

UNIVERSIDAD DE CONCEPCIÓN
FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES Y OCEANOGRÁFICAS
BIOLOGÍA



**ESTUDIO DE LA POTENCIA INMUNOGENICA DE ANTÍGENOS RECOMBINANTES
DE *LAWSONIA INTRACELLULARIS* EN MODELO “IN VIVO”.**

PAULA SOLANGE CAMPOS MARTÍNEZ

SEMINARIO DE TÍTULO PARA OPTAR AL TÍTULO DE BIÓLOGO

CONCEPCIÓN-CHILE

MARZO, 2023.

Universidad de Concepción

Facultad de Ciencias Naturales y Oceanográficas

Este Seminario de Título ha sido realizado en el Laboratorio de Biotecnología y Biofármacos, laboratorio de Investigación del Departamento de Fisiopatología de la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad de Concepción.

Profesora guía

Dra. Raquel Montesino Seguí

Universidad de Concepción

Concepción

Profesores evaluadores

Dra. Jannel Acosta Alba

Universidad de Concepción

Concepción

Dra. María Francisca Starck

Universidad de Concepción

Concepción

Coordinador seminario de título

Dr. Víctor Hernández Santander

Universidad de Concepción

Concepción

DEDICATORIA

Dedicada principalmente a mi abuelita Delicia Pino y tía Karina Martínez que yacen en el Santo Reino Celestial. A mi hijo Ithiel Oporto por ser mi motor motivacional en la última fase de mi tesis y a mi familia, quienes siempre creyeron en mí.

Paula Solange Campos Martínez

AGRADECIMIENTOS

Agradezco primeramente a Dios por permitir la oportunidad de llegar al laboratorio de Biotecnología y Biofármacos de la Universidad de Concepción a realizar mi trabajo de investigación y tesis.

Agradezco a la Doctora Raquel Montesino por guiarme en cada nuevo desafío que me proponía, por motivarme, aconsejarme y hacerme sentir cómoda en todo momento. Me guio durante mis últimos dos años de carrera de Biología, me brindó confianza y me dio la posibilidad de ser parte del proyecto que estaba trabajando.

A María Francisca Starck por ser un apoyo incondicional en mi embarazo, me escuchó, me ayudó, me guio, me aconsejó y me entendió.

A mi amiga y compañera de Carrera Constanza Díaz por su apoyo en los largos años que duró la carrera, por llorar juntas, reír juntas, nuestros días enteros en la biblioteca haciendo informes y darme una palabra de aliento cuándo los problemas me abrumaban.

Finalmente, no puedo dejar de pasar la oportunidad de agradecer a mi familia, por creer en mí y ser mi motor durante todos estos años, en especial a mi padre Pablo Campos que se esforzó año tras año para ser esto posible.

ÍNDICE DE CONTENIDOS

RESUMEN	9
ABSTRACT	10
1. INTRODUCCIÓN	11
Lawsonia intracellularis	11
Enteropatía proliferativa	11
Patogénesis	12
Vacunas para prevenir la enteropatía proliferativa	12
Vacunas recombinantes	12
2. HIPÓTESIS DE TRABAJO	14
3. OBJETIVOS	14
3.1 Objetivo general	14
3.2 Objetivos específicos	14
4. METODOLOGÍA	15
4.1. Establecimiento del inóculo	15
4.2. Inoculación del fermentador	15
4.3. Crecimiento celular y determinación de biomasa seca	15
4.4. Monitoreo de las condiciones de crecimiento en fermentador y alimentación del cultivo .	15
4.5. Inducción de la expresión de los antígenos recombinantes	16
4.6. Ruptura celular en homogeneizador	16
4.7. Visualización de la expresión de proteínas mediante electroforesis en geles de poliacrilamida (SDS-PAGE)	16
4.8. Ensayo de inmunodetección (Western blot)	16
4.9. Análisis de pureza y concentración de los cuerpos de inclusión	16
4.10. Formulación y envasado del candidato vacunal	17
4.11. Calidad del emulsionado	17
4.12. Calidad microbiológica	17
4.13. Análisis de los antígenos en la emulsión	17
4.14. Inmunización con antígenos recombinantes	17
4.15. Caracterización de la respuesta inmune humoral de anticuerpo IgG totales mediante ELISA indirecto	18
4.16. Análisis estadístico	19
5. RESULTADOS	20
5.1 Crecimiento celular y expresión de los antígenos recombinantes.	20
5.1.1 Crecimiento celular en fermentador de 10 L.	20
5.2. Ruptura celular y aislamiento de antígenos	20

5.2.1. Ruptura celular	20
5.3 Purificación de cuerpos de inclusión.....	20
5.4 Determinación de la concentración y nivel de pureza de los antígenos.....	21
5.4.1 Cuantificación de antígenos y pureza	21
5.5. Ensayos de estabilidad de los antígenos	22
5.6 Establecimiento de las condiciones de emulsión.....	22
5.7 Análisis de antígenos en la emulsión	23
5.7.1 Análisis de los antígenos a los tres y seis meses de preparado el candidato vacunal. ...	24
5.8 Calidad microbiológica	25
5.9 Variación del peso en ratones en el primer y segundo ensayo de inmunización con el candidato vacunal.	26
5.9 Evaluación de la potencia inmunológica mediante ensayo inmunoenzimático (ELISA).	26
6. DISCUSIÓN.....	28
7. CONCLUSIÓN	31
8. SUGERENCIAS	31
9. BIBLIOGRAFÍA	32

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Esquema de inmunización en ratones.	18
Figura 2. Curva de crecimiento de la bacteria E. coli, fermentación Law2110 e inducción del antígeno OMP2.	20
Figura 3. Análisis mediante SDS-PAGE al 12,5% del aislamiento de los cuerpos de inclusión.	21
Figura 4. Análisis de la concentración de los antígenos OMP2, OMP1 e INVASc en SDS-PAGE al 12,5%.....	21
Figura 5. Análisis mediante SDS-PAGE al 12,5% de la mezcla de los antígenos INVASc, OMP1 y OMP2.....	22
Figura 6. Premezcla de las fases acuosa y oleosa previo a la emulsión.	23
Figura 7. Análisis mediante SDS-PAGE al 12,5 de los antígenos en la formulación vacunal.	24
Figura 8. Análisis mediante SDS-PAGE de los antígenos de L. intracellularis en la emulsión a los tres (izquierda) y seis meses (derecha) de preparada la formulación. Línea 1 patrón de peso molecular; línea 2, 3, 10 uL y 15 uL de los cuerpos de inclusión extraídos de la emulsión.	24
Figura 9. Ensayo de calidad microbiológica de los antígenos. (A) medio Agar Triptona Soja sin diluir; (B) Medio Agar Triptona Soja dilución 1/10; C: Medio Agar Potatoe Dextrosa dilución 1/10.	25
Figura 10. Calidad microbiológica de los antígenos en medio Caldo Tioglicolato.....	25
Figura 11. Promedio de peso de los ratones correspondientes al grupo control e inmunizado del primer (izquierda) y segundo (derecha) ensayo de inmunización con el candidato vacunal.	26
Figura 12. Curso temporal de la respuesta inmune humoral de anticuerpos IgG totales en ratones inmunizados con la formulación vacunal conservada a 4°C durante distintos tiempos. A, B) Curso temporal de anticuerpos IgG totales en ratones inmunizados con las formulaciones de tres y seis meses de conservación a 4°C. Se representa la media y el error estadístico. *** < 0,001; **** < 0,0001.	27

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1: Comparación de la concentración de los antígenos al tiempo 0 y tiempo de 30 días.....	22
Tabla 2: Comparación de los ensayos de emulsión realizando la pre-mezcla fase acuosa:fase oleosa.....	23

RESUMEN

La enteropatía proliferativa porcina (EPP) es una enfermedad infecciosa transmisible que ocasiona grandes pérdidas económicas en las granjas de cerdos a nivel mundial. El agente etiológico responsable de la EPP es la bacteria *Lawsonia intracellularis*, un organismo intracelular obligado que fue identificado en 1995. Esta enfermedad se caracteriza por provocar problemas diarreicos, aumento del índice de conversión alimentaria y disminución de las tasas de reproducción. Actualmente la vacuna es el principal medio para controlar esta enfermedad, sin embargo, las vacunas convencionales basadas en la bacteria atenuada o inactivada no permite el uso habitual de antibióticos para el control de otras infecciones, además de ser difícil de obtener por las exigentes condiciones de cultivo bacteriano. El desarrollo de una vacuna recombinante contra la bacteria *Lawsonia intracellularis*, permitirá controlar dicha infección y además co-administrar antibióticos, en caso necesario.

La hipótesis planteada postula que “Los antígenos recombinantes *contra Lawsonia intracellularis* producidos como cuerpos de inclusión generan una respuesta inmunológica significativa en los animales inmunizados”. Para aceptar o rechazar la hipótesis se han propuesto tres objetivos específicos, 1) producir antígenos recombinantes *contra Lawsonia intracellularis*; 2) obtener la formulación vacunal y 3) determinar la potencia inmunológica en el tiempo de la formulación vacunal. Los resultados obtenidos en esta investigación mostraron que la formulación vacunal es estable en el tiempo por al menos 6 meses conservada a 4°C.

Palabras claves:

- Enteropatía proliferativa porcina
- *Lawsonia intracellularis*
- Cuerpos de inclusión
- Antígenos recombinantes

ABSTRACT

Porcine proliferative enteropathy (PPE) is a transmissible infectious disease that causes great economic losses in pig farms worldwide. The etiologic agent responsible for PPE is the *Lawsonia intracellularis* bacterium, an obligate intracellular organism that was identified in 1995. This disease is characterized by causing diarrheal problems, increased food conversion ratio, and decreased reproductive rates. Currently, the vaccine is the main way to control this disease, however, conventional vaccines based on attenuated or inactivated bacteria do not allow the regular use of antibiotics to control other infections, in addition to being difficult to obtain due to the demanding conditions of bacterial culture. The development of a recombinant vaccine against the *Lawsonia intracellularis* bacterium will make it possible to control this infection and also to administer antibiotics, if necessary.

The proposed hypothesis postulates that "Recombinant antigens against *Lawsonia intracellularis* produced as inclusion bodies generate a significant immune response in immunized animals." To accept or reject the hypothesis, three specific objectives have been proposed: 1) to produce recombinant antigens against *Lawsonia intracellularis*; 2) obtain the vaccine formulation and 3) determine the immunological potency over time of the vaccine formulation. The results obtained in this investigation showed that the vaccine formulation is stable over time for at least 6 months when stored at 4°C.

1. INTRODUCCIÓN

Lawsonia intracellularis

La bacteria intracelular obligada, *Lawsonia intracellularis* pertenece a la familia Desulfovibrionaceae (McOrist et al.1995). Esta bacteria puede ser pleomórfica en el cultivo *in vitro* que generalmente aparece como un bacilo curvado o de forma sigmoide, no mótil, con un tamaño que oscila entre 1.25 y 1.75 μm de largo por 0.5 a 1.5 μm de ancho. La bacteria posee un genoma único y tres plásmidos, con un total de 1,72 millones de pb y 1.324 regiones codificantes de proteínas (Vanucci, et al. 2019a).

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). La infección por *L. intracellularis* ocasiona pérdidas económicas significativas en la industria porcina debido a la ocurrencia de diarreas intermitentes, aumento del índice de conversión alimentaria (Kg de alimento/Kg de peso) hasta un 50 %, y reducción del peso promedio, en comparación con los cerdos no afectados (Montesino et al., 2019; Peixoto et al., 2008).

Enteropatía proliferativa

La enteropatía proliferativa Porcina (EPP) o Ileítis Porcina es una enfermedad infecciosa bacteriana causada por *L. intracellularis* (McOrist et al., 1995). Esta enfermedad se considera endémica de cerdos (Vannucci & Gebhart, 2014) que 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 (Peixoto, França, Ribeiro, Bezerra Jr, & Driemeier, 2008). Actualmente se conocen cuatro formas anatomopatológicas de EPP: 1) Adenomatosis intestinal porcina (AIP); 2) Enteritis necrótica (EN); 3) Ileítis regional (IR) y 4) Enteropatía proliferativa hemorrágica (EPH) (Rowland & Lawson, 1995). La Adenomatosis intestinal porcina, de curso crónico, sucede principalmente en cerdos de 6 a 20 semanas de edad; en tanto que la Enteropatía proliferativa hemorrágica de curso agudo afecta principalmente a cerdos de 4-12 semanas. La primera, AIP suele desarrollarse sin complicaciones, con la recuperación de la mayoría de los animales y con una mortalidad baja, excepto que se presenten infecciones secundarias. En estos casos los animales presentan lesiones más graves y alta mortalidad (Lawson & Gebhart, 2000).

Patogénesis

La enteropatía proliferativa puede producirse mediante la exposición de cerdos receptivos a *L. intracellularis* o a la mucosa afectada que contiene esta bacteria intracelular (Vanucci *et al.*, 2019b). Los estudios realizados *in vivo* e *in vitro* han aclarado algunos de las primeras etapas que se producen en la interacción entre bacteria y la célula hospedadora (McOrist *et al.*, 2005). Las bacterias se unen a la membrana de la célula y penetran rápidamente en el enterocito mediante una vacuola endocítica. No se han identificado adhesinas o receptores específicos, pero *L. intracellularis* podría poseer un sistema de secreción de tipo III. La vacuola endocítica se rompe rápidamente en un plazo de 3 horas y la bacteria crece y se multiplica en el citoplasma de los enterocitos de forma libre, sin unirse a la membrana. La infección depende de la viabilidad bacteriana, es decir, se trata de un tipo de fagocitosis inducida (Lawson *et al.*, 1993).

Vacunas para prevenir la enteropatía proliferativa

Las altas pérdidas económicas asociadas a la infección por *L. intracellularis* han sido fundamental para el desarrollo de vacunas (Karuppannan & Opriessnig, 2018; Shrivastava & Ramasamy, 2018). Las vacunas comerciales que existen actualmente se basan en la bacteria viva atenuada o inactivada (Riber *et al.*, 2015). 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 tres días antes y después de la vacunación (Karuppannan & Opriessnig, 2018; Proyma Ganadera S. L., 2019). Mientras la vacuna inactivada (Porcilis® Ileitis), intramuscular, no necesita de una ventana donde no se administre antibiótico (Karuppannan & Opriessnig, 2018; Merck Animal Health USA, 2019). Sin embargo, la producción de ambas vacunas requiere del cultivo de la bacteria, proceso altamente complejo y de alto riesgo (Jansen, Weersink, von Massow, & Poljak, 2019). Actualmente no existen vacunas recombinantes para prevenir la enteropatía proliferativa, pero se sabe que la identificación de genes implicados en la patogenicidad de la bacteria, podrían formar parte del principio activo de una vacuna eficaz (Kroll *et al.*, 2005).

Vacunas recombinantes

Las vacunas recombinantes constituyen una alternativa a la fabricación de vacunas en base al cultivo del patógeno. A diferencia de las vacunas convencionales, las vacunas recombinantes, poseen una fabricación rápida, simple y segura. Además, no presentan riesgo 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 (INVASc) de la bacteria *L. intracellularis* para combatir la enteropatía proliferativa.

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

Un hito que marcó la investigación hacia el desarrollo de una vacuna recombinante contra *L. intracellularis* fue el conocimiento del genoma de la bacteria (Li et al., 2017; Mirajkar et al., 2017). Existen grupos de investigación que han identificado proteínas de *L. intracellularis* como potenciales antígenos vacunales (Obradovic et al., 2019). Un grupo de investigadores del laboratorio de Biotecnología y Biofármacos, de la Universidad de Concepción recientemente diseñó un candidato vacunal multiepitope basado en tres proteínas del patógeno. Estas proteínas fueron ingenierizadas para aumentar la potencialidad antigénica mediante la inclusión de epítopes T en regiones específicas. Las secuencias codificantes para las tres proteínas quiméricas se expresaron en la bacteria de *E. coli* Shuffle T7 y demostraron protección en un ensayo de inmunización y reto en cerdos (Montesino et al., 2019). Una particularidad de la investigación fue que los antígenos que componen el candidato vacunal se obtuvieron y mostraron su actividad biológica en forma de cuerpos de inclusión (CI).

Los cuerpos de inclusión son nanomateriales naturales que se forman durante el proceso de producción de proteínas recombinantes. En la última década se ha demostrado extensivamente que los CI son nanopartículas de proteínas con alto potencial en las industrias biotecnológica y biomédica, específicamente en biocatálisis, diagnóstico, ingeniería de tejidos y administración de fármacos (de Marco et al., 2019; Garcia-Fruitos et al., 2012; Villaverde et al., 2015). La producción de los CI tiene varias ventajas, tales como: altos niveles de producción, pureza del producto de interés de hasta 95% dentro del CI, alta estabilidad mecánica y térmica, biocompatibilidad, baja toxicidad y relativa resistencia a proteasas.

Teniendo en cuenta lo anterior nuestro trabajo propone la siguiente Hipótesis:

2. HIPÓTESIS DE TRABAJO

La formulación oleosa de antígenos recombinantes contra *L. intracellularis* producidos como cuerpos de inclusión es estable en el tiempo por al menos 6 meses conservada a 4°C.

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo general

Evaluar la potencia inmunológica de la formulación vacunal contra *L. intracellularis* en ratones durante 6 meses.

3.2 Objetivos específicos

1. Producir antígenos recombinantes en fermentador a escala de laboratorio (2L).
 - 1.1. Cultivo de la bacteria para la producción de los antígenos.
 - 1.2. Ruptura celular y purificación de los antígenos.
 - 1.3. Determinación de la concentración de los antígenos y el nivel de pureza.
 - 1.4. Determinación de la calidad microbiológica.
2. Obtener la formulación vacunal, agua en aceite, que contienen los antígenos como cuerpos de inclusión.
 - 2.1. Establecimiento de las condiciones de emulsión.
 - 2.2. Determinación de la calidad de la emulsión.
3. Determinar la potencia inmunológica en el tiempo de la formulación vacunal.
 - 3.1. Inmunización de ratones con la formulación vacunal y con proteína negativa de *E. coli* (grupo control).
 - 3.2. Evaluación de la respuesta IgG mediante ensayo ELISA.

4. METODOLOGÍA

4.1. Establecimiento del inóculo

Preinóculo. El preinóculo se preparó en 2 tubos falcon de 50 mL que contiene 10 mL de medio de cultivo Luria Bertani (LB) y ampicilina a una concentración de 100 ug/mL (LBA). Los tubos se inocularon con 100 uL de un stock de glicerol de *E. coli* SHuffle T7 (New England Biolabs, Reino Unido) transformada con plásmido pLawVac (Montesino *et al.*, 2019), proveniente del banco de células de trabajo del laboratorio de Fisiopatología de la Universidad de Concepción. El preinóculo se incubó a 37°C en agitación constante a 150 rpm durante 10 horas.

Inóculos. Cuatro matraces erlenmeyer que contenían 250 mL de LBA cada uno, se inocularon con 2,5 mL del preinóculo. Los matraces se incubaron a 37°C en agitación constantes a 150 rpm durante 10 horas.

4.2. Inoculación del fermentador

Los cuatro matraces de 250 mL de inóculo de 10 horas de cultivo se utilizaron para inocular el fermentador. Las condiciones iniciales de fermentación fueron temperatura de 37°C, agitación a 200 rpm y pH de 7,0.

4.3. Crecimiento celular y determinación de biomasa seca

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

4.4. Monitoreo de las condiciones de crecimiento en fermentador y alimentación del cultivo

Durante la fermentación se monitoreó las condiciones de crecimiento. El oxígeno disuelto se controló variando la agitación del cultivo para que permaneciera sobre el 20%. El ajuste de pH a 7,0 se realizó mediante adición de 25% (v/v) NH₃OH o 20% (v/v) H₃PO₄.

La alimentación del cultivo se realizó a las 6 horas de crecimiento con la adición de una solución estéril de extracto de levadura (176 g/L) y glicerol (221 mL/L), mediante flujo constante de 5 mL/min, durante 2 horas.

4.5. Inducción de la expresión de los antígenos recombinantes

La inducción se realizó añadiendo una concentración final de 0,75 mM de isopropil-B-D-1-tiogalactopiranosido (IPTG) al cultivo a las 8 horas cuando la concentración de biomasa seca fuese cercana a 11 g/L.

4.6. Ruptura celular en homogeneizador

El cultivo se centrifugó a 4400 G por 20 minutos a 4°C. El sobrenadante se descartó y el pellet se resuspendió en un volumen de buffer de ruptura 1 (Tris HCL 50 mM, NaCl 300 mM, EDTA 5 mM a pH 7,0) a una concentración final de 20 g/L. La ruptura celular se llevó a cabo en un homogeneizador de presión EmulsiFlex-C5 a 12000 psi y a un flujo de 40 mL/min. Se realizaron 6 pases y se diluyó en la misma solución Tampón hasta una concentración final de 10g/L. Posterior se centrifugó la muestra a 4342 G por 20 minutos. El sobrenadante se recolectó y guardó a -20°C. El pellet se resuspendió en buffer PBS. Las muestras del sobrenadante y pellet de ruptura se analizaron mediante SDS-PAGE y Western blot.

4.7. Visualización de la expresión de proteínas mediante electroforesis en geles de poliacrilamida (SDS-PAGE)

La expresión de los antígenos se analizó mediante electroforesis SDS-PAGE en geles de poliacrilamida al 12% 1,5 mm de espesor. La electroforesis se corrió a 110V durante 15 minutos y posteriormente a 150V durante 1.45 horas. Las bandas de proteínas se visualizaron mediante tinción con azul de Coomassie durante 1 hora que luego con una solución de distinción (20% metanol, 10% ácido acético) se procedió a desteñir. El gel se escaneó por el sistema de imágenes Odyssey.

4.8. Ensayo de inmunodetección (Western blot)

Las proteínas se transfirieron del gel de poliacrilamida a una membrana de nitrocelulosa utilizando un aparato de transferencia semiseco. La membrana se bloqueó con 5% de leche descremada en TBS durante toda la noche a 4°C y agitación constante. Las proteínas se inmuno-detectaron con el anticuerpo monoclonal anti-Histidina producido en ratón (Clontech, USA) diluido 1:5000; posteriormente la membrana se incubó con el anticuerpo secundario anti-ratón Alexa fluor 680 producidos en cabras (Jackson InmunoReseach, USA) diluido 1:10.000. Las proteínas se visualizarán con el sistema de imágenes Odyssey.

4.9. Análisis de pureza y concentración de los cuerpos de inclusión

La pureza y concentración de los cuerpos de inclusión se analizaron mediante densitometría de los geles teñidos con una solución de azul de coomassie R250 al 0.25%. La pureza se estimó comparando la intensidad de las proteínas de interés con las proteínas

totales. La concentración se determinó usando BSA como estándar. Ambos análisis se visualizaron mediante el sistema de imágenes Odyssey.

4.10. Formulación y envasado del candidato vacunal

La solución de antígenos se mezcló con el adyuvante oleoso Montanide ISA 660 VG en una relación 60:40 respectivamente. La mezcla se agitó en el homogeneizador a 5000 rpm a 4°C en 4 intervalos de 1 minuto de mezclado y 1 minuto de descanso. La formulación se envasó en frascos de 50 mL de polipropileno de alta densidad, sellados con tapón de caucho:nitrilo y retapa de aluminio con cierre Flip-off.

4.11. Calidad del emulsionado

La estabilidad mecánica se calculó midiendo la diferencia de altura de la fase emulsionada antes y después (Hu/Ho) de centrifugar la emulsión a 1512 g a temperatura ambiente por 1 hora en rotor de ángulo libre. Se considera estable si Hu/Ho es mayor o igual a 0,7, sin separación de fases.

4.12. Calidad microbiológica

La calidad microbiológica se evaluó a partir del crecimiento en diferentes medios de cultivos: Agar potato dextrose (PDA), AgarTryptona-soya (ATS) y CaldoTioglicolato (CT). Tubos Falcon que contenían 30 mL de CT, se inocularon con 1 mL de la preparación vacunal, y se incubaron a 25°C por 21 días. Adicionalmente, placas con 20 mL de medio ATS y PDA se inocularon con 100 uL de la preparación vacunal y se incubaron a 25°C y 30°C por 7 días. Se realizaron observaciones diarias para detectar el crecimiento de microorganismos. Todos los cultivos se realizaron en duplicado.

4.13. Análisis de los antígenos en la emulsión

El análisis de los antígenos en la emulsión se realizó en geles de poliacrilamida al 12,5%. La emulsión se rompió añadiendo alcohol bencílico al 10%. La muestra se agitó fuertemente durante 20 minutos (vórtex) a temperatura ambiente y se centrifugó por 10 minutos a 16.100 G.

4.14. Inmunización con antígenos recombinantes

Los ensayos con animales se realizaron en las instalaciones de la Facultad de Ciencias Biológicas siguiendo los protocolos de cuidado y uso de animales de experimentación, aprobados por el Comité de Bioética de la Universidad de Concepción. Se utilizaron ratones hembra C57BL6 de 6 semanas que se adquirieron del Instituto Nacional de Salud Pública (ISP). El bioterio cuenta con condiciones de ciclo de luz, ventilación, control de temperatura y humedad e higienización sistemática. El experimento se realizó con dos grupos de 10 ratones cada uno. Grupo 1: control negativo, formulación con lisado de bacteria sin

transformar; Grupo 2: Dosis equivalente a 250 uL de la formulación por vía subcutánea siguiendo un esquema de inmunización de 0 a 21 días (Figura 1). Las extracciones de sangre se realizaron por la vena safena lateral semanalmente hasta la semana seis y el suero se guardó a -20°C hasta su evaluación. Los ratones se pesaron semanalmente en una balanza Nex KS1561.

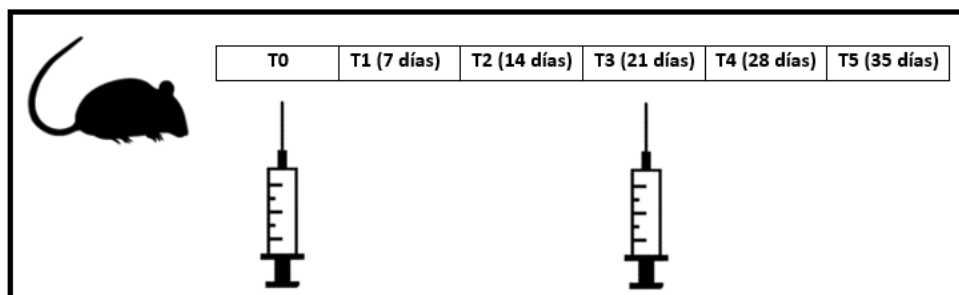


Figura 1. Esquema de inmunización en ratones.

4.15. Caracterización de la respuesta inmune humoral de anticuerpo IgG totales mediante ELISA indirecto

La respuesta humoral se evaluó mediante ensayo de inmunoabsorción ligado a enzima (enzyme-linked immunosorbent assay; ELISA) indirecto. Los antígenos OMP1, OMP2 e INVASc como cuerpos de inclusión fueron solubilizados en Urea 8M con agitación a 37°C durante 1 hora, a una concentración de 5 ug/mL de cada uno. Se recubrieron placas de 96 pocillos de alta unión a proteínas Costar® High-Binding (Corning, EE.UU.) con 100 uL/pocillo de los antígenos solubilizados, durante toda la noche a 4°C en cámara húmeda. Al día siguiente, los pocillos se bloquearon con 200 uL/pocillo de leche descremada al 3% diluida en PBS 1X, durante 2 horas a 37°C en cámara húmeda. Durante este tiempo, se realizó la liberación de los sueros. Para esto, se prepararon diluciones 1 en 100 de cada suero con proteínas de *E. coli* negativa en 50% v/v en leche descremada 1% disuelta en PBS 1X – Tween 20 0.05%, manteniéndolos en agitación a 37°C durante 1 hora. Pasado este tiempo, los sueros fueron centrifugados a 12.000 rpm durante 10 minutos y se traspasó el sobrenadante en tubos eppendorf limpios y rotulados. Luego del bloqueo, los pocillos se lavaron una vez con 200 uL/pocillo de solución de lavado (PBS 1X - Tween 20 0.05%), golpeándola a continuación contra papel absorbente cuidadosamente para secar los pocillos. Se añadieron 100 uL/pocillo de los sueros liberados a una dilución 1 en 100, y la placa se incubó por 1 hora a 37 °C en cámara húmeda. Posteriormente, los pocillos se lavaron 2 veces con solución de lavado como se describe anteriormente, y se añadió como anticuerpo secundario anti-IgG de ratón conjugado con HRP (Abcam, U.K.) a una dilución de 1 en 30.000 en leche 1% en PBS 1X - Tween 20 0.05%. La placa se incubó nuevamente durante 1 hora a 37°C en cámara húmeda. En seguida, los pocillos se lavaron según lo descrito previamente 3 veces con solución de lavado y se añadió 100 uL/pocillo de solución

sustrato (OPD (o-Phenylenediamine dihydrochloride) 0,04% p/v + peróxido de hidrógeno (30%) 0,04% v/v en tampón citrato pH 4,5), y se incubó a temperatura ambiente en oscuridad por 15 minutos. Finalmente, para detener la reacción se añadió 50 uL/pocillo de H₂SO₄ 2 M. La señal desarrollada se midió a una longitud de onda de 492 nm, en un lector de microplacas Synergy HTX Multi-Mode Reader.

4.16. Análisis estadístico

Los análisis estadísticos se realizaron utilizando el *software* GraphPad Prism versión 6.00 para MacOS (GraphPad Software, La Jolla California USA, www.graphpad.com). Para la comparación entre los grupos control y experimental de los resultados de ELISA se aplicó test ANOVA de dos vías de medidas repetidas, seguido de corrección de Bonferroni para múltiples comparaciones.

5. RESULTADOS

5.1 Crecimiento celular y expresión de los antígenos recombinantes.

5.1.1 Crecimiento celular en fermentador de 10 L.

El cultivo celular para la obtención de los antígenos recombinantes fue realizado siguiendo el mismo esquema de crecimiento e inducción. Los cultivos realizados en fermentador de 10 L mostraron que la bacteria creció en fase exponencial las primeras 6 horas, donde se realizó la inducción (0,75 mM) de los antígenos. Posterior a ese tiempo se observó una disminución de la velocidad de crecimiento celular. La figura 2 (tabla 1) muestra el crecimiento de los uno de los antígenos (OMP2c) que componen el candidato vacunal. El mismo esquema de crecimiento e inducción se realizó para los tres antígenos, por tanto, el rendimiento de antígeno y biomasa fueron similares.

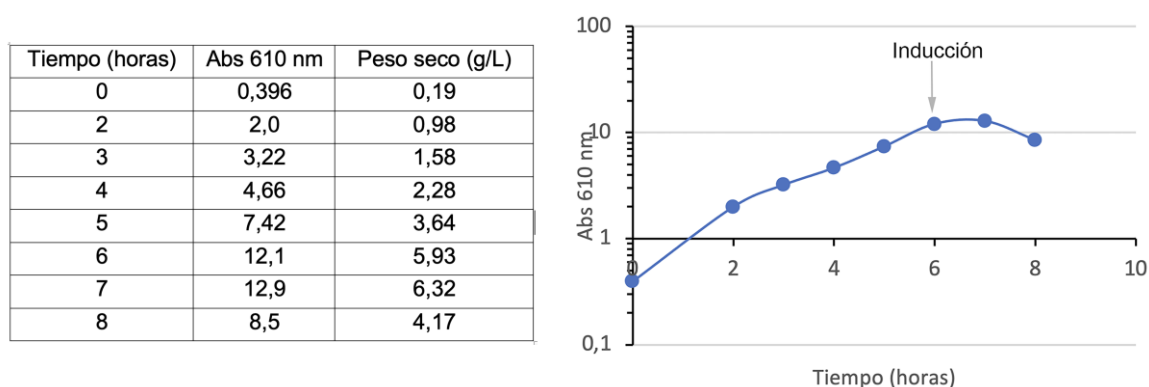


Figura 2. Curva de crecimiento de la bacteria *E. coli*, fermentación Law2110 e inducción del antígeno OMP2.

5.2. Ruptura celular y aislamiento de antígenos

5.2.1. Ruptura celular

A las 8 horas del cultivo, la biomasa se cosechó y se resuspendió en buffer de ruptura para extraer los antígenos como cuerpos de inclusión, utilizando un homogeneizador de presión EmulsiFlex-C5. Las mejores condiciones de ruptura celular se obtuvieron luego de seis pases a 12.000 psi y a un flujo de 20 g/L.

5.3 Purificación de cuerpos de inclusión

Los cuerpos de inclusión obtenidos se evaluaron mediante SDS-PAGE luego de lavados con dos soluciones tampón para eliminar contaminantes como lípidos, ADN y proteínas de membrana (Figura 3). La primera solución que se utilizó fue con NaCl 1M y el segundo lavado se realizó con buffer Na_2HPO_4 pH 12,0. En el primer lavado se mostró que no aumentó significativamente la pureza de los antígenos, en cambio, al aplicar el segundo lavado con Na_2HPO_4 pH 12, se logró aumentar significativamente la pureza alcanzando valores superiores al 62% (Figura 3).

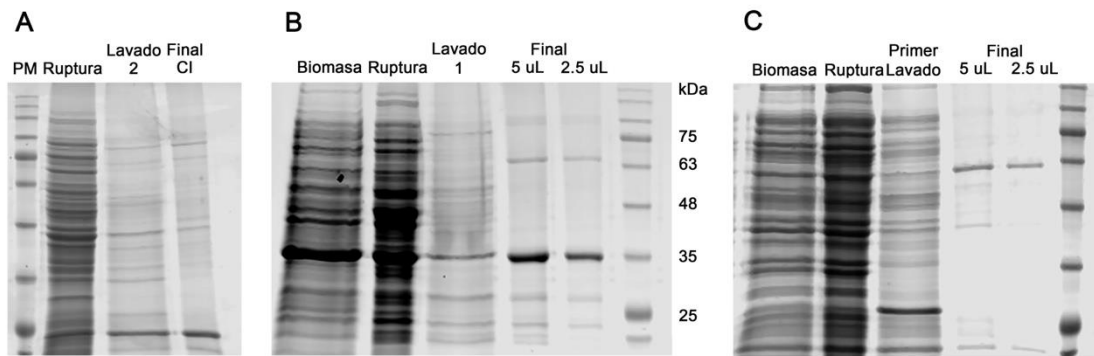


Figura 3. Análisis mediante SDS-PAGE al 12,5% del aislamiento de los cuerpos de inclusión.

5.4 Determinación de la concentración y nivel de pureza de los antígenos.

5.4.1 Cuantificación de antígenos y pureza

La cuantificación de los antígenos se realizó utilizando una curva de BSA como estándar. Las concentraciones se calcularon mediante el programa Image Studio. Los resultados demostraron que los tres antígenos estaban en concentraciones similares (Figura 4). Esta información se consideró para hacer la mezcla que se utilizaría para la preparación de la formulación vacunal.

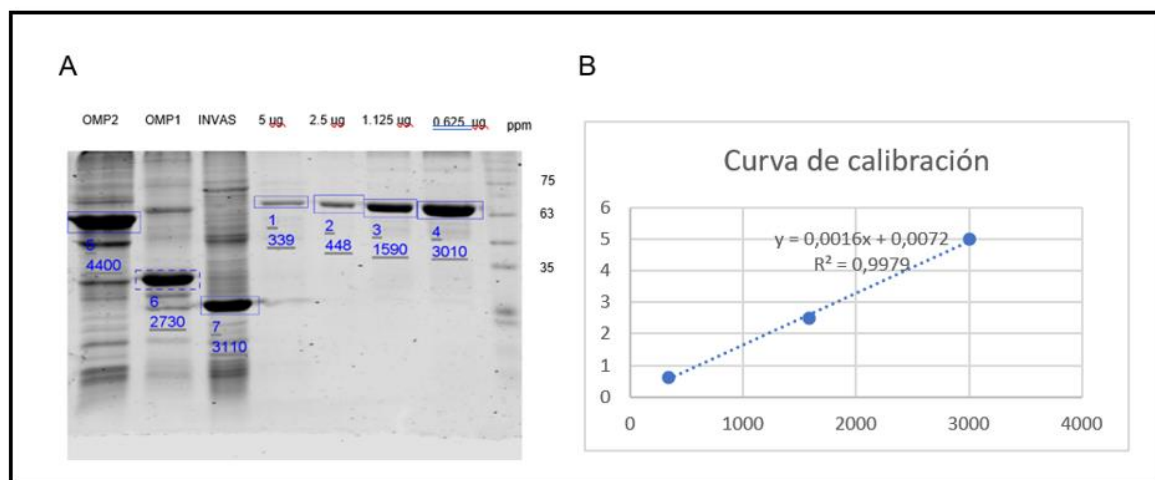


Figura 4. Análisis de la concentración de los antígenos OMP2, OMP1 e INVASc en SDS-PAGE al 12,5%.
 Figura 4: Análisis de la concentración de los antígenos en SDS-PAGE al 12,5%.

El porcentaje de pureza de los antígenos se realizó mediante el sistema de densitometría utilizando el programa Odyssey Page. Según el gráfico de densitometría obtenido se estima que la pureza de los tres antígenos es de aproximadamente 62% (Figura 5). Los antígenos se mezclaron para realizar la formulación vacunal. A la mezcla se le realizó un ensayo de estabilidad a temperatura de conservación de -20°C.

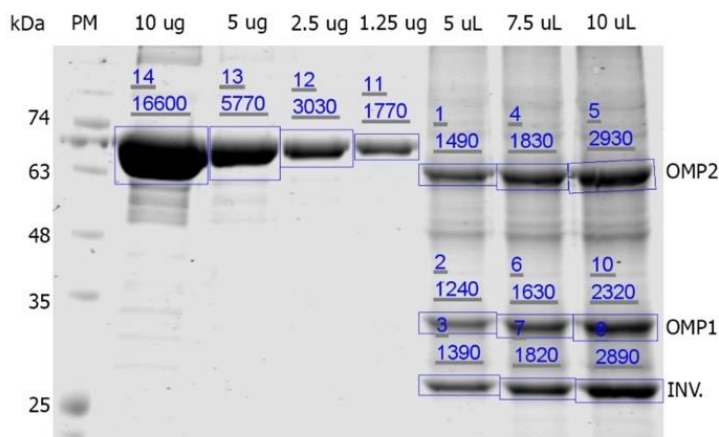


Figura 5. Análisis mediante SDS-PAGE al 12,5% de la mezcla de los antígenos INVASc, OMP1 y OMP2.

5.5. Ensayos de estabilidad de los antígenos

La estabilidad de los antígenos recombinantes a temperatura -20°C de conservación se evaluó mediante SDS-PAGE al 12.5%. Los resultados demostraron que la concentración de los antígenos se mantuvo estable a -20°C por al menos 30 días (Tabla 1).

Tabla 1: Comparación de la concentración de los antígenos al tiempo 0 y tiempo de 30 días.

Días	OMP2 (<u>ug/uL</u>)	OMP1 (<u>ug/uL</u>)	INVASINA (<u>ug/uL</u>)
0	0.65	0.34	0.51
30	0.70	0.38	0.50

5.6 Establecimiento de las condiciones de emulsión.

El establecimiento de las condiciones de emulsión se realizó utilizando como fase acuosa solución salina (PBS). La relación fase oleosa:fase acuosa fue de 60:40. Como fase oleosa se utilizó Montanide ISA50 v2. La emulsión para lograr una formulación de agua en aceite se realizó en un homogeneizador Ultraturra T25 (IKA, Alemania), pero fue necesario determinar las condiciones de la pre-mezcla antes de realizar la emulsión final. Para determinar estas condiciones, se adicionó 1 mL de la pre-mezcla en agua limpia en forma de gotas y los resultados demostraron que las gotas de aceites son estables y no se separan (Figura 6). La emulsión se realizó manteniendo una velocidad constante y variando el tiempo de mezcla. Posteriormente, se analizó la estabilidad mecánica y la viscosidad de la emulsión final utilizando el viscosímetro DV-E (Brookfield, Canadá). Los resultados demostraron que las tres condiciones presentaron una estabilidad mecánica mayor a 0.7 y una viscosidad mayor a 200 (Tabla 2); sin embargo, la condición 3 (8.000 rpm y 6 minutos) presentó la mejor estabilidad mecánica y viscosidad (Tabla 2).



Figura 6. Premezcla de las fases acuosa y oleosa previo a la emulsión.

Tabla 2: Comparación de los ensayos de emulsión realizando la pre-mezcla fase acuosa:fase oleosa.

Muestra	Velocidad (rpm)	Tiempo (min)	Estab. Mecánica (hu/hº)	Viscosidad
1	8.000	4	0.7	225
2	8.000	5	0.7	255
3	8.000	6	0.8	249

5.7 Análisis de antígenos en la emulsión

Una vez realizada la emulsión se analizó la composición de los tres antígenos. La ruptura de la emulsión se logró mediante la adición de alcohol bencílico. La separación de los antígenos en SDS-PAGE mostró que el antígeno OMP2 constituía el 18.3 %, mientras que la OMP1 el 38% y la INVASc el 43,7% del total de antígeno en la formulación (Figura 7). Esta composición debe mantenerse en el tiempo para demostrar la estabilidad de la formulación.

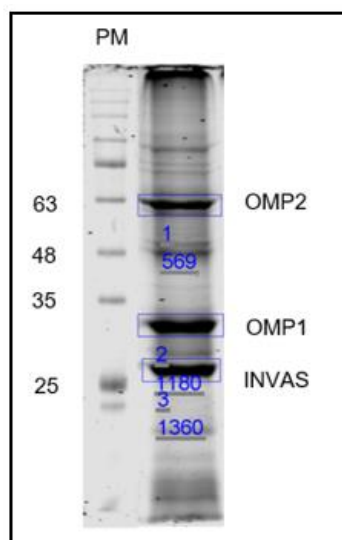


Figura 7. Análisis mediante SDS-PAGE al 12,5 de los antígenos en la formulación vacunal.

5.7.1 Análisis de los antígenos a los tres y seis meses de preparado el candidato vacunal.

La formulación fue analizada respecto a la composición relativa de los antígenos a los tres y seis meses de preparada. La separación en SDS-PAGE mostró que los antígenos no se degradan en el tiempo. A los tres meses la proteína OMP2 constituía el 17,6% del total, mientras que la OMP1 el 47,3%, y la INVASc el 35,1% del total de antígenos. A los 6 meses los valores fueron similares; OMP2 19,8%, OMP1 46,4%, e INVASc 33,8%. Se obtuvo un patrón de migración electroforética similar en los tiempos evaluados (Figura 8).

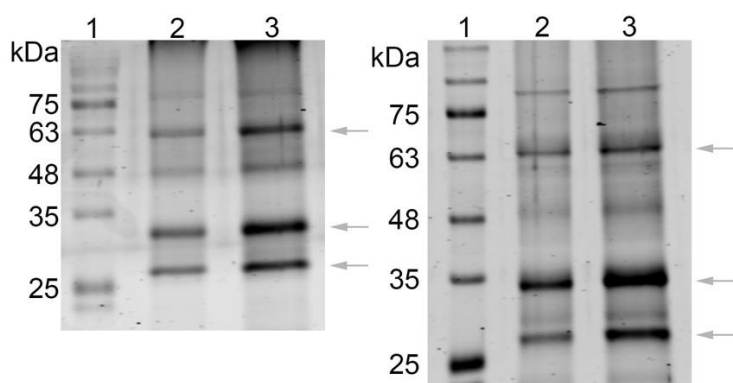


Figura 8. Análisis mediante SDS-PAGE de los antígenos de *L. intracellularis* en la emulsión a los tres (izquierda) y seis meses (derecha) de preparada la formulación. Línea 1 patrón de peso molecular; línea 2, 3, 10 uL y 15 uL de los cuerpos de inclusión extraídos de la emulsión.

5.8 Calidad microbiológica

La calidad microbiológica se determinó sembrando 1 mL de la mezcla de los antígenos sin diluir y 1 mL de la mezcla con dilución 1/10 de los antígenos en medios de agar triptona soja, potatoe dextrosa y caldo tioglicolato. Luego de los 7 días de incubación se observó que las placas con los medios agar triptona soja y potatoe dextrosa sembradas con dilución 1/10 mostraron crecimiento de microorganismos, mientras que las placas sembradas con

la muestra sin diluir no mostraron crecimiento (Figura 9). En los tubos con caldo tioglicolato inoculados con la dilución 1/10 se observó crecimiento microbiano (Figura 10).

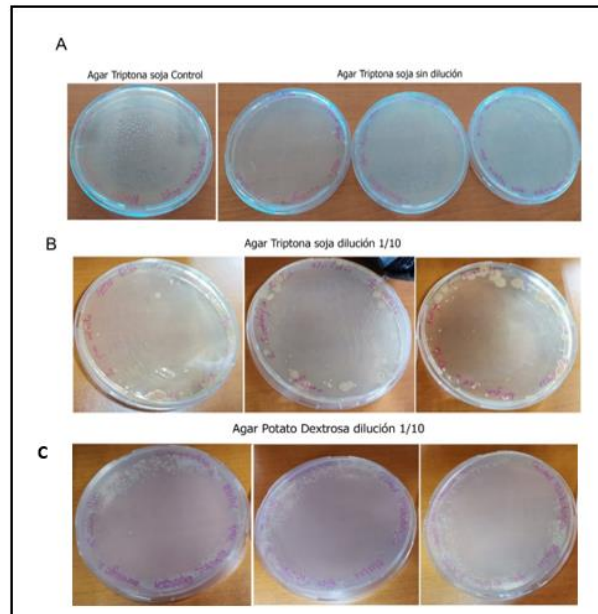


Figura 9. Ensayo de calidad microbiológica de los antígenos. (A) medio Agar Tryptona Soja sin diluir; (B) Medio Agar Tryptona Soja dilución 1/10; C: Medio Agar Potatoe Dextrosa dilución 1/10.

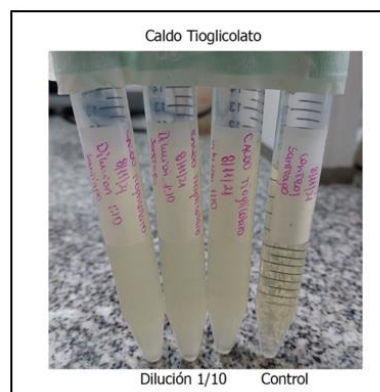


Figura 10. Calidad microbiológica de los antígenos en medio Caldo Tioglicolato.

5.9 Variación del peso en ratones en el primer y segundo ensayo de inmunización con el candidato vacunal.

La ganancia de peso es un factor importante para informar si hay alguna reacción secundaria a la inmunización del candidato vacunal. Los ratones de ambos grupos experimentales se pesaron en una balanza semanalmente durante los ensayos correspondiente a tres y seis meses de realizada la formulación (Figura 11). Todos los animales mostraron un comportamiento adecuado, así como crecimiento y aumento de peso acorde a las semanas de edad.

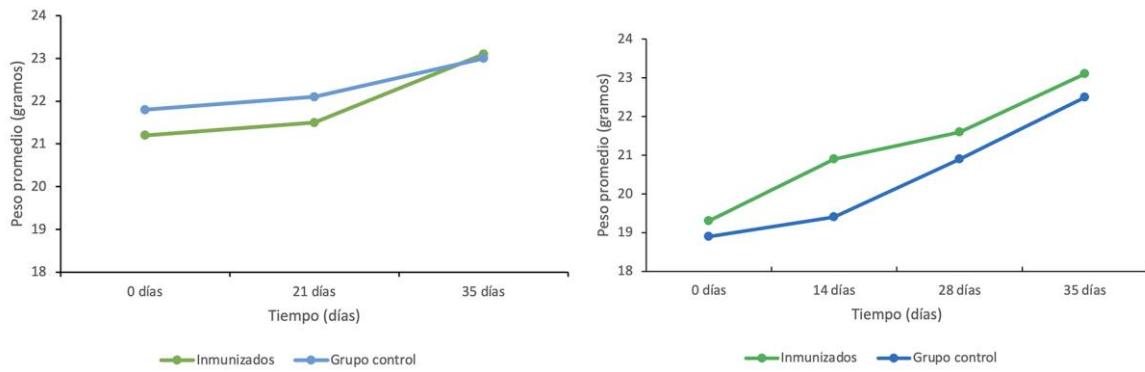


Figura 11. Promedio de peso de los ratones correspondientes al grupo control e inmunizado del primer (izquierda) y segundo (derecha) ensayo de inmunización con el candidato vacunal.

5.9 Evaluación de la potencia inmunológica mediante ensayo inmunoenzimático (ELISA).

Para evaluar y caracterizar la respuesta inmune humoral de anticuerpos IgG posterior a la inmunización, se realizaron ensayos de inmunoadsorción ligado a enzima (enzyme-linked Immunosorbent assay; ELISA) indirectos. Los pocillos fueron recubiertos con 5 ug de cada uno de los antígenos solubilizados. Los sueros, previamente liberados, fueron aplicados en dilución 1 en 100, mientras que para la detección se aplicó anticuerpo anti-IgG de ratón conjugado con peroxidasa de rabanito picante (horse-radish peroxidase; HRP). De esta forma se analizó la respuesta de anticuerpos IgG totales de ratones inmunizados con la formulación tres meses (Figura 12A) o seis meses (Figura 12B) luego de su preparación.

Al analizar la variación en el tiempo de la respuesta inmune para cada grupo, se pudo determinar que tanto el grupo inmunizado con la preparación de 3 meses de antigüedad como el grupo inmunizado con la preparación de 6 meses de antigüedad desarrollan un aumento significativo de la respuesta de anticuerpos IgG en la semana 4, una semana posterior al refuerzo ($p < 0,0001$). Esta elevación de la respuesta se mantuvo hasta la semana 6, en que finalizaron estos ensayos.

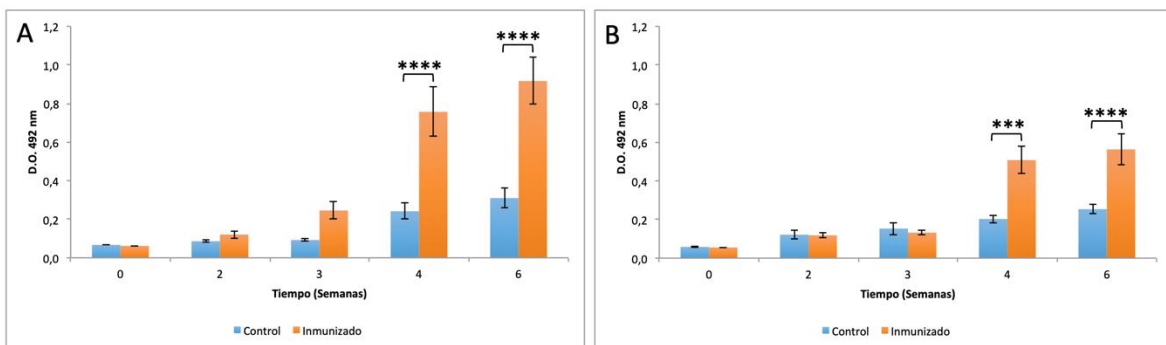


Figura 12. Curso temporal de la respuesta inmune humoral de anticuerpos IgG totales en ratones inmunizados con la formulación vacunal conservada a 4°C durante distintos tiempos. A, B) Curso temporal de anticuerpos IgG totales en ratones inmunizados con las formulaciones de tres y seis

meses de conservación a 4°C. Se representa la media y el error estadístico. *** < 0,001; **** < 0,0001.

6. DISCUSIÓN

El medio y las condiciones de cultivo son elementos muy importantes en el proceso de producción de biofármacos. Dentro de estas etapas la preparación del pre-inóculo e inóculo del fermentador constituyen elementos relevantes para garantizar que el cultivo en el fermentador comience en fase estacionaria (Stanbury, Whitaker, & Hall, 2017). Esta condición se logró desde el cultivo inóculo al fermentador. La fase de crecimiento exponencial se obtuvo desde la hora cero y se mantuvo durante 6 horas (Figura 1). Esta información es importante para garantizar un inóculo de alta viabilidad.

Concentraciones celulares elevadas son deseadas al momento de la inducción de la proteína de interés (Restaino et al., 2013). Teniendo en cuenta esta información se han diseñado cultivos alimentados, que consisten en la adición de fuente de carbono extra, a inicialmente añadida, cuando este nutriente se está agotando. Otro aspecto relevante es la concentración de inductor para la expresión de la proteína de interés. Concentraciones desde 0,5 hasta 1,5 mM de IPTG se han evaluado con resultados que dependen de muchos factores entre ellos, la proteína a obtener. Las células luego de la inducción pueden presentar una disminución de la velocidad de crecimiento lento y eventual detención del crecimiento. Este comportamiento puede estar relacionado con el estrés celular al sobreproducir proteínas no esenciales originándose una reducción en la fracción de proteínas esenciales, debido a una competencia por recursos (Quiroga, 2010). También, a altos niveles de inducción, la bacteria degrada rRNA previamente ensamblado generando un colapso en el sistema de traducción (Kurland y Dong, 1996). Resultados previos mostraron que la mayor expresión de proteínas se alcanzaba al inducir con 0.75 mM de IPTG, en cultivo alimentado.

Las proteínas producidas por *E. Coli* pueden producirse insolubles en el interior de las células. Por tanto, es necesario realizar un paso de ruptura celular para obtenerlas. Los procesos de recuperación de proteínas intracelulares tradicionalmente involucran una etapa de ruptura celular mecánica o química para la liberación del producto, seguida por una etapa de centrifugación a alta velocidad para remover los fragmentos celulares y algunos contaminantes (Cisneros & Rito, 2005). La eficiencia de este paso es relevante para recuperar la mayor cantidad de proteína producida al interior de la célula. La prensa francesa y el molino de bolas son los métodos más usados en la ruptura celular a escala industrial (Ho, Tan, Yap, Ling & Tey, 2008). En el presente trabajo se utilizó un homogeneizador EmulsiFlex-C5 que mostró alta eficiencia de ruptura celular (99.9%) luego de seis pases (Fahnert et al., 2004). Posterior a la ruptura celular, es necesario la inclusión de etapas de purificación que se diseñan según el propósito final de la molécula. En nuestro

caso los antígenos serán utilizados para una formulación de uso veterinario, lo que permite purzas mayores al 70%. El uso de cromatografía líquida en columnas encarecería el producto final, por tal motivo se diseñan pasos de lavado, con alta concentración de sales y pH básicos, que persiguen aumentar pureza sin pérdida de los antígenos (Chung et al, 2015) (Figura 6).

Tanto la pureza como la estabilidad del producto son criterios importantes en los procesos productivos (Weuster-Botz et al., 2006). Teniendo en cuenta estos criterios se determinó la estabilidad de las proteínas a -20°C , temperatura de conservación. Este estudio es muy relevante porque define el tiempo en que puede estar almacenado la materia prima activa de la formulación, sin que ocurra degradación. Según la literatura los cuerpos de inclusión son estructuras muy estables que pueden permanecer hasta 180 días sin ser degradados a temperaturas de almacenamiento (García-Fruitos et al., 2009). Los resultados obtenidos en la presente investigación fueron similares a los informados previamente, pues no se mostró degradación de los CI en el tiempo evaluado.

Un aspecto a tener en cuenta cuando se obtienen moléculas recombinantes como CI es su tamaño, lo que impide la esterilización por filtro de $0,2\ \mu\text{m}$. Por esta razón se hace necesario la aplicación de otros métodos que garanticen la calidad microbiológica del producto final. La adición de gentamicina y timerosal para prevenir el crecimiento de bacterias y hongos está aprobada para fármacos veterinarios, como preservantes. El timerosal es un componente que contiene 50% de mercurio y se metaboliza a etilmercurio y tiosalicilato; ha sido utilizado como preservante en la producción de vacunas desde 1930, fundamentalmente, para evitar la contaminación bacteriana y fúngica (Muñoz et al., 2007).

Además del análisis de estabilidad y calidad microbiológica a la materia prima activa se hace necesario evaluar la potencia inmunológica de las formulaciones vacunales. Esta evaluación se realiza generalmente en modelos animales y específicamente en este trabajo se realizó en ratones. La potencia inmunológica de la formulación se puede estudiar a temperatura de conservación 4°C (estabilidad en tiempo real), midiendo la respuesta inmune humoral (anticuerpos IgG) mediante ensayo o ELISA, en los animales inmunizados.

La técnica ELISA tiene una gran ventaja por su simplicidad, especificidad y sensibilidad (Cardona et al., 2005). La evaluación mediante ELISAs indirectos demostraron una diferencia significativa entre el grupo control y el inmunizado, en ensayos de inmunización utilizando la formulación de tres meses de antigüedad como de seis meses. Ambas formulaciones mostraron una respuesta temporal similar en ratones inmunizados, con una respuesta de anticuerpos IgG estadísticamente significativa desde la semana 4 post-inmunización, y que se mantiene durante la semana 6. Estos ensayos sugieren que la

formulación es estable y capaz de generar una respuesta inmune humoral de anticuerpos IgG incluso 6 meses después de formulada, al mantenerse almacenada a 4°C. Así, los resultados de respuesta inmune nos alientan a seguir investigando y evaluando su efectividad a futuro. Es necesario evaluar mejoras que podrían presentarse al utilizar otros adyuvantes, como por ejemplo la presencia de inmunopotenciadores (Kim & Jang, 2017; McElrath, 2017). También es necesario determinar otros factores críticos, como la evaluación de la mejor vía de administración (Zhang et al., 2015), determinación a largo plazo de la inmunidad generada y la efectividad de la vacuna frente a ensayos de desafío (Starck, 2020) con la bacteria *L. intracellularis*.

7. CONCLUSIÓN

1. La adición de preservantes como el timerosal y la gentamicina garantizó la calidad microbiológica del producto final.
2. La formulación vacunal basada en una emulsión oleosa agua en aceite fue estable hasta 6 meses de producida, no observándose degradación de los antígenos.
3. El candidato vacunal puede conservarse a 4°C por al menos seis meses sin perder su potencia inmunológica.

8. SUGERENCIAS

4. Realizar ensayos de inmunización para evaluar la estabilidad y potencia inmunológica de la formulación a mayores tiempos (9 y/o 12 meses).
5. Evaluar métodos de esterilización aplicados a los cuerpos de inclusión, que garanticen la esterilidad a la formulación vacunal.

9. BIBLIOGRAFÍA

Arnold, M. *et al.* (2019) "Prevalence of lawsonia intracellularis in pig herds in different European countries," *Porcine Health Management*, 5(1). Available at: <https://doi.org/10.1186/s40813-019-0137-6>.

Cardona, N. I., Lora, F., & Gomez, J. E. (2005). Estandarización del inmunoensayo ELISA para la detección de IgG anti-Toxoplasma gondii en ratón. *Parasitología latinoamericana*, 60(1-2), 97-101.

Chung, W. J., Huang, C. L., Gong, H. Y., Ou, T. Y., Hsu, J. L. y Hu, S. Y. (2015). Recombinant production of biologically active giant grouper (*Epinephelus lanceolatus*) growth hormone from inclusion bodies of *Escherichia coli* by fed-batch culture. *Protein Expression and Purification*, 110, 79–88.

Cisneiro, M., Rito-Palomares, M., (2005). Estrategias de bioingeniería para la recuperación primaria de productos biológicos. *Revista mexicana de Ingeniería Química*, vol 4, núm 1, pp. 131-139.

Fahnert, B., Lilie, H., & Neubauer, P. (2004). Inclusion bodies: formation and utilisation. *Physiological Stress Responses in Bioprocesses: -/-*, 93-142.

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.

García-Fruitós, E., Rodríguez-Carmona, E., Díez-Gil, C., Ferraz, R. M., Vázquez, E., 79 Corchero, J. L., Cano-Sarabia, M., Ratera, I., Ventosa, N., Veciana, J. y Villaverde, A. (2009). Surface Cell Growth Engineering Assisted by a Novel Bacterial Nanomaterial. *Advanced Materials*, 21(42), 4249–4253. <https://doi.org/10.1002/adma.200900283>.

García-Fruitós, E., Vázquez, E., Díez-Gil, C., Corchero, J. L., Seras-Franzoso, J., Ratera, I., ... & Villaverde, A. (2012). Bacterial inclusion bodies: making gold from waste. *Trends in biotechnology*, 30(2), 65-70.

Ho, C. W., Tan, W. S., Yap, W. B., Ling, T. C. y Tey, B. T. (2008). Comparative evaluation of different cell disruption methods for the release of recombinant hepatitis B core antigen from *Escherichia coli*. *Biotechnology and Bioprocess Engineering*, 13(5), 577–583. <https://doi.org/10.1007/s12257-008-0020-9>.

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.

- 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.
- 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.
- Kim, S. H., & Jang, Y. S. (2017). The development of mucosal vaccines for both mucosal and systemic immune induction and the roles played by adjuvants. *Clinical and Experimental Vaccine Research*, 6(1), 15–21. <https://doi.org/10.7774/cevr.2017.6.1.15>.
- 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>.
- Kurland, C. G., & Dong, H. (1996). Bacterial growth inhibition by overproduction of protein. *Molecular microbiology*, 21(1), 1-4.
- Lawson, G. H. K., & Gebhart, C. J. (2000). Proliferative Enteropathy. 122, 77–100. <https://doi.org/10.1053/jcpa.1999.0347>.
- Lawson, G. H. K., McOrist, S., Jasni, S., & Mackie, R. A. (1993). Intracellular bacteria of porcine proliferative enteropathy: Cultivation and maintenance in vitro. *Journal of Clinical Microbiology*, 31(5), 1136–1142.
- Li, H., Zhang, M., & Zheng, E. (2017). Comprehensive miRNA expression profiles in the ilea of *Lawsonia intracellularis*-infected pigs. *Journal of Veterinary Medical Science*, 79(2), 282-289.
- McElrath, M. J. (2017). Adjuvants: Tailoring humoral immune responses. *Current Opinion in HIV and AIDS*, 12(3), 278–284. <https://doi.org/10.1097/COH.0000000000000365>.
- 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., Jasni, S., Mackie, R. A., Berschneider, H. M., Rowland, A. C., & Lawson, G. H. K. (1995). Entry of the bacterium ileal symbiont *intracellularis* into cultured enterocytes and its subsequent release. *Research in Veterinary Science*, 59(3), 255–260. [https://doi.org/10.1016/0034-5288\(95\)90013-6](https://doi.org/10.1016/0034-5288(95)90013-6).

- McOrist, Steven. (2005). Defining the full costs of endemic porcine proliferative enteropathy. *The Veterinary Journal*, 170(1), 8–9. <https://doi.org/10.1016/J.TVJL.2004.04.008>.
- Mirajkar, N. S., Kelley, M. R., & Gebhart, C. J. (2017). Draft genome sequence of *Lawsonia intracellularis* strain E40504, isolated from a horse diagnosed with equine proliferative enteropathy. *Genome Announcements*, 5(19), e00330-17.
- 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>.
- Muñoz, A., Abarca, K., Jiménez, J. (2007). Seguridad de las vacunas que contienen timerosal: Declaración del Comité Consultivo de Inmunizaciones (CCI) de la Sociedad Chilena de Infectología. *Revista Chilena Infectología* 24 (5); 372-376.
- Nascimento, I. P., & Leite, L. C. C. (2012). Recombinant vaccines and the development of new vaccine strategies. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research = Revista Brasileira de Pesquisas Medicas e Biologicas*, 45(12), 1102–1111. <https://doi.org/10.1590/s0100-879x2012007500142>.
- Obradovic, M., Pasternak, J. A., Ng, S. H., Allan, B., Brownlie, R., & Wilson, H. L. (2019). Immunoproteomic analysis of *Lawsonia intracellularis* identifies candidate neutralizing antibody targets for use in subunit vaccine development. *Veterinary microbiology*, 235, 270-279.
- 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, 447-451.
- Quiroga, A. J., Huertas, A., Cómbita, A. L., & Bravo, M. M. (2010). Variación en el número de repeticiones EPIYA-C en la proteína CagA de aislamientos colombianos de *Helicobacter pylori* y su capacidad para inducir fenotipo colibrí en células epiteliales gástricas. *Biomédica*, 30(2), 251-258.
- 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>.

- Rosano, G. L. y Ceccarelli, E. A. (2014). Recombinant protein expression in *Escherichia coli*: Advances and challenges. *Frontiers in Microbiology*, 5, Número APR. Frontiers Research Foundation. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2014.00172>.
- Resende, T. P., Pereira, C. E. R., Gabardo, M. D. 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.
- Stanbury, P. F., Whitaker, A. y Hall, S. J. (2017). Culture preservation and inoculum development. *Principles of Fermentation Technology* (pp. 335–399). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/b978-0-08-099953-1.00006-5>.
- Starck, M. F. (2020) Desarrollo y caracterización de un candidato vacunal recombinante contra Hantavirus basado en las glicoproteínas de superficie del virus Andes. Universidad de Concepción.
- 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>.
- Vannucci, F. A., & Gebhart, C. J. (2014). Recent Advances in Understanding the Pathogenesis of *Lawsonia intracellularis* Infections. *Veterinary Pathology*, 51(2), 465–477. <https://doi.org/10.1177/0300985813520249>.
- Vannucci, Fabio A., Gebhart, C. J., & McOrist, S. (2019a). Proliferative Enteropathy. In *Diseases of Swine* (pp. 898–911). <https://doi.org/10.1002/9781119350927.ch58>.
- Vannucci, Fabio A., Gebhart, C. J., & McOrist, S. (2019b). Proliferative Enteropathy. In *Diseases of Swine* (pp. 898–911). <https://doi.org/10.1002/9781119350927.ch58>.
- Weuster-Botz, D., Hekmat, D., Puskeiler, R. y Franco-Lara, E. (2006). Enabling technologies: Fermentation and downstream processing. *Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology*, 105, 205–247. https://doi.org/10.1007/10_2006_034.
- Zhang, L., Wang, W., & Wang, S. (2015). Effect of vaccine administration modality on immunogenicity and efficacy. *Expert Review of Vaccines*, 14(11), 1509–1523. <https://doi.org/10.1586/14760584.2015.1081067>.