- Lawsonia intracellularis infections in pigs. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 219, 109959. <https://doi.org/10.1016/j.vetimm.2019.109959>
- Oliveira, C., & Domingues, L. (2018). Guidelines to reach high-quality purified recombinant proteins. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 102(1), 81–92. <https://doi.org/10.1007/s00253-017-8623-8>
- Opriessnig, T., Karuppanan, A. K., Beckler, D., Ait-Ali, T., Cubas-Atienzar, A., & Halbur, P. G. (2019). Bacillus pumilus probiotic feed supplementation mitigates Lawsonia intracellularis shedding and lesions. *Veterinary Research*, 50(1), 1–11. <https://doi.org/10.1186/s13567-019-0696-1>
- Panda, A. K. (2003). Bioprocessing of therapeutic proteins from the inclusion bodies of Escherichia coli. In *Advances in biochemical engineering/biotechnology* (Vol. 85). [https://doi.org/10.1007/3-540-36466-8\\_3](https://doi.org/10.1007/3-540-36466-8_3)
- Peixoto, P. V., França, T. N., Ribeiro, C. T., Bezerra Jr, P. S., & Driemeier, D. (2008). Proliferative enteropathy (Lawsonia intracellularis) outbreak in rabbits in Brazil. *Pesquisa Veterinária Brasileira*, 28(10), 447–451. <https://doi.org/10.1590/S0100-736X2008001000001>
- Pérez, E. M. (2016). *Estudio clínico, anatomopatológico y de biología molecular de cuadros entéricos en cerdos de crecimiento y terminación* (Universidad Nacional de La Plata). Retrieved from <http://sedici.unlp.edu.ar/handle/10915/58536>
- Pozo, J., Collins, A. M., Rubio, P., & Love, R. J. (2000). Maternal immunity in Lawsonia intracellularis infection. *16th International Pig Veterinary Society Congress*, 17–21. Melbourne, Australia.
- Promdonkoy, B., Warit, S., & Panyim, S. (2004). Production of a biologically active growth hormone from giant catfish (Pangasianodon gigas) in Escherichia coli. *Biotechnology Letters*, 26(8), 649–653. <https://doi.org/10.1023/B:BILE.0000023024.27549.6d>



- Proyma Ganadera S. L. (2019). Enterisol® Ileitis oral | Proyma Ganadera S. L. Retrieved June 15, 2019, from <https://proymaganadera.com/content/enterisol-ileitis-oral-100-ml>
- QIAexpressionist. (2003). *A handbook for high-level expression and purification of 6xhis-tagged proteins* (Qiagen).
- Rabølle, M., & Spliid, N. H. (2000). Sorption and mobility of metronidazole, olaquinox, oxytetracycline and tylosin in soil. *Chemosphere*, *40*(7), 715–722. [https://doi.org/10.1016/S0045-6535\(99\)00442-7](https://doi.org/10.1016/S0045-6535(99)00442-7)
- Resende, T. P., Pereira, C. E. R., Gabardo, M. de P., Haddad, J. P. A., Lobato, Z. I. P., & Guedes, R. M. C. (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>
- Riber, U., Heegaard, P. M. H., Cordes, H., Ståhl, M., Jensen, T. K., & 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. H., Archibald, A. L., Ait-Ali, T., & 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>
- Roof, M., Kroll, J., & Gebhart, C. (2007). La inmunidad inducida por *Lawsonia*. Retrieved June 30, 2019, from 3tres3 - Comunidad Profesional Porcina website: [https://www.3tres3.com/articulos/la-inmunidad-inducida-por-lawsonia\\_4092/](https://www.3tres3.com/articulos/la-inmunidad-inducida-por-lawsonia_4092/)
- Rosano, G. L., Morales, E. S., & 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>

- Rubio Nistal, P., & Carvajal, A. (2007). Cuadro clínico de la ileítis. Retrieved June 23, 2019, from 3tres3 - Comunidad Profesional Porcina website: [https://www.3tres3.com/articulos/cuadro-clinico-de-la-ileitis\\_4088/](https://www.3tres3.com/articulos/cuadro-clinico-de-la-ileitis_4088/)
- Safarpour, H., Banadkoki, S. B., Keshavarzi, Z., Morowvat, M. H., Soleimanpour, M., Pourmolaei, S., & Shirazi, F. H. (2017). Expression analysis and ATR-FTIR characterization of the secondary structure of recombinant human TNF- $\alpha$  from Escherichia coli SHuffle® T7 Express and BL21 (DE3) cells. *International Journal of Biological Macromolecules*, 99, 173–178. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2017.02.052>
- Salazar, S., Montesino, R., & Ramos, T. (2020). *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*. Universidad de las Fuerzas Armadas - ESPE.
- Schettters, S. T., Jong, W. S., Kruijssen, L. J., van Saparoea, H. V. D. B., Engels, S., & Unger, W. (2020). Bacterial inclusion bodies function as vehicles for dendritic cell-mediated T cell responses. *Cellular & Molecular Immunology*, 17(4), 415–417. <https://doi.org/https://doi.org/10.1038/s41423-019-0298-x>
- Seras-Franzoso, J., Affentranger, R., Ferrer-Navarro, M., Daura, X., Villaverde, A., & García-Fruitósa, E. (2012). Disulfide bond formation and activation of Escherichia coli  $\beta$ -galactosidase under oxidizing conditions. *Applied and Environmental Microbiology*, 78(7), 2376–2385. <https://doi.org/10.1128/AEM.06923-11>
- Shrivastava, S. R., & 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. Retrieved from [www.jmedsoc.org/article.asp?issn=0972-4958;year=2018;volume=32;issue=1;spage=76;epage=77;aulast=Shrivastava](http://www.jmedsoc.org/article.asp?issn=0972-4958;year=2018;volume=32;issue=1;spage=76;epage=77;aulast=Shrivastava)

- Singhvi, P., Saneja, A., Srichandan, S., & Panda, A. K. (2020). Bacterial Inclusion Bodies: A Treasure Trove of Bioactive Proteins. *Trends in Biotechnology*, 38(5), 474–486.  
<https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2019.12.011>
- Smith, D. G., & Lawson, G. H. (2001). *Lawsonia intracellularis*: getting inside the pathogenesis of proliferative enteropathy. *Veterinary Microbiology*, 82(4), 331–345.  
[https://doi.org/10.1016/S0378-1135\(01\)00397-2](https://doi.org/10.1016/S0378-1135(01)00397-2)
- Son, Y. J., Phue, J. N., Trinh, L. B., Lee, S. J., & Shiloach, J. (2011). The role of Cra in regulating acetate excretion and osmotic tolerance in *E. coli* K-12 and *E. coli* B at high density growth. *Microbial Cell Factories*, 10. <https://doi.org/10.1186/1475-2859-10-52>
- Tartoff, K., & Hobbs, C. (1987). Improved media for growing plasmid and cosmid clones. *Bethesda Res Lab Focus*, 9–12.
- Thomas, S., & Luxon, B. A. (2013). Vaccines based on structure-based design provide protection against infectious diseases. *Expert Review of Vaccines*, Vol. 12, pp. 1301–1311.  
<https://doi.org/10.1586/14760584.2013.840092>
- 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>
- Umetsu, M., Tsumoto, K., Nitta, S., Adschiri, T., Ejima, D., Arakawa, T., & Kumagai, I. (2005). Nondenaturing solubilization of  $\beta$ 2 microglobulin from inclusion bodies by L-arginine. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 328(1), 189–197.  
<https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2004.12.156>
- Unzueta, U., Cespedes, M. V., Sala, R., Alamo, P., Sánchez-Chardi, A., Pesarrodonna, M., ... Seras-Franzoso, J. (2018). Release of targeted protein nanoparticles from functional bacterial amyloids: A death star-like approach. *Journal of Controlled Release*, 279, 29–39.  
<https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2018.04.004>
- Vannucci, F. A., Gebhart, C. J., & McOrist, S. (2019). Proliferative Enteropathy. In *Diseases of*

*Swine* (pp. 898–911). <https://doi.org/10.1002/9781119350927.ch58>

Visscher, C., Mischok, J., Sander, S., Verspohl, J., Peitzmeier, E.-U., von dem Busche, I., & Kamphues, J. (2018). Spread of an Experimental Salmonella Derby Infection in Antibiotic-Treated or *Lawsonia intracellularis* Vaccinated Piglets. *Animals*, *8*(11), 206.

<https://doi.org/10.3390/ani8110206>

Wedrychowicz, H., Kesik, M., Kaliniak, M., Kozak-Cieszczyk, M., Jedlina-Panasiuk, L., Jaros, S., & Plucienniczak, A. (2007). Vaccine potential of inclusion bodies containing cysteine proteinase of *Fasciola hepatica* in calves and lambs experimentally challenged with metacercariae of the fluke. *Veterinary Parasitology*, *147*(1–2), 77–88.

<https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2007.03.023>

Widdel, F. (2010). Theory and Measurement of Bacterial Growth. *Bremen: University Bremen*.

Yoon, S. H., Jeong, H., Kwon, S. K., & Kim, J. F. (2009). Genomics, biological features, and biotechnological applications of *Escherichia coli* B: Is B for better? In *Systems Biology and Biotechnology of Escherichia coli* (pp. 1–17). [https://doi.org/10.1007/978-1-4020-9394-4\\_1](https://doi.org/10.1007/978-1-4020-9394-4_1)

Zhuravko, A. S., Kononova, N. V., & Bobruskin, A. I. (2015). Features of the solubilization of interferon beta-1B from inclusion bodies. *Russian Journal of Bioorganic Chemistry*, *41*(4), 357–363. <https://doi.org/10.1134/S1068162015040159>

Zumba, L. (2018, July 30). El cerdo se gana la confianza del país. *Expreso*, p. 1. Retrieved from <https://www.expreso.ec/economia/economia-cerdos-carne-consumo-dinero-XA2301066>