

Trabajo de tesis, Maestría en Biotecnología

Facultad de Ciencias

Universidad de la República

# **"PRODUCCIÓN DE ESTREPTOLISINA- O RECOMBINANTE PARA USO DIAGNÓSTICO"**

**Lic. Blanca Velázquez**

Laboratorio de Investigación en Vacunas

Laboratorio de Fermentación

Departamento de Desarrollo Biotecnológico

Instituto de Higiene, Facultad de Medicina

Universidad de la República

Julio de 2004

# AGRADECIMIENTOS

Quiero agradecer a los Miembros que integran la Comisión de la Maestría en Biotecnología por permitir mi formación en esta área del conocimiento.

Al Tribunal agradezco el tiempo dedicado a la corrección de este trabajo así como los aportes realizados.

Deseo agradecer especialmente a mis tutores, Dr. Hugo Massaldi y Dr. Alejandro Chabalgoity, por brindarme la oportunidad de realizar la Maestría en el marco del Departamento de Desarrollo Biotecnológico y por todo el apoyo recibido durante la realización de este trabajo.

A mis compañeros: Alba, Albina, Alejandra, Alicia, Ana, Analía, Andrea Filipini, Andrea Rossi, Andreína, Anita, Beatriz, Caroline, Claudia, Esther, Fernanda, Fernando Ferreira, Fernando Goñi, Fernando Silvera, Germán, Laura, Leonardo, Lucía, Marcelo, María, María Inés Bessio, María Inés Figueredo, Marinela, Margarita, Norma, Silvina, Susana y Vanessa, agradecerles no sólo el aporte científico-técnico sino también el compañerismo tanto en los buenos momentos como en tiempos difíciles.

A la Ing. Adriana Vázquez le agradezco el asesoramiento técnico brindado durante mis primeras experiencias en el manejo del fermentador.

A la Prof. Gladys Guineo y al Lic. Víctor Martínez, agradecerles el trabajo realizado en el tratamiento de datos y análisis estadístico de los experimentos descritos en esta tesis.

También quiero agradecer profundamente a las personas que me han brindado fuerza, ánimo y cariño para seguir adelante a lo largo de mi vida y que de alguna manera han colaborado para que pudiera alcanzar este objetivo. Quienes han sido puntales en momentos críticos, otros cuya existencia es fuente de reciente felicidad y aquellos que siempre están, ya sea porque la vida aún nos concede la dicha de estar juntos como para quienes están vivos en mi corazón:

A Nea y Manuel por su candor, paciencia, ternura, dulzura y amor que jamás olvidaré.

A Alberto, Alejandra, Atila, Haydeé, Enrique, Washington, Mercedes, Susana, Raquel, Pablo y Karina, por estar a mi lado, por compartir alegrías, por escucharme, por comprenderme.

A Isabel, por su cariño y apoyo práctico que posibilitó en muchas ocasiones mi dedicación completa al trabajo.

A mi abuela por brindarme todo lo que está en sus manos para ayudarme siempre.

A mi abuelito y a la tía Nena por los dulces recuerdos que guardo de ellos en mi corazón.

A la tía Cristina por ser un apoyo.

A mis hermanos Rúben, Daniel y Mauricio, por todas las cosas lindas, los sentimientos que como hermanos hemos compartido y por darme las fuerzas para seguir adelante.

A mis sobrinitos Joaquín y Rodrigo, por ser ellos son una fuente inagotable de alegría. A Milagritos la ilusión que me provoca su venida.

A Rossina, su fuerza contagiosa.

A mi compañero del alma, Mario, quiero agradecer profundamente todo su amor, paciencia, comprensión y apoyo constante durante todo este tiempo.

A mi hijita, el despertar de un nuevo sentir: el ser mamá.

A mis padres, por darme la vida, por sus constantes cuidados, porque gracias a su amor y enorme sacrificio es que hoy estoy aquí...

# DOCUMENTOS PUBLICADOS HASTA LA FECHA RELACIONADOS CON ESTA TESIS

**Velázquez, B., J.A., Chabalgoity, y H. Massaldi.** 2003. Producción de estreptolisina-O recombinante adecuada para uso en inmunodiagnóstico. Desarrollo de un kit de ELISA para titulación de anticuerpos anti-estreptolisina-O. Departamento de Desarrollo Biotecnológico y División Producción, Instituto de Higiene. Facultad de Medicina. Universidad de la República. *Patente UY 27.964.* Dirección Nacional de la Propiedad Industrial. Ministerio de Industria Energía y Minería. República Oriental del Uruguay.

**Martínez, V., G. Guineo, B. Velázquez, J. Chabalgoity and H. Massaldi.** Bifactorial design applied to recombinant protein expression. Enviado a *Journal of Data Science*. Junio, 2004.

**Velázquez, B., H. Massaldi, J. Battistoni and J. Chabalgoity.** Expression of recombinant Streptolysin-O and pre-evaluations of it use in immunoassays. Enviado a *Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology*: Julio, 2004.

# RESUMEN

El trabajo de tesis aquí presentado, consistió en la obtención de una forma recombinante de estreptolisina-O adecuada para inmunoensayos y la optimización del proceso productivo a escala preparativa.

La determinación del título de anticuerpos anti-estreptolisina-O es uno de los ensayos paraclínicos más usados en el diagnóstico de las secuelas ocasionadas luego de infecciones por *Streptococcus pyogenes*. Para desarrollar este tipo de reactivos es necesario obtener estreptolisina-O en cantidad y calidad adecuadas. El proceso de producción de la misma es dificultoso, con esquemas de recuperación y purificación complejos, con bajo rendimiento de producción que obliga la manipulación de grandes volúmenes de cultivo de *S. pyogenes*. Debido a estas dificultades en el proceso de producción, se han considerado otras alternativas, como por ejemplo, la obtención de la proteína por técnicas de ADN recombinante. Este tipo de aproximación permite la obtención de altos rendimientos de proteína a partir de esquemas relativamente simples de purificación en mejores condiciones de bioseguridad.

En este trabajo, se clonó el gen de estreptolisina-O desde el nucleótido 430 hasta el final de la molécula, como proteína de fusión con la enzima glutatión S transferasa de *Schistosoma japonicum*, en el vector de expresión pGEX-2T. Con el fin de incrementar la producción del recombinante en *Escherichia coli*, se optimizó la expresión del mismo en matraces de pequeño volumen, analizando distintos factores tales como concentración del inductor, temperatura de inducción, relación volumen de medio de cultivo/volumen total de matraz y expresión en distintas cepas. En una segunda etapa, se optimizó en fermentador, analizando los factores velocidad volumétrica de consumo de oxígeno y

alimentación del sistema con glucosa. Luego de la fase de cultivo en fermentador, se procedió a la recuperación y purificación del producto mediante cromatografía de afinidad en columna de glutatión sefarosa. Por último, se determinó la estabilidad del producto terminado analizando distintas formulaciones que fueron caracterizadas según la integridad antigénica y la actividad hemolítica de la molécula.

Los estudios de optimización permitieron definir un protocolo de producción de estreptolisina-O recombinante en un sistema controlado de temperatura, pH y suministro de glucosa; variando las condiciones de velocidad volumétrica de consumo de oxígeno (alta en la fase de crecimiento y baja durante la fase de inducción).

Ensayos de inmunoblot realizados usando el recombinante, demostraron que el mismo es reconocido específicamente por sueros humanos positivos para anticuerpos anti-estreptolisina-O. A partir de ello, se desarrolló un ELISA para titular anticuerpos anti-estreptolisina-O en suero humano, y se evaluó en forma comparativa con un látex comercial que emplea estreptolisina-O nativa. Los resultados obtenidos sugieren que el recombinante sería apto para inmunoensayos.

En suma, los resultados descriptos en esta tesis indican que se logró un protocolo de producción de estreptolisina-O recombinante simple y seguro apropiado para uso en inmunoensayos, con un rendimiento aproximadamente 30 veces superior al obtenido mediante el sistema de producción tradicional, a partir de cultivos de *S. pyogenes*. Este protocolo podría ser utilizado como base para su transferencia a la industria con el fin de desarrollar la producción masiva de kits para el diagnóstico de las secuelas ocasionadas por *S. pyogenes*.

..

***A Mario, mi gran amor y compañero;  
y a lo más bello, tierno y puro que la vida me ha dado,  
mi amada hijita Alessa.***

# ÍNDICE TEMÁTICO

<b>Capítulo1: Introducción.....</b>	<b>1</b>
1.1.- Fiebre reumática y su diagnóstico.....	1
1.1.1.- Generalidades.....	1
1.1.2.- Patogenia de la fiebre reumática.....	2
1.1.3.- Epidemiología de la fiebre reumática.....	3
1.1.4.- Profilaxis.....	4
1.1.1.5.- Generalidades de la respuesta inmune en la fiebre reumática.....	4
1.1.6.- Diagnóstico.....	5
1.2.- Estreptolisina-O, obtención y aplicación.....	7
1.2.1.- Características generales de la estreptolisina-O.....	7
1.2.2.- Toxicidad de la estreptolisina-O.....	8
1.2.3.- Actividad hemolítica.....	9
1.2.4.- Relación entre estreptolisina-O y fiebre reumática.....	9
1.2.5.- Valor de la titulación de anticuerpos anti-estreptolisina-O.....	10
1.2.6.- Métodos para la determinación de anticuerpos anti-estreptolisina-O.....	11
1.3.- Optimización de la expresión y producción de proteínas recombinantes.....	12
1.3.1.-Generalidades.....	12
1.3.2.- Características generales de un vector de expresión.....	14
1.3.3.- Localización de la expresión de proteínas recombinantes.....	14
1.3.4.- Estrategias para mejorar la expresión de proteínas recombinantes.....	16
1.3.5.- Antecedentes de la producción de estreptolisina-O recombinante.....	21
1.4.- Objetivos del trabajo.....	23

1.4.1.- Objetivo general.....	23
1.4.2.- Objetivos específicos.....	23

**Capítulo 2: Materiales y métodos.....25**

2.1.- Materiales.....	25
2.1.1.- Productos químicos, enzimas, marcadores de peso molecular, sistemas de purificación y medios de cultivo.....	25
2.1.2.- Soluciones tampones, soluciones stocks y medios de cultivo.....	26
2.1.3.- Bacterias.....	27
2.1.4.- Oligonucleótidos sintéticos.....	28
2.1.5.- Sueros y antisueros.....	29
2.1.5.1.- Sueros humanos.....	29
2.1.5.2.- Sueros de ratón.....	29
2.1.6.- Plásmidos.....	30
2.1.7.- Cromatografía de afinidad.....	30
2.2.- Métodos.....	31
2.2.1.- Análisis computacional de la molécula de SLO.....	31
2.2.2.- Centrifugaciones.....	31
2.2.3.- Métodos para análisis y manipulación de ADN.....	31
2.2.4.- Electroforesis de ADN en geles de agarosa.....	32
2.2.5.- Amplificación de ADN por PCR.....	32
2.2.6.- Digestión de ADN con enzimas de restricción.....	33
2.2.7.- Reacción de ligación.....	33
2.2.8.- Preparación y purificación de ADN plasmídico.....	33
2.2.9.- Purificación de ADN a partir de geles de agarosa.....	33
2.2.10.- Preparación y transformación de <i>E. coli</i> competentes.....	34
2.2.11.- Métodos para análisis de la expresión proteica.....	34
2.2.11.1.- Expresión de proteínas en <i>E.coli</i> .....	34

2.2.11.1.1.- SDS-PAGE.....	35
2.2.11.1.2.- Inmunoblot.....	36
2.2.11.1.3.- Titulación de la actividad hemolítica.....	37
2.2.12.- Titulación de anticuerpos anti-SLO por técnica de látex.....	37
2.2.13.- Desarrollo de un enzimo inmunoensayo (ELISA) para titulación de anticuerpos anti-SLO usando GST-SLOr.....	38
2.2.13.1.- Optimización de la concentración de GST-SLOr a sensibilizar .....	38
2.2.13.2.- Titulación de anticuerpos anti-SLO.....	38
2.2.14.- Estudio de la expresión de GST-SLOr en matraces de 100 mL.....	39
2.2.15.- Escalado en fermentador.....	40
2.2.15.1.- Determinación de la velocidad volumétrica de consumo de oxígeno....	40
2.2.15.2.- Producción de GST-SLOr.....	42
2.2.16.- Determinación de peso seco de biomasa celular vs. DO 600 nm.....	44
2.2.17.- Cálculos.....	44
2.2.17.1.- Velocidad máxima específica de crecimiento ( $\mu_{m\acute{a}x.}$ ).....	44
2.2.17.2.- Tiempo de duplicación ( $t_d$ ).....	45
2.2.17.3.- Rendimientos ( $Y$ ).....	45
2.2.17.4.- Productividad específica de producto ( $q_p$ ).....	45
2.2.17.5.- Productividad volumétrica global del proceso ( $Q_p$ ).....	46
2.2.18.- Determinación de la concentración de proteínas.....	46
2.2.18.1.- Determinación por densitometría en geles.....	46
2.2.18.2.- Determinación por técnica del ácido bicinconínico.....	46
2.2.19.- Formulación de producto final.....	47
2.2.19.1- Controles del producto.....	48

**Capítulo 3: Clonado, expresión y evaluación de GST-SLOr para uso en inmunoensayos.....50**

3.1.- Introducción.....	50
3.1.1.- Objetivo del trabajo.....	52
3.2.- Resultados.....	52
3.2.1- Análisis computacional de la molécula de SLO.....	52
3.2.2.- Construcción y expresión de la proteína de fusión GST-SLOr.....	55
3.2.3.- Evaluación de la expresión de GST-SLOr.....	60
3.2.4.- Evaluación de la actividad hemolítica del purificado obtenido.....	64
3.2.5.- Comparación del título de anticuerpos anti-SLO en suero humano determinado por técnica de aglutinación de látex y por ELISA.....	65
3.3.- Discusión.....	69

**Capítulo 4: Expresión de GST-SLOr en matraces.....75**

4.1.- Introducción.....	75
4.1.1.- Objetivo del trabajo.....	80
4.2.- Resultados.....	80
4.2.1.- Efecto del momento-tiempo de inducción y cantidad de medio de cultivo en la expresión de GST-SLOr soluble.....	81
4.2.2.- Estudio de la expresión de GST-SLOr.....	84
4.2.2.1.- Evaluación de los factores porcentaje de medio de cultivo y temperatura de inducción en la expresión de GST-SLOr en fase soluble.....	85
4.2.2.2.- Evaluación de la expresión de GST-SLOr citoplásmica en fase soluble a distintas temperaturas de inducción y concentración de inductor.....	87
4.2.2.3.- Expresión de GST-SLOr en diferentes cepas de <i>E. coli</i> con distintos volúmenes de medio de cultivo y distintas temperaturas de inducción.....	90
4.2.2.4.- Influencia de la temperatura en el proceso global de producción de GST-SLOr.....	95

4.3.- Discusión.....	97
----------------------	----

**Capítulo 5: Expresión de GST-SLOr en fermentador. Formulación de producto final.....103**

5.1.-Introducción.....	103
5.1.1.- Objetivo del trabajo.....	110
5.2.- Resultados.....	111
5.2.1.- Expresión de GST-SLOr en fermentador.....	111
5.2.1.1. -Determinación de la velocidad volumétrica de consumo de oxígeno en fermentador.....	111
5.2.1.2.- Determinación de la biomasa bacteriana y cinética de crecimiento celular en diferentes condiciones de cultivo.....	115
5.2.1.3.- Evaluación de los parámetros $k_L a C_L^*$ y alimentación con glucosa en la producción de GST-SLOr.....	119
5.2.2.- Estudio de formulación del producto final.....	124
5.3.- Discusión.....	129
5.3.1.- Expresión de GST-SLOr.....	129
5.3.2.- Estudio de formulación del producto final.....	133

**Capítulo 6: Aspectos económicos.....136**

6.1.- Consideraciones generales.....	136
6.1.1.- Generalidades de la economía de los procesos de fermentación a nivel industrial.....	136
6.1.2.- Valor comercial de algunos productos recombinantes que están en el mercado. Ejemplos de estrategias para la reducción de los costos de producción .....	143

6.1.3.- Estimación económica para producir GST-SLOr empleando el protocolo desarrollado.....	145
6.1.3.1.- Clonado.....	146
6.1.3.2.- Fermentación.....	146
6.1.3.3.- Recuperación y purificación.....	147
6.1.3.4.- Formulación del producto terminado.....	147
6.1.3.5.- Mantenimiento.....	147
6.1.3.6.- Costo total de producción.....	148
6.1.3.7.- Evaluación económica de la producción de GST-SLOr.....	148

**Capítulo 7: Discusión general, conclusiones y perspectivas futuras.....149**

**Referencias.....154**

**Anexos: Tratamiento estadístico.....184**

Diseño Factorial $2^k$ .....	184
Diseño 2-factorial.....	185
Anexo correspondiente al capítulo 4.....	186
Anexo correspondiente al capítulo 5.....	195

# CAPITULO 1

## INTRODUCCIÓN

### 1.1.- Fiebre reumática y su diagnóstico

#### 1.1.1.- Generalidades

El *Streptococcus pyogenes*, o estreptococo  $\beta$  hemolítico de grupo A, es el principal agente bacteriano causante de un número importante de infecciones del tracto respiratorio superior así como de infecciones cutáneas y sistémicas (Wyngaarden y Smith, 1987; Rodríguez, 2002). Particularmente, este microorganismo es el causante bacteriano más frecuente de faringitis aguda (Rodríguez, 2002). Las manifestaciones clínicas de esta infección son usualmente benignas. Sin embargo, un diagnóstico incorrecto y/o un tratamiento inadecuado puede dar lugar a una serie de secuelas tales como la fiebre reumática o la glomerulonefritis difusa aguda post-estreptocócica (Bastin y col., 1972; Rodríguez, 2002). Estas complicaciones suelen afectar con mayor frecuencia en niños, pero potencialmente todas las personas son susceptibles (Giménez, 1996).

La fiebre reumática es relevante debido a su incidencia luego de una angina estreptocócica, representando aproximadamente el 3% de los casos, pudiendo incrementar al 30% en epidemias (Stollerman, 1992).

Esta enfermedad se caracteriza por producir lesiones inflamatorias no supurativas que involucran corazón, tejido subcutáneo y sistema nervioso central (Stollerman, 1992). En su forma clásica es una enfermedad de curso agudo, febril y autolimitada. Sin embargo puede ocasionar cardiopatía reumática, con lesión de las válvulas cardíacas de manera crónica y progresiva, llevando a falla cardiovascular, inhabilitación y eventualmente a la muerte (Makowitz y Gayler, 1967; Taranta y Markowitz., 1982; Dajani y col., 1995; Cynthia y Hayes, 2001). Si bien la incidencia de la fiebre reumática ha disminuido en los países desarrollados, para la mayor parte de la población mundial continúa siendo un problema, debido a que es la causa principal de enfermedad valvular cardíaca y defunción durante los primeros cuatro decenios de vida (Hernández y Fernández, 1989; Stolleman, 1992; Torres, 1994; WHO, 1998; Rodríguez y col., 1999; Guilherme y col., 2001). A modo de ejemplo, en Brasil dos tercios del dinero gastado anualmente en cirugía cardíaca es destinado a intervenciones de valvulopatías reumáticas (Torres, 1994, Giménez, 1996). Por tal motivo la prevención y lucha contra la fiebre reumática y la cardiopatía reumática siguen siendo aspectos importantes del "Programa de Enfermedades Cardiovasculares de la Organización Mundial de la Salud" (OMS) (WHO, 1998).

### **1.1.2.- Patogenia de la fiebre reumática**

La fiebre reumática puede manifestarse clínicamente 2 o 3 semanas después de un episodio de faringoamigdalitis estreptocócica (Rodríguez, 2002). La misma se asocia exclusivamente con la infección faríngea por *S. pyogenes* de determinados serotipos M, denominados "cepas reumatógenas" (Rodríguez, 2002). Aunque *S. pyogenes* es el agente causante de la fiebre reumática, no se conocen con exactitud los mecanismos por el cual este microorganismo induce la

enfermedad, existiendo varias teorías al respecto. Algunas de las mismas se basan en: los efectos tóxicos de ciertas moléculas producidas por *S. pyogenes* tales como las estreptolisinas O y S (Rodríguez, 2002), el daño tisular ocasionado por complejos antígeno-anticuerpo (Guilherme y col., 2000) y mecanismos autoinmunes inducidos por la similitud de antígenos estreptocócicos con moléculas de tejidos humanos (Guilherme y col., 2001).

### **1.1.3.- Epidemiología de la fiebre reumática**

La incidencia de la fiebre reumática es a nivel mundial de 15.000.000 de nuevos casos por año (Bisno y col., 2002). Sin embargo se observó un aumento de la incidencia de hasta un 50% en individuos que ya habían desarrollado fiebre reumática, cuando éstos contraían una nueva infección por *S. pyogenes* (Jaiyesimi, 1982; Lan y Bisno, 1983; Tierney y col., 2001). Si bien la fiebre reumática afecta por igual a individuos de distinto sexo y raza (Bisno y col., 1987), se ha observado que algunos factores pueden predisponer a la aparición de la misma, tales como la edad, afectando principalmente a individuos entre 5 y 15 años (Bisno y col., 2002), la susceptibilidad a infecciones estreptocócicas recurrentes (con elevación de anticuerpos anti-estreptolisina-O) y poseer antecedentes de fiebre reumática (Tierney y col., 2001). Esta enfermedad tiene máxima frecuencia durante los meses más fríos del año, pero probablemente el factor ambiental principal que favorece su aparición es el hacinamiento (Tierney y col., 2001).

La incidencia de la fiebre reumática es mayor en países en vías de desarrollo (Kaplan y Hill, 1984; Stollerman, 1989; Tierney y col., 2001), siendo su incidencia y prevalencia menor en Norteamérica y Europa Occidental, indicando que los factores socioeconómicos pueden influir predominantemente en la aparición de fiebre reumática sobre los factores genéticos (Morrow, 1981; Strasser, 1981; Strasser, 1985; Tierney y col., 2001). Sin embargo, el resurgimiento de la misma en países desarrollados (Gordis, 1985; Veasy y col., 1987; Cortina y col., 1991),

ha puesto de manifiesto la importancia de las medidas preventivas para evitar esta enfermedad, así como la necesidad de profundizar en el conocimiento de los mecanismos patogénicos de la fiebre reumática y la cardiopatía reumática (Kaplan y Hill, 1984, Rodríguez y col., 1999; Bisno y col., 2002).

#### **1.1.4.- Profilaxis**

Debido a que la recurrencia de la fiebre reumática es mayor durante los 3 a 5 años subsiguientes a un primer episodio en niños y que el riesgo de reinfección continúa tanto en adultos como en ancianos; es que se recomienda el tratamiento profiláctico de por vida (Tierney y col., 2001). Conviene resaltar que en pacientes adultos, la fiebre reumática se manifiesta de forma diferente que en niños y adolescentes (Bisno y col., 1987). Por este motivo cuando aparece un episodio de actividad reumática en el adulto (que usualmente ya padece valvulopatía resultante de episodios anteriores), sin manifestaciones sistémicas, es muy difícil reconocer si la cardiomegalia, insuficiencia cardíaca o arritmia se deben a la valvulopatía ya establecida o es consecuencia de un nuevo brote de la enfermedad. Es por ello que los nuevos episodios de actividad reumática pueden pasar inadvertidos, conduciendo a daño valvular y miocárdico progresivo (Bisno y col., 2002).

#### **1.1.5.- Generalidades de la respuesta inmune en la fiebre reumática**

La respuesta inmune en la fiebre reumática se caracteriza por elevación de globulinas séricas y disminución de los componentes C1q, C3 y C4 del complemento en el líquido sinovial de pacientes con fiebre reumática. (Bisno y col., 2002). También se ha observado la existencia de epitopos cardíacos que reaccionan en forma cruzada con antígenos de *S. pyogenes*, en especial contra la proteína M (Guilherme y col., 1995). En el caso de los anticuerpos anti-proteína

M, los mismos reaccionan en forma cruzada a un epitopo de la trompomiosina, ocasionando miocarditis (Guilherme y col., 2001). Sin embargo, otros antígenos de estreptococo pueden también inducir a la formación de anticuerpos de reacción cruzada. Ejemplo de ello son algunos anticuerpos anti-polisacárido de la pared celular que reaccionan contra glicoproteínas de las válvulas cardíacas, anticuerpos anti-antígenos de la membrana citoplasmática que reaccionan contra el sarcolema de las células del músculo liso del endocardio y arterias así como anticuerpos dirigidos contra la cápsula de ácido hialurónico que reaccionan en forma cruzada con el tejido sinovial y cartilaginoso (Guilherme y col., 2001; Bisno y col. 2002). Otros mecanismos de daño tisular propuestos para la fiebre reumática son la liberación de exotoxinas bacterianas tales como estreptolisina S y O y la presencia de inmunocomplejos (Yary, 1996). En el caso de los inmunocomplejos, los mismos bloquearían los receptores para el complemento y la porción Fc de células mononucleares, comprometiendo la fagocitosis y perpetuando de este modo el daño tisular (Yary, 1996; Bisno y col., 2002). Es de destacar que durante la fase aguda de la enfermedad, se observa activa síntesis de anticuerpos concomitantemente con una disminución del número absoluto de linfocitos T, retomando los mismos a valores normales luego de 4 a 6 semanas (Bisno y col., 2002).

#### **1.1.6.- Diagnóstico**

El diagnóstico de la fiebre reumática es dificultoso debido a que suele presentar un cuadro clínico variado y a la ausencia de un test de diagnóstico específico (Wannamaker, 1972). Por tal motivo en el diagnóstico se toma en cuenta el cuadro clínico y la evidencia de infección estreptocócica reciente (Wannamaker, 1972). Tal evidencia puede ser un episodio de faringitis estreptocócica documentado bacteriológicamente, o la demostración de título elevado de anticuerpos anti-estreptocócico, tales como anticuerpos anti-estreptolisina-O en suero (Wannamaker, 1972; Whitnack y Stollerman, 1985). El examen serológico en busca de anticuerpos anti-estreptococo es de suma importancia debido a que

cuando ocurre el inicio de un ataque agudo de fiebre reumática, los estreptococos del grupo A con frecuencia han sido eliminados de la vía respiratoria (Rodríguez, 2002). Por ello, un título elevado o una curva de elevación de anticuerpos anti-estreptocócico en muestras seriadas de suero, es el indicador más fiable de infección estreptocócica. Debido que clínicamente esta enfermedad es de difícil diagnóstico, se han empleado distintos criterios, denominados mayores y menores de acuerdo a su importancia diagnóstica. Estos criterios fueron propuestos por T. Duckette Jones en 1944 (Stollerman y col., 1965) y actualmente continúan vigentes (Bisno y col., 2002). De acuerdo a Jones, los criterios mayores son la carditis, poliartritis, nódulos subcutáneos, corea y eritema marginado; y los criterios menores son fiebre, artralgia, falla cardíaca, elevación de proteínas de fase aguda tal como la Proteína C Reactiva, leucocitosis y aumento de la velocidad de eritrosedimentación (Stollerman y col., 1965; Bisno, 1996; Bisno y col., 2002). Según Jones, la presencia clínica de un signo mayor con dos menores al mismo tiempo, o la presencia de dos signos mayores, indicarían alta probabilidad de fiebre reumática (Stollerman y col., 1965; Bisno, 1996; Bisno y col., 2002). Respecto a los exámenes paraclínicos, no existen otros exámenes de laboratorios más específicos a excepción de aquellos que certifican infección estreptocócica previa. De éstos el más empleado son los inmunoensayos que determinan el título de anticuerpos anti-estreptolisina-O (Rodríguez, 2002). Los anticuerpos anti-estreptolisina-O son específicos para *S. pyogenes* y aparecen en suero luego de 2 semanas de comenzada la infección, alcanzando su máximo entre las 4-6 semanas (Bisno, 1996). Si bien la población normalmente presenta niveles de anticuerpos anti-estreptolisina-O (Rodríguez, 2002), niveles superiores a 200 unidades Todd/mililitro en adultos o 333 unidades Todd/mililitro en niños (1.04 unidades Todd corresponden a 1 unidad internacional), indicarían infección reciente por *S. pyogenes* (Boreland y col., 1987; Bisno 1996). Es importante notar que un aumento del título de anticuerpos anti-estreptolisina-O sólo estaría indicando que el paciente tiene o tuvo una infección por estreptococo grupo A, pero no certificaría un diagnóstico de fiebre reumática (Bisno 1996). Sin embargo aproximadamente el 80% de los pacientes con fiebre reumática aguda poseen títulos de anticuerpos anti-estreptolisina-O superiores a 333 unidades internacionales/mL (UI/mL) (Boreland y col., 1987).

## 1.2.- Estreptolisina-O, obtención y aplicación

### 1.2.1.- Características generales de la estreptolisina-O

Los estreptococos sintetizan distintos tipos de moléculas capaces de lisar glóbulos rojos, y este hecho ha servido como base para la clasificación primaria de estos microorganismos (Rodríguez, 2002). La mayoría de las infecciones en humanos son provocadas por cepas de *S. pyogenes* que producen halos transparentes de hemólisis alrededor de las colonias, cuando los mismos son cultivados en placas de agar sangre. Este tipo de hemólisis se denominan “hemólisis beta” ( $\beta$ ) (Rodríguez, 2002). Todd, observó la existencia de dos toxinas sintetizadas por la mayoría de los estreptococos; una estable y otra lábil en presencia de oxígeno, denominadas respectivamente estreptolisina S y estreptolisina-O (SLO) (Todd, 1932). Todd, demostró que la SLO es antigénica y que la inhibición de su capacidad hemolítica era una herramienta útil para estudiar la respuesta inmune en pacientes con enfermedad estreptocócica (Todd, 1932). La SLO es sintetizada por todas las cepas de estreptococo grupo A y por algunas cepas de los grupos C y G, en particular aquellas que causan infecciones humanas (Halbert, 1970; Bastin y col., 1972). Se ha reportado que la producción de SLO alcanza su máximo entre las 6 y 12 horas de iniciado el cultivo *in vitro*, disminuyendo significativamente los títulos de la misma luego de ese tiempo (Fuveysy y col., 1967). Ésta es una proteína termolábil que puede ser reversiblemente oxidada (Neill y Mallory, 1926), siendo la actividad hemolítica y la toxicidad de la misma asociadas a condiciones de reducción (Halbert, 1970; Smyth y Duncan, 1978).

### **1.2.2.- Toxicidad de la estreptolisina-O**

Se ha hallado correlación entre la sensibilidad celular y la presencia de colesterol en la membrana celular (Bernheimer, 1976); comprobándose que la SLO es una exotoxina cuya forma nativa se liga al colesterol presente en la membrana de una variedad de células, tales como leucocitos polimorfonucleares, plaquetas y eritrocitos, provocando lisis de los mismos (Bhakdi y col., 1985). El daño celular está causado por alteraciones de la membrana, ocasionando estructuras en forma de "canal" que penetran en el dominio apolar de la bicapa lipídica. (Niedermeyer, 1985). Respecto a otros efectos tóxicos de la SLO, se ha observado la producción de lesiones cardíacas (Halbert, 1970; Atik, 1994). En estudios donde la toxina parcialmente purificada se administró por vía intravenosa en conejos, se observó que ésta causó lesiones focales en miocardiocitos que llevaron a la destrucción de los mismos y muerte por disrupción cardíaca en un período entre 24 y 40 horas (Halbert, 1970). Análisis por microscopía electrónica confirmaron que la intoxicación con esta toxina causó cambios ultraestructurales en los miocardiocitos (Atik, 1994). Los electrocardiogramas realizados en conejos y ratones que fueron administrados con dosis letales de SLO por vía intravenosa, revelaron que la muerte abrupta de los mismos fue ocasionada por disrupción de la función cardíaca (Halbert, 1970). Estas alteraciones cardíacas podrían incidir en la liberación de moléculas de bajo peso molecular que actúan como mediadores fisiológicamente activos (Halbert, 1970; Atik, 1994), provocando por ejemplo, aumento de la liberación de potasio por parte de los miocardiocitos, que conlleva a una rápida hemólisis intravascular (Alouf, 1980). Otros estudios han demostrado que una variedad de células, además de los eritrocitos, son susceptibles a los efectos tóxicos de SLO tales como polimorfos nucleares (Duncan y Schlegel, 1975), macrófagos y plaquetas (Bernheimer, 1974; Alouf, 1980). Estas células presentaron distintos grados de susceptibilidad, siendo los

leucocitos aproximadamente 100 veces más resistentes a los efectos citotóxicos de esta toxina que los eritrocitos (Alouf, 1980).

### **1.2.3.- Actividad hemolítica**

Respecto a la actividad hemolítica de esta proteína, se observó que eritrocitos de distintas especies de vertebrados eran susceptibles a lisis, con excepción de los eritrocitos de ratón (Smyth y Duncan, 1978). La cinética de la hemólisis ha sido investigada en detalle. Ciertos aspectos cuantitativos de la hemólisis causada por SLO son diferentes que las ocasionadas por otras moléculas, incluso aquellas relacionadas, tales como la pneumolisina de *Streptococcus pneumoniae* (Bernheimer, 1974). El período de latencia de la hemólisis por SLO es relativamente corto, siendo inferior a un minuto cuando la concentración de toxina es incrementada. Igualmente, la velocidad de lisis aumenta rápidamente a altas concentraciones de toxina, siendo prácticamente instantánea una vez que ésta comenzó (Alouf, 1980). Estudios de los mecanismos de hemólisis demostraron que la SLO reducida se fija a los eritrocitos, mientras que la forma oxidada no, siendo el anclaje de la molécula reducida en forma rápida e independiente de la temperatura. Se estima que alrededor de 1.500 moléculas de SLO son suficientes para saturar el sitio de fijación sobre la superficie de los eritrocitos, y que aproximadamente 360 moléculas causan la hemólisis de los mismos. Estas cifras indican que esta exotoxina es más potente que otros agentes hemolíticos. Por ejemplo, la toxina  $\alpha$  de estafilococo requiere alrededor de 13.000 moléculas para lisis, mientras que los glicósidos de saponina, ácidos grasos, polienos y detergentes, requieren de 2 millones a varios millones de moléculas para lisis un único eritrocito (Bhakdi y col., 1985).

### **1.2.4.- Relación entre estreptolisina-O y fiebre reumática**

A pesar de la considerable información sobre esta exotoxina, el rol de la misma en el desarrollo de lesiones locales supurativas así como en la evolución de secuelas no supurativas de la infección post-estreptocócica no es del todo claro. Así, se ha observado que algunos pacientes con título elevado de anticuerpos anti-SLO desarrollaron infecciones estreptocócicas severas (Dajani, 1995). También se halló relación entre la síntesis de SLO y la recurrencia de fiebre reumática; encontrándose que en 40 aislados de cepas estreptococo del grupo A provenientes de pacientes con fiebre reumática, el 50% de los mismos desarrolló fiebre reumática recurrente. La comparación de estas cepas *in vitro* reveló que aquellas cepas que causaban recurrencia de la enfermedad sintetizaban mayor cantidad de SLO (Taranta y Markowitz, 1982). Los estudios mostraron una relación directamente proporcional entre el título de anticuerpos anti-SLO y la incidencia de fiebre reumática, variando entre 0.8% para títulos menores de 120 UI/mL a 5.5% para títulos mayores de 250 UI/mL (Torres, 1994). Se postula que el papel de la SLO en la patogenia de la fiebre reumática sería a través de la formación de complejos antígeno-anticuerpo: La SLO liberada a la circulación durante la infección podría unirse a anticuerpos y circular como complejo antígeno-anticuerpo. Tanto estos complejos como la SLO disociada de los mismos en forma gradual, tendrían predilección por el tejido cardíaco contribuyendo al desarrollo de la fiebre reumática (Siegel y col., 1961; Bisno, 1996; Bisno y col., 2002).

#### **1.2.5.- Valor de la titulación de anticuerpos anti-estreptolisina-O**

La titulación de anticuerpos anti-SLO es el ensayo más frecuente para determinar infección por *S. pyogenes* (Arroyo de la Fuente, 1973). Los títulos considerados valores normales son variables, dependiendo de la edad, lugar geográfico, contexto epidemiológico y estación del año. En ausencia de datos precisos sobre los valores normales en una zona geográfica determinada, se consideran títulos elevados de anticuerpos anti-SLO aquellos superiores a 250 UI/mL en adultos y 333 UI/mL en niños menores de 5 años (Klein y col., 1970). La determinación de

anticuerpos anti-SLO tiene además valor pronóstico en el diagnóstico precoz de otras patologías reumáticas no asociadas a infección por *S. pyogenes*, tales como en episodios agudos de artritis reumatoidea y espondilitis anquilosante (Peña, 1983).

#### **1.2.6.- Métodos para la determinación de anticuerpos anti-estreptolisina-O**

Se han desarrollado varios métodos para la detección de anticuerpos anti-SLO en muestras de suero. Algunos de éstos son el método de Rantz-Randall (Rantz y Randall, 1945), el test de aglutinación de partículas de látex (Gerber y col., 1990), el ensayo de ELISA (Moscoso del Prado y Serrano, 1989) y el inmunoensayo turbidimétrico (Hostetler y col., 1988). El método de Rantz-Randall, es una modificación del procedimiento desarrollado originalmente por Todd en 1932 (Todd, 1932), que consiste en la inhibición de la hemólisis de eritrocitos de conejo por diluciones sucesivas de anticuerpos anti-SLO presentes en suero, frente a una concentración constante de SLO, siendo ésta la prueba de referencia (Curtis y col., 1988). Sin embargo los reactivos de aglutinación de partículas de látex son ampliamente usados en el laboratorio de diagnóstico debido a la rapidez, fácil manejo y a que los mismos evitan la manipulación de eritrocitos. Estos reactivos consisten en partículas de látex a las que se les ha adsorbido SLO purificada, aglutinando al mezclarse con suero que contiene anticuerpos anti-SLO (Gerber y col., 1990). La calidad de los reactivos de diagnóstico está en relación directa con la calidad de la SLO, siendo crítico el proceso de obtención de la misma para el posterior desarrollo del reactivo. La obtención y purificación de SLO nativa proveniente de cultivo de *S. pyogenes* es un proceso complejo, con muchos pasos de purificación y bajo rendimiento de producto (Altahus y Merle, 1993).

La dificultad en obtener un protocolo de producción de SLO es un problema que han debido enfrentar las compañías productoras de este reactivo. El uso de tecnología de ADN recombinante con el fin de producir SLO recombinante (SLOr) es una alternativa para la producción de esta proteína. Es posible, por medio de técnicas standard modificar cepas de *Escherichia coli* para que sobreexpresen SLOr, existiendo un buen número de sistemas de expresión que permiten purificar proteínas recombinantes por métodos sencillos y reproducibles (Balbas y

Bolívar, 1990; Baneyx, 1999). En efecto, este tipo de alternativa es la usada en la actualidad por las compañías productoras de reactivos de látex para determinación de anticuerpos anti-SLO (Prof. Battistoni, comunicación personal). Sin embargo, ha sido documentado que la producción de SLOr, tiene problemas asociados a inactivación proteolítica de la misma por parte de proteasas de *E. coli* y a la insolubilidad de la proteína entera recombinante (Weller y col., 1996).

La insolubilidad de la proteína recombinante, de presentarse, plantea un serio problema. Como estrategia, es posible clonar y expresar fracciones de dicha proteína que pudieran ser solubles (Hockney, 1994; Yamada y col., 1995; Weller y col., 1996). También se ha descrito que estos problemas pueden ser solucionados obteniendo SLOr como proteína de fusión con alguna proteína portadora (Yamada y col., 1995; Weller y col., 1996). Si bien no es necesario obtener SLOr activa para su uso en inmunoensayos, la obtención de SLOr con actividad hemolítica y biológica, es una característica deseada que permitiría la realización de otros ensayos que se emplean en diagnóstico, tal como el ensayo de Rantz-Randall. Además el poseer SLOr con actividad hemolítica posibilitaría realizar ensayos de seguimiento durante el proceso de recuperación y purificación, siendo ventajoso para el proceso de producción.

## **1.3.- Optimización de la expresión y producción de proteínas recombinantes**

### **1.3.1.- Generalidades**

En los últimos años han sido publicados diversos estudios focalizados a la optimización de la producción y escalado de proteínas recombinantes para uso médico, veterinario e industrial. Aunque células de mamíferos, insectos y

levaduras han sido usadas como hospedadores, la bacteria *E. coli* continúa siendo el hospedador más empleado para la expresión de genes heterólogos. Muchas proteínas heterólogas expresadas intracelularmente en *E. coli* se producen rutinariamente con niveles superiores al 15% del total de proteínas celulares, a menudo en forma de agregados insolubles llamados cuerpos de inclusión (Hockney, 1994; Hannig y Makrides, 1998). Los cuerpos de inclusión están determinados por una combinación de factores relativos a la velocidad de plegamiento y agregación, solubilidad de la proteína, estabilidad termodinámica y plegamiento intermediario así como susceptibilidad a degradación proteolítica e interacción con chaperonas (Buchner, 1996). Al elegir un sistema de expresión para incrementar los niveles de producción de las proteínas recombinantes deben tenerse en cuenta muchos factores. Estos incluyen características del crecimiento celular, niveles de expresión, expresión intracelular y extracelular, modificaciones post-traduccionales, actividad biológica de la proteína de interés, así como características especiales en el caso de la producción de proteínas terapéuticas (Das, 1990). La selección de un sistema particular de expresión requiere además la valoración de costos del proceso así como de otras consideraciones económicas. Si bien *E. coli* es el microorganismo más empleado para la producción de proteínas recombinantes, debido en parte al conocimiento de la biología molecular del mismo (Derynck y col., 1980; Duffaud y col. 1987; Datar y col., 1993), no todos los genes pueden expresarse eficientemente en este microorganismo. Esto puede estar determinado por las características de la secuencia génica, estabilidad y eficiencia traduccional del ARN mensajero (ARNm), plegamiento proteico, degradación proteica por proteasas celulares, diferencias de uso de determinados codones del gen extraño respecto a *E. coli*, así como la toxicidad potencial de la proteína heteróloga al hospedador (Baneyx, 1999). Las mayores desventajas de los sistemas de expresión en *E. coli* incluyen la incapacidad de realizar modificaciones post-traduccionales en proteínas eucariotas, la carencia de mecanismos de secreción para la liberación eficiente de proteínas al medio de cultivo, y limitada capacidad de formación de puentes disulfuro (Baneyx, 1999). Por otro lado, muchas proteínas eucariotas retienen su actividad biológica en forma no glicosilada pudiendo ser producidas en *E. coli* (Das, 1990).

### **1.3.2.- Características generales de un vector de expresión**

La construcción de un vector de expresión requiere la consideración de varios elementos con el fin de asegurar mayores niveles de síntesis proteica (Makrides, 1996). El mismo debe poseer un promotor “fuerte”, baja expresión basal, ser fácilmente transferible con el fin de evaluar la producción proteica en distintas cepas y tener un sistema de inducción simple y efectivo (Gergiou, 1996). Debe incluirse factores de terminación de la transcripción (Rosenberg y Court, 1979), pues éstos protegen el ARNm de degradación exonucleotídica, extendiendo la vida media del mismo (Wong y Chang, 1986; Belasco y Higgins, 1988; Belasco, 1993). Otro factor importante a tener en cuenta en la construcción de un vector de expresión es el sitio de unión al ribosoma. La secuencia Shine-Dalgarno interactúa con el extremo 3' del ARN ribosómico (ARNr) 16 S durante el inicio de la traducción (Gold y Storno, 1990), siendo la distancia adecuada entre ésta y el codón de inicio de la traducción de 5 a 13 pares de bases (Gold y Storno, 1990). Esta distancia es relevante para lograr una adecuada eficiencia de la traducción (Hall y col., 1982, Gold y Storno 1990). Además, debe considerarse el número de copias del plásmido, determinado por el origen de replicación, debido a que en algunos casos, plásmidos con elevado número de copia dan alta eficiencia de proteína expresada (Morino, y col., 1988), pero en otros, la expresión proteica decrece cuando el número de copias plasmídica aumenta (Vásquez y col., 1989). Sumado a ello, se ha observado que la presencia de promotores fuertes en plásmidos con alto número de copia podría interferir con la viabilidad celular (Minas y Bailey, 1995).

### **1.3.3.- Localización de la expresión de proteínas recombinantes**

La localización de la proteína expresada en el compartimento celular del microorganismo, ya sea en el citoplasma, periplasma, o medio extracelular es clave, debido a que de ella depende la metodología de recuperación y purificación (Baneyx, 1999). La expresión en el citoplasma puede realizarse en forma soluble o en cuerpos de inclusión. Esta última es una forma de expresión frecuente cuando los niveles de producción son elevados (Baneyx, 1999). Si bien la producción de proteínas recombinantes en cuerpos de inclusión tiene ventajas, como obtener alta concentración proteica en forma parcialmente purificada, la recuperación de la actividad biológica puede ser dificultosa y cara cuando el proceso de producción es escalado (Rudolph y Lilie, 1996). Con el fin de evitar estos problemas, varias estrategias de expresión han sido desarrolladas para lograr una expresión con estructura tridimensional similar a la proteína nativa. Algunas de estas estrategias son: coexpresar chaperonas, usar cepas deficientes en tioredoxina con el fin de mantener un potencial redox adecuado que permita el correcto plegamiento, reducir la tasa de síntesis proteica, crecer las bacterias e inducir la expresión a temperaturas menores a las óptimas, así como usar polipéptidos solubles fusionados a la proteína de interés para aumentar la solubilidad de la proteína expresada (Talmadge y Gilbert, 1982; Makrides, 1996).

La expresión dentro del periplasma puede ser una buena aproximación para obtener proteína recombinante purificada de manera simple, debido a que el número de proteínas es menor en este compartimento celular y el entorno oxidante del periplasma puede facilitar el plegamiento apropiado de la proteína (Makrides, 1996). Para mejorar la translocación de las proteínas al periplasma varias alternativas han sido diseñadas. Algunas de las cuales incluyen sobreexpresión de la peptidasa señal I y co-expresión de proteínas que participan en el proceso de transporte de membrana (Makrides, 1996). Por otro lado, la secreción al medio extracelular podría ser una estrategia deseable, debido a que *E.coli* secreta poca proteína al medio extracelular (Baneyx, 1999), con la ventaja que este compartimento tiene menor actividad proteolítica y la purificación podría estar facilitada debido a la baja expresión de proteínas bacterianas como contaminantes. Sin embargo, esta alternativa no es viable para la producción a gran escala de proteínas heterólogas en *E.coli*, debido principalmente a que las

proteínas diseñadas para ser expresadas en el medio extracelular tienen que atravesar el periplasma y la membrana celular externa, siendo un proceso altamente específico (Duffaud y col., 1987). Por lo tanto, los métodos para lograr secreción extracelular requieren la utilización de rutas metabólicas específicas (Stader y Silhavy, 1990), la incorporación de secuencias señales, patrones de fusión y agentes permeabilizantes para mejorar la permeabilización proteica selectiva hacia el exterior celular, obteniéndose generalmente niveles modestos de producción (Makrides, 1996).

#### **1.3.4.- Estrategias para mejorar la expresión de proteínas recombinantes**

No existe un proceso universal de fermentación óptimo para la expresión de todas las proteínas recombinantes en *E. coli*, dado que los niveles de expresión del gen heterólogo son altamente dependientes y específicos para cada sistema (Baile y Ollis, 1977; Atkinson y Mavituna, 1983; Balbas y Bolívar, 1990; Baneyx, 1999). El conocimiento de la relación entre la fisiología microbiana, sistema hospedador/vector y expresión génica durante la fermentación es esencial para optimizar la producción de proteínas recombinantes. Por lo tanto el proceso de optimización requiere el conocimiento y mejoramiento de las condiciones de cultivo basados en la composición del medio, condiciones de crecimiento, métodos de inducción y el logro de mínima inhibición metabólica para un sistema genético dado (Luli y Strahal, 1990), siendo estos parámetros determinados frecuentemente en forma empírica. Por ello, las condiciones de cultivo, junto con el tipo de construcción génica, tienen incidencia en la optimización de la expresión de la proteína heteróloga (Kramer y col., 1994), pudiendo ser controlada mediante las condiciones de fermentación (Dahlegren y col., 1993). Se sabe que optimizando la expresión del gen recombinante en el hospedador adecuado y ajustando las condiciones de cultivo, en algunos sistemas se han obtenido altos rendimientos de proteína heteróloga. Por ejemplo, usando cepas adecuadas de *E.coli* se han reportado porcentajes de expresión de productos recombinantes entre 10% al 40% del total de proteínas, variando los mismos de

acuerdo a las condiciones de cultivo (Klotz, 1983; Mattanovich y col., 1996, Lin y col., 2002). Estudios basados en la producción de proteínas recombinantes en diferentes sistemas de fermentación (cultivo en batch, alimentado y continuo), demostraron que la composición química del medio de cultivo y los factores físicos tales como temperatura, pH, transferencia de oxígeno y agitación, pueden influir en la expresión proteica a distintos niveles biosintéticos, por ejemplo, variando la velocidad de traducción de ARNm (Mattanovich y col., 1996; Lee y col., 1997). Sin embargo, debe tenerse en cuenta que trabajar en sistemas de producción con alta densidad celular, no siempre es beneficioso, ya que puede conllevar a problemas en la dinámica del cultivo celular tales como: limitar la disponibilidad de oxígeno, incrementar los niveles de dióxido de carbono y estimular la formación de metabolitos secundarios como acetato, reducir la eficiencia del mezclado del fermentador junto con dificultad en el control de la generación de calor, causando disminución de la velocidad de crecimiento (Yee y Blanch, 1992). Por lo tanto luego de controlar distintos factores en la construcción génica que pueden afectar la expresión del gen recombinante, tales como optimización del “dosaje” génico (número de copias del plásmido recombinante), control de la velocidad de transcripción y traducción e inducibilidad o constitutividad del sistema, el control del proceso de fermentación es fundamental (Lee y col., 1997). Desde el punto de vista económico y con el fin de lograr una producción con máxima rentabilidad, sería lógico alcanzar alta concentración celular con elevada expresión del producto recombinante (Klotz, 1983). Por lo tanto las condiciones de cultivo y el estado de crecimiento celular al tiempo de la inducción de la expresión proteica, deben ser cuidadosamente evaluados, debido a que los mismos pueden ser muy variables y no predecibles (Zabriskie y col., 1987; Uhlén y col., 1988; Okita y col., 1989; Yang, 1992).

El estudio previo de estos factores en cultivos en matraces de pequeño volumen, puede reducir el tiempo de análisis a escala preparativa. Sin embargo no siempre las condiciones de cultivo en matraces se ajustan a biorreactores de gran volumen debido principalmente a las diferencias físicas del sistema. El empleo de sistemas de expresión que están bajo el control de promotores reprimidos,

permite trabajar en dos fases durante la fermentación: una fase de aumento de la concentración celular y una segunda fase de síntesis de la proteína heteróloga. Dado que el rendimiento dependerá de la concentración de la biomasa celular y de la expresión de la proteína heteróloga, una estrategia empleada es lograr alta concentración celular en el biorreactor durante la primer fase y optimizar las condiciones de inducción de la expresión proteica en la segunda fase con el fin de maximizar la productividad (Kapralek y col., 1991). En este sentido, la optimización durante la etapa de aumento de biomasa celular apunta a ajustar el tipo de nutrientes y su concentración, tanto de fuentes de carbono como de nitrógeno, así como el ajuste de la relación carbono/nitrógeno a factores físicos como pH, temperatura y oxígeno disuelto (Park y Ryu, 1990; Ozer y col., 1991; Yang, 1992).

El control de la fuente de carbono adecuada es esencial. Se ha informado que el suplemento de glucosa al medio de cultivo aumenta la productividad tanto en el crecimiento como en la expresión de proteínas recombinantes en *E.coli* (Robbins y Taylor, 1989). Sin embargo el exceso de glucosa en condiciones aeróbicas, resulta en la oxidación incompleta de la misma, ocasionando acumulación de metabolitos, principalmente ácido acético (Robbins y Taylor, 1989). La acumulación de este metabolito lleva a la inhibición del crecimiento celular, fenómeno denominado "Efecto Crabtree", junto con reducción de la expresión de proteína recombinante (Spivey, 1978; Rinas y col., 1989; Luli y Strahl, 1990; Li y Taylor, 1994), siendo dependiente de la cepa empleada y de las condiciones de cultivo (Robbins y Taylor, 1989). En el caso de la fermentación de *E.coli* en batch, el potencial de este efecto está relacionado con el nivel inicial de glucosa, la capacidad tampón del medio, la densidad celular y el tiempo de inducción (Robbins y Taylor, 1989). Una manera de minimizar estos efectos es disminuir la concentración inicial de glucosa, y/o agregar "pulsos" de la misma distribuidos a lo largo del tiempo durante el crecimiento celular, en concentración adecuada, lo cual convierte el sistema en un reactor-alimentado o "fed-batch" (Gombert y Kilikiam, 1997). Otra alternativa es la sustitución de glucosa por distintas fuentes de carbono (Chou y col., 1994; Aristidou y Bennett, 1999). Se ha documentado

que el agregado de glicerol, incluso a altas concentraciones, como única fuente de carbono, quintuplica la productividad de  $\beta$  lactamasa recombinante en *E.coli* y reduce a un tercio la concentración de ácido acético, comparado con los cultivos en donde se suministró glucosa (Kwon y col., 1996). En otros estudios se sustituyó el uso de glucosa por fructosa obteniendo incremento en la producción de proteínas heterólogas (Aristidou y col., 1999). Otra alternativa es el agregado de competidores no tóxicos al medio de cultivo que compitan con la glucosa en la captación de ésta por parte de la célula como fuente de carbono, tal como el agregado de metil alfa glucósido (Chou y col., 1994).

Otro factor clave para disminuir del "Efecto Crabtree", es la concentración de oxígeno disuelto en el medio de cultivo (Chen y col., 1997). Si bien hay poca documentación de la influencia de la concentración limitante de oxígeno sobre los niveles de expresión en *E.coli*, excepto para el caso de los promotores regulados por oxígeno (Oxer y col., 1991), es posible que el desvío hacia el metabolismo anaerobio pueda influir en la expresión génica mediante afectar la síntesis de proteínas y/o procesos celulares (Chen y col., 1997).

Se ha observado que la temperatura y pH tienen un rol importante en la expresión proteica, al afectar la estabilidad plasmídica, los procesos enzimáticos y el transporte molecular a través de membrana, por lo cual estos parámetros deben ser optimizados en cada sistema de producción (Aiba y Koizumi, 1984). La relación carbono/nitrógeno puede también afectar el número de copias del plásmido, siendo el ADN y las proteínas celulares afectados por este cociente (Bhattacharya y Dubey., 1997a). Debido al efecto significativo de la relación carbono/nitrógeno sobre el hospedador y los parámetros de expresión, es importante optimizar este factor para la máxima expresión de proteínas heterólogas en *E.coli*.

Las condiciones de inducción del cultivo tales como agente inductor, concentración del inductor y tiempo de inducción, son parámetros importantes en la economía global del proceso (Aiba y Koizumi, 1984; Lee y col., 1997; Hanning y Makrides, 1998). La fase de inducción debe lograr alta especificidad con alto rendimiento de producto, por lo cual debe optimizarse el momento adecuado de

inicio de la misma. A modo de ejemplo, si la inducción se realiza en la fase de crecimiento exponencial temprana, se obtiene proteína recombinante con alta especificidad, pero en baja concentración, debido a la escasa biomasa celular obtenida (Lee y col., 1997). En el caso particular de vectores que usan el promotor "tac" se emplea isopropil  $\beta$  D tiogalactósido (IPTG) como agente inductor para la expresión de proteínas recombinantes (Sambrook y col., 1989). Dado que el IPTG es tóxico, no sería una opción adecuada para uso industrial, de modo que se han evaluado distintas alternativas para su sustitución. Con este objetivo, los trabajos de Neubauer y colaboradores (1992) estudiaron el uso de lactosa como agente inductor en sustitución de IPTG en procesos industriales. Esto sería ventajoso desde el punto de vista industrial ya que la lactosa es un agente inductor no tóxico y económico que además puede ser empleado como fuente de carbono (Gombert y Kilikiam, 1998).

Además de las estrategias generales para optimizar la expresión de un gen heterólogo, es importante elegir y/o diseñar un sistema de expresión adecuado.

Los sistemas que emplean proteínas de fusión son una alternativa para expresar proteínas heterólogas con alto rendimiento, siendo apropiados además por poseer esquemas de purificación simples (Duffaud y col., 1987; Ford y col., 1991.). En estos sistemas, la purificación, detección y seguimiento en el proceso productivo son relativamente sencillos debido a la expresión de péptidos, polipéptidos o proteínas fusionados a la proteína recombinante de interés en el extremo N o C terminal. (Duffaud y col., 1987; Ford y col., 1991; Nilsson y col., 1994; Makrides, 1996). Además el uso de estos sistemas disminuye o evita la formación de cuerpos de inclusión, mejora el plegamiento molecular y limita la degradación proteolítica (Nilsson y col., 1994; Makrides, 1996). Algunas de las proteínas usadas en estos sistemas de expresión son: la proteína A de estafilococo, la proteína G de estreptococo, la glutatión-S-transferasa (GST) de *Schistosoma japonicum* y la proteína de unión a la maltosa (Di Guan y col., 1988; Uhlén y Moks, 1990; Ford y col., 1991; Guan y Dixon 1991; Ron y Dressler, 1992; Nilsson y col., 1994; La Vallie y McCoy, 1995; Makrides, 1996).

Respecto a la recuperación y purificación del producto final, el mismo varía de acuerdo al sistema empleado, dependiendo de que el recombinante sea secretado, intracelular, soluble o se encuentre en cuerpos de inclusión. (Uhlén y Moks, 1988). En el caso particular del sistema pGEX, donde el producto recombinante es expresado como proteína de fusión con la enzima GST dentro del citoplasma, la purificación es efectuada por cromatografía de afinidad con glutatión agarosa (Thain y col., 1996). La especificidad del sistema y las condiciones poco desnaturizantes en la que se produce la elución, lo hacen adecuado para uso en productos de aplicación en diagnóstico (Uhlén y Moks, 1988). Debido a que la GST es poco inmunogénica (Uhlén y Moks, 1988), podría usarse la proteína de fusión entera, sin remover la porción GST, en reactivos para inmunodiagnóstico. Por tales motivos, este sistema de expresión podría ser una buena alternativa para la producción de SLO para uso en diagnóstico.

### **1.3.5.- Antecedentes de la producción de estreptolisina-O recombinante**

Diversos laboratorios han desarrollado reactivos para determinar título de anticuerpos anti-SLO. Muchos de ellos están basados en la aglutinación, de partículas de látex adsorbidas con SLO, cuando son enfrentados a muestras de suero que contienen anticuerpos anti-SLO (Curtis y col., 1988; Moscoso del Prado y Serrano, 1989; Gerber y col., 1990). La visualización de esta aglutinación se efectúa a simple vista en portaobjetos y en los últimos años, la utilización de métodos basados en la dispersión de luz tales como nefelometría y turbidimetría, han permitido la utilización de autoanalizadores y la automatización de los ensayos.

Para la producción de estos reactivos es necesario el empleo de cantidades importantes de SLO altamente purificada. Esta toxina contiene 571 aminoácidos de los cuales los 31 primeros del extremo N-terminal pertenecen al péptido señal que permite la secreción de la proteína al medio extracelular a través de la membrana citoplasmática (Pinkney y col., 1995). En los sobrenadantes de cultivos de *S. pyogenes* se encuentra en proporción variable la forma A de 540

aminoácidos y la forma B de 494 aminoácidos. Estas formas moleculares de SLO son resultado de proteólisis por la cisteín proteasa de estreptococo, entre los residuos Lys-77 y Leu-78, siendo esta proteasa producida en concentración variable de acuerdo al pH del medio de cultivo (Pinkley y col., 1995). Ambas formas tienen similar actividad hemolítica. (Bhakdi y col., 1984a; Pinkney y col., 1995).

La producción de SLO, a partir de sobrenadante de cultivo de *S. pyogenes*, es problemática, debido a que el rendimiento es bajo, requiriendo además condiciones de crecimiento estrictas (Althaus y Merle, 1995). Por otra parte, el proceso de purificación de esta toxina es muy largo y complejo, por la dificultad de separar el producto deseado de las proteínas procedentes del medio de cultivo así como de otras proteínas secretadas por el microorganismo. Sumado a ello, la degradación rápida de SLO producida por la cisteín-proteasa durante la recuperación de la misma, es otro factor que dificulta el proceso de purificación, dando como consecuencia un sistema productivo costoso, poco apropiado para la aplicación a nivel industrial (Althaus y Merle, 1995). En el caso particular de la producción de SLO llevada a cabo por compañías productoras de reactivos de inmunodiagnóstico, si bien la misma puede obtenerse como subproducto de la producción de estreptoquinasa por el *S. pyogenes*, ésta no es una alternativa adecuada. Esto es debido a que para obtener niveles apropiados de SLO, es necesario previamente seleccionar cepas que sean altamente productoras de esta exotoxina para lograr un producto de mejor calidad con buenos rendimientos.

La empresa española Biokit S.A, mayor productora a nivel internacional de SLO, informó que la demanda de la producción de SLO tiene una media actual de 50.000 litros de cultivo de *S. pyogenes* por año. El manejo de grandes volúmenes de cultivo de *S. pyogenes* representa un problema de bioseguridad, ya que estos microorganismos son patógenos humanos, sumado al complejo esquema de purificación de SLO, ha motivado que tanto esta compañía como otras, estén desarrollando nuevas estrategias para la producción de SLO.

Con el fin de solucionar los problemas asociados a la producción de esta molécula, se están empleando técnicas de ingeniería genética, usando diferentes

sistemas de expresión (Kehoe y Timmis, 1984; Kehoe y col., 1987; Yamada y col., 1995; Weller y col., 1996). Esta alternativa permitiría lograr mayor rendimiento de producción de proteína recombinante, simplicidad en los sistemas de purificación frente a los esquemas de purificación tradicionales, proporcionando además mejora en la bioseguridad del proceso en la planta de producción. Esto trae como consecuencia una mayor productividad, mejor reproducibilidad lote a lote, facilidad de producción y reducción de residuos de difícil eliminación, lográndose disminución en los costos del producto. Por tales motivos la producción de SLOr, es considerada por las empresas productoras de productos biológicos, estimándose que en los próximos años, la producción de la molécula recombinante sustituirá definitivamente a la molécula nativa.

## **1.4.- Objetivos del trabajo**

Dada la conveniencia de disponer de SLO con el fin de desarrollar y producir posteriormente kits de inmunoensayos para la detección de la infección causada por *S. pyogenes*, se proponen los siguientes objetivos :

### **1.4.1.- Objetivo general**

Obtener un protocolo estandarizado de producción de SLOr a escala fermentador de 3 litros en condiciones aptas para realizar su escalado a nivel industrial.

### **1.4.2.- Objetivos específicos**

**1.4.2.1.-** Clonar parte de la molécula de SLO en un sistema de expresión bacteriano y producir a microescala, en matraces de 100 mL, SLOr.

**1.4.2.2.-** Determinar el valor antigénico de esta molécula en inmunoensayos.

**1.4.2.3.-** Estandarizar el sistema de recuperación y purificación en microescala establecida anteriormente.

**1.4.2.4.-** Obtener un protocolo de producción en fermentador de 3 litros y de separación primaria del producto.

**1.4.2.5.-** Desarrollar un sistema de formulación de la SLOr para la presentación final del producto.

## CAPITULO 2

# MATERIALES Y MÉTODOS

### 2.1.- Materiales

#### 2.1.1.- Productos químicos, enzimas, marcadores de peso molecular, sistemas de purificación y medios de cultivo

Los productos químicos fueron obtenidos de SIGMA Chemical (Poole, Dorset, U.K) o BDH Chemical Ltd. (Dageenham, U.K) y fueron de grado analítico o similar. Las endonucleasas de restricción y otras enzimas para uso en biología molecular, los marcadores de peso molecular de ácido desoxiribonucleico (ADN), los sistemas de preparación y purificación de ADN plasmídico Minipreps Wizard<sup>™</sup> y Clean Up<sup>™</sup> fueron de Promega Corporation (Madison, USA). El kit GeneClean II fue obtenido de BIO 101(distribuido por Stratatech Scientific Ltd., Luton, Bedfordshire, U.K). Los antibióticos e IPTG fueron adquiridos por SIGMA. Los conjugados para inmunoanálisis fueron obtenidos por Dako Ltd. (Buckinghamshire, U.K). Los marcadores de peso molecular de proteínas fueron obtenidos por Amersham Pharmacia Biotech (Uppsala, Suecia) y New England

Biolabs Inc. (Hertfordshire, U.K). Los medios de cultivo para crecimiento bacteriano fueron marca Difco laboratories (Molesley, U.K).

### **2.1.2.-Soluciones tampones, soluciones stock y medios de cultivo**

Tampón Carbonato:  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  1.59 g,  $\text{NaHCO}_3$  2.93 g, agua destilada ( $\text{H}_2\text{O}_d$ ) llevar a 1 litro, pH 9.6.

Tampón Carbonato:  $\text{NaHCO}_3$  0.1 M, pH 8.2.

Tampón de corrida para ADN 5x: glicerol 25%, azul de bromofenol 0.2%, cianol xilene 0.4% en TAE 5x.

Tampón fosfato salino (PBS) 10x:  $\text{NaCl}$  80.0 g,  $\text{KCl}$  2g,  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  11,5 g,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  2g, ( $\text{H}_2\text{O}_d$ ), llevar a 1 litro, pH 7.2.

Tampón de muestra para electroforesis en gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) 2x: 12.5 mL 2-amino [2-hidroximetil] propano-1,3-diol (Tris) 1 M pH 6.8, 40 mL dodecil sulfato de sodio (SDS) 10%, 20 mL de glicerol y 2mL de azul de bromofenol 0.2%, ( $\text{H}_2\text{O}_d$ ) hasta 100 mL., siendo agregado  $\beta$  mercaptoetanol al 5% previo a su uso.

Tampón de corrida SDS-glicina: Tris base 30.3 g, glicina 144.1 g, SDS 10 g, ( $\text{H}_2\text{O}_d$ ) hasta 1 litro, pH 8.3.

TAE 10x: Tris base 96.8 g, acetato de sodio 26.75 g, ácido tetra-acético etilen diamina (EDTA) 14.8 g, ( $\text{H}_2\text{O}_d$ ) hasta 2 litros, pH ajustado a 8.0 con ácido acético glacial.

TBE 10x: Tris base 121.0 g, ácido bórico 61.8 g, EDTA 18.6 g, ( $\text{H}_2\text{O}_d$ ) hasta 1 litro, pH 8.0.

TES: Tris 50 mM pH 8.0, EDTA 10 mM, NaCl 50 mM.

TE 50x: Tris base 60 g, 100 mL EDTA 0.5 M, (H<sub>2</sub>O)<sub>d</sub> hasta 1 litro, pH 8.0.

Tampón de transferencia para inmunoblot 10x: glicina 28.8 g, Tris base 6.1 g, metanol 400 mL, SDS 2 g, (H<sub>2</sub>O)<sub>d</sub> hasta 2 litros, pH 8.3.

El medio líquido de cultivo Luria Broth (LB) y sólido (LB-agar) fueron preparados en el Laboratorio Central del Departamento de Desarrollo Biotecnológico.

### **2.1.3.- Bacterias**

Las cepas de *E.coli* usadas en este estudio se muestran en la tabla 2.1.-

**Tabla 2.1.- Listado de cepas usadas.** Cepas de *E. coli* empleadas en el estudio de la expresión de SLOr como proteína de fusión conGST (GST-SLOr). Las mismas fueron suministradas por Promega Corporation (Madison, USA).

Cepa	Genotipo	Referencia
<i>E.coli</i> DH1	<i>supE44 hsdR17 recA1 endA1 gyrA96 thi-1 relA1</i>	Hanahan y Meselson col., 1983
<i>E. coli</i> JM 109	<i>recA1 supE44 endA1 hsdR17 gyrA96 relA1 thi Δ(lac-proAB)</i> F' [ <i>traD36 proAB<sup>+</sup> lacI<sup>q</sup> lacZΔM15</i> ]	Yanisch-Perron y col., 1985
<i>E. coli</i> RB791	W3110 <i>lacI<sup>q</sup></i> L8	Brent y Ptashne, 1981
<i>E. coli</i> TG2	<i>supE hsdΔ5 thiΔ(lac-proAB)</i> <i>Δ(srl-recA)306::Tn10(tet<sup>r</sup>)</i> F' [ <i>traD36 proAB<sup>+</sup> lacI<sup>q</sup> lacZΔM15</i> ]	Sambrook y col., 1989
<i>E. coli</i> XL1- Blue	<i>supE44 hsdR17 recA1 endA1 gyrA46 thi relA1 lac<sup>-</sup></i> F' [ <i>proAB<sup>+</sup> lacI<sup>q</sup> lacZΔM15 Tn10(tet<sup>r</sup>)</i> ]	Bullock y col., 1987

#### 2.1.4.- Oligonucleótidos sintéticos

Se utilizaron oligonucleótidos especialmente diseñados para la amplificación de ADN por Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) (Saiki y col., 1988b). Los mismos fueron sintetizados por Operon Technologies, Inc (Alameda, USA). Los

cebadores fueron resuspendidos en (H<sub>2</sub>O)<sub>d</sub> estéril, a concentración 2.5 μM. Las secuencias de los oligonucleótidos fue la siguiente:

BV1 (forward): 5'-AAT GGA TCC CTT GCT CCC AAA GAA ATG CC-3', que corresponde a los nucleótidos 430-450 del gen completo *s/o*, el cual se diseñó en el extremo 5' el sitio para la enzima *Bam*H I (indicado con sublínea).

BV2 (reverse): 5'-CCG GAA TTC CTA CTT ATA AGT AAT CGA ACC- 3', que corresponde a la secuencia correspondiente a los nucleótidos 1894-1914 con adición del sitio *Eco*R I en el extremo 5' (indicado por sublínea).

## **2.1.5.- Sueros y antisueros**

### **2.1.5.1.- Sueros humanos**

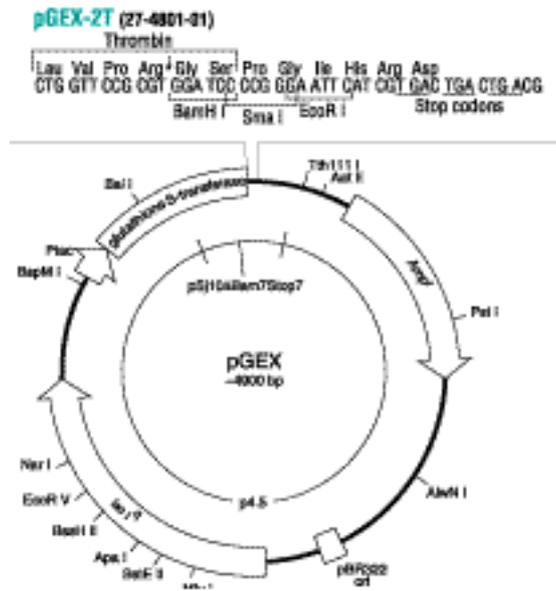
Los sueros humanos, provenientes de pacientes con infección de *Streptococcus pyogenes*, fueron suministrados por gentileza de la Dra. Isabel Bentancourt, Laboratorio Central del Hospital de Clínicas "Dr. Manuel Quintela, Facultad de Medicina, Universidad de la República (Montevideo, Uruguay). Los sueros fueron alicuotados en volúmenes de 0.5 mL y congelados a -20°C hasta su uso.

### **2.1.5.2.- Sueros de ratón**

Los sueros de ratón positivos para anticuerpos anti-GST fueron obtenidos mediante gentileza de la Lic. María Moreno, Laboratorio de Vacunas Recombinantes, Facultad de Medicina, Universidad de la República (Montevideo, Uruguay) empleando GST recombinante para la inmunización. Los mismos fueron alicuotados en volúmenes de 0.5 mL y congelados a -20°C hasta su uso.

**2.1.6.- Plásmidos**

El plásmido pGEX-2T (Figura 2.1), utilizado para el clonado y expresión de la proteína de fusión, fue proporcionado por Amersham Bioscience (Upsala, Suecia), siendo utilizado según las instrucciones del fabricante.



**Figura 2.1.- Plásmido pGEX-2T.** Esquema del plásmido obtenido por Amersham-Bioscience (Upsala, Suecia).

**2.1.7.- Cromatografía de afinidad**

El kit completo para la realización de cromatografía de afinidad por glutatión sefarosa fue suministrado por Amersham Bioscience (Upsala, Suecia), siendo conservado hasta su utilización según las instrucciones del fabricante.

## **2.2.- Métodos**

### **2.2.1.- Análisis computacional de la molécula de SLO**

La secuencia de aminoácidos de la molécula SLO fue analizada usando un programa de computación predictivo de distintas características moleculares (PC-Gene versión 6.60, Intelligenetics Inc. Switzerland; Moore y col., 1988). Este programa predice distintos perfiles de la proteína empleando diferentes algoritmos según la secuencia primaria y estructura secundaria. Los algoritmos utilizados por el programa para la predicción de giros beta fue el desarrollado por Chou y Fasman (Chou y Fasman, 1979), para el perfil de hidrofiliidad el algoritmo de Hopp y Woods (Hopp y Woods, 1981) y el perfil de flexibilidad fue calculado según el algoritmo de Karplus y Shultz (Karplus y Shulz, 1985).

### **2.2.2.- Centrifugaciones**

Los procedimientos que involucraron pequeñas cantidades, fueron llevados a cabo en tubos de microcentrífugas de 1.5 mL (Eppendorf) y fueron centrifugados usando microcentrífuga. Para volúmenes mayores se usaron tubos para centrífuga de 25 mL, 50 mL o 500 mL, siendo las centrifugaciones efectuadas en centrífuga Sorvall RC-5B (Du Pont Instruments).

### **2.2.3.- Métodos para análisis y manipulación de ADN**

Todas las técnicas de ADN recombinante, a menos que se especifique lo contrario, fueron basadas en protocolos estándares (Sambrook y col., 1989)

#### 2.2.4.- Electroforesis de ADN en geles de agarosa

El ADN fue controlado y fraccionado en geles de agarosa al 0.7 %. Los geles fueron preparados y corridos a 90 voltios (V) en tampón TBE. Las muestras fueron mezcladas con 1/5 del volumen de tampón de corrida 5x.. EL ADN fue teñido usando bromuro de etidio en TBE 0.5 µg/mL, visualizado en luz ultravioleta (UV) y fotografiado empleando cámara Polaroid. Los tamaños de los distintos fragmentos de ADN fueron estimados por comparación con estándares de peso moleculares, usando los marcadores de ADN III o IV (Boheringer Mannheim) o el DNA φX174RF digerido con *Hae* III (New England Biolab).

#### 2.2.5.- Amplificación de ADN por PCR

Para la amplificación del gen *slo* se empleó PCR, usando los oligonucleótidos específicos descritos en el apartado 2.1.4 y el ADN molde proveniente de un cultivo de *S. pyogenes* según el apartado 2.2.3. Las reacciones fueron llevadas a cabo usando un termociclador (PCR Express, (Hybait), y un volumen de 100 µL conteniendo: 10 µL de tampón Vent 10x (KCl 10mM, (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 10 mM, Tris-HCl (pH 8.8) 20 mM, MgSO<sub>4</sub> 2mM, Tritón X-100 0.1%), 2µL de la mezcla de dNTPs 10 mM (dATP, dCTP, dGTP y dTTP), 1 µM de cada cebador, 30 µL de ADN molde y 1µL (2.5 unidades) de Vent ADN Polimerasa (Vent Polymerase New England Biolabs, Inc.), llevando a volumen con (H<sub>2</sub>O)<sub>d</sub> estéril. La reacción de amplificación fue realizada usando el siguiente programa: un paso inicial de desnaturalización a 94°C por 10 minutos, seguido por 3 primeros ciclos de: 1 minuto de desnaturalización a 94°C, 2 minutos de alineamiento a 42°C y 2 minutos de elongación a 72°C, por último se realizaron 27 ciclos de 1 minuto a 94°C, 1 minuto con 30 segundos a 52°C y 1 minuto 30 segundos a 72°C, seguidos por un paso de extensión de 7 minutos a 72°C, siendo posteriormente dejado a 4°C.

### **2.2.6.- Digestión de ADN con enzimas de restricción**

Las digestiones de restricción fueron realizadas según las condiciones recomendadas por los suministradores de las enzimas, usando un volumen total de 15  $\mu$ L. Las reacciones fueron incubadas a 37°C y, culminado el tiempo de reacción, fueron guardadas a -20°C para su posterior uso.

### **2.2.7.- Reacción de ligación**

Las reacciones de ligación fueron llevadas a cabo en volúmenes de 15  $\mu$ L a 16°C. La relación molar de inserto:vector con extremos cohesivos fue de 3:1, siendo empleada 1 unidad Weiss (Weiss y col., 1968) de ADN ligasa de bacteriófago T4 en cada reacción.

### **2.2.8.- Preparación y purificación de ADN plasmídico**

El ADN plasmídico fue obtenido usando el kit “Wizard Miniprep” (Promega), siguiendo las instrucciones del fabricante.

### **2.2.9.- Purificación de ADN a partir de geles de agarosa**

La purificación de ADN plasmídico y de ADN del gen *slo*, amplificado por PCR, fueron llevadas a cabo luego de la reacción con las enzimas de restricción apropiadas, y controladas por corridas en geles de agarosa. Para ello se usó el kit GeneClean II (BIO 101 Inc.), según las instrucciones del fabricante.

### 2.2.10.- Preparación y transformación de *E.coli* competentes

Para la preparación de células competentes, un cultivo de *E. coli* fue crecido 12 – 16 horas. Posteriormente fue diluido 1:100 en caldo LB fresco y crecido a 37°C en shaker orbital con una agitación de 200 r.p.m. a hasta una densidad óptica (DO) de 600 nm = 0.2-0.4. Las células fueron incubadas en baño de hielo por 20 minutos, siendo posteriormente cosechadas por centrifugación a 1.083 x g, 15 minutos. Luego las células fueron resuspendidas 1:2 del volumen original en MgCl<sub>2</sub> 0.1M a 4 °C y nuevamente centrifugadas. A continuación, las células fueron resuspendidas en 1:30 del volumen original en CaCl<sub>2</sub> 0.1 M a 4 °C y dejadas en baño de hielo por 90 minutos. Alícuotas de 200 µL de células fueron mezcladas con 1:2 del volumen de la mezcla de ligación, incubadas en baño de hielo por 30 minutos, seguido por un shock térmico a 42°C por 2 minutos, y puestas nuevamente en baño de hielo por 1 minuto. A continuación, 2 mL de caldo LB fueron adicionados a las células y éstas fueron cultivadas por 90 minutos a 37°C. Las bacterias fueron plaqueadas en LB agar conteniendo 50 µg/mL de ampicilina, y cultivadas durante 16 horas a 37°C.

### 2.2.11.- Métodos para análisis de la expresión proteica

#### 2.2.11.1.- Expresión de proteínas en *E.coli*

La expresión de proteínas recombinantes producidas en *E.coli* fue analizada en lisados bacterianos por SDS-PAGE e inmunoblot. Cultivos de *E.coli* fueron crecidos durante 12-16 horas en caldo LB con ampicilina 50 µg/mL. A continuación, 5 mL de caldo LB fresco con ampicilina 50µg/mL fue inoculado con una dilución 1:100 del cultivo original y crecido hasta DO 600 nm = 0.5. Luego, se indujo con IPTG 1 mM por 4 horas a 37°C y 200 rpm. Posteriormente las células fueron incubadas en baño de hielo por 10 minutos antes de ser cosechadas a 1.083 x g por 15 minutos. Los sedimentos bacterianos fueron resuspendidos en 200 µL de PBS frío y posteriormente sonicados en hielo (Soniprep 150 Sonicator,

MSE, Crawley, Sussex, U.K.). La sonicación se llevó a cabo mediante 30 ciclos, siendo cada ciclo de 30 segundos de sonicación seguido por 30 segundos de descanso. A continuación las muestras fueron incubadas por 30 minutos a temperatura ambiente con Tritón X 100 al 1%. Luego fueron centrifugadas a 12.000 x g por 10 minutos. Alícuotas del sobrenadante y del precipitado obtenidos fueron guardados a -20 °C para ser posteriormente analizados. A continuación, se procedió a la purificación a partir del sobrenadante, de la proteína recombinante mediante cromatografía de afinidad por glutatión sefarosa (Smith y col., 1993). Brevemente, una matriz de glutatión sefarosa equilibrada con PBS, fue incubada en batch con sobrenadante previamente filtrado por filtros de 0.45 µm (Sartorius, Epsom, Surrey, U.K), durante 1 hora a temperatura ambiente. Luego fue transferida a una columna y el sobrenadante fue drenado a través de la misma, siendo posteriormente lavada con 30 volúmenes de columna. La fracción ligada a la matriz fue eluída por adición de tampón de elución (glutatión reducido 20 mM en Tris-HCl 50 mM, pH 8), empleando 1 volumen de lecho e incubando por 10 minutos. La elución fue seguida a DO 280 nm y las fracciones fueron colectadas para ser analizadas por SDS-PAGE. Después de la elución la matriz fue lavada con 5 volúmenes de NaCl 2 M, re-equilibrada en PBS y guardada a 4°C para su uso inmediato. En caso contrario, la misma fue guardada en etanol 20% a 4°C.

#### **2.2.11.1.1.- SDS-PAGE**

Las muestras fueron fraccionadas de acuerdo al método discontinuo de Laemmli (1970) en geles de corrida de 0.75 mm de grosor usando el sistema MiniPROTEAN II (Bio-Rad), empleando SDS-PAGE al 10% de acrilamida. Las muestras fueron mezcladas con un volumen igual de tampón de muestra 2 x y calentadas 3 minutos previo a la corrida. Las electroforesis fueron llevada a cabo con 25 mili amperios (mA) a corriente constante en tampón SDS-glicina, siendo posteriormente teñidos con Azul Coomassie Brillante. El teñido fue llevado a cabo por 3 horas usando 0.2% del colorante en una solución fijadora (agua 50%, metanol 40%, ácido acético 10%). Luego, los mismos fueron desteñidos por 8

horas en solución fijadora. Los pesos moleculares de los componentes proteicos en las muestras fueron calculados por interpolación en la curva estándar de regresión lineal, obtenida mediante el cálculo del coeficiente de migración de los pesos moleculares estándares empleados.

#### **2.2.11.1.2.- Inmunoblot**

Para la transferencia de geles se empleó el sistema "Mini Trans-Blot cell" (Bio-Rad) empleando membranas de nitrocelulosa de 0.45  $\mu\text{m}$  (Schleicher y Schuell; Anderman y Co. Ltd., Surrey; Towbin y col., 1979). Previamente, el tampón de transferencia (Tris-HCl 25 mM, glicina 192 mM, metanol 20% v/v), fue enfriado a 4°C, y luego de terminada la electroforesis, los geles fueron embebidos en tampón de transferencia por 10 minutos. Hojas de nitrocelulosa y varias piezas de papel de filtro Whatman 3 MM fueron cortadas de acuerdo al tamaño de los geles, siendo a continuación embebidos en el mismo tampón. Los geles y la nitrocelulosa fueron puestos entre el papel de filtro, posicionados de modo tal que el gel esté cercano al cátodo. Los mismos fueron transferidos a 100 V por 1 hora, siendo la corrida efectuada en cámara fría. Luego de la transferencia, las hojas de nitrocelulosa fueron lavadas en PBS y posteriormente incubadas con solución bloqueante (PBS-Tween 20 2%) durante 1 hora. A continuación las nitrocelulosas fueron incubadas con una dilución apropiada del anticuerpo en PBS Tween 20 0.1% por 3 horas a temperatura ambiente con agitación. Posteriormente las membranas de nitrocelulosa fueron lavadas 3 veces durante 5 minutos con PBS-Tween 20 0.1%, e incubadas por 2 horas a temperatura ambiente con una dilución apropiada del conjugado a fosfatasa alcalina. A continuación, las membranas fueron lavadas 3 veces con PBS-Tween 20 0.1% y una vez con PBS. Para revelar se empleó 5-bromo-4-cloro-3-indolyl phosphate (BCIP) y nitrobluetetrazolium (NTB) en tampón carbonato ( $\text{NaHCO}_3$  100 mM,  $\text{MgCl}_2$  1mM, pH 9.8). La reacción fue seguida hasta la aparición de las bandas y luego fue detenida por lavado con agua destilada.

### **2.2.11.1.3.- Titulación de la actividad hemolítica**

La titulación fue llevada a cabo en placas para microtitulación en un volumen total de 100  $\mu$ L. La actividad hemolítica del recombinante fue esencialmente estudiada según lo descrito por Bhadki y col. (1984), con algunas modificaciones. Brevemente, 50  $\mu$ L de una suspensión de eritrocitos de carnero (1.7% vol/vol en PBS-seroalbúmina bovina (BSA) al 0.1% (PBS-BSA 0.1%) fue agregado a 50  $\mu$ L de una serie de diluciones seriadas de la proteína en PBS-BSA 0.1%-cisteína 0.48%; y luego fueron incubadas por 30 minutos a 37°C. El análisis fue además realizado en condiciones no-reducidas (sin el agregado de cisteína) y en condiciones oxidadas, usando cloruro férrico al 0.012% en PBS-BSA 0.1% (PBS-BSA 0.1%-FeCl<sub>3</sub>.0.012%). El título de la actividad hemolítica fue definido como la recíproca de la dilución más alta que produjo 100% de hemólisis. Los controles del análisis fueron realizados con SLO nativa (Wiener Lab.) y GST recombinante obtenida en nuestro laboratorio, realizados en idénticas condiciones. La actividad específica fue definida como el número de unidades hemolíticas por milígramo de proteína.

### **2.2.12.- Titulación de anticuerpos anti-SLO por técnica de látex**

La titulación de anticuerpos anti-SLO en muestras de suero humano fue analizada por aglutinación de partículas de látex (Gerber y col., 1990). Para ello se empleó un reactivo comercial (Rheumagen, ASO, Biokit Inc.), siguiendo las instrucciones del fabricante. La sensibilidad del látex fue controlada usando un estándar Internacional de la OMS. La titulación de anticuerpos se realizó por diluciones seriadas, siendo los títulos expresados como la máxima dilución de suero que produce aglutinación.

### **2.2.13.- Desarrollo de un enzimo inmunoensayo (ELISA) para titulación de anticuerpos anti-SLO usando GST-SLOr**

#### **2.2.13.1.- Optimización de la concentración de GST-SLOr a sensibilizar**

La determinación de la concentración óptima de proteína recombinante a ser sensibilizada en placa de ELISA se realizó mediante técnica de saturación con peroxidasa (Nieto y col., 1984, Muñoz y col., 1986). Brevemente, en placas Nunc, Maxisorp (GIBCO, BRL, Life Technologies Ltd., Paisley, U.K.), se sensibilizaron 100  $\mu$ L/pocillo con diferentes concentraciones de GST-SLOr en un rango de 0.5  $\mu$ g/mL-25  $\mu$ g/mL por octuplicado, incubándose 12 – 16 horas en cámara húmeda a temperatura ambiente. Posteriormente se descartó el sobrenadante y se incubó 3 horas a 37°C con una solución de 100  $\mu$ L/mL de peroxidasa en PBS. A continuación, se realizaron 2 lavados de 5 minutos cada uno, con PBS-Tween 20 0.05% (PBS-T) y un lavado con PBS. El revelado se efectuó con 200  $\mu$ L/pocillo de 0.4 mg/mL de orto fenil diamina (OPD). Luego de 30 minutos, la reacción fue detenida por adición de 25  $\mu$ L por pocillo de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 2N, siendo la reacción leída a una DO de 492 nm, empleando un lector de microplaca (Dyn-EX MRX II ELISA reader, Dyn-EX Technologies). A partir de los resultados obtenidos se graficaron las concentraciones de GST-SLOr estudiadas ( $\mu$ g/mL) versus (vs) las lecturas de DO a 492 nm. La concentración óptima de proteína recombinante a sensibilizar se determinó por la intersección de dos rectas trazadas en las zonas lineales de la gráfica e interpolación en el eje correspondiente (Nieto y col., 1984, Muñoz y col., 1986).

#### **2.2.13.2.- Titulación de anticuerpos anti-SLO**

La titulación de anticuerpos humanos IgG anti-SLO fue cuantificada por ELISA. Para ello se sensibilizaron placas de 96 pocillos (Nunc, Maxisorp; GIBCO, BRL, Life Technologies Ltd., Paisley, U.K.) con 100  $\mu$ L de una concentración óptima de GST-SLOr, incubándose 12 – 16 horas a 4°C. Posteriormente, las placas fueron

bloqueadas con 200  $\mu$ L por pocillo de PBS-Tween20 0.05%-leche descremada 1% (PBS-T-leche 1%) por 30 minutos a 37°C, siendo a continuación lavadas 3 veces con PBS-Tween 20 0.05% (PBS-T). Sueros humanos, previamente titulados por látex comercial para anticuerpos anti-SLO, fueron incubados en las diluciones apropiadas (1/3000, 1/6000, 1/12000 y 1/24000) en PBS-T-leche 0.1%, durante 1 hora 30 minutos a 37°C en cámara húmeda. Posteriormente, las placas fueron lavadas 3 veces con PBS-T, siendo luego incubadas con una dilución 1/4000 del conjugado (anti-IgG humano en conejo conjugado a peroxidasa, Dako), en PBS-T-leche 0.1%, durante 1 hora 30 minutos a 37°C en cámara húmeda. A continuación, las placas fueron lavadas y reveladas con OPD como se describió anteriormente. La titulación de anticuerpos anti-SLO se realizó mediante interpolación en una curva estándar (concentración mUI/mL vs. DO 492nm). La misma fue efectuada mediante la incorporación al sistema de un suero humano positivo para anticuerpos anti-SLO empleado por la OMS como estándar internacional; en un rango entre 4 mUI/mL a 100 mUI/mL.

#### **2.2.14.- Estudio de la expresión de GST-SLOr en matraces de 100 mL**

Con el fin de incrementar la expresión de SLOr en *E. coli* se analizaron distintos parámetros o factores que pudieran intervenir en la expresión de la proteína de fusión GST-SLOr. Los factores analizados fueron: relación volumen de cultivo/volumen total del matraz, concentración de IPTG, temperatura, y cepas de *E. coli*. Los experimentos de crecimiento y expresión en *E. coli*, así como el procedimiento de purificación de GST-SLOr, se efectuaron según lo descrito en el apartado 2.2.11.1, variando en cada caso los factores a analizar. A partir de “diseños bifactoriales”, se evaluó la significación estadística de los factores estudiados por medio de análisis de varianza (ANOVA) y se compararon los valores obtenidos con los valores críticos de Fisher ( $F$ ) a 0.95 y 0.99 ( $F_{0.95}$  y  $F_{0.99}$  respectivamente; Montgomery, 1991), siendo dicho análisis realizado por el Lic. Víctor Martínez y la Prof. Gladys Guineo.

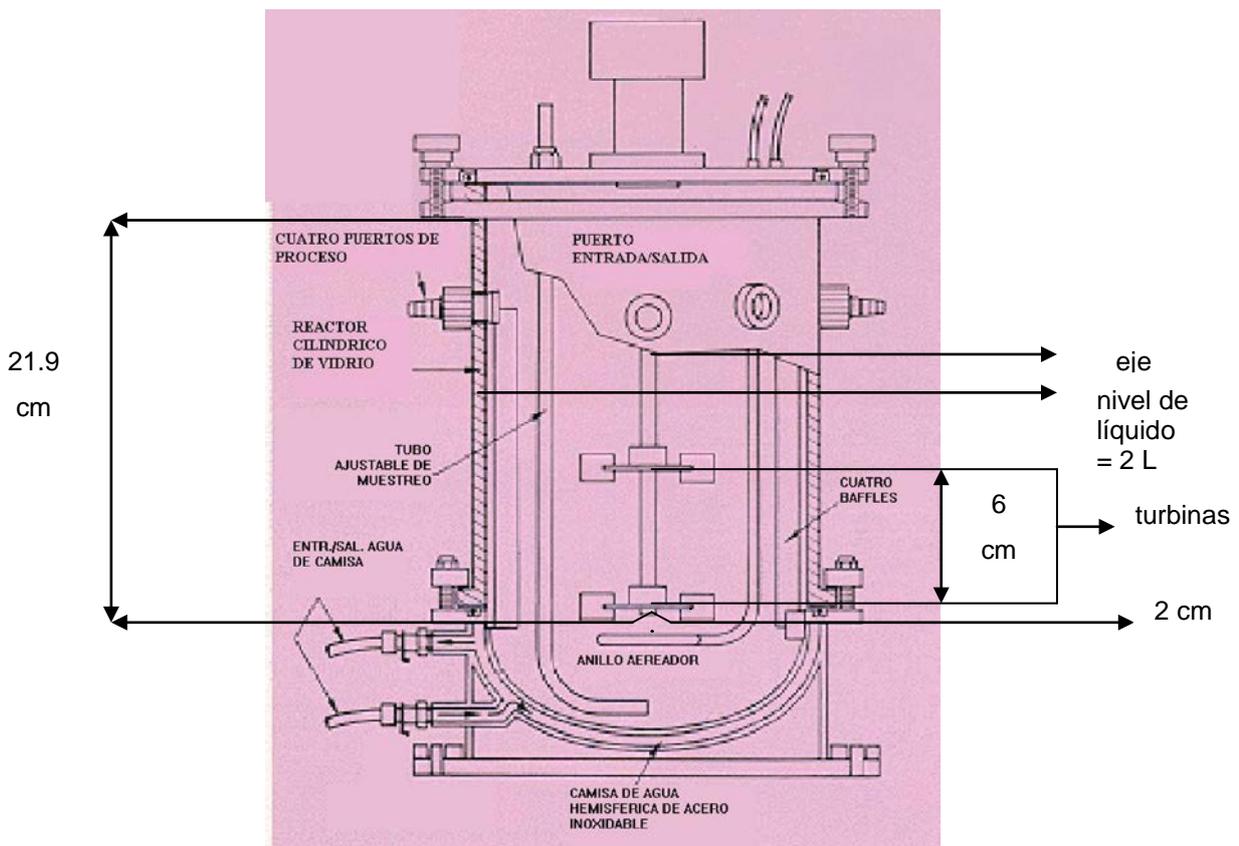
## 2.2.15.- Escalado en fermentador

### 2.2.15.1.- Determinación de la velocidad volumétrica de consumo de oxígeno

Se procedió al escalado en fermentador de 3 litros de volumen, empleando un volumen de trabajo de 2 litros (Bio Flo III, Batch-Continuos Fermentador, New Brunswick Scientific, EDISON, N.J., U.S.), siendo automáticamente controlado por software (AFS-BioCommand Bioprocessing Software, versión 2.60; New Brunswick Scientific, EDISON, N.J., U.S.). La disposición geométrica de las turbinas del fermentador está representada en la figura 2.2 y fueron mantenidas en iguales condiciones durante todos los experimentos. La determinación de la velocidad volumétrica de consumo de oxígeno ( $k_L a C_L^*$ ) fue efectuada por el método de oxidación de sulfito a sulfato en presencia de ión metálico ( $\text{Co}^{2+}$ ,  $\text{Cu}^{2+}$ ) como catalizador (Wernan y col., 1973). La determinación fue realizada en 2 litros de  $(\text{H}_2\text{O})_d$  a  $37^\circ\text{C}$ , agregando sulfito hasta una concentración de 20 g/L y el catalizador  $\text{CuSO}_4$  a una concentración de 1.5 g/L. Para cada ensayo se ajustó la velocidad de rotación del agitador y se inyectó aire ajustando el caudal. Se sacaron muestras de 5 mL a distintos tiempos (entre 5 - 15 minutos) para análisis (correspondiendo la primer toma al tiempo cero), al cual se le agregó 20 mL de solución de lodo previamente valorada. La muestra fue incubada por 5 minutos a temperatura ambiente en oscuridad. Inmediatamente después se valoró con tiosulfato de sodio previamente valorado hasta obtener un color amarillo claro, y se continuó la titulación con 1 mL de solución de almidón para iodometría hasta observar cambio de coloración de azul a transparente.

Con los resultados obtenidos de  $k_L a C_L^*$ , se realizó un estudio de superficie - respuesta mediante un diseño de experimentos  $2^2$  factorial con cuatro puntos axiales ( $\alpha = \pm \sqrt{2}$ ) y cuatro réplicas del punto central, totalizando 12 experimentos (Montgomery, 1991). Los valores codificados de las variables independientes fueron:  $-\alpha$  ( $= -\sqrt{2} \cong -1.41421$ ), 1, 0 (punto central), +1,  $+\alpha$  ( $= +\sqrt{2} \cong +1.41421$ ) (Tabla 2.2). El plan experimental es descrito en la tabla 2.3 según los valores codificados de la tabla 2.2.

Para el análisis del modelo correspondiente según los datos obtenidos y la estimación de los coeficientes de la ecuación del modelo se usó el programa estadístico "Statística" versión 4.5. Para comprobar el ajuste del modelo se utilizó como criterio la determinación del coeficiente  $R^2$  y el coeficiente de correlación múltiple  $R$  (Montgomery, 1991), como ensayos preliminares. La significación estadística del modelo fue determinada por la aplicación del test  $F$  de Fisher (Montgomery, 1991). La significación de cada coeficiente de la ecuación de regresión fue determinada usando el test  $t$  de Student y el valor  $p$  (Montgomery, 1991), de tal modo que cuanto mayor sea la magnitud del valor crítico de  $t$  y menor sea el valor de  $p$ , mayor será el efecto o significación del coeficiente correspondiente en el modelo.



**Figura 2.2.- Esquema de un fermentador.** La figura muestra un esquema de las posiciones relativas del líquido y de las turbinas en el fermentador para la determinación del  $k_L a C_L^*$  por el método del sulfito.

**Tabla 2.2.- Valores codificados de las variables independientes.** Distintos niveles codificados, empleados en el diseño experimental para el estudio superficie - respuesta de  $k_L a C_L^*$  en fermentador.

Factor	símbolo	Niveles				
		$-\alpha$	-1	0	+1	$+\alpha$
agitación (r.p.m.)	$X_1$	50	109	250	392	450
aireación (v.v.m.)	$X_2$	0.250	0.418	1.125	1.830	2.000

**Tabla 2.3.- Plan experimental para el estudio superficie – respuesta de  $k_L a C_L^*$ .** Valores de las variables independientes agitación (rpm). y aireación (vvm) para la determinación del  $k_L a C_L^*$  en el fermentador codificados según la tabla 2.2.

nº del experimento	agitación	Aireación
	$x_1$	$x_2$
1	-1	-1
2	+1	-1
3	-1	+1
4	+1	+1
5	0	0
6	0	0
7	$-\alpha$	0
8	$+\alpha$	0
9	0	$-\alpha$
10	0	$+\alpha$
11	0	0
12	0	0

### 2.2.15.2.- Producción de GST-SLOR

Las condiciones analizadas en fermentador fueron: suministro al sistema de glucosa y diferentes combinaciones de  $k_L a C_L^*$  en distintas fases de la fermentación. La concentración de glucosa fue controlada cada 1 hora y cuantificada por el método enzimático de glucosa oxidasa (Lott y Turner, 1975; (Wiener Lab.)). La concentración de glucosa se corrigió manualmente por el

agregado de una solución estéril de glucosa 50% hasta una concentración final en el fermentador de 0.2% (2g/L) cuando la misma descendía a valores iguales o menores de 1 g/L. Todos los experimentos fueron efectuados a 37°C, siendo la temperatura constante durante la fase de crecimiento (FC) y la fase de inducción (FI). Las corridas fueron realizadas a pH 7 y fueron controladas en forma manual o automática, por el agregado de NaOH 20% o HCl 50%, cuando los valores variaban +/- 0.2. El efecto de los factores alimentación de glucosa y  $k_L a C_L^*$  en distintas fases de la fermentación en la producción de GST-SLOr se determinó mediante análisis de contrastes a partir de “diseños  $2^3$  completos” (Montgomery, 1991), siendo los mismos realizados por el Lic. Víctor Martínez y la Prof. Gladys Guineo.

Los experimentos en fermentador se realizaron de la siguiente manera: Un cultivo cultivado durante 12 – 16 horas de *E.coli* TG2 conteniendo la construcción pGEX-2T con el gen *slo* con la secuencia nucleotídica 430 – 1914, fue diluido 1:10 en medio fresco LB con ampicilina 50 µg/mL en matraz de 1000 mL con un volumen final de 200 mL de cultivo. El mismo fue cultivado a 37°C en shaker con agitación orbital de 200 rpm hasta que la DO 600 nm fue de 1.5 +/- 0.1. Posteriormente el cultivo fue cosechado en condiciones estériles y fue centrifugado a 1.560 x g durante 20 minutos a 4°C. El precipitado celular fue resuspendido en condiciones estériles en 10 mL de LB fresco con ampicilina e inoculado en el fermentador, previamente esterilizado por autoclave (121 °C durante 20 minutos), que contenía 2 litros de medio fresco LB con 100 ug/mL de ampicilina. A partir de este momento se sacaron muestras del fermentador de 1 mL cada 1 hora para controlar el crecimiento bacteriano mediante lectura de DO a 600 nm. En la mitad de la FC exponencial, el cultivo fue inducido durante 4 horas con una concentración final de 0.01 mM de IPTG. A continuación, el cultivo fue cosechado, recuperado y purificado siguiendo condiciones similares a las descriptas en el apartado 2.2.11.1. Los controles de todas las corridas fueron efectuados sin el agregado de IPTG, con el fin de comparar la producción de GST-SLOr en condiciones inducidas y sin inducir

### 2.2.16.- Determinación de peso seco de células vs. DO 600 nm

Para realizar la curva de calibración de peso seco de biomasa bacteriana vs DO ,se transfirieron alícuotas por cuadruplicado de 40 mL de un cultivo a tubos pre-pesados. Las tomas fueron realizadas cada 1 hora hasta que el cultivo llegó a fase estacionaria, siendo posteriormente centrifugadas a 1.560 x g por 20 minutos a 4°C. A continuación, las mismas fueron lavadas 2 veces en PBS. Los sobrenadantes fueron descartados cuidadosamente y los precipitados escurridos y puesto a secar a 80°C hasta peso constante. Luego, los tubos fueron nuevamente pesados siendo calculado el peso seco en g/L. Paralelamente para cada alícuota se midió DO 600 nm. Se trabajó en un rango de diluciones de la muestra bacteriana de modo tal que la DO 600 nm fuera entre 0.2 - 0.9. Posteriormente se construyó la curva de calibración, peso seco (g/L) vs. DO a 600 nm, con el fin de obtener los valores de biomasa (X) por interpolación a partir de mediciones de DO 600 nm.

### 2.2.17.- Cálculos

Con el fin de evaluar las corridas en fermentador se calcularon diferentes parámetros:

#### 2.2.17.1.- Velocidad específica máxima de crecimiento ( $\mu_{m\acute{a}x.}$ )

Este parámetro se obtiene en la fase exponencial de crecimiento. Para ello se calcula la pendiente a partir de un gráfico del logaritmo neperiano (ln) de biomasa vs. tiempo de las las corridas controles sin inducir a distintos  $k_L a C_L^*$  con y sin alimentación de glucosa.

$\mu_{\text{máx.}}$  = velocidad específica máxima de crecimiento (1/h) =  $(dX/dt) \cdot 1/X$ ; en donde X = biomasa celular (g/L) y t = tiempo (h).

### 2.2.17.2.- Tiempo de duplicación ( $t_d$ )

Los valores de  $t_d$  fueron calculados para las corridas controles sin inducir en diferentes condiciones de  $k_L a C_L^*$  y alimentación de glucosa.

$t_d$  = tiempo de duplicación (min.) =  $\ln 2 / \mu_{\text{máx.}}$ .

### 2.2.17.3.- Rendimientos (Y)

Se determinó el rendimiento de las experiencias que expresaron mayor concentración de proteína recombinante por litro de cultivo.

$Y_{P/X}$  = rendimiento de producto producido (P) sobre la base de la biomasa obtenida (X) durante la fermentación = proteína producida (g)/ biomasa obtenida (g)

### 2.2.17.4.- Productividad específica de producto ( $q_p$ )

El cálculo de  $q_p$  fue efectuado para las experiencias con mayor concentración de proteína recombinante por litro de cultivo.

$q_p$  = masa de producto/ biomasa celular . tiempo  $[g \cdot (gh)^{-1}] = (dP/dt) \cdot 1/X$

### **2.2.17.5.- Productividad volumétrica global del proceso ( $Q_p$ )**

$Q_p$  fue calculada en las experiencias que presentaron mayor producción de proteína recombinante.

$$Q_p = \text{masa de producto/volumen. tiempo [g.(Lh)}^{-1}] = (dP/dt).1/V$$

### **2.2.18.- Determinación de la concentración de proteínas**

#### **2.2.18.1.- Determinación por densitometría en geles**

La concentración de GST-SLOr en SDS-PAGE proveniente de los sobrenadantes post-sonicados de cultivos en matraces de 100 mL, se determinó por densitometría en geles usando el programa de análisis "Quantity One" (Versión 4 para Windows, Bio-Rad Laboratories, U.S.A), por interpolación en una curva estándar de BSA de 0.005 mg-0.025 mg realizada en SDS-PAGE 10%.

#### **2.2.18.2.- Determinación por técnica del ácido bicinconínico**

La concentración de GST-SLOr purificada, obtenida previamente de experiencias en fermentador, fue determinada por técnica del ácido bicinconínico (Smith y col., 1985) (BCA, Pierce, Chester, U.K.), en muestras previamente dializadas con PBS. Los análisis fueron realizados por duplicado, usando los tampones dializados como control y diluciones de un estándar de BSA en un rango de 0.1 mg/mL - 1 mg/mL.

### **2.2.19.- Formulación de producto final**

Para determinar la formulación final de la proteína recombinante, sobre alícuotas de GST-SLOR purificadas y dializadas en PBS se adicionaron diferentes sustancias, siendo posteriormente congeladas a  $-80^{\circ}\text{C}$  durante 2 horas. Luego las mismas fueron liofilizadas (empleando un liofilizador Heto Drywinner, Modelo DW3; Dinamarca) por 24 horas. Los distintos preparados estudiados se detallan a continuación en la tabla 2.4:

**Tabla 2.4.- Preparados analizados para la presentación del producto final.** Distintos aditivos que fueron agregados a la proteína recombinante GST-SLOR (0.5 mg/mL) previo a su liofilización.

<b>Codigo</b>	<b>Formulación</b>
<b>A...</b>	sin agregado de estabilizantes
<b>B...</b>	BSA 1 mg/mL
<b>C...</b>	BSA 1 mg/mL + sacarosa 1 mg/mL
<b>D...</b>	BSA 1 mg/mL + cisteína 0.48 %
<b>E...</b>	BSA 1 mg/mL + sacarosa 1 mg/mL + cisteína 0.48 %
<b>F...</b>	cisteína 0.48 %
<b>G...</b>	sacarosa 1 mg/mL + cisteína 0.48 %
<b>H...</b>	sacarosa 1 mg/mL
<b>I....</b>	sacarosa 5 mg/mL
<b>J...</b>	sacarosa 10 mg/mL
<b>K...</b>	glicina 0.1 M
<b>L...</b>	glicina 1 M
<b>M</b>	sacarosa 1 mg/mL + glicina 0.1 M
<b>N..</b>	sacarosa 1 mg/mL + glicina 1 M
<b>Ñ..</b>	sacarosa 5 mg/mL + glicina 0.1 M
<b>O..</b>	sacarosa 5 mg/mL + glicina 1 M
<b>P..</b>	sacarosa 10 mg/mL + glicina 0.1 M
<b>Q..</b>	sacarosa 10 mg/mL + glicina 1 M

### 2.2.19.1.- Controles del producto

Los liofilizados fueron reconstituídos en 1 mL de PBS 1x. Los mismos fueron resuspendidos y posteriormente centrifugados a 10.000 x g durante 5 minutos.

Con los sobrenadantes obtenidos se realizaron ensayos de SDS-PAGE, inmunoblot, cuantificación de proteínas por BCA y determinación de actividad hemolítica. Se tomaron los títulos de actividad hemolítica como control principal de los liofilizados. Se estudió la significación estadística de los diferentes agregados, según la actividad hemolítica que presentaron las formulaciones a los 7 días de reconstituídas y conservadas a 4 °C. Para ello se realizó un ANOVA empleando diseños experimentales 2<sup>3</sup> completo (para los factores BSA, sacarosa y cisteína) y diseño bifactorial de efecto fijo (para los factores sacarosa y glicina) (Montgomery, 1991). A continuación, se efectuaron estudios de estabilidad con la formulación que presentó mejores características. La misma fue determinada sobre la base de la actividad hemolítica del preparado al momento de ser reconstituído, luego de 2 horas de incubación a temperatura ambiente, a los 5 y 7 días de incubación a 4°C y a los 2 y 6 meses de incubación a -20° y -80°C respectivamente luego de la reconstitución.

## **CAPITULO 3**

# **CLONADO, EXPRESIÓN Y EVALUACIÓN DE GST-SLOr PARA USO EN INMUNOENSAYOS**

### **3.1.- Introducción**

La SLO es una proteína extracelular producida por *S. pyogenes*, y forma parte de un grupo de 15 toxinas relacionadas biológicamente, conocidas como citolisinas tiol-activadas (sensibles a la presencia de oxígeno). Estas enzimas son producidas por especies de bacterias Gram-positivas de 4 géneros distintos: *Streptococcus*, *Bacillus*, *Clostridium*, y *Listeria* (Alouf, 1980). La SLO es una de las más caracterizadas en términos del conocimiento de sus mecanismos de acción físicos y químicos.

Una respuesta fuerte de anticuerpos contra algunos antígenos estreptocócicos, incluyendo SLO, se correlaciona con secuelas ocasionadas luego de una faringitis estreptocócica tales como fiebre reumática y glomerulonefritis (WHO, 1966;

Halbert, 1970; McCarty, 1980; Bisno y col., 2002). Niveles de anticuerpos anti-SLO en suero superiores a 200 UI/mL son indicadores de infección por *S. pyogenes* (Smith y Duncan, 1978). Por tal motivo, la titulación de anticuerpos anti-SLO en suero es particularmente importante en pacientes con infección recurrente por estreptococo, dado que estos pacientes tienen alto riesgo de desarrollar fiebre reumática. Algunos de los reactivos de diagnóstico para determinar los niveles de anticuerpos anti-SLO en suero son partículas de látex cubiertas por SLO, que frente a la presencia de anticuerpos anti-SLO producen aglutinación (Boreland y col., 1987). El ensayo de Rantz-Randall es la técnica de referencia, el mismo consiste en inhibir la actividad hemolítica de SLO mediante anticuerpos anti-SLO presentes en suero (Rantz y Randall, 1945). La mayoría de los reactivos, usan SLO nativa purificada a partir de cultivo de *S. pyogenes* (Boreland y col., 1987). Sin embargo, la obtención de la SLO es dificultosa, con complicados pasos de purificación, bajo rendimiento y considerable variación lote a lote (Weller y col., 1996). Además, la necesidad de usar grandes volúmenes de cultivo de *S. pyogenes* a escala industrial, incorpora problemas de bioseguridad.

El uso de una forma de SLOr, tanto de la proteína entera como de fracciones inmunogénicas de la misma, es una alternativa para la detección de anticuerpos anti-SLO que podría evitar estos problemas. Si bien desarrollar un protocolo de producción de SLOr representa un avance, debe considerarse algunos factores para la adecuada expresión de esta proteína. Se ha observado que gran parte de SLOr expresada en *E. coli* es inactivada rápidamente en el periplasma de la bacteria (Weller y col., 1996). Con el fin de evitar este problema, se han diseñado alternativas tales como expresar SLOr fusionada a la proteína de unión a maltosa, utilizando el sistema pMAL (Guan y col., 1988; Weller y col., 1996). Sin embargo, la mayoría de los estudios de expresión de SLOr se han realizado en microescala (Kehoe y Timmis, 1984; Weller y col., 1996), siendo muy pocos los estudios publicados con un perfil biotecnológico.

### **3.1.1.- Objetivo del trabajo**

En este trabajo el objetivo fue clonar y expresar parte de la molécula de SLO conservando la mayoría de los sitios antigénicos de la molécula madura, evitando los sitios sensibles a la acción de proteasas, conocidos en *S. pyogenes*. Además nos propusimos estudiar la expresión del recombinante obtenido y realizar una evaluación preliminar de la factibilidad de su uso futuro en inmunoensayos para la titulación de anticuerpos anti-SLO en muestras de suero humano.

## **3.2.- Resultados**

### **3.2.1- Análisis computacional de la molécula de SLO**

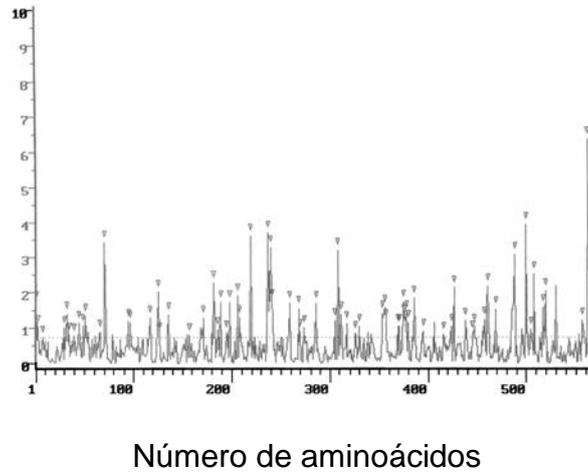
La secuencia aminoacídica de la molécula de SLO (Tabla 3.1) fue analizada por un programa predictivo para distintas características moleculares basado en el estudio de la secuencia primaria y estructura secundaria de la misma (PC-Gene versión 6.60, Intelligenetics Inc., Suiza; Moore y col., 1988). Este programa predice los giros beta de la molécula a estudiar, calculados según el algoritmo de Chou y Fasman (Chou y Fasman, 1979), sitios antigénicos de acuerdo al perfil de hidrofiliidad, según el algoritmo de Hopp y Woods (Hopp y Woods, 1981), y el perfil de flexibilidad según el algoritmo de Karplus y Shultz (Karplus y Shulz, 1985).

La distribución de los posibles giros beta en la secuencia entera de la molécula de SLO nativa mostró un leve incremento en la región C-terminal (Figura 3.1.a).

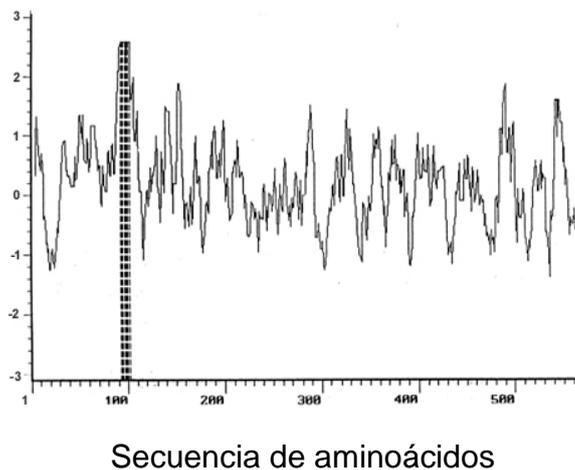
De acuerdo al perfil de hidrofiliidad, la SLO nativa posee varios sitios con posible relevancia antigénica eventualmente distribuidos a lo largo de la secuencia completa, correspondiendo el mayor valor a la secuencia comprendida entre los aminoácidos 89-108 (Figura. 3.1.b). El programa además calculó los posibles epitopes de la molécula, basándose en la presencia de aminoácidos más frecuentes en la mayoría de epitopes conocidos. Según este algoritmo, éstos aminoácidos están igualmente distribuidos en la molécula. Sin embargo, se observó un mayor índice de probabilidad de zonas de reconocimiento antigénico en las secuencias comprendidas entre los aminoácidos 7-25, 390-396, 475-485 y 510-517 (datos no mostrados). Asimismo el perfil de flexibilidad mostró una distribución uniforme, con un incremento mayor de la probabilidad de flexibilidad en la molécula entre los aminoácidos 350-360 (Figura 3.1.c).

**Tabla 3.1.- Secuencia aminoacídica de SLO.** Secuencia de la molécula nativa entera proveniente de *S. pyogenes* (Kehoe y Timmis, 1984). Los números a la izquierda indican la posición de los aminoácidos.

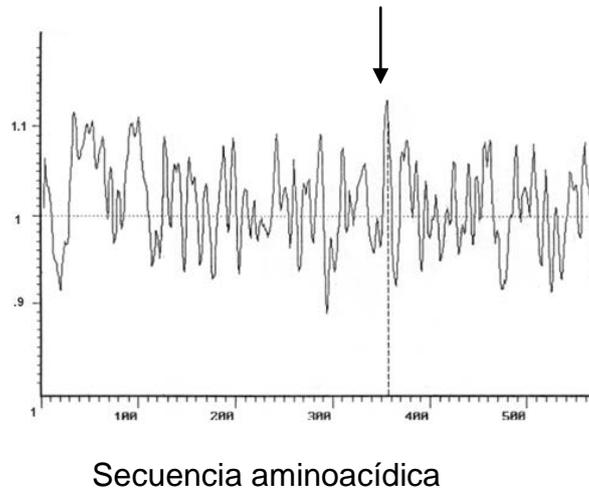
```
1 MSNKKTFK KY SRVAGLLTAA LIIGNLVTAN AESNKQNTAS TETTTTNEQP KPESSELTTE
61 KAGQKTDDML NSNDMIKLAP KEMPLESAEK EEKKSSEDKKK SEEDHTEEIN DKIYSLNYNE
121 LEVLAKNGET IENFVPKEGV KKADKFVIE RKKKNINTTP VDISIIDSVT DRTYPAALQL
181 ANKGFTENKP DAVVTKRNPQ KIHIDLPGMG DKATVEVNDP TYANVSTAI D NLVNQWHDNY
241 SGGNTLPART QYTESMVYSK SQIEAALNVN SKILDGTLGI DFKSISKGEK KVMIAAYKQI
301 FYTVSANLPN NPADVFDKSV TFKELQRKGV SNEAPPLFVS NVAYGRTVFV KLETSSKSND
361 VEAAFSAALK GTDVKTNGKY SDILENSSFT AVVLGGDAE HNKVVTKDFD VIRNVIKDNA
421 TFSRKNPAYP ISYTSVFLKN NKIAGVNNRT EYVETTSTEY TSGKINLSHQ GAYVAQYEIL
481 WDEINYDDKG KEVITKRRWD NNWYSKTSPF STVIPLGANS RNIRIMAREC TGLAWEWWRK
541 VIDERDVKLS KEINVNISGS TLSPYGSITY K
```



**Figura 3.1.a.- Perfil de giro beta de SLO nativa.** La probabilidad de giro beta fue calculada según el método de Chou y Fasman (Chou y Fasman, 1979), para la secuencia aminoacídica 1-571 de SLO nativa. El valor del eje "y" representa la probabilidad de poseer giro beta  $\times 10^{-4}$  (p). Los giros betas en la molécula están indicados con fechas arriba de cada pico de probabilidad.



**Figura 3.1.b.- Perfil de hidrofiliidad de SLO nativa.** El eje "Y" representa el perfil de hidrofiliidad de la secuencia de SLO (aminoácido 1-571) según el algoritmo de Hopp y Woods (Hopp y Woods, 1981). La barra vertical indica el pico con mayor índice de probabilidad de hidrofiliidad.



**Figura 3.1.c.- Perfil de flexibilidad de SLO nativa** Se determinó el perfil de flexibilidad según el método desarrollado por Karpus y Schulz (Karpus y Schulz, 1985). El eje “y” representa los valores normalizados del cuadrado medio de los valores de desplazamiento promedio de cada átomo en la molécula de SLO (B[norm]). La flecha indica el pico de mayor flexibilidad en SLO nativa.

### 3.2.2.- Construcción y expresión de la proteína de fusión GST-SLOr

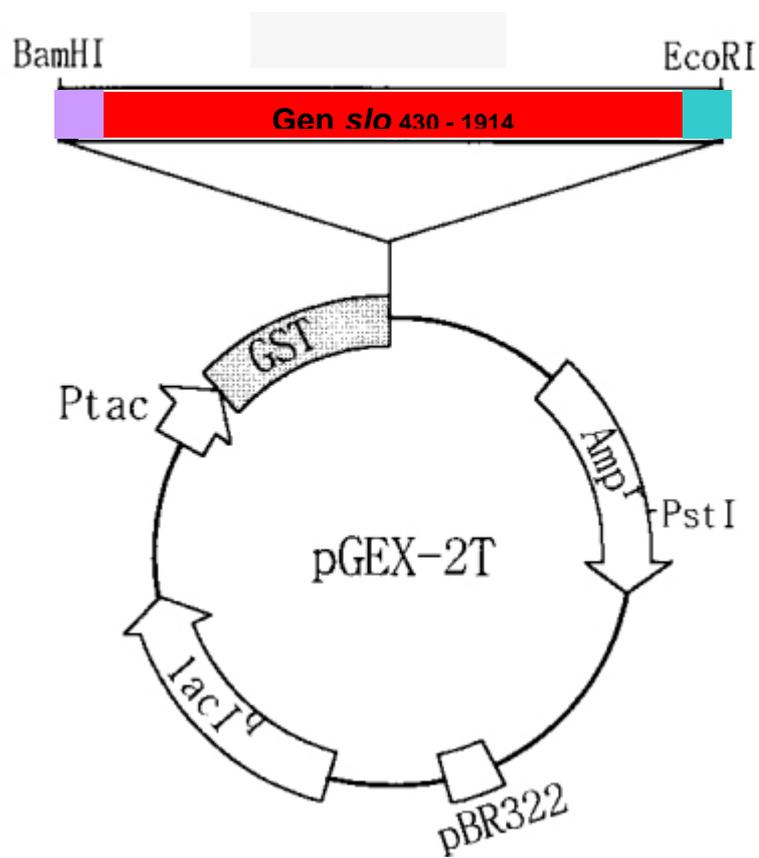
Debido a que el análisis de predicción de posibles sitios de reconocimiento antigénico no mostró una zona de claro predominio en la molécula de SLO nativa, se optó por clonar la mayor parte de la molécula de SLO madura, evitando sitios sensibles a proteasas descritos para *S. pyogenes*. Por tal motivo se clonó un fragmento que va desde el aminoácido 78 hasta el 571, comprendido entre los nucleótidos 430 - 1918 de la secuencia entera del gen *slo* (Tabla 3.2). Para ello, se amplificó por PCR la secuencia elegida de ADN, empleando los oligonucleótidos sintéticos descritos en el apartado 2.1.4, clonándose en el vector pGEX-2T (Figura 3.2) previamente digerido con las enzimas *BamH* I y *EcoR* I. Posteriormente, se transformaron *E.coli* TG2 y se seleccionaron para análisis. Seis 6 colonias fueron seleccionadas cuyos plásmidos fueron purificados y digeridos con la enzima de restricción *BamH* I, con el fin que los mismos adquirieran una conformación lineal que permitiera observar el tamaño molecular.

Luego, los mismos fueron separados por tamaño por electroforesis en gel de agarosa con el fin de evaluar la incorporación del plásmido recombinante (Figura 3.3). Los resultados indicaron que las colonias 1 y 3 incorporaron el gen *slo* de acuerdo al tamaño esperado, correspondiendo el mismo aproximadamente a la sumatoria del tamaño molecular del plásmido pGEX-2T (4948 pb) y la secuencia 430-1914 del gen *slo* (1484 pb), siendo de 6432 pb (Figuras 3.3 y 3.4).

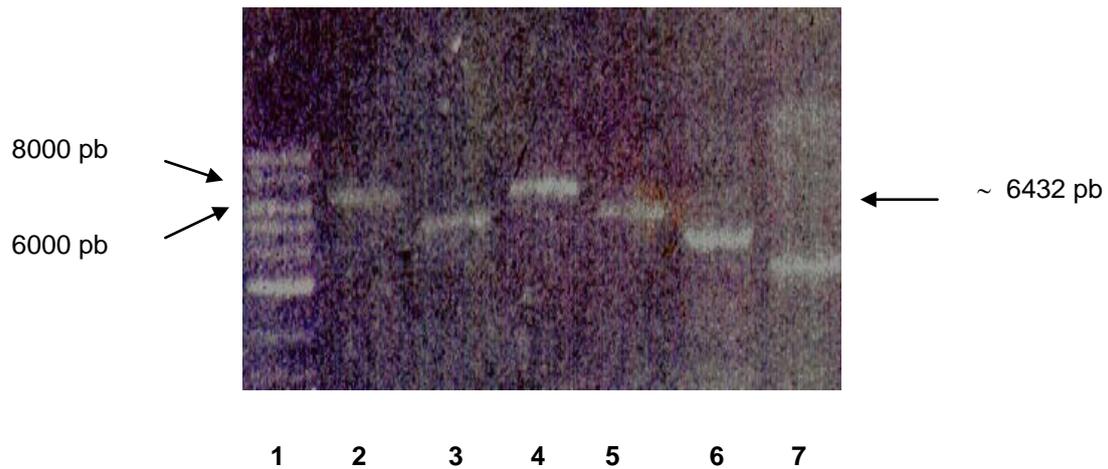
A partir de la colonia 1 se realizaron los estudios de expresión de SLOr como proteína de fusión con GST (GST-SLOr) por SDS-PAGE. Para ello, una dilución 1:100 de un cultivo fue crecido durante 12 – 16 horas en LB ampicilina y posteriormente inducido con IPTG. Luego el cultivo fue concentrado y sonicado. El análisis por SDS-PAGE del sonicado bacteriano mostró que la proteína de fusión GST-SLOr se expresó dentro del citoplasma mayoritariamente en cuerpos de inclusión. La fracción de proteína expresada en el citoplasma en fase soluble fue purificada por cromatografía de afinidad, obteniéndose una concentración de proteína eluída de 1.5 mg/L de cultivo.

**Tabla 3.2.- Secuencia nucleotídica del gen *slo*.** Se representa la secuencia de la molécula nativa entera proveniente de *S. pyogenes* (Kehoe y col, 1987). En rojo se muestra el fragmento comprendido entre los nucleótidos 430 - 1914. Los números a la izquierda indican la posición de los mismos.

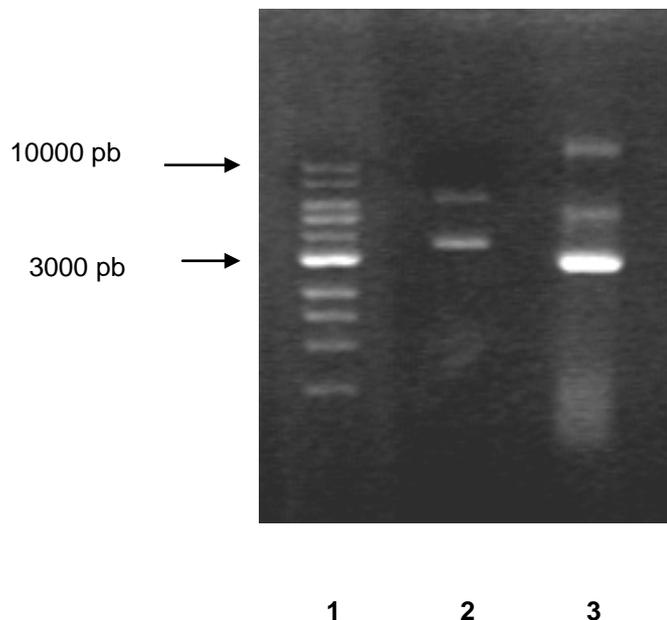
1 ttattacgaa agcttgccat ttatttaaa ccgcaaagc atagtagcta atatgaccaa  
 61 agcgtaaaa gatgcgcata ttagagaggc tatggcacat tacaattag gagaatttgc  
 121 tcactatcaa gatactatgc ttgatatggt cgaaagaaca atagaaacat tttagaatga  
 181 taaaaggta tgaaggacat gtctaataaa aaaacattta aaaatacag tgcgctcgt  
 241 gggctactaa cggcagctct tatcattggt aatcttgta ctgctaatgc tgaatcgaac  
 301 aaacaaaaca ctgctagtac agaaaccaca acgacaagt agcaaccaa accagaaagt  
 361 agtgagctaa ctatcgaaaa agcaggtcag aaaatggatg atatgctta ctctaacgt  
 421 atgattaagc **ttgctccca agaatgcca ctagaatctg cagaaaaaga agaaaaaag**  
 481 **tcagaagaca aaaaaagag cgaagaagat cacactgaag aatcaatga caagattat**  
 541 **tcactaaatt ataatgagct tgaagtactt gctaaaaatg gtgaaacct tgaaaat**  
 601 **gttcctaaag aaggcgtaa gaaagctgat aaatttattg tcattgaaag aaagaaaaa**  
 661 **aatatcaaca ctacaccagt cgatatttcc attattgact ctgtcactga taggacctat**  
 721 **ccagcagccc ttcagctggc taataaagg tttaccgaaa acaaccaga cgcggtagtc**  
 781 **accaagcgaa accacaaaa aatccatatt gattaccag gtatgggaga caagcaacg**  
 841 **gttgaggta atgaccctac ctatgccaat gttcaacag ctattgataa tctgttaac**  
 901 **caatggcatg ataattattc tgggtgtaac acgcttctg ccagaacaca atatactgaa**  
 961 **tcaatggat attctaagtc acagattgaa gcagctctaa atgttaatag caaaatctta**  
 1021 **gatggactt taggcattga tttcaagtcg atttcaaag gtgaaaagaa ggtgatgatt**  
 1081 **gcagcataca agcaaattt ttacaccgta tcagcaaacc ttctaataa tctgcggat**  
 1141 **gtgtttgata aatcagtgac cttaaagat ttgcaacgaa aagggtcag caatgaagc**  
 1201 **ccgccactct ttgtgagtaa cgtagcctat ggtcgaactg ttttgcata actagaaca**  
 1261 **agttctaaa gtaatgatgt tgaagcggcc tttagtgcag ctctaaaagg aacagatgtt**  
 1321 **aaaacgaatg gaaaatactc tgatatctta gaaaatagct catttacagc tgcgtttta**  
 1381 **ggaggagatg ctgcagagca caataagggtg gtcacaaaag actttgatgt tattagaaac**  
 1441 **gttatcaaag acaatgctac cttcagtaga aaaaccag cttatcctat tcatacacc**  
 1501 **agtgttttcc taaaaataa taaattgcg ggtgtcaata acagaactga atacgttgaa**  
 1561 **acaacatcta ccgagtacac tagtgaaaaa attaacctgt ctatcaagg cgcgatgtt**  
 1621 **gctcaatag aatcctttg ggatgaaatc aattatgatg acaaggaaa agaagtgatt**  
 1681 **acaaaacgac gttgggaca caactggat agtaagacat caccatttag cacagttatc**  
 1741 **ccactaggag ctaattcacg aaatatccgt atcatggcta gagagtgcac cggcttagct**  
 1801 **tgggaatggt ggcgaaaagt gatcgacgaa agagatgtga aactatctaa agaatcaat**  
 1861 **gtcaacatct caggatcaac cttgagccca tatggttcga ttactataa gtaggactgg**



**Figura 3.2.- Plásmido recombinante.** Esquema del plásmido pGEX-2T con el gen inserto *slo*<sub>430-1914</sub> (en rojo). Se indican los sitios de clonado *BamH* I (en lila) y *EcoR* I (en verde).



**Figura 3.3.- Gel de agarosa 0.7% de los plásmidos recombinantes purificados por técnica de miniprep a partir de colonias aisladas de *E.coli* TG2.** Carril 1: ADN ladder 1 Kb (10.000-8.000-6.000-5.000-4.000.3.000-2.500-2.000-1.500-1.000-750-500-250 pb); Carriles 2-7: plásmidos recombinantes purificados a partir de diferentes colonias, cortados con la enzima *BamH* I (carril 2: colonia 1, carril 3: colonia 2, carril 4: colonia 3, carril 5: colonia 4, carril 5: colonia 6, carril 7: colonia 6). Los tamaños de los plásmidos recombinantes, visualizados luego del corte con la enzima *BamH* I, mostraron que las colonias 1 y 3 adquirieron el gen *slo* con el tamaño esperado. En tal sentido, la continuación del trabajo se realizó a partir de la colonia 1.



**Figura 3.4.- Electroforesis en agarosa.** Gel de agarosa 0.7% donde se observan las bandas purificadas correspondientes al plásmido pGEX-2T recombinante y al plásmido pGEX-2T. Carril 1: Marcador ADN ladder 1Kb; Carril 2: pGEX-2T recombinante conteniendo la secuencia nucleotídica 430-1914 del gen *slo*, sin cortar con enzimas de restricción; Carril 3: pGEX-2T sin cortar con enzimas de restricción.

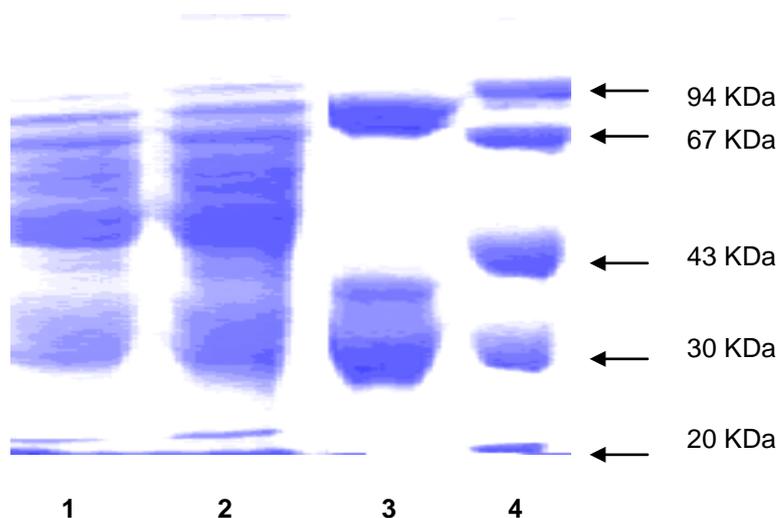
### **3.2.3.- Evaluación de la expresión de GST-SLOr**

Una dilución 1:100 de un cultivo de *E. coli* TG2 recombinante previamente incubado durante 12 – 16 horas de la colonia seleccionada, fue cultivada en 1 litro de medio LB conteniendo ampicilina en matraces Erlenmeyer de 2 litros, en shaker orbital a 200 r.p.m a 37°C por 2 horas. La expresión del recombinante fue inducida por la adición de IPTG a una concentración final de 1mM, siendo incubado por 4 horas en similares condiciones de temperatura y agitación. Posteriormente las células fueron cosechadas y sonicadas, incubando el sobrenadante post-sonicado en batch con glutatión sefarosa. Las fracciones obtenidas luego de la elución con una solución de glutatión reducido 20 mM fueron juntadas y analizadas por SDS-PAGE e inmunoblot. El análisis por SDS-PAGE del material purificado mostró la presencia de dos bandas de aproximadamente 77 kilo Dalton (KDa) y 26 KDa, siendo las mismas consistentes con los pesos teóricos estimados para la proteína de fusión GST-SLOr y para la proteína GST sola (Figura 3.5).

Para evaluar el reconocimiento antigénico de los productos obtenidos, se realizó un inmunoblot con sueros humano anti-SLO y de ratón anti-GST. El análisis de los resultados reveló que un suero humano de referencia positivo para anticuerpos anti-SLO (proveniente de la OMS) reconoció dos bandas de aproximadamente 77 KDa y 70 KDa, siendo ésta última de menor intensidad; mientras que un suero de ratón positivo para anticuerpos anti-GST reconoció además de estas dos bandas, la banda correspondiente a 26 KDa. Pre-incubación del suero de ratón con GST resultó en una marcada reducción de todas las bandas (Figura 3.6). Estos resultados confirmaron que las tres bandas contienen GST, siendo las dos bandas de mayor peso molecular, diferentes tamaños de la fusión GST-SLOr, mientras que la banda de 26 KDa correspondió a GST sola.

En función de estos resultados, se efectuó cromatografía por gelfiltración para intentar separar las bandas de mayor peso molecular (77 KDa - 70 KDa) de la banda de menor peso molecular (26 KDa). Para ello se usó una columna Superdex 75 grado preparativo en columna HR 10/70 acoplado a un equipo

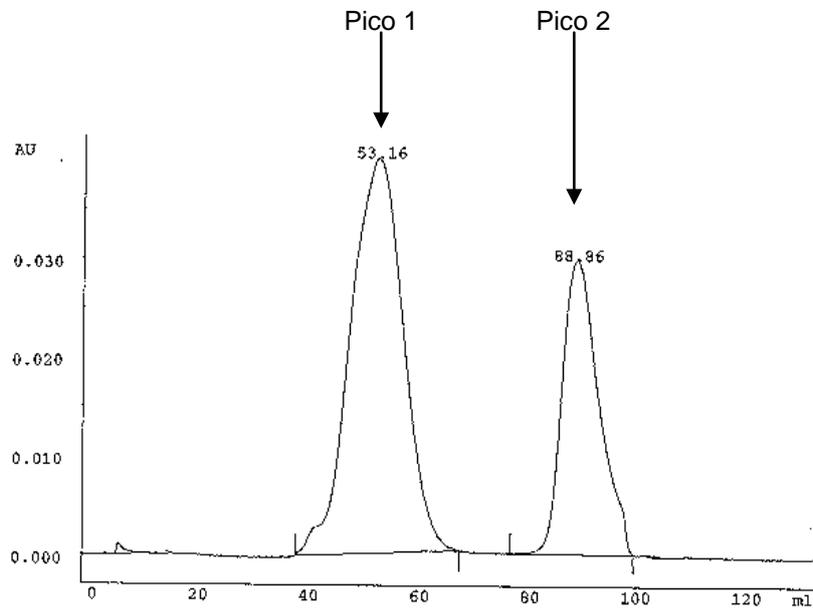
automatizado (Biopilot. Pharmacia, Upsala, Suecia) cuyo límite de exclusión es de  $1 \times 10^5$  Dalton y rango de separación es de  $3 \times 10^3$  -  $7 \times 10^4$  Dalton para proteínas globulares (Scandella y Peterson, 1991). El cromatograma obtenido a partir de la gelfiltración mostró la presencia de 2 picos bien separados: un pico mayor a los 53.16 mL y un segundo pico a los 69.86 mL de volumen de elución (Figura. 3.7). A continuación, fracciones correspondientes al ascenso y descenso de los picos obtenidos fueron analizadas por SDS-PAGE. Respecto al primer pico, el análisis por SDS-PAGE mostró que las muestras estudiadas contenían GST y GST-SLOr. Sin embargo se observó enriquecimiento de GST en la muestra analizada correspondiente al ascenso del pico, observándose enriquecimiento de GST-SLOr en la muestra correspondiente al descenso del mismo. Los resultados mostraron que el segundo pico no tenía presencia de proteínas totales por este método (Figura 3.8).



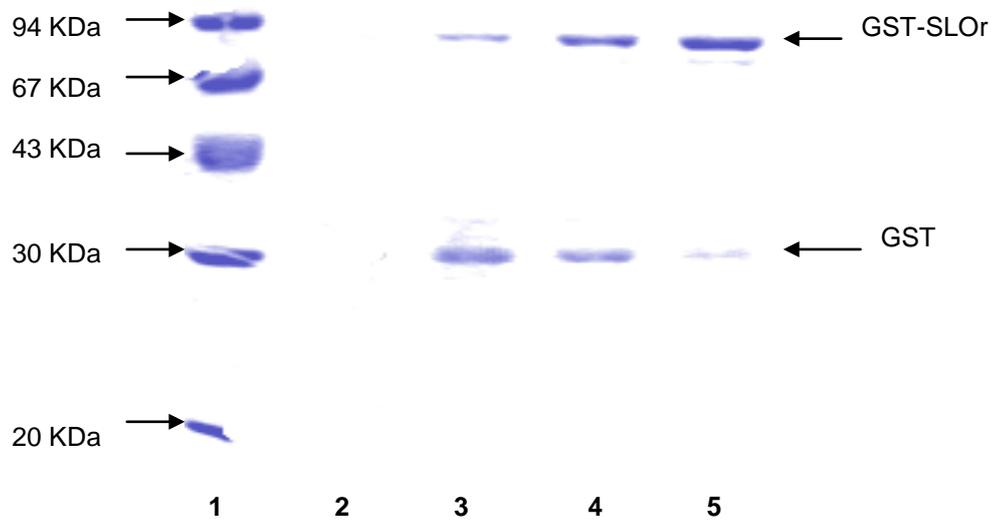
**Figura 3.5.- Expresión del gen de fusión recombinante GST-SLOr.** Análisis por SDS-PAGE 10% visualizado por tinción con azul de Coomassie. Carril 1: 10  $\mu$ L sobrenadante de cultivo sonificado previo a la incubación con glutatión sefarosa. Carril 2: 10  $\mu$ L sobrenadante no unido a glutatión sefarosa. Carril 3: 10  $\mu$ L pool de elución luego de la incubación con glutatión sefarosa. Carril 4: 5 $\mu$ L marcador de peso molecular (94-67-43-30-20 KDa).



**Figura 3.6.- Análisis del purificado por inmunoblot.** El material eluído de la columna de glutatión sefarosa fue separado por peso molecular por SDS-PAGE 10% e inmediatamente transferido a nitrocelulosa para análisis de reconocimiento antigénico. Carril 1: nitrocelulosa incubada con suero humano de referencia positivo para anticuerpos anti-SLO 1/500 y posteriormente incubado con anti-IgG humano conjugado a fosfatasa alcalina 1/1000. Carril 2: nitrocelulosa incubada con suero de ratón positivo para anticuerpos anti-GST 1/200 y a continuación incubada con conjugado anti-IgG de ratón a fosfatasa alcalina 1/1000. Carril 3: similares condiciones que para el carril 2 efectuando una pre-incubación del suero de ratón con GST (0.0075 mg) 1 hora a 37°C. Carril 4: Control negativo.



**Figura 3.7.- Cromatograma obtenido a partir de gelfiltración por Superdex 75.** El eluido obtenido luego de la cromatografía por glutatión sefarosa fue dializado en PBS y posteriormente gelfiltrado, usando una columna preparativa Superdex 75 acoplada a un sistema automatizado (Biopilot; Pharmacia, Upsala, Suecia). La cromatografía fue realizada inyectando 2mg de proteína totales (en un volumen de 2 mL) trabajando con un flujo de 1 mL/min y manteniendo la presión  $\leq 4$  bar.



**Figura 3.8.-Análisis del cromatograma obtenido por geltracción en columna Superdex 75.** Fracciones de los picos obtenidos por gelfiltración fueron corridas en SDS-PAGE y teñidas con azul de Coomassie. Carril 1: 5 $\mu$ L marcador de peso molecular (94-67-43-30-20 KDa). Carril 2: 10  $\mu$ L muestra correspondiente al segundo pico. Carril 3: 10  $\mu$ L muestra correspondiente al ascenso del primer pico. Carril 4: 10  $\mu$ L de muestra correspondiente al punto máximo del primer pico. Carril 5: 10  $\mu$ L muestra correspondiente al descenso del primer pico.

### 3.2.4.- Evaluación de la actividad hemolítica del purificado obtenido

Se analizó la actividad hemolítica, del purificado obtenido por cromatografía de afinidad, en eritrocitos de carnero. El mismo presentó un título de 25600, teniendo actividad específica de  $1.3 \times 10^9$  por miligramo de proteína. El control realizado con GST recombinante sola no presentó hemólisis. La GST-SLOr presentó actividad hemolítica en condiciones reducidas, mientras que en condiciones no reducidas (sin agregado de cisteína) y oxidadas (con el agregado de  $\text{FeCl}_3$ .) no se observó hemólisis (Tabla 3.3).

**Tabla 3.3.- Actividad hemolítica de SLO nativa y GST-SLOr.** El ensayo fue realizado en eritrocitos de carnero en condiciones reductoras (con el agregado de cisteína 0.48%), no reductoras (sin agregado de cisteína) y en condiciones oxidantes (con el agregado de FeCl<sub>3</sub> 0.012%).

	<b>Título de hemólisis de SLO nativa</b>	<b>Título de hemólisis de GST-SLOr</b>	<b>Título de hemólisis de GST</b>
<b>Condiciones reductoras</b>	1600	25600	0
<b>Condiciones no-reductoras</b>	0	0	0
<b>Condiciones oxidantes</b>	0	0	0

### 3.2.5.- Comparación del título de anticuerpos anti-SLO en suero humano determinado por técnica de aglutinación de látex y por ELISA

Se realizaron ensayos de aglutinación de partículas de látex para determinar el título de anticuerpos anti-SLO en 34 muestras de suero humano provenientes de pacientes con posible infección reciente por *S. pyogenes*. Para ello se empleó un reactivo látex comercial (Rheumagen, ASO, Biokit Inc.), cuyas partículas de látex tienen adsorbida a su superficie SLO nativa. A continuación, se determinó el título de anticuerpos anti-SLO por técnica de ELISA usando GST-SLOr adsorbida a la superficie de la placa y se compararon los títulos de anticuerpos anti-SLO obtenidos por ambas técnicas (Tabla 3.4). Debido a que los títulos obtenidos por técnica de aglutinación de látex tienen distribución discontinua y los títulos obtenidos por ELISA tienen distribución continua, para compararlos se discretizaron los resultados obtenidos por ELISA (Moscoso y Serrano, 1989). Para ello, los valores obtenidos por ELISA en un determinado intervalo, fueron

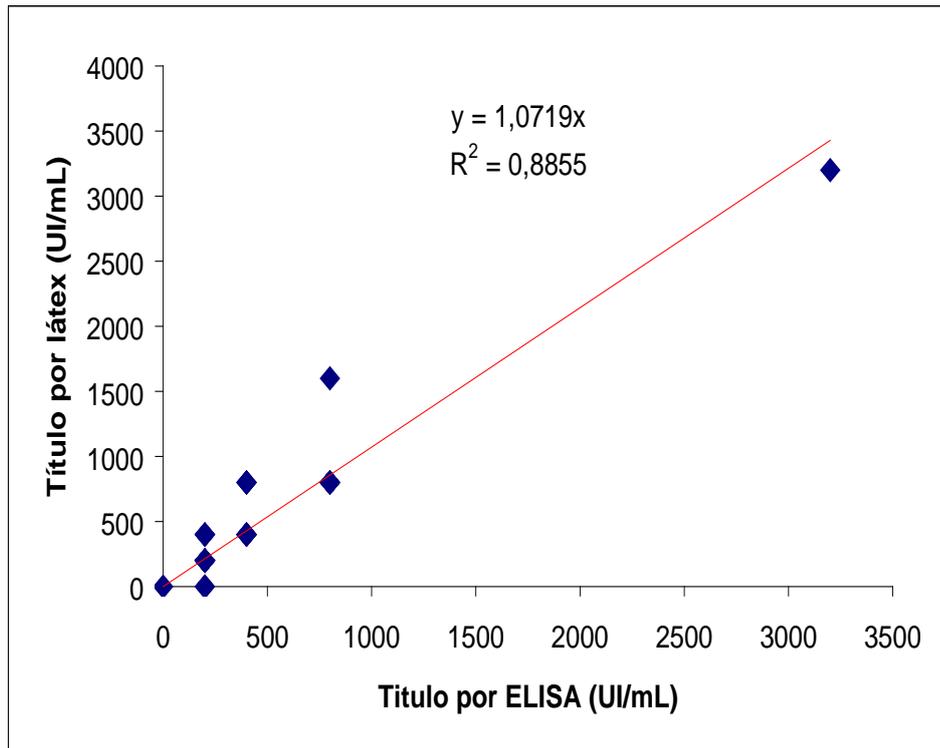
asignados a un título particular del ensayo por aglutinación de látex, siendo el mismo definido por el punto medio entre títulos consecutivos obtenidos por aglutinación de látex (Tabla 3.5). La comparación de los títulos obtenidos por aglutinación de látex y por ELISA está representada en la figura 3.9. El coeficiente de correlación entre ambos métodos fue calculado tratando el título de anticuerpos anti-SLO como una variable continua, dando un valor de  $r = 0.9410$  ( $R^2=0.8855$ ;  $y = 1.0719x$ ). Con el fin de tener un criterio estrictamente estadístico sobre la correlación de ambas metodologías se realizó el test de Wilcoxon de rangos con signo para un experimento apareado (Mendehall y col.,1995), empleando el programa Statística versión 4.5. La aplicación de dicho test dio un valor  $p = 0.0064$ , rechazándose la hipótesis nula de igualdad de los resultados por ambas metodologías.

**Tabla 3.4.-Comparación del título de anticuerpos anti-SLO en suero humano por ELISA y látex comercial.** Para la determinación de anticuerpos anti-SLO se usó reactivo látex que emplea SLO nativa con una sensibilidad de 200 UI/mL, siguiendo las recomendaciones del fabricante. El error de la técnica es +/- 1 dilución. Para el ELISA se empleó GST-SLOr a una concentración de 3 µg/mL por pocillo. Los sueros fueron diluidos (1/3000-1/6000-1/12000-1:24.000) e incubados 1 hora 30 minutos a 37°C. Luego se incubó con un conjugado anti IgG humano a peroxidasa (1/4000) durante 1 hora 30 minutos a 37°C. A continuación, las placas fueron lavadas y reveladas con OPD. La titulación de anticuerpos anti-SLO se realizó por interpolación en una curva estándar (concentración mUI/mL vs. DO 492nm) usando un suero humano estándar positivo para anticuerpos anti-SLO, proveniente de la OMS; en un rango entre 4 mUI/mL a 100 mUI/mL.

Número de suero	Título por Elisa +/- desvío estándar (UI/mL)	Título por Látex (UI/mL)
4	116 +/- 3	<200
13	125 +/- 1	<200
16	173 +/- 4	<200
34	(<0.04)	<200
1	215 +/- 4	200
3	215 +/- 3	200
6	161 +/- 2	200
9	190 +/- 3	200
10	254 +/- 2	200
18	137 +/- 1	200
20	187 +/- 6	200
26	108 +/- 9	200
32	197 +/- 8	200
33	168 +/- 10	200
2	232 +/- 8	400
5	219 +/- 4	400
7	364 +/- 7	400
14	349 +/- 5	400
17	323 +/- 5	400
25	200 +/- 2	400
29	245 +/- 3	400
30	390 +/- 7	400
31	377 +/- 11	400
8	438 +/- 2	800
11	495 +/- 7	800
12	703 +/- 10	800
15	605 +/- 25	800
19	793 +/- 3	800
21	804 +/- 6	800
22	788 +/- 11	800
27	1074 +/- 5	800
28	445 +/- 7	800
23	1072 +/- 50	1600
24	3000 +/- 17	3200

**Tabla 3.5.- Equivalencia entre los títulos determinados por ELISA y aglutinación de látex.** La equivalencia entre los títulos de anticuerpos anti-SLO entre ambas técnicas se realizó mediante asignar a un intervalo de títulos obtenidos por ELISA, títulos obtenidos por látex de acuerdo a la siguiente tabla de conversión:

<b>Título por látex (UI/mL)</b>	<b>Título por ELISA (UI/mL)</b>
≥200	0 - 99
200	100 -299
400	300 - 599
800	600 - 1199
1600	1200 - 2399
3200	>2400



**Figura 3.9.- Correlación entre los títulos de anticuerpos anti-SLO medidos por ELISA y látex.** Para graficar se “discretizaron” previamente los títulos obtenidos por ELISA de acuerdo a la tabla 3.5. En el gráfico se indica la correlación entre ambas técnicas.

### 3.3.- Discusión

En este trabajo se expresó en *E.coli* SLOr fusionada al extremo C-terminal de GST empleando el vector pGEX-2T. El sistema pGEX-2T permite la producción de proteínas de fusión que pueden ser purificadas en un solo paso en condiciones no agresivas para la proteína, pudiendo mantener su actividad biológica. Esta característica del sistema, sumado al hecho que los niveles de anticuerpos anti-GST en la población humana son muy bajos o nulos, provee una excelente alternativa para su uso en inmunoensayos (Smith, 1993).

Debido a que el análisis de los distintos algoritmos evidenció que no hay una clara dominancia antigénica en la molécula de SLO nativa, presentado áreas de potencial inmunogénico a lo largo de la secuencia completa (Figura 3.1.a, b, y c ), la estrategia fue clonar la mayor parte de la molécula de SLO nativa madura, de modo de obtener una molécula adecuada para uso en inmunoensayos, evitando sitios sensibles a clivaje proteolítico descritos para *S. pyogenes* (Pinkney y col., 1995). Si bien estos sitios descritos para SLO nativa en *S. pyogenes* no tienen necesariamente que coincidir en *E. coli*, a priori fueron igualmente excluidos.

La proteína de fusión GST-SLOr fue purificada a partir de sobrenadante de sonificado de cultivos de *E. coli*. El análisis por SDS-PAGE del eluido de la cromatografía de afinidad evidenció la presencia de dos bandas: una de aproximadamente 77 KDa y otra de 26 KDa. Sin embargo cuando se realizaron geles con menor carga proteica, y en ensayos de inmunoblots, se detectó la presencia de una banda adicional de menor intensidad de aproximadamente 70 KDa. Las bandas de mayor intensidad correspondieron con el peso teórico estimado para la fusión entera (77 KDa) y GST sola (26 KDa). El análisis de inmunoblot usando suero humano anti-SLO mostró reconocimiento de las bandas de 77 KDa y 70 KDa. Sin embargo cuando el ensayo fue realizado con suero de ratón anti-GST, las tres bandas fueron reconocidas. Estos resultados confirmaron que las bandas de 77 KDa y 70 KDa corresponden a la proteína de fusión GST-SLOr, debido a que las mismas fueron reconocidas por ambos antisueros. Se obtuvieron entonces dos formas de una proteína de fusión, una con un peso molecular que corresponde al peso molecular estimado para la fusión GST-SLOr, y otra forma menor que carece de una porción de aproximadamente de 7 KDa.

Si bien se intentó separar por gelfiltración GST-SLOr de GST, no se pudo lograr, probablemente por interacciones moleculares entre ambas proteínas. Debido a que diferentes condiciones de expresión pueden alterar la calidad y cantidad de proteína recombinante (Galindo y col., 1990; Hanning y Makrides, 1998; Egli y Zinn; 2003) se trató de estudiar condiciones de cultivo que favorecieran la expresión de GST-SLOr, minimizando o evitando la expresión de GST sola. Los resultados de éstos experimentos son descritos en los capítulos 4 y 5.

Una hipótesis para explicar la presencia de dos formas de GST-SLOr es clivaje proteolítico en el extremo C-terminal del fragmento SLO. Esta hipótesis está basada en la susceptibilidad a proteasas que se ha observado cuando SLOr es expresada como una única proteína en *E. coli* (Pinkney y col., 1995). Aunque no secuenciamos ambos fragmentos, los resultados sugieren que esta proteína de fusión recombinante podría ser susceptible a clivaje proteolítico en el extremo C-terminal dando un subproducto de menor tamaño. Este hallazgo resultó inesperado, debido a que el clivaje en *E. coli* ocurre cuando la proteína es exportada al periplasma. Sin embargo la fusión GST-SLOr carece de señal de exportación y permanece en el citoplasma. Por lo tanto la presencia de una banda de menor peso molecular podría representar un producto de degradación o una forma modificada de la proteína de fusión.

Dado que las dos variantes de la fusión fueron reconocidas en ensayos de inmunoblots por suero anti-SLO y anti-GST, otra hipótesis que podría explicar la aparición de una fusión de menor peso molecular, sería la existencia de sitios alternativos de terminación de la transcripción en el gen *slo*. Este mecanismo ha sido sugerido para la expresión de formas no activas de SLOr obtenidas en cultivos en *E. coli* (Kehoe y Timmis col., 1984; Pinkney y col., 1995). Si bien se ha observado que la expresión del gen *slo* en *S. pyogenes* está afectada por reordenamiento génico en el extremo 5' (Savic y col., 2002; Savic y Ferretti, 2003), mecanismos similares podrían ocurrir en el gen *slo* recombinante en *E. coli*. Por otro lado ha sido informado que cuando SLOr es producida como fusión con la proteína de unión a la maltosa, una única banda es obtenida (Weller y col., 1996). En nuestro trabajo hemos purificado ambas fusiones sin evaluar si la forma de menor peso molecular es activa.

En relación con la banda de 26 KDa que correspondería a GST sola, existen varias hipótesis que pueden explicar resultados similares de expresión de GST sola reportadas con otras proteínas fusionadas a ésta enzima (Smith, 1993), así como en otros sistemas de expresión que expresan otras proteínas como fusión (Chabalgoity y col., 1996; Guan y col., 1988). La misma podría resultar como consecuencia de la acción de proteasas presentes en la preparación. Estas

proteasas podrían actuar en algún sitio sensible situado entre el extremo C-terminal de GST y el N-terminal de SLOr.

Otro mecanismo que podría explicar la expresión de GST sola sería la presencia de señales de terminación temprana en el proceso de transcripción/traducción. Este fenómeno puede deberse a diferencias en el uso de ciertos codones en *E. coli* respecto a los usados por *S. japonicum* y *S. pyogenes* para la expresión de GST y SLO respectivamente. Las diferencias en el uso de codones, podría ocasionar pausas en el tráfico ribosomal durante la transcripción/traducción en *E.coli*. Dado que en procariotas la transcripción y traducción es un proceso acoplado, las pausas ribosomales podrían resultar en el incremento de la longitud de “ARNm desnudo” entre la molécula de ARN polimerasa que esta transcribiendo y el primer ribosoma. De este modo, determinadas regiones de ARNm podrían tornarse particularmente susceptibles a la acción de endonucleasas y de factores de terminación rho dependientes (Peterson y col.,1992; Lewis, 2000). Debido que codones sinónimos pueden ser usados de forma diferencial para la expresión génica, dependiendo del hospedador (Spanjaard y Van Duin, 1988; Makoff y col., 1989), una alternativa para mejorar e incrementar la expresión GST-SLOr podría ser estudiar e identificar la presencia de codones de uso infrecuente para *E. coli* en los genes *gst* y *slo*, sustituyéndolos por codones de uso frecuente por mutagénesis dirigida. También se ha demostrado que en algunos casos este fenómeno puede ser evitado co-expresando ARNt mediante plásmidos multicopias (Spanjaard y col., 1990).

Respecto a la actividad biológica del recombinante obtenido, la proteína de fusión GST-SLOr mantiene el mismo patrón de actividad hemolítica que SLO nativa; a saber, presenta actividad hemolítica en condiciones reducidas, siendo abolida dicha actividad en condiciones no reducidas u oxidadas (Halbert y col.,1970).

Es de destacar que la actividad específica reportada para SLO nativa proveniente de sobrenadante de cultivo de *S. pyogenes* es del orden de  $8 \times 10^5$  unidades hemolíticas por mg de proteína (UI/mg) (Alouf, 1980; Bhakdi y col., 1984a, 1984b, 1985), siendo los valores descriptos para otras SLOr del orden de  $8 \times 10^5$  a  $1 \times 10^6$  UI/mg (Kehoe y col., 1984). En este trabajo el recombinante obtenido tubo una

actividad específica de  $1 \times 10^9$  UI/mg. Este hallazgo fue sorprendente debido a que la molécula de GST sola tiene un peso molecular de 26 KDa, representando aproximadamente un tercio del peso molecular total de la fusión; no teniendo una explicación para este fenómeno. Esta característica de GST-SLOr indicaría que podría ser usado en experimentos de permeabilización celular. Como ejemplo, podría utilizarse GST-SLOr en trabajos de permeabilización de células eucariotas para permitir la entrada de ADN o ARNm en ensayos de terapia génica (Spiller y col., 1998; Giles y col., 2000).

Referente al empleo de la fusión en inmunoensayos, los resultados obtenidos mostraron que GST-SLOr puede ser usada para la detección específica de anticuerpos anti-SLO en muestras de suero humano. Es de destacar además, que de acuerdo a los resultados obtenidos la fusión entera podría ser directamente empleada en inmunoensayos sin requerir en forma previa procesamiento alguno. Esto significa que no sería necesario remover, mediante clivaje proteolítico con trombina, la porción GST de la fusión. Esto es sugerido por el hecho que los ensayos de inmunoblots y ELISAs mostraron que la fusión fue reconocida por sueros humanos positivos para anticuerpos anti-SLO y que el recombinante obtenido presentó actividad hemolítica; sumado al hecho que los sueros humanos no reconocieron GST, decidiendo por tales motivos trabajar con la fusión entera. Esto puede ser considerado una gran ventaja desde el punto de vista tecnológico para el desarrollo de reactivos de diagnóstico que empleen SLOr, debido a que se estaría evitando una etapa de corte enzimático para separar GST de la fusión, que podría complicar el proceso, aumentando los costos de producción. En tal sentido, se desarrolló un ELISA para titulación de anticuerpos anti-SLO en suero humano. Con el fin de realizar una pre-evaluación del ELISA desarrollado, los títulos de anticuerpos anti-SLO obtenidos por esta técnica fueron comparados con los títulos obtenidos por un reactivo látex comercial que emplea SLO nativa. Para ello se titularon 34 muestras de suero humano provenientes de pacientes con posible infección reciente por *S. pyogenes*. La correlación entre ambas técnicas fue de  $r = 0.9410$ . Este resultado indicaría que ambas metodologías tienen una buena correlación. Sin embargo este resultado provee un criterio semicuantitativo que puede ser complementado con la aplicación de un test estadístico apropiado,

en este caso la prueba de Wilcoxon de rangos con signo para un experimento apareado (Mendehall y col. 1995). La aplicación de dicho test dio como resultado el rechazo de la hipótesis nula respecto a la igualdad de los resultados por las dos metodologías. Sin embargo teniendo en cuenta la sensibilidad de la técnica de látex y el error propio de su metodología (+/- una dilución), si hubiera existido un error de una dilución, bastaría con que sólo dos datos (por ejemplo para el caso de los sueros N° 8 y 23) hubieran sido afectados con este tipo de error para que el resultado del test estadístico se modificara pasando de un valor de  $p = 0.0064$  a  $p = 0.0644$  (datos no mostrados), aceptando en este caso la igualdad de los resultados obtenidos por ambas metodologías. Sumado a ello, debe tenerse en cuenta que muchas de las diferencias entre los títulos de anticuerpos anti-SLO medidos por las dos técnicas pueden ser atribuidos a diferencias en los esquemas de dilución empleados para uno y otro ensayo. Es importante destacar que el estudio efectuado fue a modo de evaluación preliminar, siendo necesario realizar un análisis más exhaustivo. En este sentido se debería incrementar el número de muestras a analizar con el fin de realizar estudios de sensibilidad, especificidad y reproducibilidad del ELISA desarrollado.

En suma, los resultados expuestos indican que la fusión GST-SLOr es un antígeno apropiado que podría sustituir el uso de SLO nativa en el desarrollo de inmunoensayos empleados para titular anticuerpos anti-SLO. Sin embargo, es necesario previamente mejorar el protocolo de producción de GST-SLOr antes de proseguir con el desarrollo de inmunoensayos basados en este antígeno.

# **CAPITULO 4**

## **EXPRESIÓN DE GST-SLOr EN MATRACES**

### **4.1.- Introducción**

La aplicación industrial de un determinado bioproceso requiere en forma previa estudios de desarrollo del mismo en menor escala. Para implementar un nuevo bioproceso es necesario poder integrar tanto el conocimiento de los sistemas biológicos implicados así como la aplicación de metodologías y estrategias provenientes de la Bioingeniería.

Estos estudios pueden efectuarse siguiendo distintos métodos de diseño y análisis experimental (Montgomery, 1991). La aplicación de la estadística en la interpretación de los resultados es una herramienta útil para el desarrollo de un bioproceso tanto a microescala, usando matraces de pequeño volumen, como a escala preparativa empleando biorreactores de mayor tamaño. Este tipo de análisis junto con el conocimiento de las variaciones inherentes al sistema biológico en estudio, permitiría evaluar los resultados de manera objetiva y de

este modo tomar decisiones que permitan desarrollar y/u optimizar un determinado bioproceso.

En la fase de experimentación en microescala en laboratorio pueden emplearse diferentes diseños y volúmenes de matraces, aproximadamente de 50 a 500 mL. En esta etapa, los objetivos son usualmente el estudio y selección de cepas, el desarrollo del medio de cultivo y el análisis de los factores o parámetros físicos y químicos más significativos. Durante el desarrollo en biorreactor a escala de laboratorio, el volumen de trabajo varía aproximadamente de 1 a 20 litros. A este nivel, los factores experimentales a estudiar y optimizar son: aireación, agitación, adición de nutrientes, control de espuma, etc. Los mismos incluyen estudios de cinética, elección del tipo de biorreactor apropiado para el bioproceso y evaluación técnica y económica. Previo al desarrollo del proceso a nivel industrial, el mismo es evaluado a escala piloto, en un volumen aproximado de 50 a 200 litros. En esta escala se optimiza principalmente los factores físicos de las condiciones experimentales, se implementan los criterios para el escalado industrial, se configura el método de inoculación, esterilización y ajuste del medio y se realiza análisis de calidad del producto obtenido junto con una evaluación técnica y económica. A nivel industrial, en un volumen aproximado de 100 a 5000 litros se efectúa el ajuste del proceso para un adecuado nivel de aceptación económica (Bailey y Ollis, 1986; Cunha y Aires-Barros, 2002).

Para lograr un sistema productivo con alto rendimiento de expresión de proteínas heterólogas, es necesario tener un conocimiento integrado del tipo de construcción génica y la capacidad biosintética de la célula hospedadora. Si bien tradicionalmente la expresión de proteínas recombinantes ha sido optimizada mediante manipulación de la construcción génica (Corchero y Villaverde, 1998; Wegrzyn y Wegrzyn, 2002), un abordaje basado en el conocimiento y control del metabolismo celular ha cobrado interés, con el fin de aumentar los rendimientos de producción de productos recombinantes en *E. coli* (Balbas, 2001). Debido a que los precursores, la maquinaria de síntesis y la energía para la producción de recombinantes son provistos por el metabolismo de la célula hospedadora, estos factores deben ser extensamente analizados y optimizados. Desde el punto de vista tecnológico además de obtener la cantidad de biomasa necesaria, el objetivo

principal del proceso de producción es obtener alta producción de proteína recombinante por unidad de biomasa. Siendo el máximo específico de producción ( $F_p\%$ ), en el caso de proteínas recombinantes estables y no tóxicas para la célula hospedadora, determinado por la relación entre la velocidad de producción de proteína recombinante ( $q_p$ ) y la velocidad de crecimiento celular ( $\mu$ ), representado por la ecuación  $F_p\% = (q_p/\mu) \cdot 100$ . La  $q_p$  de un sistema de expresión depende principalmente del tipo de construcción génica y de las condiciones de fermentación. Considerando la producción de proteínas recombinantes como una parte en el total de la capacidad biosintética de la célula hospedadora, es imposible obtener coeficientes altos de producción a una velocidad de crecimiento alta. Por tal motivo para lograr una adecuada producción de proteína recombinante, manteniendo la actividad metabólica del hospedador, es necesario evitar trabajar a velocidades altas de crecimiento celular (Baneyx, 1999; Balbas 2001). La aplicación del control del proceso productivo es posible mediante el ajuste de los cocientes  $q_p/\mu$ . Además de estos aspectos cinéticos, es evidente la conveniencia de investigar sobre los factores que modulan la  $q_p/\mu$ , ya que pueden ocasionar cambios sustanciales en la regulación de la célula hospedadora.

Para desarrollar un determinado bioproceso, la selección del microorganismo a utilizar depende de diversos factores. Algunos de los mismos involucran: el tipo de producto a obtener, rendimiento de producto y biomasa, velocidad de reacción, costo y recuperación de producto, facilidad de conservación del microorganismo a lo largo del tiempo, estabilidad de las células durante el manejo en el equipo industrial y factibilidad de mejoramiento genético. Las mejores productividades se obtienen en aquellos bioprocesos donde se logra trabajar con cepas mejoradas, por ejemplo por ingeniería genética, junto con una adecuada formulación del medio de cultivo (Wang y col., 1979).

El análisis de los factores relevantes del proceso de crecimiento y producción es fundamental para evaluar la presencia de interacciones y su influencia en el bioproceso. También es importante determinar el método a seguir para el desarrollo del inóculo y las condiciones de iniciación del proceso. Estas dos variables son generalmente usadas para representar el estado fisiológico del inóculo y las condiciones iniciales de cultivo, la edad del inóculo y la

concentración inicial de células. Pero también existen otros factores que pueden tomarse en cuenta tales como actividad de enzimas, concentración celular de ADN, proteínas, nitrógeno, morfología celular, etc.

El medio de cultivo debe proveer suficiente fuente de energía y aporte de elementos químicos necesarios para producir biomasa y producto. La utilización de medios sintéticos permite alterar fácilmente la concentración de un compuesto de interés, eliminar las interferencias y obtener ensayos más reproducibles. Sin embargo los medios complejos son más económicos y por ende son los más utilizados a nivel industrial. Estos medios pueden estimular el crecimiento y la formación de productos debido a la presencia de factores muchas veces desconocidos, pero también pueden presentar factores tóxicos difíciles de controlar y eliminar (Trejo y col., 2001). La optimización del medio se centra en los componentes fundamentales y valiosos, siendo dirigida al uso eficiente de los mismos y a mantener una concentración que permita una elevada formación del producto deseado. De este modo el diseño del medio de cultivo permitiría alterar la productividad celular aportando un beneficio económico a la totalidad del sistema productivo.

Otro factor a tomar en cuenta son las condiciones físicas del bioproceso. En el caso de la selección de pH, debe considerarse que un valor óptimo para obtención de biomasa puede diferir respecto al pH adecuado para la formación de producto, siendo entre otros dependiente de la cepa utilizada. Durante un proceso biológico, la síntesis de productos o el consumo de nutrientes pueden ocasionar variación en el pH del medio de cultivo, pudiendo ser incluso desfavorable para el crecimiento y/o formación de producto, por tal motivo es crítico mantener el pH constante. A nivel de matraces, el control de pH es limitado, ajustándose sólo al inicio. Por lo tanto la adición de agentes con buena capacidad tampón podría evitar o retardar estas variaciones de pH.

La temperatura es otro factor importante a ser optimizado, ya que la temperatura óptima de crecimiento puede diferir respecto a la temperatura óptima de producción de determinado metabolito; siendo en algunos casos necesario establecer un perfil óptimo según la etapa que esté el cultivo (Vasina y col., 1998; Chao y col., 2002). El control de temperatura presenta problemas de escalado, siendo difícil mantener la misma constante cuando se trabaja con volúmenes

grandes de medio. Esto debe tenerse en cuenta cuando se trabaja a temperaturas altas, pues cambios bruscos de temperatura pueden causar descenso en la velocidad de producción de un bioproceso (Bailey y Ollis, 1986).

La eficiencia del suministro de oxígeno es un parámetro difícil de determinar debido a que está relacionado con otros parámetros y variables del bioproceso, tales como coeficiente volumétrico de transferencia de oxígeno ( $K_L a C_L^*$ ), concentración de oxígeno disuelto en el medio y velocidad de consumo del mismo (Zhang y col., 2002). Este último depende de la concentración de células y de la actividad metabólica de las mismas. A su vez el suministro de oxígeno es dependiente de las características del medio de cultivo, factores ambientales y dispositivo experimental empleado, siendo un parámetro difícil de escalar. A nivel de matraces es posible detectar si el mismo es significativo para la producción tanto de biomasa como de determinado producto, pero la optimización deberá realizarse en biorreactores (Freedman, 1969).

Respecto a la velocidad de alimentación de nutrientes, una adecuada formulación del medio permite el desarrollo de estrategias de optimización de un bioproceso, mediante el control de la disponibilidad de nutrientes claves. Sin embargo el análisis de este parámetro es complejo debido a su interrelación con otros parámetros y variables que intervienen en la velocidad de consumo de nutrientes, por tal motivo su análisis requiere del uso de diseños experimentales multifactoriales.

Con el fin de evaluar distintas condiciones de cultivo de un proceso biológico, el empleo de matraces agitados en ensayos experimentales permite efectuar corridas simultáneas con bajo consumo de medio. Es útil para estudiar la selección de cepas, formulación del medio y selección de factores significativos tales como temperatura y pH inicial. Pero da una información parcial en la optimización del suministro de oxígeno y no es adecuado para estudiar sistemas de control de pH, esquemas de adición de nutrientes, control de espuma y de concentración de nutrientes en el medio, lo cual es posible controlar en fermentador (Zabriskie y col., 1987; Bhattacharya y Dubey, 1997a; Chen y col., 1997; Zhang y col., 2002). La mayor diferencia entre el sistema de cultivo en matraz agitado y biorreactor reside en el modelo de flujo y en la eficiencia del

suministro de gases, pudiendo ocasionar limitaciones en el desarrollo de criterios para el escalado.

Sin embargo en líneas generales, los cultivos en matraces agitados, son esencialmente una práctica útil previo a la etapa en fermentador, debido a que es un procedimiento relativamente sencillo con buenos resultados para ajustar medios y condiciones de cultivo.

### **4.1.1.-Objetivo del trabajo**

El objetivo de esta parte del trabajo fue producir GST-SLOr en microescala y determinar el efecto de algunos de los parámetros que intervienen en la expresión de esta proteína dentro del citoplasma de *E. coli* en forma soluble.

## **4.2.- Resultados**

Se analizaron las condiciones de cultivo en matraces de 100 mL con el fin de lograr una mayor expresión de GST-SLOr en fase soluble. Particularmente, se estudiaron las condiciones de cultivo en distintas relaciones de volumen de medio/volumen de matraz, diferentes condiciones de inducción y expresión en distintas cepas de *E. coli*.

Las diferencias de los niveles de expresión se analizaron en SDS-PAGE tal como se describió en el apartado 2.2.11.1.1. El criterio para determinar la carga de proteína en cada carril fue, para el caso de: a) sobrenadante de cultivo de *E. coli* luego de sonicado: tomar el mismo volumen de muestra a estudiar y b) en los

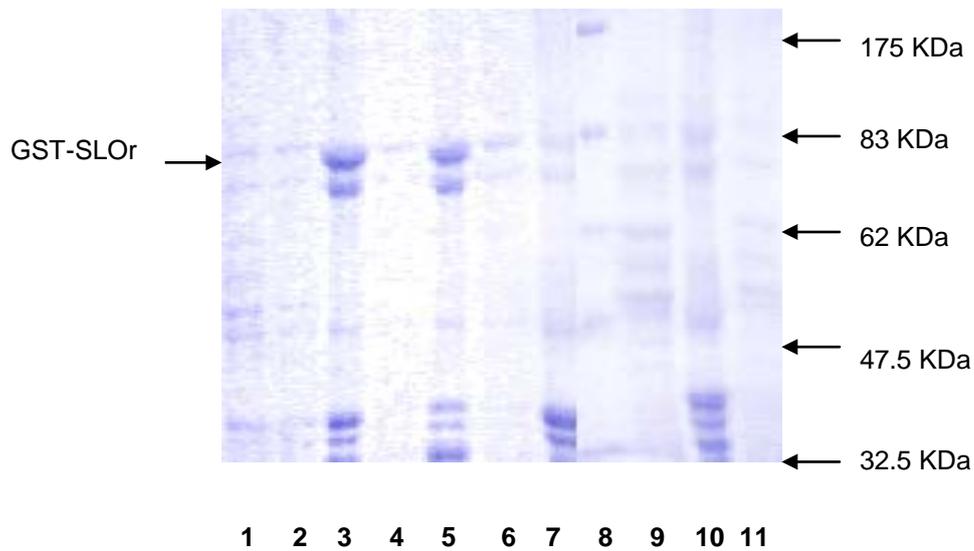
residuos sólidos de *E.coli* obtenidos luego de la sonicación: resuspender en igual volumen que el original, y tomar para la carga de los geles el mismo volumen empleado que en los sobrenadantes. De este modo, la uniformización de la carga en SDS-PAGE permitiría la estimación de la concentración de producto recombinante expresado.

#### **4.2.1.- Efecto del momento-tiempo de inducción y cantidad de medio de cultivo en la expresión de GST-SLOr citoplásmica en fase soluble**

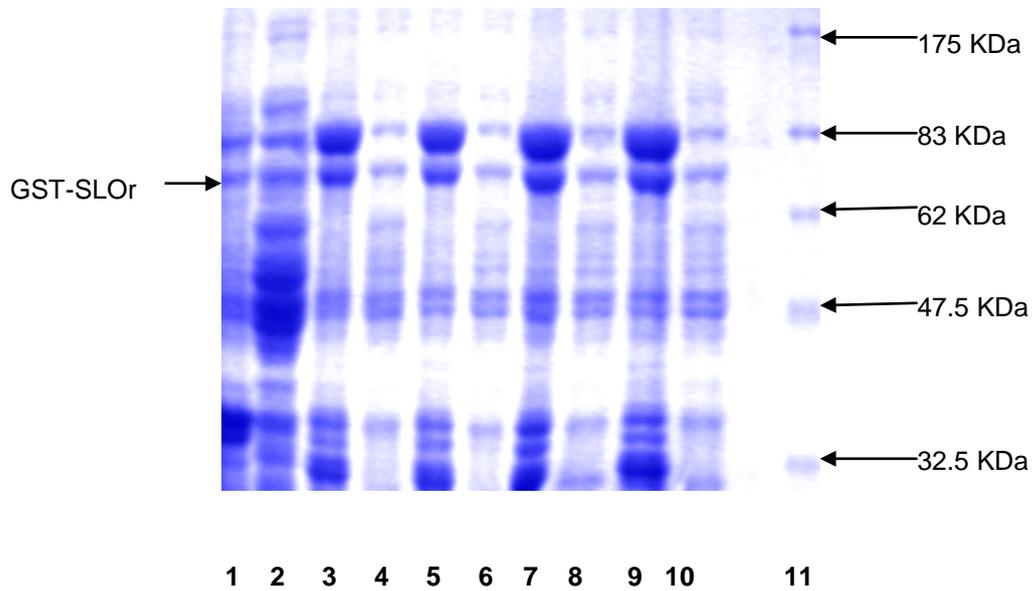
Se analizó el efecto del tiempo de inducción y la cantidad del medio de cultivo en *E.coli* TG2 recombinante. Cultivos conteniendo distintas relación de medio LB respecto al volumen total del matraz (20% y 50%) fueron crecidos a 37°C y posteriormente inducidos con IPTG 1 mM. La inducción se realizó en fase de crecimiento logarítmica o en fase estacionaria durante 4 horas y 16 horas respectivamente. Los cultivos fueron mantenidos a 37°C en shaker orbital a 200 r.p.m., durante todo el proceso sin control de pH y sin el agregado de glucosa. Se observó que la proteína recombinante se expresó mayoritariamente en cuerpos de inclusión y que el aumento del tiempo de inducción no produjo mayor expresión de la misma dentro del citoplasma en fase soluble (Figura 4.1).

A continuación, se realizaron experimentos con 10% de LB repitiéndose los ensayos a 20 %. Los cultivos fueron crecidos por 2 horas y luego inducidos con IPTG 1 mM durante 4 horas, efectuándose los mismos a 37°C y 200 r.p.m., sin agregado de glucosa y sin corrección de pH. Los resultados confirmaron que la proteína se expresó mayoritariamente en forma insoluble (Figura 4.2). Los resultados obtenidos hacían suponer que la baja visualización del recombinante en fase soluble, podría ser causada por problemas en el procesamiento de las muestras y no por baja expresión en dicha fase. Para evaluar esta hipótesis, los residuos sólidos celulares fueron nuevamente sonicados y procesados. Los resultados obtenidos sugieren que no hubieron problemas de procesamiento de las muestras, específicamente durante el proceso de sonicación. Asimismo se observó que la inducción a 37°C con bajo porcentaje de medio de cultivo respecto

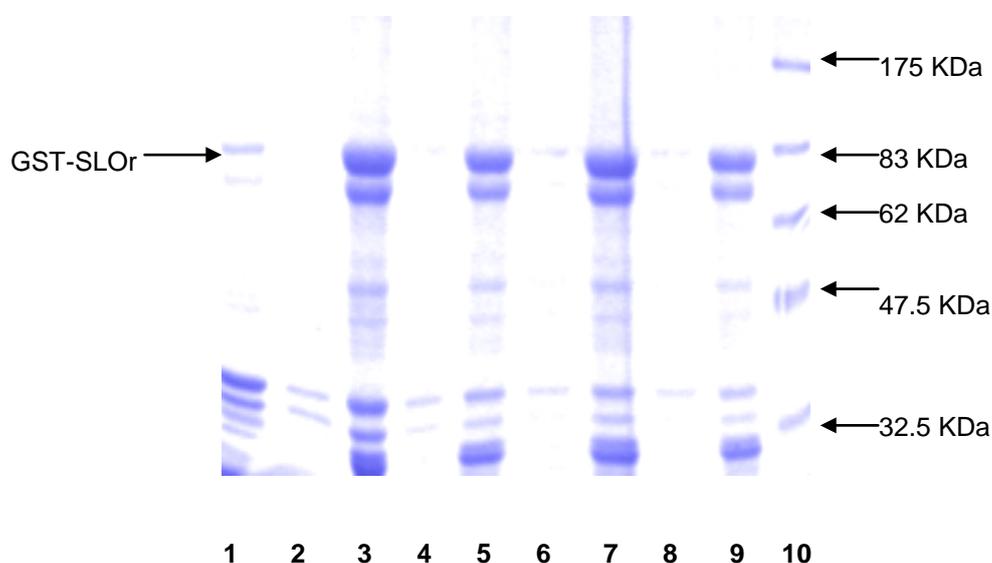
al volumen total del matraz no mejora la expresión de GST-SLOr citoplásmica en fase soluble (Figura 4.3).



**Figura 4.1.- Análisis de productos obtenidos en distintas condiciones de cultivo e inducción.** Muestras analizadas por SDS-PAGE 10% de residuo sólido y sobrenadante, luego de sonicar cultivos de *E. coli* TG2 recombinante. Carril 1: Residuo sólido cepa recombinante sin inducir. Carril 2: Sobrenadante cepa recombinante sin inducir. Carril 3-6: Muestras de cultivos de la cepa recombinante inducidos por 4 horas. Carril 3: Residuo sólido de cultivo en 20% de LB. Carril 4: Sobrenadante de cultivo en 20% de LB. Carril 5: Residuo sólido cultivo en 50% LB. Carril 6: Sobrenadante cultivo en 50% LB. Carril 7y 9-11: Muestras de cultivos de la cepa recombinante inducidos 16 horas. Carril 7: Residuo sólido cultivo en 20% de LB. Carril 8: Marcador de peso molecular (175-83-62-47.5-32.5 KDa). Carril 9: Sobrenadante cultivo en 20 % de LB. Carril 10: Residuo sólido cultivo en 50% de LB. Carril 11: Sobrenadante cultivo en 50% de LB.



**Figura 4.2.- Análisis de productos obtenidos en distintas condiciones de cultivo luego de inducir 4 horas.** Muestras analizadas por SDS-PAGE 10% de residuo sólido y sobrenadante luego de sonicar cultivos de *E. coli* TG2 recombinante. Carril 1: Residuo sólido cepa recombinante sin inducir. Carril 2: Sobrenadante cepa recombinante sin inducir. Carril 3-6: Muestras de cultivos de la cepa recombinante crecidos en 20% de LB. Carril 3: Residuo sólido. Carril 4: Sobrenadante. Carril 5-6 Duplicados obtenidos a partir de procesos independientes, correspondientes a los carriles 3 y 4 respectivamente. Carril 7-10: Muestras de cultivos de la cepa recombinante crecidos en 10% de LB. Carril 7: Residuo sólido. Carril 8: Sobrenadante. Carril 9: Residuo sólido. Carril 10: Sobrenadante. Carril 11: Marcador de peso molecular (175-83-62-47.5-32.5KDa).



**Figura 4.3.- Análisis de productos obtenidos luego de repetir el procesamiento de los cultivos de *E. coli* TG2 recombinante.** Muestras analizadas por SDS-PAGE 10% de residuo sólido y sobrenadante obtenidos a partir de residuos sólidos nuevamente sonicados y procesados. Carril 1-2: Residuo sólido y sobrenadante respectivamente proveniente de cultivo sin inducir. Carril 3-4: Residuo sólido y sobrenadante respectivamente provenientes de cultivo crecido en 20% de LB e inducido por 4 horas. Carril 5-6: Residuo sólido y sobrenadante respectivamente provenientes de cultivo crecido en 10% de LB e inducido por 4 horas. Carril 7-9: Muestras correspondientes a duplicados obtenidos a partir de procesos independientes. Carril 7-8: Duplicados carril 3-4 (residuo sólido y sobrenadante respectivamente). Carril 9: Duplicado carril 5. Carril 10: Marcador de peso molecular (175-83-62-47.5-32.5KDa).

#### 4.2.2.- Estudio de la expresión de GST-SLOr

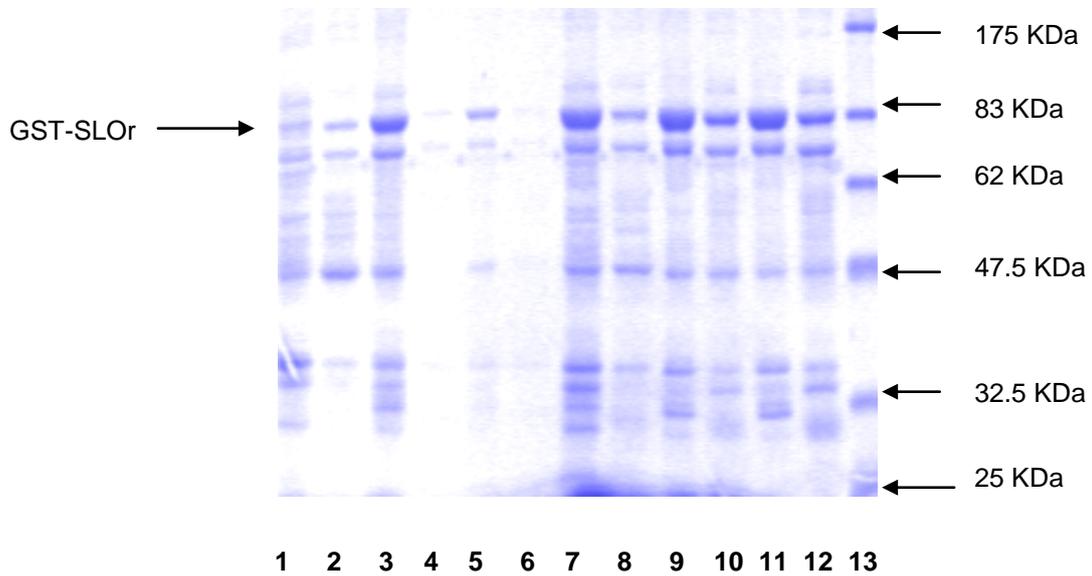
Para ello, los experimentos fueron realizados aplicando diseño bifactorial de efectos fijos (Montgomery, 1991). En este diseño, los tratamientos corresponden a todas las combinaciones posibles de dos factores en todos los niveles que se presentan. Se efectuaron repeticiones para la estimación del error estadístico y realizar el análisis de varianza (ANOVA). El ANOVA permitió calcular los estadísticos a partir del cociente entre el cuadrado medio de cada factor y el cuadrado medio del error. El valor obtenido fue comparado según la tabla de Fisher ( $F$ ) para valores críticos de  $F_{0.95}$  y  $F_{0.99}$ .

#### **4.2.2.1.- Evaluación de los factores porcentaje de medio de cultivo y temperatura de inducción en la expresión de GST-SLOr citoplásmica en fase soluble**

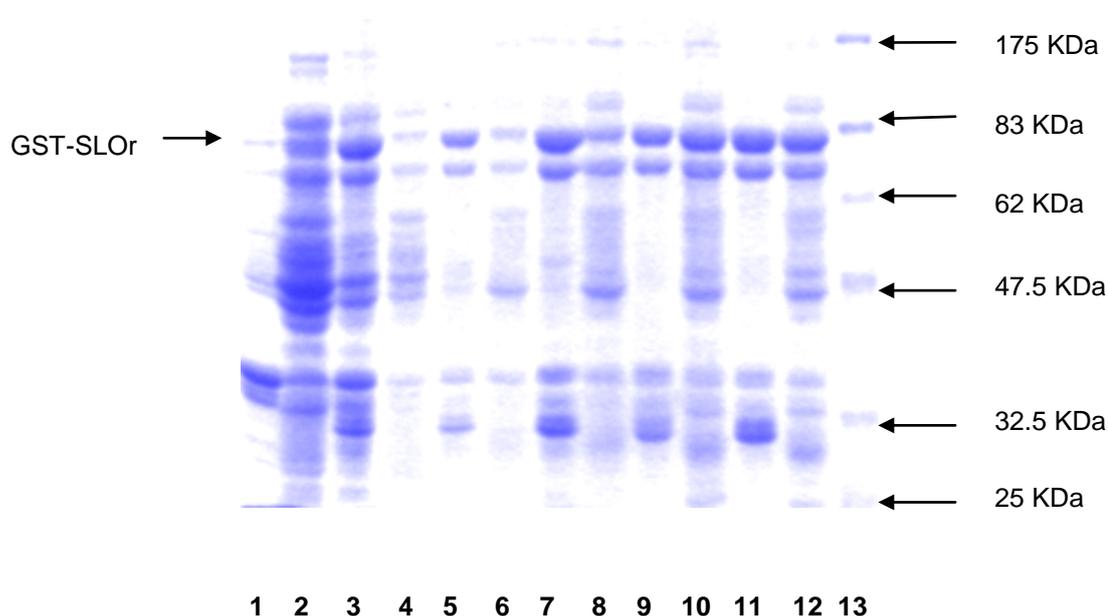
Se analizó un rango de porcentaje de volumen de medio de cultivo (LB) respecto al volumen total del matraz entre 5%-75%. Cultivos previamente crecidos durante 2 horas a 37°C en agitación a 200 r.p.m., fueron inducidos con IPTG 1 mM. La inducción fue realizada por 4 horas en agitación a 28°C y 37°C, siendo los cultivos realizados sin corrección de pH y sin agregado de glucosa (Figuras 4.4. y 4.5).

Los resultados por SDS-PAGE mostraron que independientemente de la temperatura de inducción, a mayor porcentaje de medio de cultivo se produce mayor proporción de GST-SLOr citoplásmica en fase soluble. Además se observó aumento de la expresión de GST-SLOr tanto en residuo sólido como en sobrenadante en los cultivos inducidos a 37°C.

El análisis estadístico de los resultados de los parámetros o factores independientes y de su interacción, mostraron valores superiores para valores críticos de  $F_{0.95}$  y  $F_{0.99}$  (ver cuadro estadístico y valores tabulados en página 188). Por lo tanto se rechaza la hipótesis nula de homogeneidad de la temperatura (factor A), porcentaje de medio de cultivo (factor B), e inexistencia de interacción entre ambos factores. El cuadro estadístico mostró valores similares para los factores independientes, siendo en el valor obtenido de la interacción un orden de magnitud menor. Esto indicaría que si bien la interacción entre los factores temperatura de inducción y porcentaje de medio de cultivo es importante para la optimización de la expresión de GST-SLOr, los factores independientes son aún más significativos.



**Figura 4.4.- Análisis de la expresión de GST-SLOr citoplásmica en fase soluble en distintos porcentajes de medio y temperatura de inducción 28°C.** Muestras analizadas por SDS-PAGE 10% de residuo sólido y sobrenadante obtenidos por sonicación de cultivos de *E. coli* TG2 recombinante. Carril 1-2: Cultivo crecido en 20% de LB sin inducir; residuo sólido y sobrenadante respectivamente. Carril 3-4: Cultivo crecido en 5% de LB; residuo sólido y sobrenadante respectivamente. Carril 5-6: Cultivo crecido en 10% de LB; residuo sólido y sobrenadante respectivamente. Carril 7-8: Cultivo crecido en 20% de LB; residuo sólido y sobrenadante respectivamente. Carril 9-10: Cultivo crecido en 50% de LB; residuo sólido y sobrenadante respectivamente. Carril 11-12: Cultivo crecido en 75% de LB; residuo sólido y sobrenadante respectivamente. Carril 13: Marcador de peso molecular (175-83-62-47.5-32.5-25 KDa).

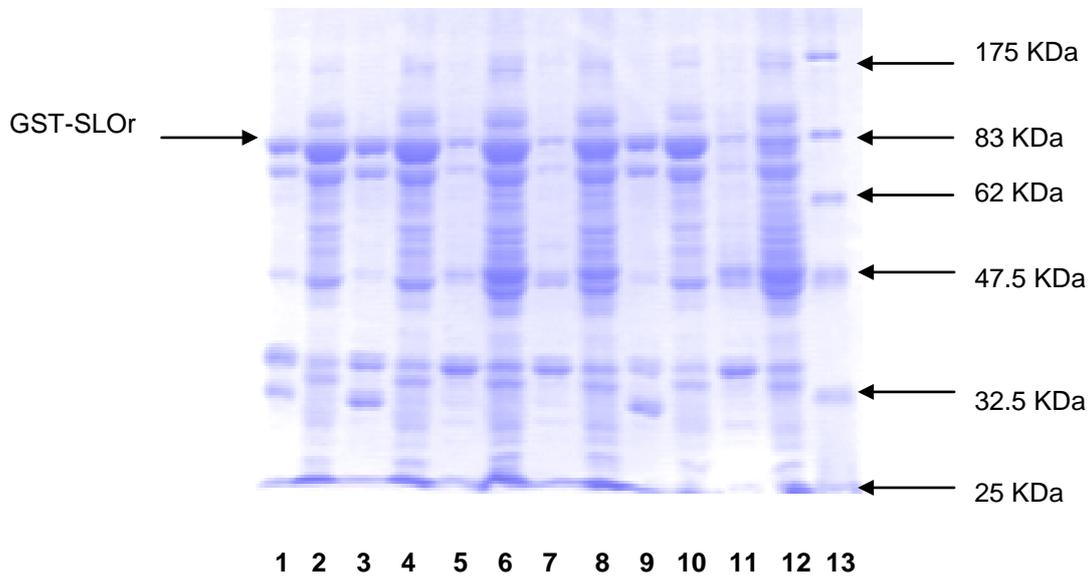


**Figura 4.5.- Análisis de expresión de GST-SLOr citoplásmica en fase soluble en distintos porcentajes de medio y temperatura de inducción 37°C.** Muestras analizadas por SDS-PAGE 10% de residuo sólido y sobrenadante obtenidos por sonicación de cultivos de *E. coli* TG2 recombinante. Carril 1-2: Cultivo crecido en 20% de LB sin inducir; residuo sólido y sobrenadante respectivamente. Carril 3-4: Cultivo crecido en 5% de LB; residuo sólido y sobrenadante respectivamente. Carril 5-6: Cultivo crecido en 10% de LB; residuo sólido y sobrenadante respectivamente. Carril 7-8: Cultivo crecido en 20% de LB; residuo sólido y sobrenadante respectivamente. Carril 9-10: Cultivo crecido en 50% de LB; residuo sólido y sobrenadante respectivamente. Carril 11-12: : Cultivo crecido en 75% de LB; residuo sólido y sobrenadante respectivamente. Carril 13: Marcador de peso molecular (175-83-62-47.5-32.5-25KDa).

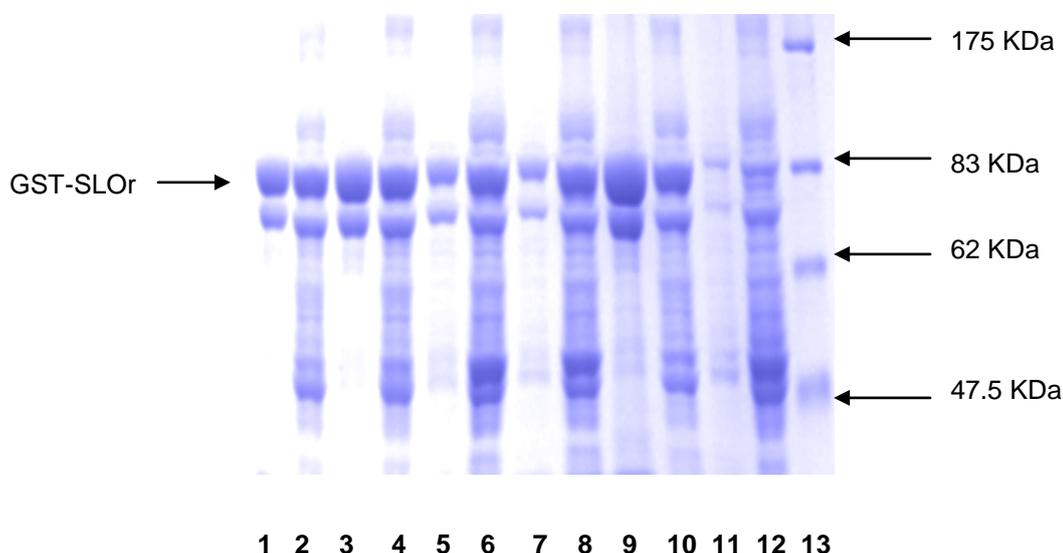
#### 4.2.2.2.- Evaluación de la expresión de GST-SLOr citoplásmica en fase soluble a distintas temperaturas de inducción y concentración de inductor

Se trabajó con *E.coli* TG2 recombinante en matraces conteniendo 50% de LB, sin agregado de glucosa y sin corrección de pH durante el proceso. Los matraces fueron sembrados e incubados 2 horas a 37°C con agitación a 200 r.p.m. Posteriormente, los cultivos fueron inducidos con diferentes concentraciones de IPTG (0.00 - 0.01 - 0.10 – 1.00 mM) por 4 horas a diferentes temperaturas (28°C o 37°C) con agitación. A continuación las muestras fueron procesadas y controladas por SDS-PAGE 10% (Figuras 4.6 y 4.7).

En ambos experimentos se observó que la expresión relativa de GST-SLOr intracitoplasmática en fase soluble mejoró cuando se trabajó con 0.01 mM de IPTG tanto a 28°C como a 37°C. Si bien la observación cualitativa de la expresión de GST-SLOr en cuerpos de inclusión (expresión dentro del citoplasma en fase insoluble), en el residuo sólido celular, fue poco perceptible a 28°C, la expresión del recombinante en el citoplasma en fase soluble a 37°C fue superior respecto a los cultivos inducidos a 28°C. Además se observó diferencias en el patrón de expresión de GST-SLOr cuando se varió la concentración de inductor. Cuando la inducción fue efectuada con IPTG 0.01mM la mayoría de la proteína recombinante se expresó en el citoplasma en fase soluble, a diferencia de la inducción con IPTG 1.00 mM, en donde la proteína se expresó mayoritariamente en cuerpos de inclusión. El análisis estadístico (ver cuadro estadístico y valores tabulados en página 190) mostró que la temperatura de inducción (factor A) es el factor más significativo en la expresión de GST-SLOr, seguida por la concentración de inductor (factor B) y la interacción entre ambos factores.



**Figura 4.6.- Análisis de productos obtenidos en distintas condiciones de inducción.** Muestras de residuo sólido y sobrenadante obtenido de sonicación de cultivo de *E. coli* TG2 recombinante analizadas por SDS-PAGE 10%. Carril 1-10: Cultivos inducidos a 28°C. Carril 1-2: Residuo sólido y sobrenadante respectivamente, cultivo inducido con IPTG 0.10 mM. Carril 3-4: Duplicados carril 1-2 respectivamente, obtenidos a partir de procesos independientes. Carril 5-6: Residuo sólido y sobrenadante respectivamente, cultivo inducido con IPTG 0.01 mM. Carril 7-8: Duplicados carril 5-6 respectivamente, obtenidos a partir de procesos independientes. Carril 9-10: Residuo sólido y sobrenadante respectivamente, cultivo inducido con IPTG 1.00 mM. Carril 11-12: Residuo sólido y sobrenadante respectivamente, cultivo sin inducir. Carril 13: Marcador de peso molecular (175-83-62-47.5-32.5-25 KDa).



**Figura 4.7.- Análisis de productos obtenidos en distintas condiciones de inducción.** Muestras de residuo sólido y sobrenadante obtenido de sonicación de cultivo de *E. coli* TG2 recombinante analizadas por SDS-PAGE 10%. Carril 1-10: Cultivos inducidos a 37°C. Carril 1-2: Residuo sólido y sobrenadante respectivamente, cultivo inducido con IPTG 0.10 mM. Carril 3-4: Duplicados carril 1-2 respectivamente, obtenidos a partir de procesos independientes. Carril 5-6: Residuo sólido y sobrenadante respectivamente, cultivo inducido con IPTG 0.01 mM. Carril 7-8: Duplicados carril 5-6 respectivamente, obtenidos a partir de procesos independientes. Carril 9-10: Residuo sólido y sobrenadante respectivamente, cultivo inducido con IPTG 1.00 mM. Carril 11-12: Residuo sólido y sobrenadante respectivamente, cultivo sin inducir. Carril 13: Marcador de peso molecular (175-83-62-47.5 KDa).

#### 4.2.2.3.- Expresión de GST-SLOr en diferentes cepas de *E. coli* con distintos volúmenes de medio de cultivo y distintas temperaturas de inducción

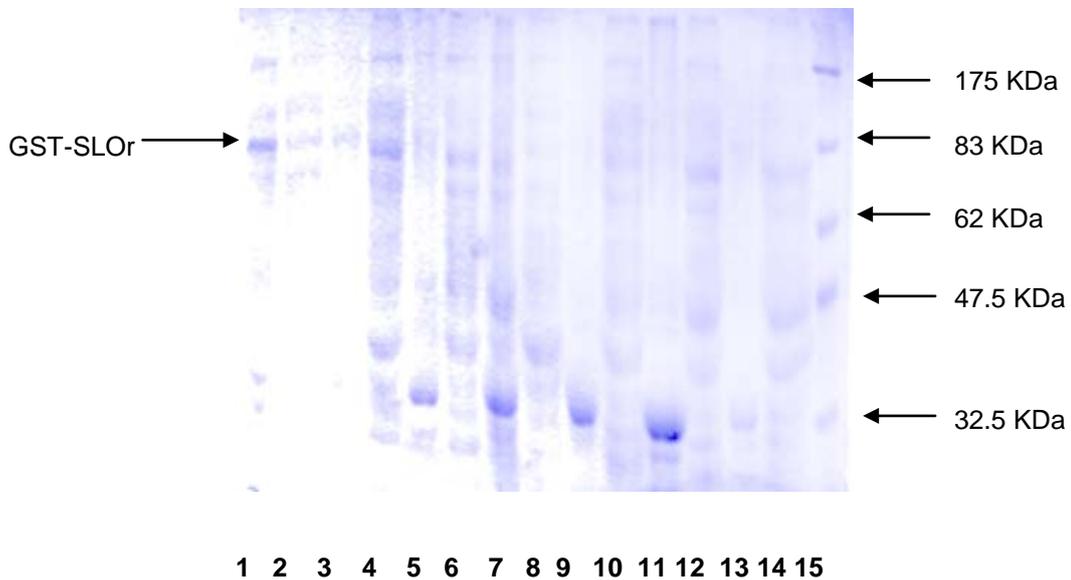
Distintas cepas de *E. coli* fueron transformadas con el plásmido recombinante. Se analizó la expresión de éste en diferentes porcentajes de medio de cultivo LB, respecto al volumen total del matraz (10%-20%-50%) a diferentes temperaturas de inducción (28°C - 37°C), manteniéndose constante la concentración de IPTG (0.01mM). La expresión de GST-SLOr en las distintas cepas fue analizada por SDS-PAGE (Figuras 4.8 - 4.9 - 4.10 - 4.11). A continuación, se prosiguió el trabajo

con la cepa que expresó mayor concentración de GST-SLOr intracitoplasmática en fase soluble.

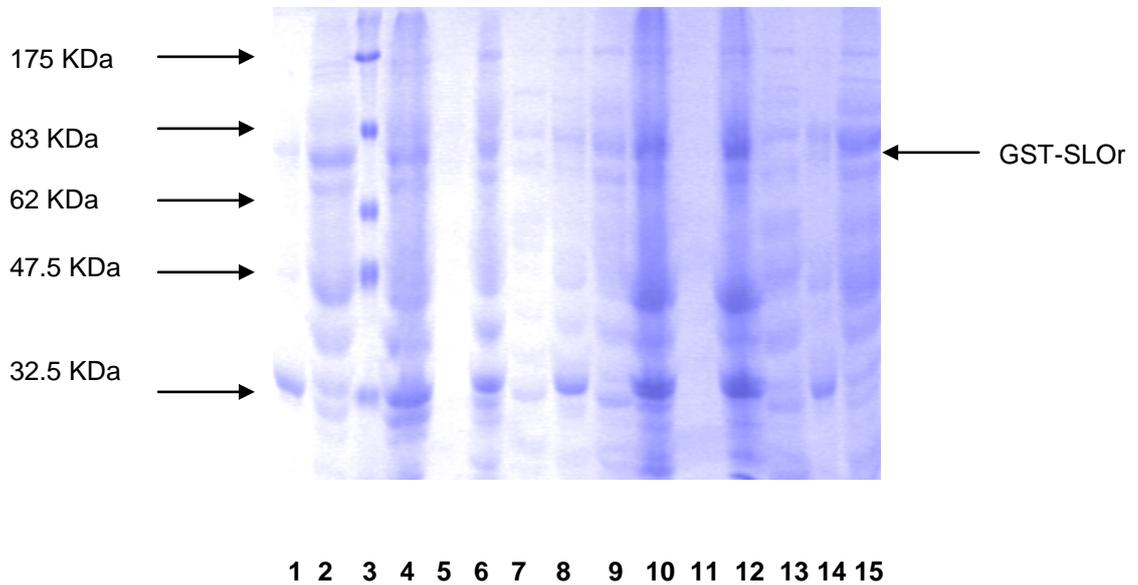
Las cepas que expresaron GST-SLOr en fase soluble inducidas a 28°C fueron TG2, JM 109 y DH1. Siendo la mejor expresión obtenida con un porcentaje del 50% de medio de cultivo. Además las cepas XL-Blue y RB791 expresaron GST-SLOr intracitoplasmica soluble a 20% y 50% de volumen de medio de cultivo. El análisis estadístico (ver cuadro estadístico y valores tabulados en página 192) efectuado para valores críticos de  $F_{0.95}$  y  $F_{0.99}$  mostró que las cepas (factor A) y el porcentaje de medio de cultivo (factor B) son factores significativos, siendo éste último aún más significativo. Además los resultados indicaron que existe interacción entre ambos factores.

Respecto a la expresión de GST-SLOr en las cepas inducidas a 37°C, el análisis por SDS-PAGE evidenció que JM 109 y TG2 expresaron el recombinante en forma intracitoplásmica soluble en condiciones de 50% de medio de cultivo respecto al volumen total de matraz. El análisis estadístico (ver cuadro estadístico y valores tabulados en página 194) mostró que el tipo de cepa (factor A) y el porcentaje de medio de cultivo (factor B) son factores significativos en la expresión de GST-SLOr. Asimismo, la interacción entre ambos factores es significativa aunque en menor grado que los factores independientes.

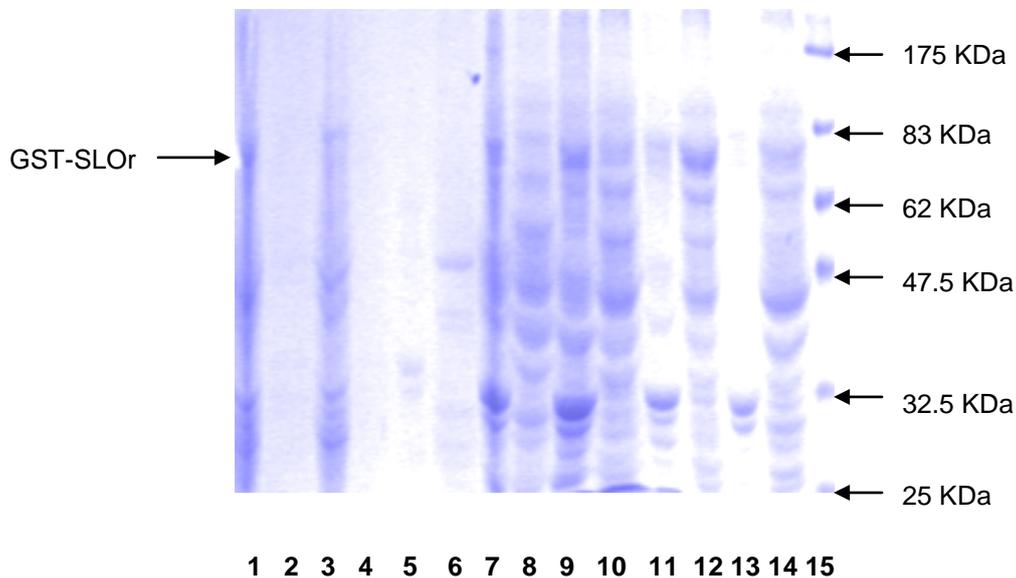
Por otro lado, análisis estadístico realizado a partir de experimentos donde se evaluó la expresión de GST-SLOr citoplásmica en fase soluble evaluando diferentes temperaturas de inducción (factor A), en distintas cepas (factor B), manteniendo constante el porcentaje de medio de cultivo (50%) y la concentración de inductor (IPTG 0.01 mM), indicó que la cepa TG2 expresó mayor cantidad de proteína recombinante tanto a 28°C como 37°C respecto a las otras cepas analizadas. En este caso, el análisis efectuado para valores críticos de  $F_{0.95}$  y  $F_{0.99}$  mostró que el tipo de cepas es el factor más significativo respecto a la temperatura de inducción en la optimización de GST-SLOr, siendo la interacción entre ambos aún más significativa que los factores independientes (ver cuadro estadístico y valores tabulados en página 196).



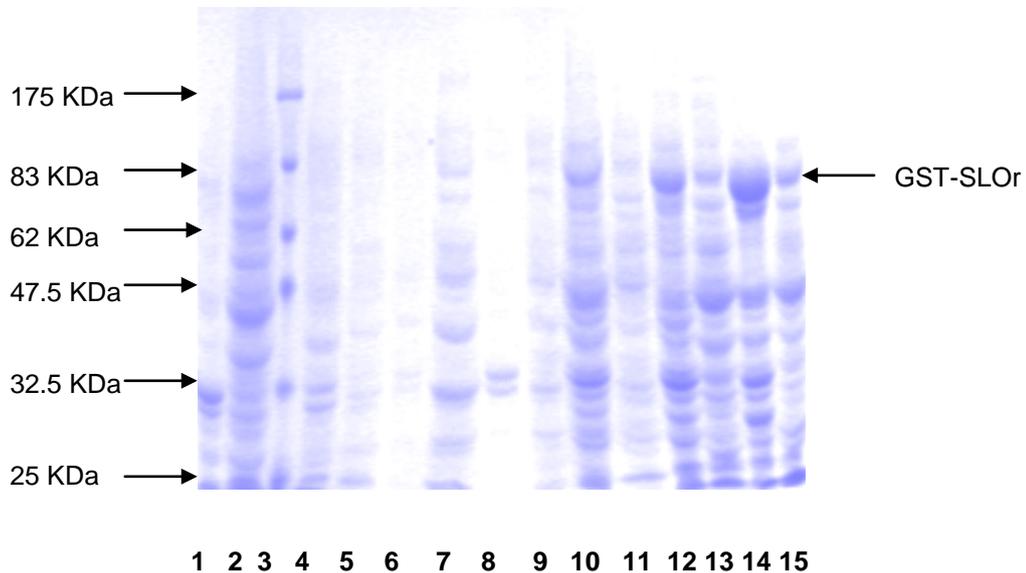
**Figura 4.8.- Análisis de productos obtenidos en distintas cepas y diferentes volúmenes de medio de cultivo.** Muestras de residuo sólido y sobrenadante, analizadas por SDS-PAGE 10%, obtenido a partir de sonicados de cultivo de diferentes cepas de *E. coli* recombinante. Carril 1-14: Cultivos inducidos con IPTG 0.01mM a 28°C. Carril 1-6: Cepa XL Blue recombinante. Carril 1-2: Residuo sólido y sobrenadante respectivamente, cultivo en 10% de LB Carril 3-4: Residuo sólido y sobrenadante respectivamente, cultivo en 20% de LB. Carril 5-6: Residuo sólido y sobrenadante respectivamente, cultivo en 50% de LB. Carril 7-12: Cepa JM 109 recombinante. Carril 7-8: Residuo sólido y sobrenadante respectivamente, cultivo en 10% de LB. Carril 9-10: Residuo sólido y sobrenadante respectivamente, cultivo en 20% de LB. Carril 11-12: Residuo sólido y sobrenadante respectivamente, cultivo en 50% de LB. Carril 13-14: Residuo sólido y sobrenadante respectivamente, cepa TG2 recombinante cultivo en 50% de LB. Carril 15: Marcador de peso molecular (175-83-62-47.5-32.5 KDa).



**Figura 4.9.- Análisis de productos obtenidos en distintas cepas y diferentes volúmenes de medio de cultivo.** Muestras de residuo sólido y sobrenadante, analizadas por SDS-PAGE 10%, obtenido a partir de sonicados de cultivo de diferentes cepas de *E. coli* recombinante. Cultivos inducidos con IPTG 0.01mM a 28°C. Carril 1-2: Residuo sólido y sobrenadante respectivamente, cepa TG2 recombinante cultivo en 50% LB. Carril 3: Marcador de peso molecular (175-83-62-47.5-32.5 KDa). Carril 4-9: Cepa DH1 recombinante. Carril 4-5: Residuo sólido y sobrenadante respectivamente, cultivo en 10% de LB. Carril 6-7: Residuo sólido y sobrenadante respectivamente, cultivo en 20% de LB. Carril 8-9: Residuo sólido y sobrenadante respectivamente, cultivo en 50% de LB. Carril 10-15: Cepa RB791 recombinante. Carril 10-11: Residuo sólido y sobrenadante respectivamente, cultivo en 10% de LB. Carril 12-13: Residuo sólido y sobrenadante respectivamente, cultivo en 20% de LB. Carril 14-15: Residuo sólido y sobrenadante respectivamente, cultivo en 50% de LB.



**Figura 4.10.- Análisis de productos obtenidos en distintas cepas y diferentes volúmenes de medio de cultivo.** Muestras de residuo sólido y sobrenadante, analizadas por SDS-PAGE 10%, obtenido a partir de sonicados de cultivo de diferentes cepas de *E. coli* recombinante. Carril 1-14: Cultivos inducidos con IPTG 0.01mM a 37°C. Carril 1-6: Cepa XL Blue recombinante. Carril 1-2: Residuo sólido y sobrenadante respectivamente, cultivo en 10% de LB Carril 3-4: Residuo sólido y sobrenadante respectivamente, cultivo en 20% de LB. Carril 5-6: Residuo sólido y sobrenadante respectivamente, cultivo en 50% de LB. Carril 7-12: Cepa JM 109 recombinante. Carril 7-8: Residuo sólido y sobrenadante respectivamente, cultivo en 10% de LB. Carril 9-10: Residuo sólido y sobrenadante respectivamente, cultivo en 20% de LB. Carril 11-12: Residuo sólido y sobrenadante respectivamente, cultivo en 50% de LB. Carril 13-14: Residuo sólido y sobrenadante respectivamente, cepa TG2 recombinante cultivo en 50% de LB. Carril 15: Marcador de peso molecular (175-83-62-47.5-32.5-25 KDa).



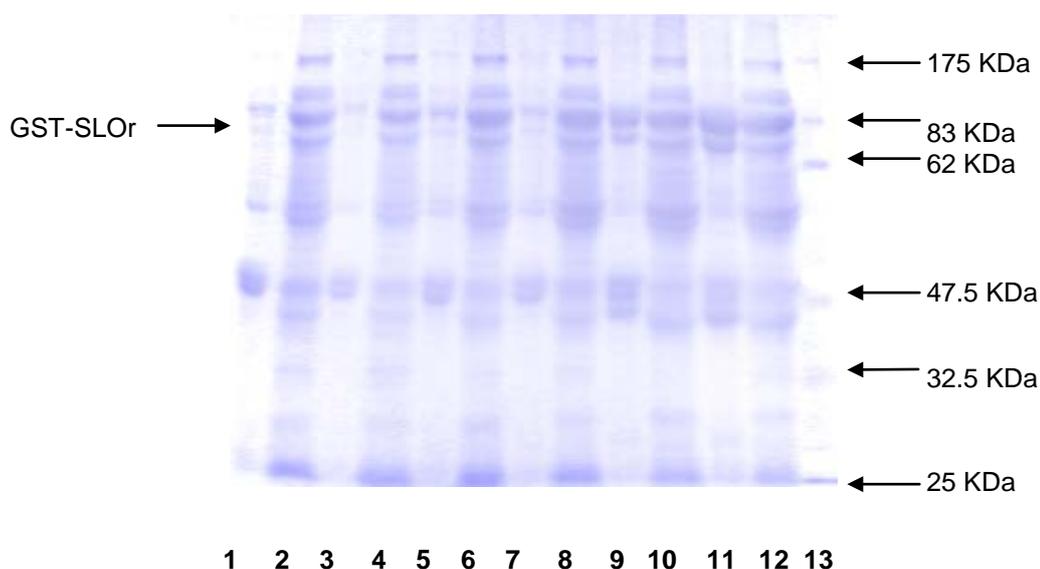
**Figura 4.11.- Análisis de productos obtenidos en distintas cepas y diferentes volúmenes de medio de cultivo.** Muestras de residuo sólido y sobrenadante, analizadas por SDS-PAGE 10%, obtenido a partir de sonicados de cultivos de diferentes cepas de *E. coli* recombinante, inducidas con IPTG 0.01mM a 37°C. Carril 1-2: Residuo sólido y sobrenadante respectivamente, cepa TG2 recombinante cultivo en 50% LB. Carril 3: Marcador de peso molecular (175-83-62-47.5-32.5-25 KDa). Carril 4-9: Cepa DH1 recombinante. Carril 4-5: Residuo sólido y sobrenadante respectivamente, cultivo en 10% de LB. Carril 6-7: Residuo sólido y sobrenadante respectivamente, cultivo en 20% de LB. Carril 8-9: Residuo sólido y sobrenadante respectivamente, cultivo en 50% de LB. Carril 10-15: Cepa RB791 recombinante. Carril 10-11: Residuo sólido y sobrenadante respectivamente, cultivo en 10% de LB. Carril 12-13: Residuo sólido y sobrenadante respectivamente, cultivo en 20% de LB. Carril 14-15: Residuo sólido y sobrenadante respectivamente, cultivo en 50% de LB.

#### 4.2.2.4.- Influencia de la temperatura en el proceso global de producción de GST-SLOR

Se evaluó la incidencia de la temperatura en la expresión de GST-SLOR, variando la misma en la fase de crecimiento celular e inducción. Para ello se cultivó la cepa TG2 recombinante con 50% de LB respecto al volumen total del matraz y se efectuaron procesos con fase de crecimiento e inducción a temperatura constante (28°C o 37°C), y procesos con fase de crecimiento a 37°C e inducción a 28°C.

Los cultivos fueron realizados con agitación a 200 r.p.m., sin agregado de glucosa y sin corrección de pH. La inducción se realizó por 4 horas con IPTG 0.01 mM.

El análisis en SDS-PAGE mostró expresión diferencial de GST-SLOr intracitoplásmica tanto en fase insoluble como en fase soluble, dependiendo de las condiciones de cultivo (Figura 4.12). En las condiciones en donde la inducción fue a 28°C, se observó escasa expresión de GST-SLOr en cuerpos de inclusión y expresión mayoritaria en fase soluble. En los cultivos en donde todo el proceso fue efectuado a 37°C, se observó incremento de la expresión de GST-SLOr en cuerpos de inclusión. Sin embargo la expresión de GST-SLOr en fase soluble fue prácticamente constante en todos los extractos solubles en las diferentes condiciones de cultivo analizadas.



**Figura 4.12.- Análisis de productos obtenidos en diferentes temperaturas de cultivo.** Muestras de residuo sólido y sobrenadante, analizadas por SDS-PAGE 10%, obtenido a partir de sonicados de cultivo de *E. coli* TG2 recombinante. Carril 1-2: Residuo sólido y sobrenadante respectivamente, cultivo con fase de crecimiento e inducción a 28°C. Carril 3-4: Duplicados carril 1-2 respectivamente, obtenidos en procesos independientes. Carril 5-6: Residuo sólido y sobrenadante respectivamente, cultivo con fase de crecimiento a 37°C e inducción a 28°C Carril 7-8: Duplicados carril 5-6, obtenidos en procesos independientes. Carril 9-10: Residuo sólido y sobrenadante respectivamente, cultivo con fase de crecimiento e inducción a 37°C. Carril 11-12: Duplicados, carril 9-10, obtenidos a partir de procesos independientes. Carril 13: Marcador de peso molecular (175-83-62-47.5-32.5-25 KDa).

### 4.3.- Discusión

El análisis primario de la expresión de GST-SLOr mostró que esta proteína se expresó mayoritariamente en cuerpos de inclusión. Información proveniente de la industria indica que cuando la molécula de SLOr es expresada en cuerpos de inclusión, presenta problemas de solubilización. Se ha observado que luego de realizar diferentes protocolos de solubilización, o bien los cuerpos de inclusión persisten o la molécula se desnaturaliza de modo tal que no es adecuada para uso en inmunoensayos. Debido a ello, el objetivo del trabajo fue lograr las condiciones de cultivo y expresión de GST-SLOr de tal modo que el patrón de expresión pudiera ser cambiado, logrando expresar la mayor parte del producto en el citoplasma celular en fase soluble. Para ello se evaluaron diferentes cepas de *E. coli* recombinantes cultivadas en distintas condiciones empleando matraces de 100 mL. Estudios preliminares respecto a la incidencia del momento y tiempo de inducción en distintos porcentajes de medio de cultivo, mostraron que cuando se indujo la expresión con IPTG 1.00 mM en distintas fases de crecimiento por 4 u 16 horas, GST-SLOr se expresó en cuerpos de inclusión. Debido a que el vector pGEX-2T es un sistema de expresión, en donde las proteínas recombinantes se encuentran localizadas en el citoplasma, en su mayoría en fase soluble (Guan y Dixon, 1991; Smith, 1993), se pensó que los resultados obtenidos eran debido a algún error o mal procesamiento de los cultivos bacterianos. Sin embargo, los experimentos que se realizaron para probar esta hipótesis evidenciaron que no hubo problemas en el procesamiento de las muestras. Por tal motivo se efectuaron una serie de experimentos con el fin de lograr modificar el patrón de expresión de GST-SLOr, de cuerpos de inclusión a fase soluble. Para ello se analizó el efecto de la temperatura de inducción y el porcentaje de medio de cultivo respecto al volumen total del matraz en la expresión de GST-SLOr. Los resultados obtenidos sugieren que tanto a temperaturas de inducción de 28°C y 37°C con IPTG 1.00 mM, el patrón de expresión GST-SLOr se mantuvo constante, aumentando la expresión en fase soluble en los experimentos que se

realizaron con porcentajes mayores de medio de cultivo. El análisis estadístico mostró que la temperatura de inducción y el porcentaje de volumen de medio de cultivo son factores significativos en la expresión de esta proteína recombinante, existiendo interacción entre ambos. Los valores estadísticos para los factores independientes fueron sensiblemente superiores a los valores críticos de  $F_{0.95}$  y  $F_{0.99}$ . Por otra parte, si bien se observó que hay efecto de interacción, el mismo es un orden de magnitud inferior a los obtenidos para cada factor independiente. Por tal motivo debe tenerse en cuenta que cada una de los factores analizados de forma independiente juega un papel más importante en la expresión de GST-SLOr comparada con su interacción.

Los resultados obtenidos correlacionan con el hecho que el oxígeno es un importante nutriente que se torna limitante. Dicho nutriente es usualmente suplementado a través de agitación vigorosa por un agitador rotatorio o en shaker. La agitación y/o mezclado, en el caso de cultivo de microorganismos aerobios, es importante debido a que el oxígeno es un nutriente poco soluble. Dado que el oxígeno puede ser un nutriente limitante crítico, la caracterización del suministro de oxígeno tanto en matraces como en fermentadores es fundamental (Banks, 1980; Bhattacharya y Dubey, 1997b; Zhang y col., 2002.). En el caso de los estudios en matraces, si bien no se calculó los niveles de transferencia de oxígeno, se estima que a mayor porcentaje de medio, disminuye la cantidad de oxígeno disponible por el cultivo, al disminuir la cámara de aire dentro del matraz. Debido a que la agitación permite el mezclado de los componentes del medio de cultivo y transferir más eficientemente los nutrientes, tales como el oxígeno; otra alternativa para evaluar la incidencia de la expresión de GST-SLOr soluble, además de la variación del volumen de medio de cultivo, podría ser el estudio de distintas velocidades de agitación. Estudios basados en la transferencia de oxígeno en matraces agitados (Yamada y col., 1978) mostraron que tanto en el crecimiento celular como en la producción de metabolitos están involucrados un número importante de procesos celulares tales como la asimilación de carbohidratos, formación de compuestos intermediarios y generación de energía, estando los mismos afectados por los patrones de agitación y aireación. Esto estaría indicando que las características celulares hasta cierto grado determinan la eficiencia, productividad y respuesta a las condiciones de cultivo; observándose

que los mismos en fermentador son afectados fuertemente por el sistema de suministro y mezclado de oxígeno en el medio (Bhattacharya y Dubey, 1997b). En el caso de cultivo en matraces agitados, las células obtienen oxígeno por absorción directa desde el aire (Cooper y col., 1944). La agitación produce un movimiento tipo remolino en una delgada capa alrededor de las paredes del matraz, dando como resultado que en matraces agitados se observa mejor crecimiento y producción que para los rangos esperados de velocidad de captación de oxígeno indicadas por el método de sulfito (Sumino y col., 1972). Aunque la transferencia de oxígeno es dependiente de la forma del frasco, del tipo de agitador, de la velocidad de agitación y del volumen de medio de cultivo, en este último punto se observó que un incremento de volumen del líquido da como resultado decrecimiento exponencial de transferencia de oxígeno (Freedman, 1969; Sumino y col., 1972). Por lo tanto diferencias en la agitación y aireación pueden llevar a distintos patrones de producción de metabolitos tanto en cultivos en matraces agitados como en fermentador, incidiendo en los niveles y patrones de expresión de determinado producto (Bhattacharya y Dubey, 1997b; Chen y col., 1997; Zhang y col., 2002).

En nuestros experimentos en matraces se observó que a mayor porcentaje de medio de cultivo, aumenta la expresión de GST-SLOr en fase soluble. Este fenómeno podría deberse a la disminución de la captación de oxígeno por parte de *E. coli*, provocando un enlentecimiento en el sistema transcripción-traducción. De este modo se podría lograr un mejor plegamiento de la proteína recombinante, tornándola soluble.

Otros parámetros o factores que inciden en la expresión de GST-SLOr soluble es la temperatura de inducción y la concentración de inductor. Se observó en *E. coli* TG2 recombinante que la expresión de GST-SLOr en fase soluble fue mejorada cuando disminuyó 100 veces la concentración original de IPTG, tanto a 28°C como a 37°C. En esta serie de experimentos el análisis estadístico mostró que la temperatura de inducción y la concentración de inductor son factores significativos para valores críticos de  $F_{0.95}$  y  $F_{0.99}$ . Si bien el estadístico mostró existencia de interacción entre ambos factores, éste no fue tan significativo cuando se comparó con los factores independientes, siendo la temperatura de inducción el factor más

significativo. Estos resultados sugieren la importancia de las condiciones de inducción, particularmente la temperatura de inducción en la expresión de GST-SLOr.

Respecto a la incidencia del uso de distintas de cepas en *E. coli* en la expresión de ésta proteína recombinante, el análisis estadístico indicó que la hipótesis nula de homogeneidad de las cepas en la optimización de la expresión de GST-SLOr en fase soluble es rechazada. Esto significa que el tipo de cepa usada en *E. coli* influye en la cantidad y en el perfil de expresión de esta proteína recombinante. Además los resultados del análisis estadístico sugieren que conjuntamente con el tipo de cepa, la temperatura de inducción y el porcentaje de medio de cultivo son parámetros muy importantes. Si bien, en líneas generales, el uso de diferentes cepas y el porcentaje de medio de cultivo son factores significativos, así como la interacción entre ambos; la temperatura de inducción incide en el efecto de éstos en la expresión de GST-SLOr: A 37°C hubo efecto equivalente de los factores independientes (cepas y porcentaje de medio de cultivo), teniendo la interacción entre ambos factores significación menor. Sin embargo a 28°C, el efecto del porcentaje de medio de cultivo fue mayor, comparado con el factor cepas de *E. coli* y la interacción entre ambos. Las diferencias observadas en la incidencia de los factores en la expresión de la proteína recombinante, podrían estar relacionadas a la performance del cultivo y la síntesis proteica frente a componentes químicos potencialmente limitantes en el medio, los cuales pueden variar a distinta temperatura (Okita y col., 1989; Chalmers y col., 1990; Vasina y col., 1998)

Los resultados mostraron que la mayor expresión de GST-SLOr en fase soluble fue en la cepa TG2 tanto a temperatura de inducción de 28°C como a 37°C. Respecto a la evaluación de la significación de los factores independientes cepas y temperatura de inducción, los resultados estadísticos mostraron que ambos factores son significativos para valores críticos de  $F_{0.95}$  y  $F_{0.99}$ . Sin embargo la significación estadística del factor cepa respecto a la temperatura de inducción fue superior. Además, el análisis estadístico mostró una fuerte interacción de éstos factores independientes potenciando su influencia en la expresión de GST-SLOr. Esto demostraría la importancia de la selección de la cepa en la expresión del recombinante y principalmente la interacción entre ésta y la temperatura de

inducción, debido a que la interacción entre ambos factores demostró ser la de mayor significación estadística para los valores críticos de  $F$  estudiados.

En conjunto, los resultados de este estudio evidenciaron la importancia de la selección de la cepa, la temperatura de inducción y la capacidad de transferencia de oxígeno del sistema.

Teniendo en cuenta que este desarrollo es para la producción a escala preparativa para su implementación futura a nivel industrial, se evaluó empíricamente la influencia de la temperatura en el proceso global de producción de GST-SLOr. Para ello se realizaron cultivos a temperatura constante, con fase de crecimiento e inducción a 28°C o 37°C; y cultivos con temperatura de crecimiento a 37°C y temperatura de inducción 28°C. Si bien se observó cambios en el perfil relativo de expresión de GST-SLOr soluble y en cuerpos de inclusión, no se constataron diferencias sustanciales cuando se compararon los extractos solubles en los distintos cultivos. Por tal motivo, a los efectos de la producción en fermentador se decidió realizar todo el proceso de cultivo con fase de crecimiento e inducción a 37°C. Esta decisión se realizó tomando en cuenta que la implementación de un sistema de cultivo con distintas temperaturas, podría traer aparejado problemas de diseño físico del biorreactor a nivel industrial, en particular en el sistema de enfriamiento. Sin embargo el cultivo a temperatura constante es habitual, cuya implementación a escala industrial implica el uso de sistemas de calentamiento y enfriamiento de rutina. De este modo, al usar un sistema de fermentación simple a nivel industrial, se podría estar reduciendo los costos de producción.

En suma, en este estudio se han analizado algunas de los parámetros o factores que pueden incidir en la expresión de GST-SLOr dentro del compartimento citoplasmático en *E. coli*, en fase soluble. Sin embargo existen otros parámetros que podrían interactuar y ser relevantes a la hora de optimizar el proceso. Un ejemplo de ello es el estudio del medio de cultivo. Debe tenerse en cuenta que el medio de cultivo apropiado para el desarrollo de un inóculo debería ser similar al medio de producción (Calam y Russell, 1973; Galindo y col., 1990). De este modo

el crecimiento de un cultivo en el estado de producción sería una extensión del cultivo de crecimiento previo.

Otro enfoque, es el estudio de los sustratos en los medios de cultivo, tales como las fuentes de carbono. En este caso, distintos autores han observado que la depleción de la mayor fuente de carbono y energía similares a la glucosa dan cambios en distintos parámetros tales como pH y coeficiente respiratorio, los cuales pueden ser cuantificados a través de curvas de crecimiento (Calam, 1969; Buckland, 1984; Georgiou, 1988).

Si bien otros factores podrían ser estudiados, los parámetros analizados mostraron tener importante efecto en la expresión de GST-SLOr.

La metodología de cultivo en matraces agitados en escala pequeña mostró ser un método económico de búsqueda de éstos factores debido a su fácil manejo, reducción de contaminación potencial y posibilidad de efectuar medidas simples para evaluar el crecimiento y producción en un cultivo bacteriano.

## **CAPITULO 5**

# **EXPRESIÓN DE GST-SLOr EN FERMENTADOR. FORMULACIÓN DE PRODUCTO FINAL**

### **5.1.- Introducción**

La tecnología de ADN recombinante para la expresión de proteínas heterólogas en hospedadores microbianos posibilita la producción a gran escala de proteínas bioactivas (Dubey y col., 1992). La *E. coli* es una bacteria bien caracterizada tanto en su genética y fisiología como en su comportamiento en distintos sistemas de cultivo. El uso de *E. coli* para la expresión de proteínas recombinantes permite la obtención de productos con alto rendimiento. A tal fin, se han desarrollado diferentes sistemas de cultivo con el fin de mejorar la acumulación de biomasa y los rendimientos de producción. La fermentación batch es un sistema de productividad limitada y necesita alta concentración inicial de nutrientes. Esto puede ocasionar inhibición del crecimiento bacteriano obteniéndose bajo rendimiento celular y baja concentración de producto. En cambio los cultivos

alimentados o "fed-batch" son una técnica de cultivo de microorganismos eficiente para incrementar la productividad de biomasa y metabolitos. Este tipo de cultivo ha sido empleado en muchos procesos industriales debido a la posibilidad de control en la concentración de nutrientes durante todo el proceso. De este modo se logra un sistema con alta densidad de biomasa en corto período de tiempo.

La tecnología "fed-batch" es útil no sólo para los cultivos de microorganismos que muestran represión catabólica, sino también para alcanzar alta concentración celular, mientras se mantienen las óptimas condiciones de cultivo (Narciandi y col., 1994). Sin embargo, la expresión de genes foráneos impone en algunos casos un límite al metabolismo de la célula hospedadora conduciendo a desbalance metabólico (George y col. 1992). La expresión de un gen heterólogo puede alterar la fisiología de la célula hospedadora, y a su vez ésta puede afectar la estabilidad del producto recombinante (Old y Primrose, 1989). Debido a ello, es necesario incrementar el conocimiento de los sistemas de expresión de recombinantes y su relación con el metabolismo de la célula hospedadora de tal modo de lograr la expresión de genes heterólogos en alta concentración. Con ese fin, podría ser deseable investigar la expresión de genes heterólogos en relación a factores fisiológicos tales como fuente de carbono, nitrógeno, relación carbono/nitrógeno, temperatura y pH. Tales estudios podrían contribuir hacia el desarrollo de bioprocesos que provean rendimientos aceptables de proteína recombinante en biorreactor. Las condiciones de cultivo inciden en la expresión de proteínas recombinantes (Ingraham y col. 1983). Se ha observado que distintas velocidades de crecimiento en *E. coli* previo a la inducción de la expresión de interferón recombinante presenta diferencias (Curless y col. 1990), observándose a altas velocidades de crecimiento bacteriano (en el rango de 0.025 a 0.200 h<sup>-1</sup>) mayor producción de interferón. Estos resultados sugieren que trabajando en sistemas que producen alta concentración celular durante la fase pre-inducción, podría posteriormente inducirse la expresión del gen recombinante, logrando buenos rendimientos.

Otro aspecto importante a considerar es la calidad de la proteína recombinante producida, especialmente para el caso de productos de uso terapéutico. Aunque

en general *E. coli* carece de vías metabólicas para realizar modificaciones post-traduccionales, se han observado algunas modificaciones en determinados residuos, por ejemplo en residuos lisina de ciertas proteínas recombinantes (Ryan y col., 1996). Actualmente no existe un único proceso universal de fermentación que haya sido optimizado para la expresión de todas las proteínas recombinantes en *E. coli*. Esto se debe a que los niveles de expresión de genes heterólogos son altamente dependientes de las características bioquímicas de la proteína recombinante, de los mecanismos de inducción de la expresión génica, de las cepas hospedadoras y de las condiciones de cultivo empleadas en el proceso. El conocimiento de la relación entre las variables tales como fisiología microbiana, sistema hospedador/vector y expresión génica durante la fermentación es esencial para lograr la optimización de la expresión de proteínas recombinantes. El proceso de optimización a menudo involucra el mejoramiento de las condiciones de fermentación, focalizada en la composición del medio de cultivo, las condiciones de crecimiento (Chalmers y col. 1990), la metodología de inducción (Okita y col, 1989), lograr mínima inhibición catabólica (Bauer y col., 1990; Luli y Strohl, 1990; Konstantinov y col., 1991), así como tener conocimiento del sistema genético. Los parámetros de fermentación para lograr óptima expresión de un gen recombinante son frecuentemente determinados empíricamente dado que los efectos combinados de los mismos no son fácilmente predecibles (Bentley y col., 1990).

Una importante aproximación para optimizar la producción de una proteína recombinante en fermentaciones de *E. coli* logrando máxima productividad específica y masa celular simultáneamente, reside en utilizar un método apropiado de inducción (Chen y col., 1992). En determinadas condiciones, la inducción de un cultivo en estado de crecimiento temprano de la fase exponencial presenta alto rendimiento de productividad específica, pero resultados insatisfactorios en productividad volumétrica debido a la baja concentración de masa celular final. Por el contrario, inducción en alta biomasa celular produce baja productividad específica. Por tal motivo el conocimiento de la relación inducción y metabolismo celular en el proceso de fermentación es importante.

El esquema más económico de producción consiste en lograr alta concentración celular en el fermentador junto con altos niveles de expresión del producto. Los medios de producción empleados para la fermentación de *E. coli*, típicamente tienen altas concentraciones iniciales de glucosa, o están suplementados con glucosa durante el cultivo, dado que la misma es una fuente de carbono relativamente barata, obteniéndose con su uso, altas concentración de densidad celular (Rinas y col., 1989; Luli y Strohl, 1990). En contraste los medios de cultivo más utilizados para el "screening" de *E.coli*, tales como LB (Sambrook y col., 1989), no contienen carbohidratos y generalmente no logran alta concentración celular. Una de las complicaciones del uso de glucosa en condiciones aerobias es la oxidación incompleta de la misma, resultando en la acumulación de metabolitos ácidos, particularmente acetato, siendo este fenómeno conocido como "Efecto Crabtree" (Sambrook y col., 1989, Tempest y Neijssel, 1987, Zabriskie y col., 1987). Este efecto lleva a la reducción del crecimiento del cultivo junto con disminución de la expresión de la proteína recombinante (Zabriskie y col., 1987; Rinas y col., 1989; Bauer y col., 1990; Luli y Strohl, 1990; MacDonald y Neway, 1990, Van de Walle y Shiloach, 1998). La posible complicación de la acumulación de acetato en el proceso de fermentación en *E. coli*, impone restricciones en tres factores relacionados: el nivel de concentración inicial de carbohidrato, la capacidad tampón del medio de cultivo y la densidad celular al tiempo de inducción. Además, por ser *E. coli* anaerobio facultativo, es capaz de producir otros metabolitos diferentes al acetato, tales como piruvato, lactato y etanol, que pueden interferir en la expresión del recombinante. Los cultivos crecidos en biorreactores pueden acumular estos metabolitos cada vez que la densidad celular excede la capacidad de aireación del sistema.

El rol de la limitación de nutrientes en el crecimiento de microorganismos y su aplicación en procesos biotecnológicos en especial de las fuentes de fósforo, carbono y nitrógeno en la velocidad de crecimiento ha sido enfatizado (Egli y Zinn, 2003). El óptimo rendimiento de la producción de una proteína recombinante puede ser obtenido por el ajuste de la velocidad de expresión ( $q_p$ ) de acuerdo a la capacidad biosintética de la célula hospedadora, debido a que algunos sistemas

de expresión pueden "saturar" el metabolismo de la célula hospedadora y en consecuencia detener la producción del recombinante.

La incorporación de glucosa en el medio tanto en forma inicial como alimentada, es una alternativa muy usada en la optimización de la expresión de productos recombinantes debido a que potencia el crecimiento y la productividad (Robbins y Taylor, 1989; Li y col; 1990), siendo asociada con el incremento de la velocidad de síntesis específica de ARN m. Por ejemplo, algunos autores (Robbins y Taylor, 1989) han observado que la adición de glucosa al medio LB incrementa el rendimiento celular de 10 g peso seco/L a 38 g peso seco/L, resultando un ahorro del costo de medio por unidad de densidad de crecimiento del 31% junto con mayor productividad comparado con el crecimiento en medio no suplementado con glucosa. Sin embargo se encontró que si la concentración de glucosa en el medio inicial era superior al 1%, el rendimiento aumentaba muy poco, siendo concentraciones superiores al 1% inhibitorias del crecimiento (Li y Taylor, 1994).

En nuestros experimentos la concentración de glucosa se mantuvo aproximadamente constante en 2 g/L, mediante corrección manual cada hora. La elección de la concentración de glucosa se basó en trabajos previos donde se observó mejora en los parámetros de expresión de genes clonados cuando se emplea glucosa a esa concentración en medio LB (Li y Taylor ,1994). A dicha concentración, los efectos inhibitorios de la glucosa por acumulación de acetato, no se producen o son reducidos (Chou y col., 1994).

Entre los procesos biotecnológicos de interés industrial que involucran el cultivo de células microbianas, los procesos aerobios se encuentran en una situación destacada. Los procesos fermentativos que utilizan el cultivo de células aerobias o anaerobias facultativas requieren un adecuado dimensionamiento del sistema de transferencia de oxígeno, contenido en la fase gaseosa (normalmente aire o aire enriquecido con oxígeno) hacia la fase líquida, en donde el microorganismo consumirá este oxígeno para la respiración.

La aireación y la agitación son operaciones que se realizan en el fermentador con el fin de proporcionar oxígeno al cultivo y mantener cierta homogeneidad en los parámetros fisicoquímicos. En el caso de fermentaciones aerobias, el suministro de oxígeno, puede llegar a constituirse en un factor limitante, especialmente en

operaciones a gran escala. El oxígeno es muy poco soluble, de hecho, su concentración en saturación es de  $7 \text{ mg L}^{-1}$  al burbujearse aire atmosférico a 1 atm y  $30^{\circ}\text{C}$ . Su velocidad de dilución es función de los siguientes factores: área de interfase gas-líquido, temperatura, tiempo de contacto, composición del medio de cultivo, densidad y actividad celular, entre otros (Pirt, 1975). En un sistema dado, factores tales como la temperatura están prefijados o son fácilmente controlables con el fin de obtener las condiciones óptimas. Por lo tanto, el área de contacto, tiempo de contacto y la agitación son las variables más importantes en la transferencia de oxígeno (Pirt, 1975).

El suministro de oxígeno en el fermentador, efectuado por la aireación y la agitación del sistema, se irá tornando dificultoso a medida que transcurre el tiempo de cultivo debido a las alteraciones del medio. Existe por tanto dos fenómenos distintos que con frecuencia definen la extensión posible del proceso: Por un lado, la demanda de oxígeno, que obliga a aumentar o disminuir la dilución del oxígeno en el medio según los requerimientos del proceso, y por otra parte, la capacidad de transferencia de oxígeno a la fase líquida en el sistema. La demanda de oxígeno del cultivo estará determinada por la concentración celular, la velocidad específica de crecimiento y el rendimiento de oxígeno, siendo satisfecha por el oxígeno presente en el medio de cultivo que ingresa a la célula. La transferencia de oxígeno está limitada por la velocidad de transporte de la burbuja de aire, que contiene oxígeno, a través del líquido y a través de la célula; siendo importante conocer la capacidad o potencial de transferencia de oxígeno del fermentador, mediante el correcto manejo del diseño y las condiciones de operación del mismo (Phillips y Johnson, 1961).

Junto con la expresión de la proteína recombinante, el procesamiento post-fermentación es otra fase que se requiere estudiar en el desarrollo de un bioproceso. El procesamiento post-fermentación debe ser optimizado, debido a que gran parte de los costos de producción están concentrados en esta fase, correspondiendo entre el 50%-90% de los costos totales (Pratten, 1971; Petrides y col., 1995, Cunha y Aires-Barros, 2002). Esta es un área de interés en el empleo de la tecnología de ADN recombinante. Debido a que a veces la estabilidad de

una proteína recombinante puede ser un problema, se han diseñado sistemas de expresión usando proteínas de fusión con el fin de aumentar la estabilidad de la proteína expresada en *E. coli*. Sin embargo, se ha observado en algunos sistemas de expresión de este tipo, que la expresión del recombinante tiende a manifestarse en cuerpos de inclusión (Williams y col., 1982). En estos casos, el procesamiento post-fermentación requiere el empleo de protocolos de desnaturalización y renaturalización "in vitro" de la proteína, junto con la aplicación de diversos métodos de separación cromatográfica (Marston, 1986, Chen y col., 1995, Petrides y col., 1995).

Con el fin de lograr un protocolo post-fermentación sencillo, en este trabajo se optimizó la expresión del recombinante en forma soluble dentro del citoplasma, evitando la formación de cuerpos de inclusión, durante el proceso de fermentación. A continuación se realizó el procesamiento post-fermentación de modo de lograr un producto final estable y con actividad hemolítica. A tal fin, se trató de tener un protocolo de recuperación del producto mediante centrifugación, sonicación del precipitado celular y purificación por cromatografía de afinidad. La formulación del producto final fue realizada de modo tal de tener un producto estable que conservara las características antigénicas y actividad hemolítica. Para ello se analizaron distintas formulaciones liofilizadas como producto final que fueron evaluadas según reconocimiento antigénico y hemólisis.

La liofilización es un proceso de secado en que el agua se sublima del producto después de éste haberse congelado (Avis, 1976). En particular, este proceso tiene ventajas para el caso de productos biológicos y farmacéuticos, que son relativamente inestables en solución acuosa. De esta manera, se eliminan los efectos térmicos adversos y pueden los productos ser almacenados en estado sólido, ya que en dicho estado ocurren relativamente pocos problemas de estabilidad (Avis, 1976). Otra ventaja es la facilidad de resuspensión de los productos liofilizados, logrando que los mismos se disuelvan con rapidez (Macek, 1963). En el caso particular de productos biológicos que sufren degradación por oxidación, los mismos permanecen más estables porque el proceso de liofilización se realiza al vacío (Macek, 1963). Según Wright (1999), la presentación del

producto en forma de liofilizado tiene ventajas comparada con la presentación en forma solución acuosa. Esto es debido fundamentalmente a que los productos biológicos que son relativamente inestables en solución pueden procesarse y almacenarse con poca o ninguna pérdida de la estabilidad, debido a la eliminación de agua en el proceso de liofilización. Además presenta ventajas en el almacenamiento y transporte de los mismos, ya que no es necesario contar con cadena de frío.

En el caso particular de SLO nativa, la molécula es muy inestable, presentando pérdida de la actividad biológica. Por tal motivo las formulaciones liofilizadas que contienen SLO nativa presentan varios agentes estabilizantes, dando lugar frecuentemente a formulaciones muy complejas. En nuestro trabajo, se analizaron diferentes formulaciones para la proteína GST-SLOr de modo de lograr una formulación sencilla y estable. La misma debe ser adecuada para su posterior uso en inmunoensayos.

### **5.1.1.- Objetivo del trabajo**

El objetivo de esta etapa del trabajo consistió en optimizar la expresión de GST-SLOr intracitoplasmática soluble en fermentador de 3 litros de modo de obtener un protocolo de producción a ese nivel. Particularmente se analizó la influencia de la alimentación con glucosa y la transferencia de oxígeno en el sistema, a pH y temperatura controlada y constante. Luego de ello, un segundo objetivo fue desarrollar un sistema de procesamiento post-fermentación y de formulación del producto final para lograr una formulación sencilla, económica y estable.

## 5.2.- Resultados

### 5.2.1.- Expresión de GST-SLOr en fermentador

#### 5.2.1.1. -Determinación de la velocidad volumétrica de consumo de oxígeno en fermentador

La velocidad volumétrica de consumo de oxígeno ( $k_L a C_L^*$ ) se determinó por el método del sulfito (Wernan y col., 1973). Se llevaron a cabo experimentos con diferentes valores de agitación y velocidades de flujo de aire usando la metodología de superficie de respuesta para hallar un modelo matemático de  $k_L a C_L^*$  en el fermentador (Montgomery, 1991). El  $k_L a C_L^*$  se determinó a 37 °C y con 2.0 L de H<sub>2</sub>O destilada. Se empleó un diseño experimental factorial 2<sup>2</sup> con cuatro puntos axiales ( $\alpha = \pm \sqrt{2}$ ) y cuatro réplicas del punto central totalizando un número de 12 experimentos. La tabla 5.1 resume los valores experimentales de  $k_L a C_L^*$  hallados. De acuerdo con el diseño experimental (Tabla 5.1), el siguiente modelo cuadrático fue determinado usando los valores codificados de los parámetros:

$$y = \beta_0 + \beta_1 X_1 + \beta_2 X_2 + \beta_{11} X_1^2 + \beta_{22} X_2^2 + \beta_{12} X_1 X_2$$

donde Y es el valor predicho de  $k_L a C_L^*$  (mmol/L/h)

$X_1$ = agitación (r.p.m.) en forma codificada

$X_2$ = aireación (v.v.m.) en forma codificada

$$y = 15.50014 + 22.58148X_1 + 6.43198X_2 + 13.12500X_1^2 - 0.87500X_2^2 + 4.00000X_1 X_2$$

Las dos últimas columnas de la tabla 5.2 corresponden a un test de hipótesis para probar la significación de los coeficientes en forma individual.

Los resultados indican que este modelo se ajusta bien a los resultados experimentales dentro del rango considerado de las variables, debido a que el análisis de regresión múltiple dio un  $R^2 = 0.9770$  y  $R = 0.9885$ , lo que indica alto

grado de correlación entre los valores experimentales y los valores predichos por el modelo.

La evaluación estadística del modelo se efectuó mediante el análisis de varianza (ANOVA) (Tabla 5.3) el cual se requirió para testear el efecto de los factores en el modelo propuesto. El estudio de ANOVA mostró que el valor calculado de  $F$  fue mayor que el valor tabulado ( $F_{1,5} = 6.61$ ) con un nivel de probabilidad del 5% para los factores  $\beta_1$ ,  $\beta_2$  y  $\beta_1^2$ , lo que indicó que el efecto de éstos es altamente significativo; sin embargo los valores de  $F$  para los factores  $\beta_2^2$  y  $\beta_{12}$  mostraron que los mismos no son significativos. Los niveles de probabilidad "p" menores al 0.05% mostraron que el efecto del factor agitación, es el más significativo, seguido por la expresión cuadrática del mismo, correspondiendo en tercer lugar al factor flujo de aire.

En la figura 5.1 se representa gráficamente la superficie - respuesta para las condiciones experimentales ensayadas. Se observa un máximo cuyo valor fue de  $k_L a C_L^* = 89.88$  mmol/L/h para el rango experimental analizado, que correspondió a los valores tabulados de 1.5 para la agitación y flujo de aire, 462 r.p.m. y 2.05 v.v.m. respectivamente. Es decir, que el máximo corresponde a los valores mayores de los factores en los intervalos considerados, por lo cual para determinar el máximo real de  $k_L a C_L^*$  del fermentador se debería continuar realizando el estudio en otros rangos de agitación y flujo de aire.

**Tabla 5.1. – Tabla comparativa de valores de  $k_L a C_L^*$  experimentales y calculados.** Los valores experimentales de  $k_L a C_L^*$  fueron obtenidos por el método de sulfito según distintos valores de operación del fermentador correspondientes a un diseño experimental de segundo orden. Los valores de  $k_L a C_L^*$  fueron calculados según el modelo cuadrático  $y = \beta_0 + \beta_1 X_1 + \beta_2 X_2 + \beta_{11} X_1^2 + \beta_{22} X_2^2 + \beta_{12} X_1 X_2$ .

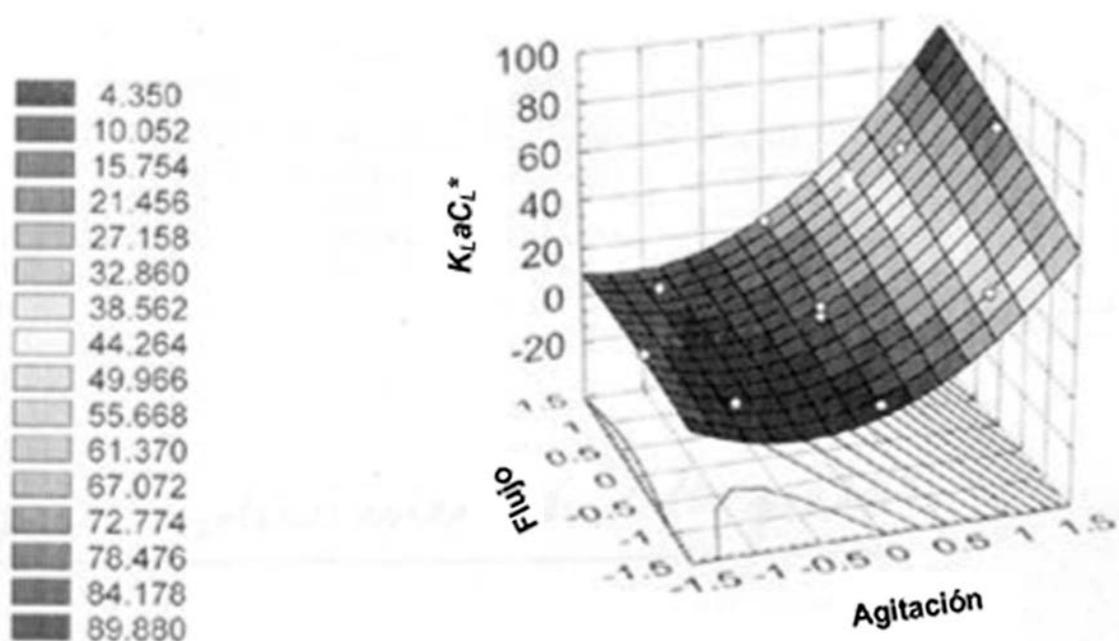
Agitación (r.p.m.)	Aireación (v.v.m.)	$k_L a C_L^*$ (mmol /L/h) experimental	$k_L a C_L^*$ (mmol /L/h) calculado
109	0.418	5.00 +/- 0.08	2.74
392	0.418	35.00 +/- 0.87	39.90
109	1.830	10.00 +/- 0.15	7.60
392	1.830	56.00 +/- 1.87	60.76
250	1.125	12.00 +/- 0.01	15.50
250	1.125	16.00 +/- 0.27	15.50
50	1.125	6.00 +/- 0.10	9.81
450	1.125	80.00 +/- 4.00	73.68
250	0.250	6.00 +/- 3.00	4.65
250	2.000	24.00 +/- 0.61	22.85
250	1.125	17.00 +/- 0.28	15.50
250	1.125	17.00 +/- 0.28	15.50

**Tabla 5.2.- Parámetros estimados para el modelo experimental de segundo orden.** En la tabla se muestra el efecto de los parámetros para el modelo cuadrático  $y = \beta_0 + \beta_1 X_1 + \beta_2 X_2 + \beta_{11} X_1^2 + \beta_{22} X_2^2 + \beta_{12} X_1 X_2$ .

Efecto	Valor del efecto	t(5)	Nivel de probabilidad
$\beta_1$	22.58148	13.56670	.000039
$\beta_2$	6.43198	3.86426	.011829
$\beta_1^2$	13.12500	7.05288	.000886
$\beta_2^2$	-.87500	-.47019	.658013
$\beta_1 \beta_2$	4.00000	1.69929	.150014

**Tabla 5.3.- Análisis de varianza para el modelo de regresión de  $k_L a C_L^*$  del fermentador.** La tabla muestra el ANOVA obtenido a partir de la superficie de respuesta.  $R^2 = 0.9770$ ,  $R = 0.9885$ . ( $R^2$  = Coeficiente de determinación,  $R$  = Coeficiente de correlación de la regresión, NS no significativo al 95 %, S significativo al 95%).

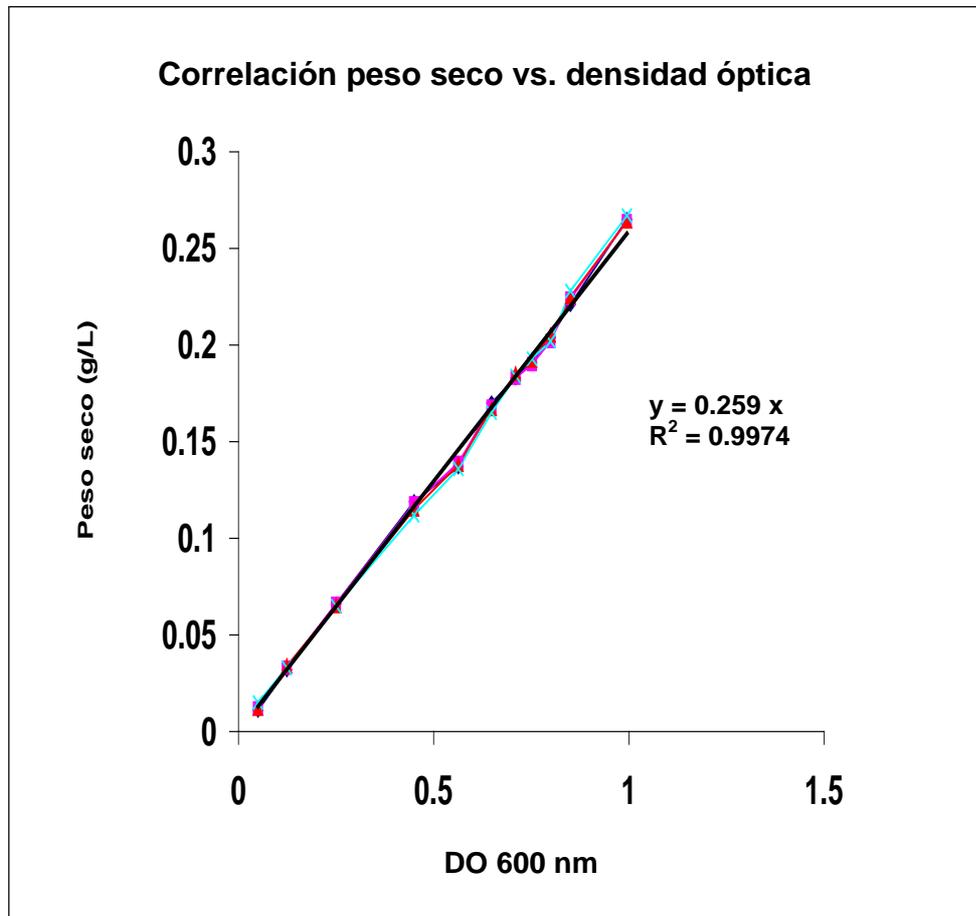
Factor	S. Cuadrados	G. Libertad	M. Cuadrática	F	Nivel significación "p"	
$\beta_1$	4079.384	1	4079.384	184.0555	.000039	S
$\beta_2$	330.963	1	330.963	14.9325	.011829	S
$\beta_1^2$	1102.500	1	1102.500	49.7431	.000886	S
$\beta_2^2$	4.900	1	4.900	.2211	.658013	NS
$\beta_1\beta_2$	64.000	1	64.000	2.8876	.150014	NS
Residual	110.819	5	22.164			



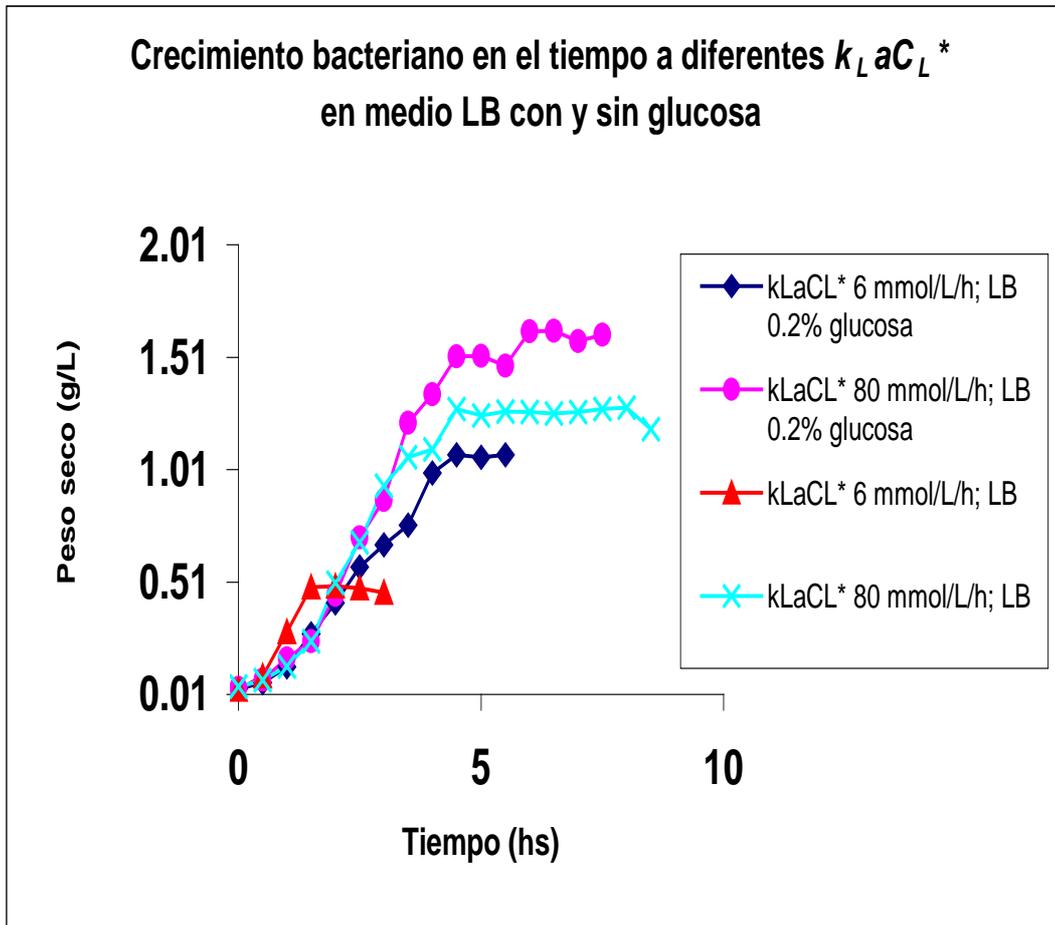
**Figura 5.1.- Superficie de respuesta para valores de  $k_L a C_L^*$ .** Se muestra el gráfico de superficie - respuesta de  $k_L a C_L^*$  del fermentador, obtenido para un volumen de 2 L a 37°C, en función de la agitación (r.p.m.) y el flujo de aireación (v.v.m.). Los valores de agitación y de aireación se hallan codificados según la tabla 2.2.

### 5.2.1.2.- Determinación de la biomasa bacteriana y cinética de crecimiento celular en diferentes condiciones de cultivo

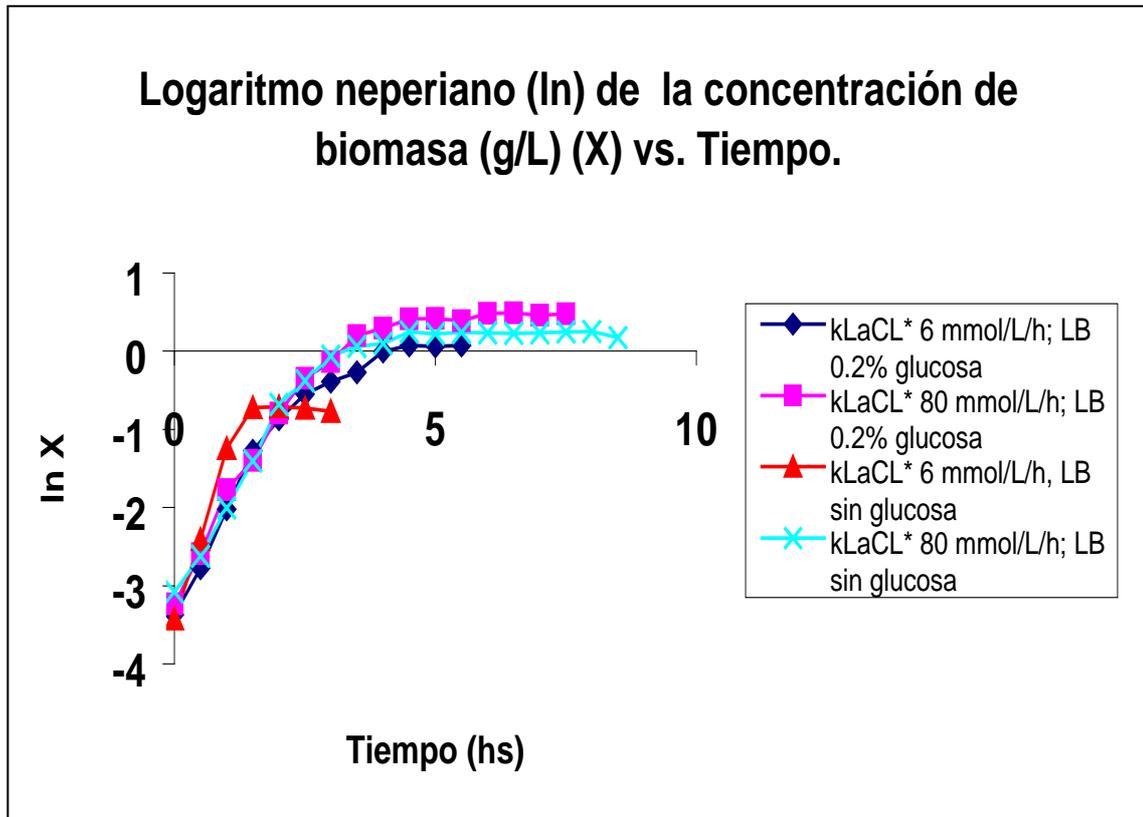
Con el fin de estandarizar las mediciones de crecimiento bacteriano se realizó una curva de calibración y se correlacionaron los valores de DO a 600 nm vs. peso seco (g/L) (Figura 5.2). Los resultados obtenidos mostraron una buena correlación entre la DO 600 nm y el peso seco, con un  $R = 0.9987$  ( $R^2 = 0.9974$ ) para las muestras analizadas en el rango de DO 600nm 0.2 - 0.9. A continuación se efectuaron experiencias controles en donde se analizaron las curvas de crecimiento bacteriano en diferentes condiciones de velocidad volumétrica de consumo de oxígeno ( $k_L a C_L^*$ ) y alimentación de glucosa. En dichas corridas se mantuvo constante la temperatura (37°C) y el pH (7), efectuándose los controles y correcciones manuales cada 1 hora. Con respecto a las corridas que fueron alimentadas con glucosa, la concentración en el fermentador fue controlada cada hora y se mantuvo a niveles de 2 g/L (Figura 5.3). En la figura 5.4 se muestra las curvas de crecimiento bacteriano graficadas como logaritmo neperiano de la concentración celular ( $\ln X$ ) en función del tiempo. Los valores de velocidad máxima específica de crecimiento bacteriano ( $\mu_{max}$ ) y tiempo de duplicación ( $T_d$ ) se observan en la tabla 5.4. Las  $\mu_{max}$  fueron calculadas en la zona lineal de las curvas obtenidas en las experiencias controles correspondientes a la figura 5.4, siendo los valores  $T_d$  calculados a partir de la ecuación  $T_d = \ln 2 / \mu_{max}$ .



**Figura 5.2.- Correlación peso seco (g/L) y DO<sub>600 nm</sub>.** Las determinaciones del crecimiento bacteriano fueron realizadas cada 1 hora por cuadruplicado, tal como se describió en el apartado 2.2.16.



**Figura 5.3.- Curvas de crecimiento bacteriano.** La gráfica muestra las curvas de crecimiento bacteriano según diferentes condiciones de  $k_L aC_L^*$  realizadas en medio LB con y sin alimentación de glucosa. Las corridas fueron efectuadas a temperatura (37°C) y pH constantes (7) a  $k_L aC_L^*$  80 mmol/L/h (450 rpm; 1.125 vvm o 2.5 L/min) y  $k_L aC_L^*$  6 mmol/L/h (250 rpm; 0.25 vvm o 0.5 L/min.). Los controles fueron realizados cada 1 hora y se corrigió manualmente el pH, llevándolo a 7 con HCl 50% y NaOH 20%. En las corridas alimentadas con glucosa, se controló y ajustó los niveles de la misma cada 1 hora a una concentración de 2 g/L.



**Figura 5.4.- Crecimiento bacteriano graficado como logaritmo neperiano (ln) de la biomasa en g/L (X) vs. tiempo.** El cálculo de la velocidad máxima específica de crecimiento ( $\mu_{max}$ ) se realizó en la porción lineal de cada curva mediante el cálculo de la pendiente.

**Tabla 5.4.- Valores obtenidos de  $\mu_{max}$  y  $T_d$  para las corridas controles en las condiciones de cultivo descritas.** Los valores de las pendientes ( $\mu_{max}$ ) fueron calculadas en la zona lineal de cada una de las curvas representadas en la figura 5.4.- Los valores  $T_d$  fueron calculados a partir de la ecuación  $T_d = \ln 2 / \mu_{max}$ .

Condiciones de cultivo	$\mu_{max}$ (1/h)	$T_d$ (min.)
$k_L a C_L$ * 6 mmol/L/h; LB sin glucosa	1.854	22.43
$k_L a C_L$ * 6 mmol/L/h; LB 0.2% glucosa	1.298	32.04
$k_L a C_L$ * 80 mmol/L/h, sin glucosa	1.205	34.52
$k_L a C_L$ * 80 mmol/L/h, 0.2% glucosa	1.155	36.00

### 5.2.1.3.- Evaluación de los parámetros $k_LaC_L^*$ y alimentación con glucosa en la producción de GST-SLOr

Se realizaron las experiencias induciendo la expresión de GST-SLOr en fermentador de 3 litros, con un volumen real de trabajo de 2 litros. Los parámetros a analizar fueron la influencia en la expresión de GST-SLOr de  $k_LaC_L^*$  y alimentación con glucosa. Las experiencias controles fueron realizadas sin duplicados y las experiencias con inducción fueron realizadas con duplicados independientes. Para el caso de la experiencia que presentó mayor producción de GST-SLOr intracitoplasmática en fase soluble, se efectuó una tercer corrida. El tratamiento estadístico se basó en un diseño de experimentos  $2^3$  completo. El mismo se efectuó con los promedios de producción de la proteína recombinante, para el caso de las corridas con duplicados y triplicados.

La figura 5.5. muestra los resultados obtenidos de producción de la proteína recombinante para las diferentes condiciones de fermentación. Se observó que la mayor producción de GST-SLOr se obtuvo cuando se realizó la fermentación en dos fases: una fase de crecimiento (FC) a  $k_LaC_L^*$  80 mmol/L/h y fase de inducción (FI) a  $k_LaC_L^*$  6 mmol/L/h; manteniéndose constantes el pH ( $\cong$  7) y la temperatura (37°C). Es de destacar que la alimentación de glucosa al sistema (hasta un valor de 2g/L) produjo un incremento aproximado en la producción de GST-SLOr de 5 veces respecto de las experiencias en similares condiciones sin alimentación de glucosa en FI. En éstas se obtuvieron valores promedio de 3.10 mg/L de GST-SLOr para las experiencias en FC con  $k_LaC_L^*$  80 mmol/L/h, FI con  $k_LaC_L^*$  6 mmol/L/h, sin alimentación de glucosa en FI, y 15.96 mg/L de GST-SLOr para las experiencias en idénticas condiciones pero con alimentación de glucosa en todo el proceso de fermentación.

En tabla 5.5 se detallan los resultados obtenidos para las experiencias que presentaron mayor producción de GST-SLOr. Estas experiencias correspondieron a aquellas cuyo  $k_LaC_L^*$  fue de 80 mmol/L/h en FC y 6 mmol/L/h en FI. En éstas, se logró un incremento promedio de la expresión de GST-SLOr, comparada con los controles sin inducir, del 97.56% y 98.20% para las experiencias con alimentación de glucosa en todo el proceso y con alimentación de glucosa sólo en FC respectivamente. Respecto a los valores promedios de coeficiente de

producción del recombinante por biomasa ( $y_{p/x}$ ) y productividad específica ( $q_p$ ), se obtuvieron incrementos del 423% y 498% respectivamente para las experiencias con alimentación de glucosa en todo el proceso comparada con las experiencias sin suministro de glucosa en FI. La productividad volumétrica global del proceso ( $Q_p$ ) promedio fue de 519 % superior para las corridas con alimentación de glucosa en todo el proceso respecto a las corridas sin alimentación de glucosa en FI.

Para el resto de las corridas efectuadas, los resultados mostraron que a  $k_L a C_L^* 80$  mmol/L/h tanto con glucosa como sin glucosa, se obtuvieron valores promedio de producción de GST-SLOr de 0.22 mg/L y 0.27 mg/L respectivamente, con expresión de la proteína recombinante del 100.00% en las experiencias inducidas respecto a los controles sin inducir.

En las fermentaciones a  $k_L a C_L^* 6$  mmol/L/h los valores promedios de producción de GST-SLOr fueron de 0.57 mg/L y 1.32 mg/L para las experiencias con glucosa y sin glucosa respectivamente. El porcentaje promedio de inducción de la expresión de GST-SLOr frente a los controles sin inducir, fue de 89.47% para las corridas con alimentación de glucosa y 36.12% para las corridas sin alimentación de glucosa.

Respecto a la calidad del recombinante expresado en aquellas corridas con mejor productividad, se observó que en las distintas eluciones obtenidas en la cromatografía de afinidad, purificó una banda única cercana a los 80 KDa, que correspondió a GST-SLOr. Además no se observó degradación ni expresión de GST sola (Figura 5.6).

El tratamiento estadístico de la incidencia de los parámetros o factores  $k_L a C_L^*$ , alimentación de glucosa e inducción, en la producción de GST-SLOr, fue realizado en base al estudio de contrastes e interacciones para dichos parámetros y se encuentra en el anexo estadístico adjunto. Los resultados mostraron que cuando se analizaron los factores  $k_L a C_L^*$  en FC (6 mmol/L/h u 80 mmol/L/h), presencia de glucosa en FC, e inducción con 0.01 mM de IPTG (ver cuadro de contrastes en página 197); el factor más significativo, en cuanto a su efecto principal, es la inducción. Sin embargo, la interacción de los otros dos factores

( $k_L a C_L^*$  y presencia de glucosa en FC) es la de mayor importancia, siendo todos los efectos principales (inducción,  $k_L a C_L^*$  en FC y glucosa en FC), y sus interacciones positivos.

Cuando los factores analizadas fueron  $k_L a C_L^*$  en FI (6 mmol/L/h u 80 mmol/L/h), presencia de glucosa en FC, e inducción (ver cuadro de contrastes en página 198);  $k_L a C_L^*$  en FI como factor principal es negativo; es decir, que es necesario tomar el valor más bajo de  $k_L a C_L^*$  durante la FI para lograr mayor expresión de GST-SLOr. A su vez, todas sus interacciones son también negativas, siendo la interacción con la inducción la más importante. Además existe interacción entre el factor presencia de glucosa en FC e inducción en forma positiva. Esto significa que la presencia de glucosa en FC es necesaria, junto con la inducción, para lograr buena expresión de la proteína recombinante.

En el análisis estadístico de los factores  $k_L a C_L^*$  en FC (6 mmol/L/h u 80 mmol/L/h), presencia de glucosa en FI, e inducción (ver cuadro de contrastes en página 200), se observó que los factores más importantes son la inducción y  $k_L a C_L^*$  en FC, en alta (80 mmol/L/h), así como la interacción entre ambos; siendo además todos los contrastes y sus interacciones positivas.

En el caso de los factores  $k_L a C_L^*$  en FI (6 mmol/L/h u 80 mmol/L/h), presencia de glucosa en FI, e inducción (ver cuadro de contrastes en página 201), los resultados mostraron que  $k_L a C_L^*$  en FI es el factor más importante y tiene además efecto negativo. Esto significa que es conveniente trabajar con  $k_L a C_L^*$  durante la FI, en nivel bajo (6 mmol/L/h) para lograr mejor expresión de GST-SLOr. También es importante el factor inducción con efecto positivo, así como su interacción con el factor  $k_L a C_L^*$  en FI. La presencia de glucosa durante la FI tiene un efecto más importante por su interacción con la inducción que por su efecto principal, el cual es positivo.

Producción de GST-SLOr en diferentes condiciones de fermentación

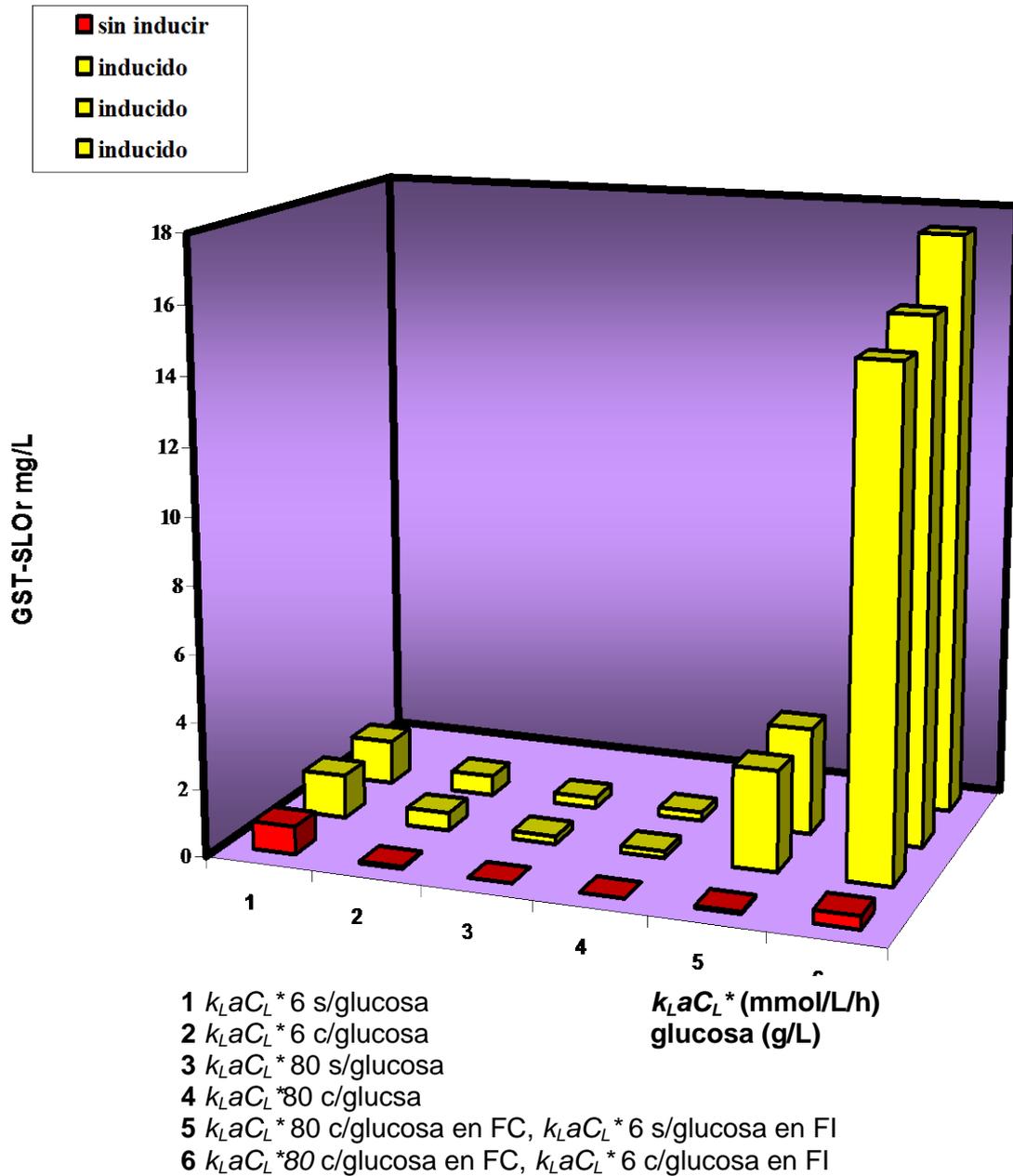
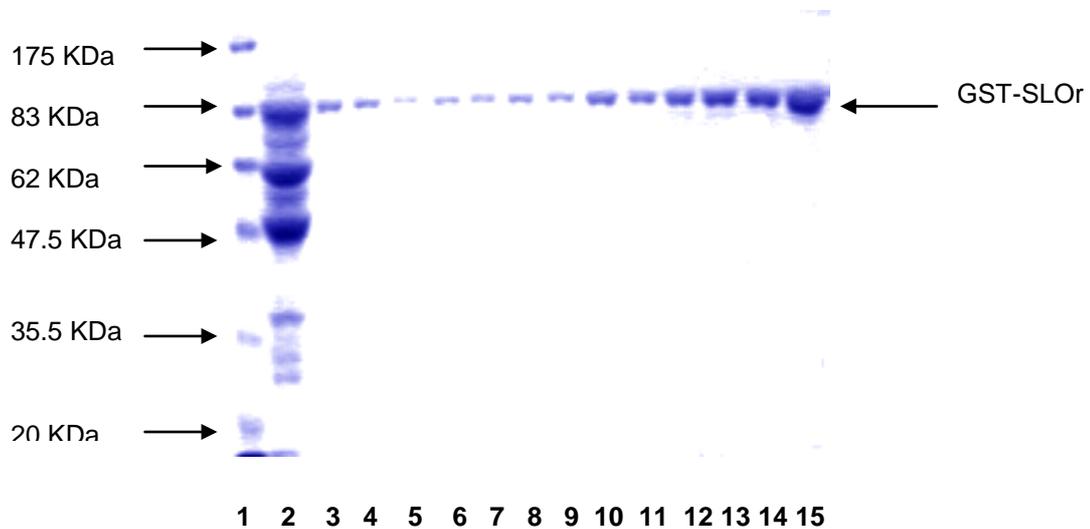


Figura 5.5.- Representación gráfica de la producción de GST-SLOr para diferentes condiciones de fermentación de  $K_L a C_L^*$  y glucosa. La proteína fue purificada por cromatografía de afinidad a partir de fase soluble citoplasmática de un concentrado bacteriano tal como se describió en materiales y métodos. La cuantificación proteica fue efectuada por técnica del ácido bicinónico.

**Tabla 5.5.- Resultados de las corridas con mejor producción de GST-SLOr.** En la tabla se muestran los resultados referentes a producción de las mejores corridas en fermentador a escala preparativa.

	<b>Corridas <math>k_L a C_L</math> * 80 mmol/L/h en FC; <math>k_L a C_L</math> * 6 mmol/L/h en FI</b>	
	<b>Con glucosa en FC+FI</b>	<b>Con glucosa en FC; sin glucosa en FI</b>
Inducción de GST-SLOr respecto al control sin inducir	97.56%	98.20%
Producción de GST-SLOr	15.96 mg/mL	3.10 mg/mL
$y_{(p/x)}$	$1.33 \times 10^{-2}$ g/g	$3.12 \times 10^{-3}$ g/g
$q_{(p)}$	$1.90 \times 10^{-3}$ g.(gh) <sup>-1</sup>	$3.82 \times 10^{-4}$ g.(gh) <sup>-1</sup>
$Q_{(p)}$	$2.30 \times 10^{-3}$ g.(Lh) <sup>-1</sup>	$4.43 \times 10^{-4}$ g.(Lh) <sup>-1</sup>



**Figura 5.6.- Análisis del eluido obtenido por cromatografía de afinidad.** Luego de la fermentación, las células fueron recuperadas y purificadas tal como se describió en el apartado 2.2.11.1. Las eluciones obtenidas luego de la cromatografía fueron analizadas por SDS-PAGE 10%. Carril 1: 5  $\mu$ L marcador de peso molecular (175-83-62-47.5-32.5-20 KDa), Carril 2: 10 $\mu$ L sobrenadante post-sonicado previo a la incubación con glutatión sefarosa, Carril 3-15: 10 $\mu$ L/carril de las sucesivas fracciones de elución de la proteína recombinante.

### 5.2.2.- Estudio de formulación del producto final

Luego de la purificación de la proteína recombinante, se procedió al estudio de los diferentes preparaciones descriptos en el apartado 2.2.19. Los mismos fueron analizados según presencia o ausencia de precipitado, reconocimiento antigénico por anticuerpos anti-SLO y actividad hemolítica.

Los resultados respecto a la presencia o ausencia de precipitado en las distintas preparaciones, indicaron que aquellas que contenían cisteína 0.48% o glicina 1M, tenían presencia de precipitado luego de su resuspensión y centrifugación (Tabla 5.6).

El análisis de reconocimiento antigénico por inmunoblot mostró que todas las formulaciones fueron reconocidas por anticuerpos anti-SLO humano. Sin embargo

en las formulaciones que presentaron BSA 1 mg/mL, BSA 1 mg/mL+cisteína 0.48% y sacarosa 1 mg/mL+cisteína 0.48%, codificadas como *B*, *D* y *G* respectivamente, tuvieron degradación antigénica (Figura 5.7).

Respecto a la actividad hemolítica en eritrocitos de carnero, todas las preparaciones, a excepción de los preparados *B*, *D* y *G*, presentaron actividad hemolítica. Sin embargo se observó que la preparación que contenía 10 mg/mL de sacarosa (preparación *J*) fue la que presentó mayor actividad hemolítica luego de reconstituída y conservada a 4° C durante 7 días (Tablas 5.7 y 5.8).

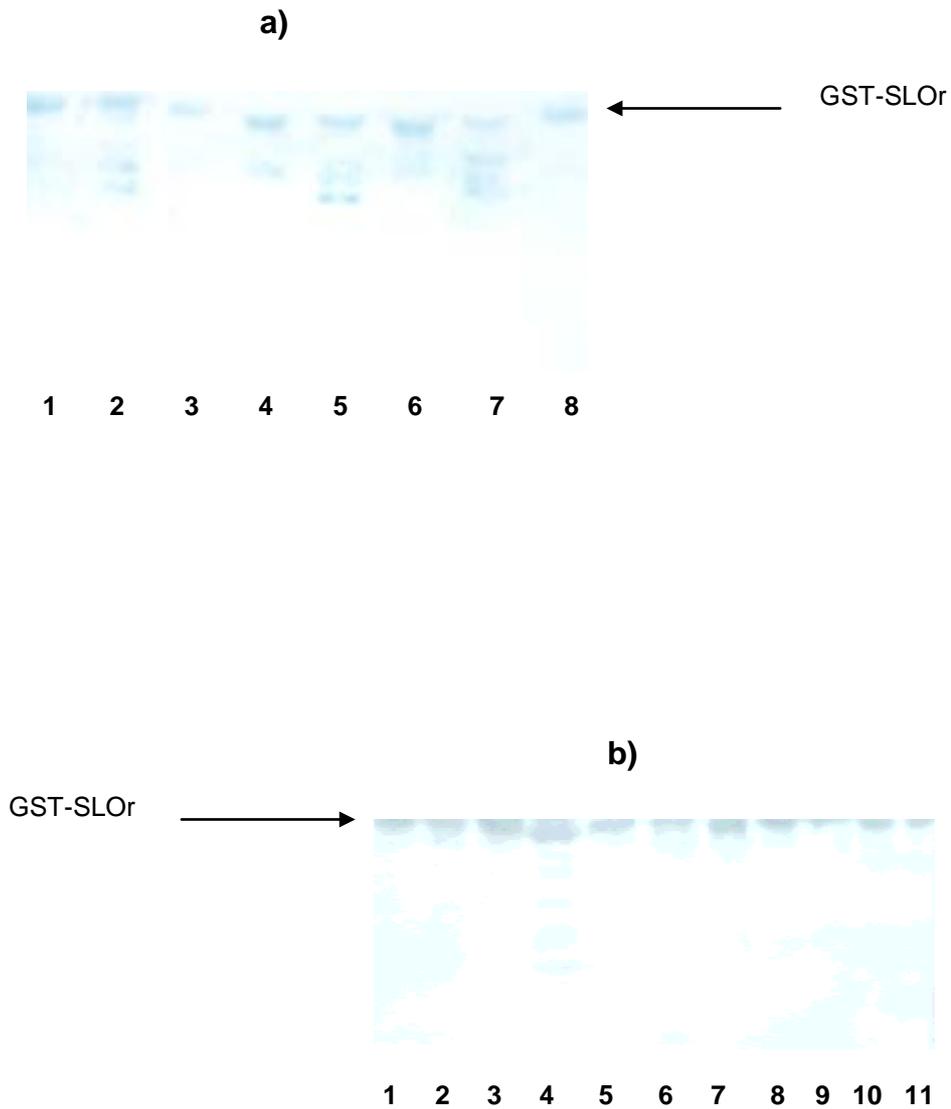
Se realizó el análisis estadístico de los factores analizados en los distintos preparados tal como se describió en el apartado 2.2.19.1. El mismo estuvo basado en los títulos de actividad hemolítica obtenidos luego de reconstituidos los preparados y conservados durante 7 días a 4° C.

Según los resultados estadísticos obtenidos a partir de un diseño experimental 2<sup>3</sup> completo replicado (Montgomery, 1991), analizado para los factores: BSA, sacarosa y cisteína, mostraron que el efecto de la sacarosa es significativo incluso al 1% ( $p = 0.01$ ), mientras que el efecto de la cisteína lo es sólo al 5% ( $p = 0.05$ ). Además el efecto del factor BSA no es significativo cuando se toma como único factor. Sin embargo la interacción con sacarosa es muy significativa, inclusive en mayor grado que la interacción de los factores cisteína con sacarosa (ver cuadro de ANOVA y valores tabulados en página 203).

Para estudiar el efecto de los factores sacarosa y glicina, se realizó un ANOVA empleando el modelo bifactorial de efectos fijos (Montgomery, 1991). Este análisis mostró que la presencia de sacarosa en la preparación es significativa tanto al 5% como al 1%, mientras que la presencia de glicina en la preparación no lo es. Sin embargo se advirtió la existencia de interacción entre ambos factores, que resultó ser significativa al 5% y al 1% (ver cuadro estadístico y valores tabulados en página 205).

**Tabla 5.6.- Observación de precipitado en los diferentes preparados luego de su resuspensión.** Las diferentes preparaciones conteniendo 0.5 mg/mL de GST-SLOr fueron resuspendidas en 1 mL de PBS 1x quedando a una concentración salina final de 0.28 M NaCl, 0.0054 M KCl, 0.0162 M Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 0.0030 M KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (PBS 2x pH 7.2). Luego de resuspendidas, las mismas fueron centrifugadas a 10.000 g por 5 minutos, observándose presencia o ausencia de precipitado. La composición de los preparados y sus respectivos códigos están descriptos en la tabla 2.4.

Preparaciones (código)	Presencia de precipitado en la muestra
<i>A</i>	No
<i>B</i>	No
<i>C</i>	No
<i>D</i>	Si
<i>E</i>	Si
<i>F</i>	Si
<i>G</i>	Si
<i>H</i>	No
<i>I</i>	No
<i>J</i>	No
<i>K</i>	No
<i>L</i>	Si
<i>M</i>	No
<i>N</i>	Si
<i>Ñ</i>	No
<i>O</i>	Si
<i>P</i>	No
<i>Q</i>	Si



**Figura 5.7.- Análisis por inmunoblots de las distintas preparaciones.** Muestras de 10 $\mu$ L de las distintas preparaciones (ver el código en la tabla 2.4, página 45) fueron corridas en SDS-PAGE 10% y posteriormente transferidas a nitrocelulosa. A continuación las muestras fueron bloqueadas e incubadas con suero anti-SLO humano 1/500. Luego, se incubaron con conjugado anti-gamma humano a fosfatasa alcalina 1/1000, y se revelaron usando el sistema BCIP-NTB en tampón carbonato. **a)**: Carril 1: Muestra sin liofilizar (S/L). Carril 2: B. Carril 3: C. Carril 4: A. Carril 5: D. Carril 6: E. Carril 7: G. Carril 8: F. **b)**: Carril 1: H. Carril 2: I. Carril 3: J. Carril 4: K. Carril 5: L. Carril 6: M. Carril 7: N. Carril 8: Ñ. Carril 9: O. Carril 10: P. Carril 11: Q.

**Tabla 5.7.- Actividad hemolítica de los distintos preparados.** La tabla muestra los resultados de actividad hemolítica de los diferentes preparados (codificados según la tabla 2.4) analizados después de 7 días de reconstituídos e incubados a 4 °C. Las determinaciones fueron efectuadas por duplicado. El título de la actividad hemolítica correspondió con la inversa de la media de la mayor dilución que presentó hemólisis total. La técnica tiene un error de +/- una dilución.

<b>Preparaciones codificadas</b>	<b>Título de hemólisis total</b>
<i>A</i>	200
<i>B</i>	<200
<i>C</i>	1200
<i>D</i>	<200
<i>E</i>	300
<i>F</i>	200
<i>G</i>	<200
<i>H</i>	400
<i>I</i>	800
<i>J</i>	2400
<i>K</i>	300
<i>L</i>	800
<i>M</i>	1600
<i>N</i>	1200
<i>Ñ</i>	200
<i>O</i>	400
<i>P</i>	400
<i>Q</i>	1200

**Tabla 5.8.- Estabilidad de la preparación J.** La preparación J fue resuspendida y se estudió la actividad hemolítica en: el momento de su reconstitución (T=0); luego de 2 horas de reconstituída y almacenada a temperatura ambiente (T= 2 hs.); a los 5 días y 7 días almacenada a 4 °C (T= 5 días y T= 7 días); luego de almacenada 2 meses a –20 °C (T= 2meses) y luego de almacenada 6 meses a –80 °C (T= 6 meses). El título de actividad hemolítica correspondió con la inversa de la mayor dilución que presentó hemólisis total. El error de la técnica es +/- 1 dilución.

Condiciones post-reconstitución	Preparación J	GST-SLOr S/L <sup>#</sup>
T=0	4096	32768
T= 2hs*	4096	32768
T= 5 días*	4096	8192
T= 7 días*	1024	1024
T= 2 meses**	4096	16384
T= 6 meses***	4096	16384

- <sup>#</sup> S/L = sin liofilizar
- \* almacenado a 4 °C
- \*\* almacenado a –20°C
- \*\*\* almacenado a – 80°C

## 5.3.- Discusión

### 5.3.1.- Expresión de GST-SLOr

En este capítulo se abordó el rol de los factores  $k_L a C_L^*$  y alimentación con glucosa en el mejoramiento de la producción de GST-SLOr en fermentador; así como el estudio de la formulación del producto final.

Para ello se efectuaron diferentes corridas en fermentador evaluando la producción de GST-SLOr en distintas condiciones de  $k_L a C_L^*$  y alimentación de

glucosa al sistema. Las corridas fueron realizadas a baja o alta  $k_L a C_L^*$  durante todo el proceso, 6 mmol/L/h y 80 mmol/L/h respectivamente; o bien a alta  $k_L a C_L^*$  en FC y baja  $k_L a C_L$  en FI. En las experiencias en donde todo el proceso o sólo la FC fue con  $k_L a C_L^*$  de 80 mmol/L/h se buscó estimular el crecimiento bacteriano, sin ocasionar alteraciones en el sistema de fermentación, tales como la formación de turbulencias que pudieran causar daño a las células. En las experiencias donde se realizó todo el proceso o la Fi a  $k_L a C_L^*$  de 6 mmol/L/h, la elección de este valor fue basado en los resultados de los experimentos en matraces de 100 mL, en donde se observó que la expresión de GST-SLOr en fase soluble en el citoplasma de *E. coli* mejoró cuando se trabajó con alto porcentaje de medio de cultivo respecto al volumen total del matraz. Además el suministro de glucosa a una concentración final de 2 g/L fue efectuado durante todo el proceso o sólo durante FC con el objetivo de alimentar el sistema con una fuente de carbohidrato ya que se verificó que el medio LB no contiene glucosa, evitando el efecto Cabtree. Los resultados mostraron que las condiciones en donde se obtuvo mayor producción de GST-SLOr fueron aquellas donde  $k_L a C_L^*$  durante la FC se mantuvo en un valor de 80 mmol/L/h y 6 mmol/L/h en FI, junto con suministro de glucosa durante todo el período de fermentación. En estas experiencias se obtuvo un promedio de producción de GST-SLOr de 16 mg/L de cultivo. Estos resultados sugieren, tal como se observó previamente en matraces que la expresión de GST-SLOr intracitoplasmática en forma soluble fue mejorada las condiciones de aireación disminuyen.

Si bien existe poca documentación de como la limitación de oxígeno puede influir en los niveles de expresión en *E. coli* excepto para el caso de los promotores regulados por oxígeno (Khosla y col., 1990; Oxeer y col., 1991); una hipótesis que podría explicar este hecho sería que al favorecerse el metabolismo anaerobio éste influiría en la expresión génica de algunas proteínas recombinantes por afectar la síntesis proteica de otros procesos celulares. Nuestros resultados mostraron que la producción de GST-SLOr mejora cuando se realiza la FI a baja  $k_L a C_L^*$  y el sistema es alimentado con glucosa durante todo el proceso. En estas condiciones de cultivo la producción de proteína recombinante aumentó aproximadamente 515% respecto a las experiencias efectuadas en similares condiciones de  $k_L a C_L^*$  sin alimentación de glucosa durante FI.

Para determinar la influencia de los parámetros o factores analizados en la expresión de GST-SLOr, se llevó a cabo un análisis estadístico  $2^3$  completo mediante el estudio de los contrastes e interacciones de los mismos. El análisis mostró que cuando se analizaron los factores  $k_L a C_L^*$  en FC, suministro de glucosa en FC e inducción, el factor más importante es la inducción, tanto en su efecto principal como en sus interacciones; siendo la interacción más relevante con el suministro de glucosa en FC. Es de destacar que los efectos principales y sus interacciones son positivos. Sin embargo cuando los factores analizados fueron  $k_L a C_L^*$  en FI, glucosa en FC e inducción, se observó que  $k_L a C_L^*$  en FI, como factor principal es negativo, es decir que para lograr una expresión optimizada de GST-SLOr es necesario tomar el valor más bajo de los valores de  $k_L a C_L^*$ . A su vez todas sus interacciones también son negativas, siendo la más importante la interacción con la inducción. Concomitantemente se observó que el suministro de glucosa en FC e inducción interactúan en forma positiva. Para el conjunto de los factores analizadas estadísticamente,  $k_L a C_L^*$  en FC, glucosa en FI e inducción, los resultados evidenciaron que los factores con mayor incidencia en la expresión de GST-SLOr son la inducción y  $k_L a C_L^*$  80 mmol/L/h en FC, así como la interacción entre ambos; destacándose que las mismas son positivas. Para caso de los factores  $K_L a C_L^*$  en FI, glucosa en FI e inducción, el análisis mostró que el factor  $K_L a C_L^*$  en FI es el factor más importante y tiene efecto negativo. Además el factor inducción es importante, con efecto positivo, teniendo la interacción entre ambos efecto negativo. La glucosa en FI es un factor importante por su interacción con la inducción, más que por su efecto principal, el cual es positivo.

El análisis estadístico de la incidencia de los factores en la optimización de la expresión de GST-SLOr permite concluir que: Es importante realizar la fermentación a  $k_L a C_L^*$  80 mmol/L/h en FC y 6 mmol/L/h en FI, indicado estadísticamente por un efecto principal positivo en FC y negativo en FI. En el caso del factor glucosa, su mayor aporte es a través de las interacciones con  $k_L a C_L^*$  e inducción. Para el caso de la inducción, se verificó estadísticamente su importancia a nivel biológico para la expresión de GST-SLOr. Este esquema de fermentación fue de hecho el que presentó mayor expresión de GST-SLOr.

Cuando se compararon similares experiencias en fermentador con y sin suministro de glucosa en FI, los resultados mostraron que el aporte de glucosa al interactuar con  $k_L a C_L^*$  durante FI, potenció la expresión de GST-SLOr. Los rendimientos de producto obtenido sobre la base de biomasa producida, así como las productividades específicas, evidenciaron que el aumento de productividad de GST-SLOr no fue debido simplemente al aumento en la biomasa celular en las experiencias en donde se alimentó el sistema con glucosa durante todo el proceso. Los valores promedios de los rendimientos, productividad específica y productividad volumétrica registraron aumentos de 426%, 497% y 519% respectivamente, respecto a las experiencias donde se alimentó con glucosa en todo el proceso, de las corridas con alimentación con glucosa sólo en FI; corroborando la influencia de la interacción de glucosa-inducción- $k_L a C_L^*$ .

Debido que el rendimiento volumétrico del producto recombinante depende de la concentración de biomasa y del rendimiento específico de producto celular, es de vital importancia conocer las características particulares del sistema hospedador-vector. Diferentes autores han informado distintas correlaciones entre formación específica de producto y  $\mu$  en cultivos de *E. coli* recombinante. Siegel y Ryu (1985) y Curless y col (1990), observaron incremento en la expresión de producto recombinante (proteína trpA 1, e interferón  $\alpha$  consenso IFN- $\alpha$ Con<sub>1</sub>), cuando se incrementaron los valores de  $\mu$  en la fase de pre-inducción. Sin embargo, Seo y Bailey (1985) demostraron una declinación en la concentración de proteína recombinante  $\beta$ -lactamasa cuando  $\mu$  fue incrementada por cambio en la composición del medio en cultivos en lote de *E. coli* HB101. Asimismo Riesenberg y col. (1990) reportaron que el nivel celular de interferón humano  $\alpha$ 1 fue superior a menor velocidad de crecimiento en estudios en cultivos continuos alimentados con glucosa. Por otro lado, varios grupos (Zabriskie y col., 1987; Bech y Carlsen, 1990) no observaron correlación entre  $\mu$  y formación específica de producto recombinante; encontrándose que la relación depende de las características del sistema recombinante en particular, tales como sistema promotor, interacción vector-hospedador, toxicidad del producto recombinante, etc.

La dependencia de la formación de producto recombinante de acuerdo a  $\mu$  específica en pre-inducción, es un factor directamente relacionado con la elección

del método de control de la alimentación del medio pre-inducción. De este modo si  $\mu$  en pre-inducción influye críticamente en el rendimiento volumétrico específico del producto recombinante, la velocidad de crecimiento celular debería estar regulada durante la FC. En nuestro sistema se trabajó en dos fases independientes: FC focalizada a la obtención de biomasa y FI en donde se indujo la expresión de GST-SLOr. Los resultados de nuestros experimentos sugieren que existiría correlación específica entre  $\mu$  y la formación del producto recombinante; sugiriendo que la estrategia de alimentación del medio en pre-inducción es un factor a tener en cuenta en la regulación de la expresión de GST-SLOr.

### **5.3.2.- Estudio de formulación del producto final**

Además de las condiciones de fermentación para optimizar la expresión de un producto recombinante, en el proceso de producción deben ser tenidas en cuenta otras variables y condiciones de trabajo. De hecho, uno de los factores más importantes en el proceso “downstream” luego de la fermentación, es la formulación del producto final, forma de presentación, uso y almacenaje del mismo.

La evaluación del producto terminado liofilizado se realizó por SDS-PAGE para determinar si el preparado presentó degradación; inmunoblot, para evaluar reconocimiento antigénico en suero humano anti-SLO y hemólisis en eritrocitos de carnero para titular actividad hemolítica. Además se evaluó la estabilidad del preparado liofilizado con 10 mg/mL de sacarosa luego de reconstituido por ensayos de hemólisis, considerando los títulos de hemólisis total. La elección de la formulación se tomó en cuenta sobre la base de la estabilidad del preparado al ser reconstituido y luego de almacenado 7 días a 4°C. La razón de seleccionar una preparación de acuerdo a su actividad hemolítica es que dicha actividad indicaría que la GST-SLOr luego de liofilizada no experimentó degradación y

conservó el reconocimiento antigénico, condición necesaria para tener actividad hemolítica.

Los resultados de nuestros experimentos mostraron que todas las preparaciones, excepto las preparaciones *B*, *D* y *G* conservaron actividad hemolítica. Sin embargo, aquellas formulaciones que no presentaron actividad hemolítica mostraron degradación antigénica. Estas formulaciones contenían como excipientes BSA (formulación *B*), BSA y cisteína (formulación *D*), y sacarosa y cisteína (formulación *G*), indicando que la presencia de BSA y cisteína no produjo en las mismas efecto estabilizante. Por otro lado, los resultados de los ensayos de inmunoblots mostraron que todas las formulaciones fueron reconocidas por anticuerpos anti-SLO humano. Es de destacar que posiblemente la fusión con GST produce algún tipo de efecto estabilizante debido a que la mayor parte de las formulaciones conservaron la actividad hemolítica, incluso en aquellos preparados que no recibieron ningún tipo de aditivos en su formulación. Los resultados de actividad hemolítica luego de 7 días de reconstituido el liofilizado, sugieren que la formulación *J* fue la formulación más sencilla que presentó actividad hemolítica y estabilidad. Esta preparación contiene como excipiente sacarosa a una concentración de 10 mg/mL, siendo la mayor concentración estudiada en nuestros experimentos para el caso de la sacarosa. Los resultados obtenidos indican que la presencia de sacarosa a esa concentración produce un mayor efecto estabilizante en la molécula de GST-SLOr en relación a otras formulaciones. Si bien se registró un descenso del título de hemólisis luego del proceso de liofilización, respecto al control sin liofilizar, y posterior caída de la actividad hemolítica entre los días 5 y 7 post-reconstitución, se observó que la formulación *J* tuvo un comportamiento más estable durante el período evaluado que la proteína sin liofilizar. Si bien estos resultados indican que el agregado de sacarosa influyó positivamente en la estabilidad del producto, otras formulaciones conteniendo sacarosa en diferentes concentraciones en combinación con BSA o glicina también tuvieron reconocimiento antigénico y actividad hemolítica con títulos similares a los obtenidos para la formulación *J*. Sin embargo, se optó por trabajar con dicha formulación debido a que fue la formulación más sencilla y económica en la cual se lograron los mejores resultados.

En suma, respecto a los objetivos planteados en este trabajo se logró obtener un protocolo de producción de GST-SLOr citoplásmica en fase soluble en fermentador de 3 litros mejorando la producción por medio de ajustar las condiciones de  $k_L a C_L^*$  y alimentación de glucosa en el sistema. Se logró además una formulación del producto para su presentación final sencilla y económica.

## CAPITULO 6

# ASPECTOS ECONÓMICOS

### 6.1.- Consideraciones generales

#### 6.1.1.- Generalidades de la economía de los procesos de fermentación a nivel industrial

La evaluación económica de un proceso productivo permite identificar las etapas de mayor influencia en el mismo y seleccionar las variables de mayor incidencia que pueden ser optimizadas. En el caso particular de los sistemas de fermentación para producción de un determinado producto comercial, se deben tener en cuenta objetivos básicos que son comúnmente empleados para el desarrollo de un proceso rentable:

- 1) Capital de inversión en el fermentador y equipamiento auxiliar suficiente versátil para ser usado en diferentes procesos de fermentación.
- 2) Materias primas económicas compatibles con la calidad requerida y su uso efectuado en forma racional y efectiva.
- 3) Cepa de microorganismo con el mayor rendimiento de acuerdo a los fines productivos, ya sea de biomasa o productos.

- 4) Se deberá economizar en tiempo y ciclos de proceso implementando; si la escala lo justifica, sistemas de automatización.
- 5) El tiempo de cultivo adecuado al mayor rendimiento de producción.
- 6) Procedimientos de recuperación y purificación simples, rápidos y eficientes.
- 7) Tratamiento de los efluentes de acuerdo a las normas de bioseguridad y seguridad ambiental.
- 8) Requerimientos de espacio adecuados, que permitan expansión.

Varios criterios adicionales merecen atención. Es muy importante conocer el costo de mantenimiento de una planta de producción, así como el costo de mantenimiento y reformas. Existen principalmente cuatro factores básicos que contribuyen al costo de un proceso. En orden decreciente los mismos son: la materia prima, los costos fijos, los costos utilitarios y los costos del personal. Cuando los costos de la materia prima son la principal fuente de gasto, es obvio que el medio de cultivo y las cepas de microorganismo deberán ser investigadas como parte de un programa de desarrollo. Debe tenerse en cuenta que los costos de los procesos industriales basados en sistemas de fermentación son raramente publicados, por tal motivo, debe tenerse especial cuidado cuando se examinan ejemplos de potenciales procesos de fermentación, dado que el capital y los costos de operación normalmente son estimados desde un criterio puramente ingenieril (Stanbury y Whitaker, 1987).

En general los productos de la fermentación pueden clasificarse como de bajo costo-alto volumen o de alto costo-bajo volumen (Stanbury y Whitaker, 1987). Sólo un número limitado de productos de bajo costo-alto volumen han sido producidos. Algunos de los productos que pertenecen a este grupo incluye los solventes, ácidos orgánicos y algunas vacunas de uso veterinario, tales como las vacunas clostridiales. Por otro lado los procesos de alto costo-bajo volumen involucran procesos con obtención de productos con alto valor agregado. Algunos de estos procesos incluyen la producción de antibióticos, corticoesteroides, L-aminoácidos, vitaminas, ácido cítrico y productos recombinantes.

Otro factor a tener en cuenta en el análisis económico de los procesos fermentativos es la estimación del mercado actual y potencial, así como el incremento en la demanda de un determinado producto.

Es importante considerar la expectativa de "vida media" de un producto, aún cuando el mismo este protegido por una patente, sin embargo muchas veces es difícil de determinar, como ha sido demostrado en el mercado industrial de enzimas (Aunstrup, 1977).

La planta y equipamiento industrial es un factor primordial, en la cual existe una relación empírica entre el costo y tamaño del equipamiento. De acuerdo a esta relación, cuando el tamaño aumenta, el costo incrementa de acuerdo a la fórmula:  $\text{costo}_1 / \text{costo}_2 = (\text{tamaño}_1 / \text{tamaño}_2)^n$ , en donde "n" corresponde al factor de la escala. Para el caso de la producción de cerveza se estimó que ese factor es 0.6 (Pratten, 1971) y para la producción de proteína vegetal es entre 0.7-0.8 (MacLennan, 1976). Sin embargo no hay disponibles datos publicados respecto a la producción de productos recombinantes. Por otro lado, existe un número de restricciones que deben ser consideradas antes de decidir la escala de operación. Tales restricciones incluyen los requerimientos de enfriado, aireación y el método de fermentación de acuerdo a la geometría del mismo. Debe tenerse en cuenta que el volumen del fermentador es proporcional a  $r^2$  (donde r es el radio del fermentador), mientras que el incremento en la superficie del área es proporcional a r. Por lo tanto el escalado del recipiente del fermentador llevará al decrecimiento del área superficial respecto al volumen, ocasionando disminución de la efectividad de la camisa de enfriado. Por tal motivo, por encima de cierto volumen de fermentador, no es posible remover el calor lo suficiente para mantener constante la temperatura a menos que la capacidad de enfriamiento sea incrementada mediante espirales de enfriamiento internos o por el uso de intercambiadores de calor externos. Estas modificaciones suelen ser costosas y pueden interferir con el mezclado dentro del fermentador. Otra alternativa posible es el uso de microorganismos con mayor temperatura óptima de crecimiento.

Los requerimientos de oxígeno de un proceso pueden limitar el tamaño del tanque del fermentador. Schugerl y col. (1978), consideraron los costos en una planta de producción de proteína vegetal de 100.000 toneladas anuales a partir de metanol

como sustrato principal y hallaron que la inversión en la planta de producción fue sólo el 20% respecto al costo total de producción. De esa inversión, el costo del fermentador fue entre 20% - 25%, representado el costo del vaso del fermentador alrededor del 5% - 10%, el sistema de agitación y aireación fue entre el 5% - 10% y el sistema de enfriamiento fue de aproximadamente 10% - 15%. Las fuentes de suministro de energía, agua, aireación y sistemas auxiliares fueron estimadas alrededor del 10% de los costos de producción. Dado que el costo de inversión del fermentador representa aproximadamente entre el 4%-5% y los costos de operación son el 10% aproximadamente, los autores concluyeron que el vaso del fermentador podría sólo influir un 15% del costo total de producción.

Por otra parte no existen datos comparables para las plantas de fermentación debido a que la mayoría de los mismos son estimados para procesos específicos. También debe considerarse la vida media de una planta de producción, siendo este tiempo muy variable; por ejemplo, se ha estimado el tiempo de uso de una planta de producción de proteína vegetal en 15 años (Hamer, 1979), para el caso de acetona y butanol el tiempo estimado ha sido de 25 años (Spivey, 1978), mientras que la producción de cerveza se ha llevado a cabo en equipamientos de 50 - 100 años de antigüedad (Pratten, 1971).

El costo de algunos componentes del medio de cultivo de producción puede tener un profundo efecto en el costo total del proceso de fermentación, siendo usualmente la fuente de carbono el componente más costoso del medio de cultivo. Los componentes minerales normalmente constituyen una pequeña parte del costo del medio de cultivo, variando entre el 4% - 14% para el caso de la producción de proteína única vegetal (Cooney y Makiguchi, 1977). Debe tenerse en cuenta que los hidróxidos y sulfatos de potasio, magnesio, manganeso, zinc e hierro son preferidos a los cloruros, con el fin de minimizar la corrosión del acero inoxidable. Es de considerar además que la fuente de las diferentes materias primas puede causar variación en el rendimiento de un producto (Corbett, 1980).

Otra consideración en el estudio del costo del equipamiento es el problema asociado con la producción de aire estéril en fermentaciones aeróbicas. Los

costos operacionales deberán estar basados en la estimación de la vida útil de los filtros de aire, debiéndose considerar el costo de recambio de los mismos.

En los procesos con alto requerimiento de oxígeno, en donde debe existir suficiente agitación para mantener el medio uniforme y dispersar la corriente de aire introducida por el sistema de aireación, el costo de energía necesaria para comprimir el aire puede variar dependiendo del sistema de fermentación y del equipamiento usado, pudiendo llegar a un costo mínimo del 2% respecto al costo total de producción (Ryu y Oldshue, 1977). Para el caso de fermentaciones anaeróbicas o con poco requerimiento de oxígeno, el sistema de agitación y aireación se considera un componente menor del total de los costos de producción.

Para el caso de los procesos en sucesivos batch, la productividad deberá ser determinada para el ciclo completo del proceso. Esta productividad está basada en la combinación del tiempo requerido para el crecimiento y la expresión de un producto y el tiempo necesario para preparar el fermentador para la próxima corrida. Este tiempo total ( $t$ ) puede ser calculado de acuerdo a la siguiente ecuación (Wang y col., 1979):  $t = 1/\mu_{\max} \ln X_f/X_0 + t_T + t_D + t_L$ ;

donde  $\mu_{\max}$  = velocidad máxima específica de crecimiento

$X_0$  = concentración inicial celular

$X_f$  = concentración final celular

$t_T$  = tiempo entre corridas (que incluye: lavado, esterilización, llenado con medio de cultivo)

$t_D$  = tiempo de espera para la inoculación

$t_L$  = tiempo para llegar a la fase de crecimiento logarítmico después de la inoculación.

En particular la productividad de biomasa está dada por la ecuación:  $P = X_f/t$ . Para el caso de fermentaciones cortas,  $t$ , es un parámetro muy significativo; sin embargo en fermentaciones donde el ciclo de producción es largo, variaciones en término de horas tienen poca influencia en la productividad total.

Para el caso de cultivos continuos Wang y col. (1979) cuantificaron la relación entre la productividad de los cultivos en lote y cultivos continuos de acuerdo a la relación: productividad del cultivo continuo / productividad del cultivo en lote =

$$= \ln X_m/X_0 + \mu_{m\acute{a}x} \cdot t_T / X_m - X_0/X_m (D_c Y);$$

donde  $\mu_{m\acute{a}x}$ . = velocidad máxima específica de crecimiento

$X_0$  = densidad celular inicial

$X_m$  = densidad celular máxima

$t_T$  = tiempo entre corridas

$D_c$  = velocidad de dilución crítica

$Y$  = coeficiente de rendimiento celular para la limitación de nutriente

Cuando se estudia la factibilidad de un proceso continuo para formación de producto, es necesario conocer la productividad volumétrica, el rendimiento de conversión de producto a partir del sustrato más costoso del medio de cultivo y la concentración del producto (Wang y col., 1979). En el caso de procesos donde el objetivo es lograr biomasa celular u obtener ciertos productos tales como alcoholes y ácidos orgánicos, la productividad volumétrica y el rendimiento de conversión de producto a partir de sustrato son los datos más relevantes a tener en cuenta en la evaluación económica (Stanbury y Whitaker, 1987).

Un proceso de fermentación continua puede ser más económico que un proceso batch si se puede lograr mayor productividad. Sin embargo en algunos procesos de fermentación continua la concentración del producto final en el efluente puede ser menor que el obtenido en procesos batch. Esto crea la necesidad de lograr mayor concentración en la fase de recuperación.

Para el caso de la producción de antibióticos y otros metabolitos secundarios, los mayores costos están asociados a la fase de recuperación. Por lo tanto la concentración final del producto puede tener un gran efecto sobre el costo total de producción, dado que el tamaño y costo operacional de un sistema de recuperación es inversamente proporcional al volumen de líquido que deberá ser manipulado.

Para el caso particular de los costos de recuperación y purificación, Stowell y Bateson (1984), identificaron algunos factores claves que contribuyen al costo del proceso:

- 1) Pérdida de rendimiento, que ocurre en cada fase del proceso de recuperación.
- 2) Altos costos de energía y mantenimiento asociados con los equipamientos de filtración y centrifugación.
- 3) Altos costos de solventes y otras materias primas usados en la recuperación y refinamiento del producto.

Atkinson y Mavituna (1983) destacaron la importancia de reducir el número de etapas en el procesamiento posterior a la fermentación, con el fin de reducir capital y costos operativos. Estos autores calcularon el costo aproximado de un sistema de filtración rotatorio o una planta de centrifugación a gran escala, representando el 80% del costo total de producción. Sin embargo la remoción de células por filtración consume menos energía que la centrifugación (Atkinson y Mavituna, 1983). Para el caso particular de la producción de biológicos, los costos de recuperación y purificación representan aproximadamente el 60% del costo total de producción (Atkinson y Mavituna, 1983), por tales motivos se debería maximizar la concentración final del producto así como la eficiencia de los métodos de extracción, separación y purificación.

Otro factor muy importante a tener en cuenta en estudios de evaluación económica es el tratamiento de los efluentes. En la mayoría de las fermentaciones es imposible disponer de los efluentes sin costo adicional. Pape (1977), consideró que el método de tratamiento de efluentes más económico es el control del vertido, seguido por gastos de incineración o vertido en minas de sal, siendo el método más caro la degradación biológica en cuanto al gasto de agua que ocasiona en la planta de tratamiento. Sin embargo este último método ha sido empleado debido a que los efluentes usualmente contienen pequeño porcentaje de materia orgánica el cual puede resultar muy costosa su separación, concentración e incineración. Otra opción que se ha manejado por años, es la evacuación directa de los efluentes en la red de alcantarillado y pagar por el uso

del servicio; o efectuar, previamente al descarte, un tratamiento del mismo; u operar una combinación de ambos sistemas. Sin embargo, ha existido un notable incremento de los costos de uso del alcantarillado (Forage, 1978). Por lo tanto antes de decidir cual sistema de tratamiento de efluentes es el más económico, debe tenerse en cuenta el volumen de agua a emplear, la carga de sólidos y materia orgánica, el rango de variación de pH, el nivel de nutrientes y la fluctuación térmica (Ripley, 1979). Además debe considerarse los requerimientos de las compañías financiadoras de pólizas de seguro, la localización de la planta industrial y el destino de los efluentes así como las disposiciones legales respecto al tratamiento de los mismos.

#### **6.1.2.- Valor comercial de algunos productos recombinantes que están en el mercado. Ejemplos de estrategias para la reducción de los costos de producción**

Es importante tener procesos de producción bien caracterizados para una correcta evaluación de costos productivos de productos recombinantes. Un ejemplo de esto son los trabajos de mejoramiento de la producción de pro-insulina humana recombinante en cultivos de *E. coli*. La insulina fue el primer producto, derivado de la tecnología de ADN recombinante, comercializado para salud humana. Después de su comercialización por la compañía Eli Lilly y Co en Estados Unidos de América en 1982, la insulina humana recombinante ha reemplazado gradualmente a la insulina animal, siendo actualmente el tratamiento más frecuente elegido para pacientes con diabetes insulino-dependientes o con requerimientos de insulina; representado en la década del 90 alrededor del 70% de la insulina empleada en Estados Unidos (Raskin y Clements, 1991, Shin y col., 1997). El precio actual de la insulina humana recombinante es inferior (menos de 500 dólares/g) cuando se compara con el valor comercial de otras proteínas recombinantes de uso farmacéutico presentes en el mercado, tales como la eritropoyetina humana (850.000 dólares/gramo) y el factor estimulante de colonias granulocíticas (450.000 dólares/gramo) (Shin y col., 1997). Para continuar

reduciendo los costos de producción de estos productos con el fin de incrementar su uso se emplean varias alternativas. Algunas se basan en lograr gran escalado en la fermentación. A este nivel, pequeñas mejoras en la concentración proteica obtenida pueden afectar significativamente la productividad del proceso de fermentación. Otras estrategias están basadas en la optimización de los procesos de recuperación y purificación de un producto luego de la fermentación. Generalmente los mismos son muy complejos y costosos por lo cual es importante optimizarlos con el fin de lograr productos más económicos. Tal es el caso de los procesos post-fermentación de la pro-insulina humana recombinante. La misma es sintetizada en *E. coli* en forma insoluble, en cuerpos de inclusión. Para incrementar los rendimientos de esta proteína con la adecuada conformación tridimensional, algunas de las estrategias empleadas son: optimizar la expresión citoplásmica en forma soluble, o incrementar la concentración o productividad volumétrica de la producción de proteína insoluble en el proceso de fermentación.

Para el caso particular de la SLO nativa, la empresa Biokit S.A (líder mundial en la producción de esta proteína) ha indicado que la producción de la misma para uso en inmunoensayos se ha incrementado desde el año 1986. Durante el período 1987 - 1996 la SLO nativa producida se destinó hacia la exportación desde España a diversos países, siendo Japón el mercado más importante. La constancia en las ventas y los grandes volúmenes de medio de cultivo empleados para la producción de SLO nativa, indicaron la necesidad de buscar alternativas para el proceso productivo. Debido a que la producción de esta exotoxina en cultivos de *S. pyogenes* tiene un rendimiento bajo, de aproximadamente 0.5 mg de SLO/litro de cultivo (Althaus y Merle, 1993); la tecnología de ADN recombinante en *E. coli* parece ser una excelente alternativa para producir SLO con mayor rendimiento. Actualmente aproximadamente el 70% de la producción realizada por Biokit S.A es de SLOr, estimándose que el producto recombinante sustituirá definitivamente a la proteína nativa. De esta manera la producción de SLOr se realiza con mejor productividad y reproducibilidad lote a lote, simplicidad en el proceso de recuperación y purificación, importante reducción de residuos de difícil eliminación y mayor bioseguridad, proporcionando una posible reducción en

los costos de producción. Actualmente el precio de la SLOr varía entre 66.000 - 88.000 dólares/gramo.

### **6.1.3.- Estimación económica para producir GST-SLOr empleando el protocolo desarrollado**

A continuación se esboza una estimación económica para la producción de 1 gramo de GST-SLOr de acuerdo al protocolo de producción desarrollado en este trabajo. Los costos calculados son aproximados y sólo involucran los costos de clonado, cultivo y mantenimiento de la cepa recombinante, el proceso de producción en fermentador a escala laboratorio y costos de recuperación y purificación del producto final envasado a granel. Además se tuvieron en cuenta costos básicos de mantenimiento de equipo e infraestructura, así como insumo de personal calificado, sin considerar la inversión inicial de equipamiento ni compra de equipamiento futuro.

La estimación de las horas/hombre fueron basadas para el caso de un operador medianamente experimentado.

La estimación de los gastos de mantenimiento de equipos e instalaciones fueron calculados de acuerdo al costo y uso de los mismos.

Debe tenerse en cuenta que los cálculos estuvieron basados en los gastos de inversión que se realizaron en nuestro laboratorio, siendo el mismo dependiente de la Facultad de Medicina de la Universidad de la República. En esta estimación económica no se tuvieron en cuenta los gastos de inversión inicial de equipos, siendo además muy reducidos los costos de mantenimiento edilicio y la cotización horas/hombre, cuando se comparan los mismos con los niveles de inversión de esos rubros en la industria privada.

### 6.1.3.1.- Clonado

Los gastos de clonado se calcularon para la obtención de una cepa recombinante para la producción de GST-SLOr.

Reactivos para extraer, manipular y analizar ADN: U\$S 480

Enzimas: U\$S 200

Oligonucleótidos: U\$S 100

Cepa bacteriana y vector de expresión: U\$S 100

Soluciones, tampones, y reactivos varios: U\$S 20

Horas/hombre para el trabajo de clonado aproximadamente 160 horas: U\$S 320

Subtotal: U\$S 1.220

### 6.1.3.2.- Fermentación

Para producir 1 gramo de GST-SLOr se necesitan 17 ciclos (2 ciclos semanales) en fermentador de 4 litros de volumen de trabajo.

Medio de cultivo LB : 68 litros : U\$S 200

Glucosa: 340 g: U\$S 34

Ampicilina: 3.4 g : U\$S 36

IPTG: 0.162 g: U\$S 10

Otros (NaOH; HCl, antiespumante, etc.): U\$S: 10

Horas/hombre para la fase de producción en fermentador (se consideraron un técnico para la etapa de producción en fermentador y un preparador para el acondicionamiento del fermentador, limpieza, preparación de medio de cultivo y esterilización): 680 horas/hombre: U\$S 1.360

Subtotal: U\$S 1.650

### **6.1.3.3.- Recuperación y purificación**

Columna de glutatión agarosa, glutatión reducido, soluciones, etc.: U\$S 600

Reactivos de control SDS-PAGE, inmunoblot, etc. y cuantificación de proteínas:  
U\$S: 60

Otros (mantenimiento de la columna, etanol, NaOH, NaCl, etc.): U\$S 10

Horas/hombre: aproximadamente 80 horas: U\$S: 160

Subtotal: U\$S 830

### **6.1.3.4.- Formulación del producto terminado**

Sacarosa: aproximadamente 20 gramos: U\$S 1

Otros (sales fosfatos, agentes conservantes, reactivos para realizar corridas electroforéticas, inmunoblastos, ensayo de hemólisis, etc.): U\$S 30

Horas hombre: aproximadamente 40 horas: U\$S 80

Subtotal: U\$S: 111

### **6.1.3.5.- Mantenimiento**

Mantenimiento del equipos:

PCR: U\$S 50

Fermentador: U\$S 1.000

Centrífuga: U\$S 200

Sonicador: U\$S 50

Liofilizador: U\$S 50

Equipo para realizar corridas electroforéticas: U\$S 50

Otros (estufas, heladeras, freezer, etc.): U\$S 200

Mantenimiento edificio, gastos generales, otros, etc.: U\$S 1.200 (U\$S/300, aproximadamente todo el proceso insume 4 meses)

Subtotal: U\$S 2.800

#### **6.1.3.6.- Costo total de producción**

Clonado: U\$S 1.220

Fermentación: U\$S 1.650

Recuperación y purificación: U\$S 830

Formulación de producto terminado: U\$S 111

Mantenimiento: U\$S 2.800

Total: U\$S 6.611

#### **6.1.3.7.- Evaluación económica de la producción de GST-SLOr**

Esta evaluación económica es primaria y aproximada. Para obtener datos más precisos debería tenerse en cuenta otros cálculos tales como: inversión de equipamiento y edilicia inicial, impuestos, logística, gastos de marketing, gerenciales, de administración, etc. También debe considerarse que en la industria privada la inversión en personal es más costosa, así como los gastos de mantenimiento e infraestructura, etc. Sin embargo, esta estimación proporciona una idea relativa y por lo tanto útil, de los costos involucrados solamente en la producción de 1 gramo de GST-SLOr. Calculada de esta manera, los datos sugieren que la producción de 1 gramo de GST-SLOr tiene un costo aproximado de U\$S 6.611 en nuestro laboratorio.

# **CAPITULO 7**

## **DISCUSIÓN GENERAL, CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS FUTURAS**

La tesis presentada tuvo como objetivo central la optimización de la expresión de SLOr obtenida en nuestro laboratorio, con el fin de lograr una molécula apropiada para su uso en inmunoensayos. Para ello, se obtuvo SLOr expresada como proteína de fusión con la enzima GST (GST-SLOr). En el sistema de producción desarrollado, se decidió trabajar con la fusión GST-SLOr, sin hacer corte enzimático de la porción GST. Esta alternativa provee mayor simplicidad en la purificación de la proteína recombinante, así como reducción en los costos de purificación, pues se evita el uso de trombina para cortar GST de SLOr, paso que puede ser muy complejo para lograr las condiciones óptimas de corte de la enzima, que además en condiciones de producción suele ser costosa. Por otra parte, el uso de la fusión GST-SLOr podría ser una buena alternativa para el diseño y desarrollo de inmunorreactivos, debido a que posibilitaría emplear la porción GST para ser unida covalentemente a una matriz sólida (Bale y Warshwsky, 1991; Isoki y col., 1992; Gregorius y col., 1995; Miraballes y col., 1997), evitando afectar antigénicamente la porción SLOr.

Es de destacar que los ensayos de ELISA confirmaron lo publicado en la literatura respecto a la no reactividad de los sueros humanos a GST (Guan y Dixon, 1991). Este hecho, fue una importante razón adicional que motivó que se trabajara con la fusión, de este modo no sólo se obtuvo una ventaja en el sistema de producción de SLOr, sino que además provee la ventaja de que el recombinante obtenido puede ser usado sin mayores modificaciones para el desarrollo futuro de reactivos para diagnóstico, ya sea por trabajar por medio de unión covalente a matrices sólidas (Bale y Warshwsky, 1991; Isoki y col., 1992; Gregorius y col., 1995; Miraballes y col., 1997) o por adsorción física pasiva a las mismas (Boreland col., 1987).

Debido a que primariamente la proteína recombinante se expresó mayoritariamente en cuerpos de inclusión dentro del citoplasma de *E. coli*, la optimización se focalizó en aumentar la expresión de GST-SLOr en el citoplasma disminuyendo la formación de cuerpos de inclusión. Para ello, en matraces de pequeño volumen, de 100 mL, se analizaron los factores que pudieran incidir en el mejoramiento de la expresión. A continuación, se pasó a trabajar en fermentador a escala laboratorio con 2 litros de volumen de trabajo. En este punto, el trabajo se centró principalmente en la incidencia de los factores  $k_L a C_L^*$  y alimentación con glucosa sólo en FC o en FC y FI. Debe tenerse en cuenta que los resultados obtenidos en matraces no pueden extrapolarse exactamente al fermentador. Esto se debe a varios factores tales como diferencias geométricas del fermentador respecto a matraces, al control de pH en fermentadores, la aplicación de flujo de aire al sistema y al propio sistema de agitación por turbinas del fermentador que confiere diferente distribución de los nutrientes comparado con el movimiento orbital del incubador donde se realizaron los cultivos en matraces. Debe además considerarse que el fermentador posee un sistema de chicanas que promueve la formación de turbulencia en el medio de cultivo, de los cuales carecían los matraces usados en este trabajo. Estas diferencias entre los sistemas, pueden ocasionar desviaciones de la expresión de GST-SLOr, pudiendo generar ciertas diferencias en el patrón de expresión del recombinante no sólo cuantitativas sino también cualitativas. En nuestro trabajo, en líneas generales, se observó que la optimización en matraces para los factores analizados, pudo ser escalada en

fermentador de laboratorio. Sin embargo como perspectiva futura sería interesante evaluar otros factores o parámetros para el mejoramiento de la expresión y protocolo de producción de GST-SLOr. Alguno de éstos parámetros podrían ser la alimentación con otras fuentes de carbono diferentes a la glucosa, tales como fructosa y glicerol (Bhattacharya y Dubey, 1997; Aristidou y col., 1999); la sustitución de IPTG por lactosa durante la FI (Neubauer y col., 1992; Gombert y Kilikiam, 1998) y evaluar la expresión a otros valores de  $k_L a C_L^*$  (Bhattacharya y Dubey, 1997b). En este último punto en particular, sería necesario determinar previamente el máximo real de  $k_L a C_L^*$  del fermentador, mediante nuevas condiciones de flujo de aire y agitación en la superficie-respuesta, debido a que para las condiciones de las variables elegidas en nuestro caso, el máximo real del fermentador no se pudo determinar. De cualquier modo, se deberá evaluar si el máximo real de  $k_L a C_L^*$  del fermentador es compatible con las condiciones fisiológicas de cultivo de la cepa *E. Coli* TG2, comprobando si además favorece la expresión de la fusión en el citoplasma bacteriano en forma adecuada.

Otro factor a considerar en futuras investigaciones es el diseño experimental. Particularmente el análisis estadístico de las corridas en fermentador que se realizó en este trabajo fue en base a contrastes e interacciones de los factores, debido a que no todos los experimentos disponían de repeticiones para realizar un análisis de varianza. Por lo tanto, como trabajo futuro, sería importante poder efectuar un diseño experimental que contemple todas los factores a analizar con el menor número de corridas que permita el análisis de varianza

Por otro lado, es de destacar que el sistema de producción desarrollado en este trabajo de tesis logra mejorar la producción de GST-SLOr no sólo de forma cuantitativa sino cualitativa. Si se compara el protocolo desarrollado con el sistema tradicional de obtención de SLO nativa (Altahus y Merle, 1993), se logra un incremento en la producción mayor de 30 veces. Además, luego del mejoramiento de la producción de GST-SLOr, se observó un incremento de aproximadamente 15 veces respecto de los valores iniciales. Es importante destacar que los valores máximos de expresión usando el protocolo estándar en el sistema pGEX-2T es de 4 mg/L de cultivo (Smith, 1993). Estos resultados

indican que el protocolo de producción desarrollado produjo un aumento de la expresión de aproximadamente 4 veces respecto al sistema tradicional. Por otro lado, no sólo se obtuvo un protocolo con mayor rendimiento de la producción de GST-SLOr, sino que se logró cambiar el perfil de producción del recombinante, disminuyendo la expresión en cuerpos de inclusión y aumentando la expresión de la forma soluble. Si bien en determinados sistemas la obtención de cuerpos de inclusión puede ser ventajosa debido a que en la fase de recuperación se obtiene productos con alto índice de purificación en buena cantidad, simplificando el esquema de purificación, por otro lado suelen tener el inconveniente que el producto es difícil de solubilizar (Klotz, 1983; Makrides, 1996; Hanning y Makrides, 1998), ocasionando pérdida de sitios antigénicos. Para el caso particular de nuestro trabajo, cuando GST-SLOr se expresó en cuerpos de inclusión, la solubilización fue dificultosa (datos no mostrados). Por tal motivo, se procedió al estudio de las condiciones que favorecieran la expresión de GST-SLOr de manera de disminuir la formación de cuerpos de inclusión, logrando un producto con mayor presencia de sitios antigénicos. Los resultados mostraron que el recombinante obtenido fue reconocido por anticuerpos humanos anti-SLO. Sumado a ello, el recombinante presentó actividad hemolítica, lo que le otorga valor agregado en sí mismo. Esto se debe a que esta molécula no sólo es adecuada para el desarrollo de inmunoensayos, sino que puede ser empleada para determinación del título de anticuerpos por técnica de inhibición de la hemólisis, que es la técnica de referencia (Todd, 1932; Rantz y Randall, 1945; Whitnack y Stollerman, 1985). Además, podría ser apropiada para el uso de técnicas que requieren permeabilización de la membrana celular (Spiller y col., 1998).

Los resultados mostraron que la mejor condición para lograr la expresión de GST-SLOr dentro del citoplasma en forma soluble, es trabajar en  $k_L a C_L^*$  bajo (6 mmol/L/h) durante el período de inducción. Este hecho difiere de los casos indicados en la literatura en los cuales se asocia el aumento de la expresión de proteínas recombinantes en fase soluble dentro del citoplasma bacteriano con condiciones de alta aireación (Talmadge y Gilbert, 1982; Smith, 1993; Makrides, 1996.). Este hecho pone de relieve la importancia de estudiar en forma particular

cada sistema de expresión. Otra característica de la expresión de este recombinante, luego de la optimización, fue la reducción de la expresión de GST. Previo al estudio de las condiciones de cultivo para mejorar la expresión del recombinante, se observó que GST sola se expresó en una concentración aproximadamente igual a la proteína de fusión. Luego de mejoradas las condiciones de producción en fermentador, la expresión de GST sola fue prácticamente imperceptible cuando se analizaron las muestras purificadas por SDS-PAGE. Sin embargo, como continuación del trabajo, la expresión de GST-SLOR puede ser optimizada no sólo desde un abordaje de las condiciones de cultivo en fermentador sino también desde un punto de vista molecular, por ejemplo, sustituyendo codones de uso infrecuente en el gen recombinante por otros de uso frecuente en *E. coli*. De esta manera se lograría una mayor eficiencia del sistema transcripción-traducción, sobre todo en la etapa de traducción (Makrides, 1996). Otra alternativa, podría ser el diseño de nuevos vectores con el fin de lograr un sistema más eficiente de expresión no sólo en bacterias sino en eucariotas (Denhardt y Colasanti, 1988; De Boer y Hul, 1990; Baneyx, 1999).

Teniendo en cuenta las distintas perspectivas que se han analizado como continuación del trabajo, debe igualmente destacarse que los resultados presentados en esta tesis indicaron que se logró mejorar la expresión de GST-SLOR. El desarrollo de un protocolo de producción de GST-SLOR fue focalizado en el estudio de los principales factores que intervienen en las condiciones de cultivo, ya sea en la fase de crecimiento del microorganismo hospedador como en la fase de inducción de la expresión. De este modo se obtuvo un producto adecuado para su posterior uso en inmunoensayos. Sin embargo; se deberá evaluar la viabilidad económica de la implementación del proceso desarrollado con fines productivos.

## REFERENCIAS

**Aiba S. and J. Koizumi.** 1984. Effects of temperature on plasmid stability and penicillinase productivity in a transformant *Bacillus strarothermophilus*. *Biotechnol. Bioeng.* **26**: 1026-1031.

**Altahus H. and P. Merle.** 1995. Process for the purification of streptolysin O, intact streptolysin O obtainable by this process. *United States Patent.* US005258504A.

**Andersen D.C., J. Swartz, T. Ryll, N. Lin and B. Snedecor.** 2001. Metabolic oscillations in an *E. coli* fermentation. *Biotechnol Bioeng.* **75**: 212-218.

**Andersen D.C. and L Krummen.** 2002. Recombinant protein expression for therapeutic applications. *Curr Opin Biotechnol.* **13**: 117-123.

**Atik F. A.** 1994. Fiebre reumática. Avanços no estudo da patogenese nas ultimas decadas. *Arq. Bras. Cardiol.* **63**: 311-219.

**Alouf J. E.** 1980. Streptococcal toxins (streptolysin O, streptolysin S, erythrogenic toxin). *Pharmacol. Ther.* **11**:661-717.

**Aristidou A., K. San and G. Bennett.** 1999. Improvement of biomass yield and recombinant gene expression in *E.coli* by using fructose as the primary carbon source. *Biotechnol. Prog.* **15**: 140-145.

**Arroyo de la Fuente F.** 1973. Valor diagnóstico del título de antiestreptolisinas. *Proc. Diar.* **4**: 81-85. Ed. Científico- Médica. Barcelona.

**Atkinson B. and F. Mavituna.** 1983. Biochemical of engineering and biotechnology. Chapter **12**: 890-931.

**Aunstrup K.** 1977. Production of industrial enzymes. In biotechnology and fungal differentiation, *FEMS Symp* **4**: 157-171.

**Avis K.E.** 1976. The theory and practice of industrial pharmacy, 2nd. ed. Lea and Febiger, Philadelphia.

**Bailey J.E. and D.F. Ollis.** 1986. Biochemical engineering fundamentals. 2<sup>nd</sup> ed. McGraw-Hill Book Co., New York.

**Balbas P. and F Bolívar.** 1990. Design and construction of expression plasmid vectors in *Escherichia coli*. *Methods Enzymol.* **185**:14-37.

**Balbas P.** 2001. Understanding the art of producing protein and non-protein molecules in *Escherichia coli*. *Mol Biotechnol* **19**: 251-267.

**Baneyx F.** 1999. Recombinant protein expression in *Escherichia coli*. *Current Opinion in Biotechnology.* **10**: 411-421.

**Banks G.T.** 1980. Scale-up of fermentation process. *Top. Enzyme Ferment. Biotechnol.* **3**: 170-266.

**Bastin R., M. Main, J. Frottier y J. L. Vilder.** 1972. Enfermedades infecciosas y parasitarias. Los estreptococos y la patología estreptocócica. Ed. Espahs. Barcelona.

**Bale M. D and A. Warshawsky.** 1991. Protein immobilization on surface modified lattices bearing aldehyde groups. *Colloid Polym. Sci.* **269**: 139-145.

**Bauer K.A, A. Ben-Bassat, M. Dawson, V.T. De La Puente and J.O. Neway.** 1990. Improved expression of human interleukin-2 in high cell density fermentor cultures of *Escherichia coli* K-12 by a phosphotranscetylase mutant. *Appl. Environ. Microbiol.* **56**: 1296-1302.

**Bech J. and S. Carlen.** 1990. Production of recombinant human growth hormone in *Escherichia coli*: Expression of different precursors and physiological effects of glucose, acetate, and salts. *Biotechnol. Bioeng.* **36**: 1-11.

**Bedouelle H. and P. Duplay.** 1988. Production in *Escherichia coli* and one-step purification of bifunctional hybrid proteins which bind maltose. *Eur. J. Biochem.* **171**:541-549.

**Belasco J. and C. Higgins.** 1988. Mechanisms of mRNA decay in bacteria: a perspective. *Gene* **72**: 15-23.

**Belasco J.** 1993. mRNA degradation in prokaryotic cells: an overview:3-12. In J.G. Belasco and G. Brawerman (ed.) Control of messenger RNA stability. Academic Press, Inc., San Diego, Calif.

**Bentley W, N. Mirjalili, K. Anderson, R. Davis and K. Kompala.** 1990. Plasmid-encoded protein: the principal factor in the "metabolic burden" associated with recombinant bacteria. *Biotechnol. Bioeng.* **35**: 668-681.

**Bernheimer A.W.** 1974. Interactions between membranes and cytolytic bacterial toxins. *Biochim. Biophys. Acta* **344**: 27-50.

**Bernheimer A.W.** 1976. Sulfhydryl-activated toxins: 85-97 in A.W. Bernheimer, (ed.), Mechanisms in bacterial toxicology. John Wiley and Sons, Inc., New York.

**Bhakdi S., M. Roth, A. Sziegoleit and J. Tranun-Jensen.** 1984a. Isolation and identification of two haemolytic forms of streptolysin-O. *Infect. Immun.* **46**:394-400.

- Bhakdi S., M. Muhly and R. Fussle.** 1984b. Correlation between toxin binding and hemolytic activity in membrane damage by staphylococcal  $\alpha$ -toxin. *Infect. Immun.* **46**: 318-323.
- Bhakdi S., J. Tranum and A. Sziegoleit.** 1985. Mechanism of membrane damage by Streptolysin-O. *Infection and Immunity.* 52-60.
- Bhattacharya S. and A. Dubey.** 1997a. High-level expression of a heterologous gene in *E.coli* in response to carbon-nitrogen source and C/N ratio in a batch bioreactor. *Biotechnol. Prog.* **13**: 151-155.
- Bhattacharya S. and A. Dubey.** 1997b. Effects of dissolved oxygen and oxygen mass transfer on overexpression of targeted gene in recombinant *E.coli*. *Enzyme Microb. Technol.* **20**: 520-527.
- Bisno A., M. Gerger, J. Gwalrney, E. Kaplan and R. Schawartz.** 1987. Diagnosis and managment of group A streptococcal pharyngitis: a practice guideline. *Clin. Infect. Dis.* **25**: 574-583.
- Bisno A.** 1996. Fiebre reumática. En: Cecil, Tratado de medicina interna **2**: 1836-1843.
- Bisno A., M. Gerber, J. Gwaltney, E. Kaplan and R. Schwartz.** 2002. Practice guidelines for the diagnosis and management of group A streptococcal pharyngitis. *Clin. Infect. Dis.* **35**: 113-125.
- Bolívar F., R.L. Rodríguez, P.J. Greene, M.C. Betlach, H.L.Heyneker, H.W. Boyer, J.H. Crosa and S. Falkow.** 1977. Construction and characterization of new cloning vehicles.II. A multipurpose cloning system. *Gene* **2**: 95-113.
- Boreland P. C., E. A. Thompson and G. Fenning.** 1987. Evaluation of a latex agglutination screening test for the determination of anti-streptolysin O (ASO) antibodies. *Serodiagn. Immnother.* **1**:113-116.

- 
- Brent, R. and M. Ptashne.** 1981. Mechanism of action of *lex* A gene product. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **78**: 4204-4208.
- Buchner J.** 1996. Supervising the fold: functional principles of molecular chaperones. *Faseb. J.* **10**: 10 -19.
- Buckland B.C.** 1984. The translation of scale in fermentation processes. The impact of computer process control. *Biotechnology* . **1984**: 875-883.
- Bull A.T. and A.P. Trinci.** 1977. The physiology and metabolic control of fungal growth. *Adv. Microb. Physiol.* **15**: 1-84.
- Bullok, W.O, J.M. Fernández and J.M. Short.** 1987. XL1-Blue: A high efficiency plasmid transforming *recA Escherichia coli* strain with beta-galactosidase selection. *BioTechniques* **5**: 376.
- Burguess S. M., Stirdivant and R.L. Greasham.** 1992. Physiological effects of TGF $\alpha$ -PE40 expression in recombinant *Escherichia coli* JM 109. *Biotechnol. Bioeng.* **40**: 437-445.
- Calam C.T.** 1969. The culture of microorganisms in liquid medium, p. 567-591. In J.R. Norris and D.W. Ribbons 8ed. *Methods in microbiology*, vol.1. Academic press, Inc. New York.
- Calam C.T. and D. W. Russell.** 1973. Microbial aspects of fermentation process development. *J. Appl. Che. Biotechnol.* **23**: 225-237.
- Calam C.T.** 1976. Starting investigational and production cultures. *Process. Biochem* **1976**: 7-12.
- Catanzaro F., C. Stetson and A. Morris.** 1954. The role of the carrier streptococcus in the pathogenesis of rheumatic fever. *Am. J. Med.* **17**: 749-756.

**Chabalgoity J.A., C.M.A. Khan., A.A. Nash and C.E. Hormaeche.** 1996. A *Salmonella typhimurium* live vaccine expressing multiple copies of a peptide comprising amino acids 8-23 of herpes simplex virus glycoprotein D as a genetic fusion to tetanus toxin fragment C protects mice from herpes simplex virus infection. *Mol. Microb.* **19**: 791-801.

**Chalmers J.J., E. Kim, J.N. Telford, E.Y. Wong, W.C. Tacon, M.L. Schuler and D.B. Wilson.** 1990. Effects of temperature on *Escherichia coli* overproducing beta-lactamase or human epidermal growth factor. *Appl. Environ. Microbiol.* **56**: 104-111.

**Chao Y.P., W. Law, P.T. Chen and W.B. Hung WB.** 2002. High production of heterologous proteins in *Escherichia coli* using the thermo-regulated T7 expression system. *Appl Microbiol Biotechnol.* **58**: 446-453.

**Chen H.C., C.F. Hwang and D.G. Mou.** 1992. High-density *Escherichia coli* cultivation process for hyperexpression of recombinant porcine growth hormone. *Enzyme Microb. Technol.* **14**: 321-326.

**Chen J., H. Zhang, M. Hu and J. Tang.** 1995. Production of human insulin in an *E. coli* system with met-lys human proinsulin as the expressed precursor. *Appl. Biochem. Biotechnol.* **55**: 5-15.

**Chen W., C. Graham and R. Ciccarelli,** 1997. Automated fed-batch fermentation with feed batch controls based on dissolved oxygen and pH for production of DNA vaccines. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology* **18**: 43-48.

**Chou P.Y. and G.D. Fasman.** 1979. Prediction of beta-turns. *Biophys J.* **26**: 367-373.

**Chou C., Bennett, G. and K. San.** 1994. Effect of modulated glucose uptake on high-level recombinant protein production in a dense *Escherichia .coli* culture. *Biotechnology Progress.* **10**: 644-647

Committee on prevention of rheumatic fever and bacterial endocarditis of the American Heart Association. Prevention of bacterial endocarditis. 1984. *Circulation*. **70**: 1123A.

**Cooney C. L. and N. Makiguchi.** 1977. An assessment of single cell protein from methanol-grown yeast. In single cell protein from renewable and non-renewable resources. *Biotech. Bioeng. Symp.* **7**: 65-76.

**Cooper C.M., G.A. Fernstrom and S.A. Miller.** 1944. Performance of agitated gas-liquid contactors. *Ind. Eng. Chem.* **36**: 504-509.

**Corbett K.** 1980. Preparation, sterilization and design of media. In Fungal biotechnology. *Brit. Mycol. Soc. Symp.* **3**: 25-41.

**Corchero J.L and A. Villaverde.** 1998. Plasmid maintenance in *Escherichia coli* recombinant cultures is dramatically, steadily, and specifically influenced by features of the encoded proteins. *Biotechnol Bioeng.* **58**: 625-632.

**Cortina P., J. Alfonso, C. Cortés, P. Smeyers y J. González.** 1991. Evolución epidemiológica de la fiebre reumática y cardiopatía reumática en España (1951-1986). *Rev. San Hig. Pub.* **65**: 17-24.

**Cunha T. and R. Aires-Barros.** 2002. Large-scale extraction of proteins. *Mol Biotechnol.* **20**: 29-40.

**Curless C., J. Pope and L. Tsai.** 1990. Effect of preinduction specific growth rate on recombinant alpha consensus interferon synthesis in *Escherichia coli*. *Biotechnol. Prog.* **6**: 149-152.

**Curtis G.D., W. A. Kraak and R.G. Mitchell.** 1988. Comparison of latex and haemolysin tests for determination of anti-streptolysin-O (ASLO) antibodies. *J. Clin. Pathol.* **41**: 1331-1333.

**Cynthia S. and M.D. Hayes.** 2001. Management of Group A beta-hemolytic streptococcal Pharyngitis. *American Family Physician*. **63**: 140-145.

**Dahlegren M., A. Powell, R. Greasham and H. George.** 1993. Development of scale-down techniques for investigation of recombinant *E.coli* fermentations: Acid metabolites in shake flaks and stirres bioreactors. *Biotechnol. Prog.* **9**: 580-586.

**Dajani A., K.Taubert, P. Ferrieri, G. Peter and S. Shulman.** 1995. Treatment of acute streptococcal pharyngitis and prevention of rheumatic fever: a statement for health professionals. Committee on rheumatic fever. Endocarditis and Kawasaki disease of the council cardiovascular disease in the young, the American Heart Association. *Pediatrics* **96**: 758-764.

**Das A.** 1990. Overproduction of proteins in *Escherichia coli*: vectors, hosts and strategies. *Methods Enzymol.* **182**: 93-112.

**Datar R, T. Cartwright and C. Rosen.** 1993. Process economics of animal cell and bacterial fermentations: a case study analysis of tissue plasminogen activator. *Bio/Technology* **11**: 349-357.

**Davis N.D. and W.T. Blevins.** 1979. Methods for laboratory fermentation H.J. Peppler and D. Perlman (ed.), *Microbial technology* . Academic Press, Inc., New York. **2**: 303-329.

**De Becze G. and A. Liebemann.** 1944. Aereation in the production of compressed yeast. *Ind. Eng. Chem.* **36**: 882-890.

**De Boer H and A. S. Hul.** 1990. Sequences within ribosome binding site affecting messenger RNA translatability and method to direct ribosomes to single messenger RNA species. *Methods Enzymol.* **185**: 103-114.

**Denhardt D.T and J. Colasanti.** 1988. A survey of vectors for regulation expression of cloned DNA in *E.coli*. In *Vectors: A Survey of Molecular Cloning*

---

Vectors and their uses. Rodríguez R. L. and Denhoardt D.T., eds. Butterworth Publishers. Stoneham, MA: 179-203.

**Derynck R., E. Remaut, E. Saman, P. Stanssens, E. De Clercq, J. Content and W. Fiers.** 1980. Expression of human fibroblast interferon gene in *Escherichia coli*. *Nature* **287**: 193-197.

**Di Guan C., P. Li, P. Riggs and H. Inouye.** 1988. Vectors that facilitate the expression and purification of foreign peptides in *Escherichia coli* by fusion to maltose-binding protein. *Gene* **67**: 21-30.

**Doelle H.W.** 1981. Basic metabolic processes. In *Biotechnology: A comprehensive treatise*. Rehm J. and G. Reed., eds. 193-201.

**Drew S.W.** 1981. Liquid culture, p. 151-178. In P. Gerhardt (ed.), *Manual of methods in general bacteriology*. *American Society for Microbiology*, Washington., D.C.

**Dubey A.K, B. Mollet and R.J. Roberts.** 1992. Purification and characterization of MspI DNA methyltransferase cloned and overexpressed in *E. coli*. *Nucleic Acids Res.* **20**: 1579-1585.

**Duffaud G., P. March and M. Inouye.** 1987. Expression and secretion of foreign proteins in *Escherichia coli*. *Methods Enzymol.* **153**: 492-507.

**Duncan J. and R. Schlegel.** 1975. Effect of streptolysin-O on erythrocyte membranes, liposomes and lipid dispersions. A protein-cholesterol interaction. *J. Cell. Biol.* **67**: 160-173.

**Egli, T. and M. Zinn.** 2003. The concept of multiple-nutrient-limited growth of microorganisms and its application in biotechnological processes. *Biotechnology Advances.* **22**: 35-43.

**Ensign J.C.** 1978. Formation, properties and germination of actinomycete spores. *Annu. Rev. Microbiol.* **32**: 185-219.

**Falconer A.E., R. Carson, R. Johnstone, P. Bird, M. Kehoe and J.E. Calvert.** 1993. Distinct IgG1 and IgG3 subclass responses to two streptococcal protein antigens in man: analysis of antibodies to streptolysin O and M protein using standardized subclass-specific enzyme-linked immunosorbent assays. *Immunology* **79**: 89-94.

**Forage A.J.** 1978. Recovery of yeast from confectionery effluent. *Proc. Biochem.* **13**: 8, 11, 30.

**Ford C.F., I. Suominen and C.E. Glatz.** 1991. Fusion tails for the recovery and purification of recombinant proteins. *Protein Expression Purif.* **2**: 95-107.

**Freedman, D.** 1969. The shaker in Bioengineering. *Process Biochem.* **4**: 35-40.

**Fuvesty I., J. Boszormenyi and A. Veress.** 1967. The effect of the physico-chemical parameters of *Streptococcus pyogenes* cultures on the formation of O-streptolysin. The role of reducing agents in the formation of O-streptolysin. *Acta Microbiol. Acad. Sci. Hung* **14**: 335-343.

**Galindo E., F. Bolívar and R. Quintero.** 1990. Maximizing the expression of recombinant proteins in *Escherichia coli* by manipulation of culture conditions. *J. Ferm. Bioeng.* **69**: 159-165.

**George H. A., A. L. Powell, M. E. Dahlgren, W.K. Herber, R.Z. Maignetter, B.W. Burgess, S.M. Stirdivant and R.L. Greasham.** 1992. Physiological effects of TGF  $\alpha$ -PE 40 expression in recombinant *Escherichia coli* JM 109. *Biotechnol. Bioeng.* **40**: 437-495.

**Georgiou G.** 1988. Optimizing the production of recombinant proteins in microorganisms. *AIChE. J.* **34**: 1233-1248.

**Georgiou G.** 1996. Expression of protein in bacteria: p.101-127. In J.L. Cleland and C.S. Craik (ed), Protein engineering: principles and practice. Wiley Liss, New York.

**Gerber M., L. Caparas, and F. Randolph.** 1990. Evaluation of a new agglutination test for detection of streptolysin O antibodies. *J. Clin. Microbiol.* **28**:413-415.

**Giles R. V., D. G. Spiller, J. Grzybowski, R. E. Clark, P. Nicklin and D. M. Tidd.** 2000. Selecting optimal oligonucleotide composition for maximal antisense effect following streptolysin O mediated delivery into human leukaemia cells. *Nucleic Acids. Res.* **26**:1567-1575.

**Giménez E.** 1996. Fiebre reumática. Congreso de enfermedades autoinmunes. Enfoque clínico terapéutico. Montevideo.

**Gold L and G. Stormo.** 1990. High-level translation initiation. *Methods Enzymol.* **185**: 89-93.

**Gombert A. and B. Kilikian.** 1997. A simple way if a achieving a high cell concentration in recombinant *E.coli* cultivation. *Brazilian Journal of Chemical Engineering* **14**: 1985-1990.

**Gombert A. and B. Kilikiam.** 1998. Recombinant gene expression in *E.coli* cultivation using lactose as inducer. *Journal of Biotechnology.* **60**: 47-54.

**Gordis M.** 1985. The virtual disappearance of rheumatic fever in the USA. *Circulation* **72**: 1152-1162.

**Gregorius K., S. Mouritsen and H. I. Elsner.** 1995. Hydrocoating: a new method for coupling biomolecules to solid phases. *J. Immunol. Meth.* **181**: 65-73.

**Guan C., P. Li, P. D. Riggs and H. Inouye.** 1988. Vectors that facilitate the expression and purification of foreign peptides in *Escherichia coli* by fusion to maltose-binding protein. *Gene* **67**: 21-30.

**Guan K. and J.E. Dixon.** 1991. Eukaryotic proteins expressed in *Escherichia coli*: an improved thrombin cleavage and purification procedure of fusion proteins with glutathione S- transferase. *Anal. Biochem.* **192**: 262-267.

**Guilherme L., E. Cunha-Neto, V. Coelho, R. Snitcowsky, P. Pomerantzeff, M.A, Assis RV, F. Pedra, J. Neumann, A. Goldberg, M.E. Patarroyo, F. Pillegi and J. Kalil.** 1995. Human heart-infiltrating T-cell clones from rheumatic heart disease patients recognize both streptococcal and cardiac proteins. *Circulation.* **92**(3): 415-420.

**Guilherme L., N. Dulphy, C. Douay, V. Coelho, E. Cunha-Neto, S. Oshiro, R. Assis, A. Tanaka, P. Pomerantzeff, D. Charron and A. Toubert Kaili.** 2000. Molecular evidence for antigen-driven immune responses in cardiac lesions of rheumatic heart disease patients. *Int Immunol.* **12**:1064-1073.

**Guilherme L., E. Cunha-Neto, N. Dulphy, A. Tanaka, A. Toubert and J. Kalil.** 2001. Heart directed autoimmunity: the case of Rheumatic Fever. *J Autoimmunity* **16**: 363-367.

**Hall M., J. Gabay, M. Débarbouillé and M. Schwartz.** 1982. A role for mRNA secondary structure in the control of translation initiation. *Nature* **295**: 616-618.

**Halbert S. P.** 1970. Streptolysin O, p.69-98. In T. C. Montie, S. Dakis, and S. J. Aji (ed.), Microbial toxins, vol.3. Academic Press, Inc., New York.

**Hamer G.** 1979. Biomass from natural gas. In Microbial biomass, economic microbiology. **4**: 315 -360.

**Hanahan, D. and M. Meselson.** 1983. Plasmid screening at high colony density. *Methods Enzymol.* **100**: 333.

**Hanning G. and S. Makrides.** 1998. Strategies for optimizing heterologous protein expression in *Escherichia coli*. *Tibtech* **16**: 54-60.

**Hansen M. T., M. Pato, S. Molin, N. P. Fill and K.V. Meyenburg.** 1975. Simple downshift and resulting lack of correlation between ppGpp pool size and ribonucleic acid accumulation. *J. Bacteriol.* **122**: 585-591.

**Hernández I., P. Fernández.** 1989. Fiebre reumática. *JANO* **37**: 55-59.

**Hockney R.** 1994. Recent developments in heterologous protein production in *Escherichia coli*. *Tibtech.* **12**: 456-463,

**Hopp T.P. and K.R. Woods.** 1981. Prediction of protein antigenic determinants from amino acids sequences. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **78**: 3824-3828.

**Hostetler C., K.P. Sawyer and I. Nachamkin.** 1988. Comparison of three rapid methods for detection of antibodies to streptolysin-O and DNase B. *J. Clin. Microbiol.* **26**: 1406-1408.

**Ingraham J.L., O. Maaloe and F.C. Neidhardt.** 1983. Growth of the bacterial cell; Sinauer Associates, Inc.: Sunderland, M. A.

**Isoki K. N. Seno and L. Matsumoto.** 1992. Immobilization of protein ligands with methyl vinyl ether-maleic anhydride copolymer. *J. Chromatogr.* **597**: 123-128.

**Jaiyesimi F.** 1982. Chorinic rheumatic heart disease in childhood. Its costs and economic implications. *Trop. Cardiol.* **8**: 55 .

**Kaplan E.L. and H.R. Hill.** 1984. Return of rheumatic fever: consequences, implications, and needs. *J. of Pediatrics.***111**: 1224.

- Kapralek F., P. Jecmen, J. Sedlaced, M. Fabry and S. Zadrazil.** 1991. Fermentation conditions for high-level expression of tac-promoter controlled calf pro-chymosin cDNA in *E.coli* HB 101. *Biotechnol Bioeng* **37**: 71-79.
- Karplus, P.A. and G.E. Schulz.** 1985. Prediction of chain flexibility in proteins: a tool for the selection of peptide antigens. *Naturwissenschaften* **72**: 212-213.
- Kehoe M. A. and K. N. Timmis.** 1984. Cloning and expression in *Escherichia coli* of the streptolysin O determinant from *Streptococcus pyogenes*: characterization of the cloned streptolysin O determinant and demonstration of the absence of substantial homology with determinants of other thiol-activated toxins. *Infect. Immun.* **43**: 804-810.
- Kehoe M.A, L. Miller, J. Walker and G. Boulnois.** 1987. Nucleotide sequence of the Streptolysin O (SLO) gene: Structural homologies between SLO and other membrane-damaging, thiol-activated toxins. *Infection and Immunity.* **55**: 3228-3232.
- Kemp D. J., D. B. Smith, S. J. Foote, N. Samaras, and M. G. Peterson.** 1989. Colorimetric detection of specific DNA segments amplified by polymerase chain reactions. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **86**: 2423-2427.
- Khosla C., J. Curtis, P. Bydalek, J.R. Swatz and J.E. Bailey.** 1990. Expression of recombinant proteins in *Escherichia coli* using an oxygen-responsive promoter. *Bio/Technology* **8**: 554-558.
- Khosrovi B. and P. Gray.** 1985. Products from recombinant DNA. In *Comprehensive biotechnology: The principles, applications and regulations of biotechnology in industry, agriculture and medicine.* Moo-Young, M., Ed.; Pergamon Press: Tarrytown, NY. **3**: 319-330.
- Klein G., E. C. Hall, C. M. Baker and B. Addison.** 1970. Antistreptolysin O test. Comparison of macro and micro technique. *Amer. J. Clin. Path.* **53**: 159-163.

---

**Klotz L.C.** 1983. Overproduction of proteins in recombinant organisms. *Ann N Y Acad Sci.* **413**: 1-11.

**Konstantinov K.B., N. Nishio, T. Seki and T. Yoshida.** 1991. Physiologically motivated strategies for control of the fed-batch cultivation of recombinant *Escherichia coli* for Phenylalanine production. *J. Ferm. Bioeng.* **71**: 350-355.

**Kramer W., G. Elmecker, R. Weik, D. Mattanovich and K. Bayer.** 1994a. Kinetic studies for the optimization of recombinant protein formation. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* **719**: 323-333.

**Kramer W., D. Mattanovich, G. Elmecker, R. Weik, C. Luttich, K. Bayer and H. Katinger.** 1994b. Regulable expression systems for the optimisation of recombinant protein production in *Escherichia coli*. In *Progress in Biotechnology* 9. L Alberghina, L. Frontali and P.Sensi, Eds.: 827-830. Elsevier. Amsterdam.

**Kwon S., S. Kim and E. Kim.** 1996. Effects of glycerol on  $\beta$ -lactamase production during high cell density cultivation of recombinant *E.coli*. *Biotechnol. Prog.* **12**: 205-208.

**Laemelli U.K.** 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**: 680.

**Landwall P. and T. Holme.** 1977. Influence of glucose and dissolved oxygen concentrations on yields of *Escherichia coli* B in dialysis culture. *J. Gen. Microbiol.* **103**: 353-358.

**La Vallie E. R and J. M. McCoy.** 1995. Gene fusion expression systems in *Escherichia coli*. *Curr. Opin. Biotechnol.* **65**: 501-506.

**Lan M. and A. Bisno.** 1983. Acute rheumatic fever: A vanishing disease suburban. *JAMA* **249**: 895-898.

- Lee J., Y.H. Choi, S.K. Kung, H.H. Park and I.B. Kwon.** 1989. Production of human leukocyte interferon in *Escherichia coli* by control of growth rate in fed-batch fermentation. *Biotechnology Letters* **11**: 695-698.
- Lee C., W. Sun, B. Burgess, B. Junker, J. Reddy, B. Buchland and R. Greasham.** 1997. Process optimization for large-scale production of TGF- $\alpha$ -PE40 in recombinant *E.coli*: effect of medium composition and induction timing on protein expression. *Journal of industrial microbiology & Biotechnonology* **18**: 260-266.
- Lewis, B.** 2000. Genes VII. Oxford University Press. Transcription. Chapter **9**: 257-262.
- Li X., J. Robbins and K. Taylor.** 1990. The production of beta-galactosidasa in *Escherichia coli* in yeast extract enriched medium. *J. Ind. Microbiol.* **5**: 85-94.
- Li X. and K. Taylor.** 1994. Effect of glucose on the expression parameters of recombinant protein in *Escherichia coli* during batch growth in complex medium. *Biotechnol. Prog.* **10**: 160-164.
- Lin Y., H. Hsiao and C. Chou.** 2002. Strain improvement to enhance the production of recombinant penicillin acylase in high-cell density *Escherichia coli* cultures. *Biotechnol. Prog.* **18**: 1458-1461.
- Lott J.A and K Turner.** 1975. Evaluation of Trinder's glucose oxidase method for measuring glucose in serum and urine. *Clin Chem.* **21**: 1754-1760.
- Luli G. and W. Strohl.** 1990. Comparison of growth, acetate production and acetate inhibitor of *E.coli* strains in batch and fed-bach fermentation. *Appl. Envirom. Microbiol.* **56**: 1004-1011.

**MacDonald H.L and J.O. Neway.** 1990. Effects of medium quality in the expression of human of human interleukin-2 at high cell density in fermentador cultures of *Escherichia coli* K-12. *Appl. Environ Microbiol.* **56**: 640-645.

**Macek T.** 1963. Liofilization technique. *J. Pharm. Sci.* **52**: 694.

**MacLennan D. G.** 1976. Single cell protein from starch. In continuous culture 6: Application a new fields, 69-84.

**Makoff A. J.M.D. Oxe, M.A. Romanos, N.F. Fairweather and S. Ballantine.** 1989. Expression of tetanus toxin fragment C in *E. coli*: high level expression by removing rare codons. *Nucl. Acids. Res.* **17**: 10191-10202.

**Makowitz M. y A. Gayler.** 1967. La fiebre reumática. Diagnóstico, tratamiento y prevención. V II de la serie Problemas actuales de la Pediatría Clínica. Ed. Científico-Médica. Barcelona.

**Makrides S.D.** 1996. Strategies for achieving high-level expression of genes in *Escherichia coli*. *Microbiol. Rev.* **60**: 512-538.

**Marston F.A.** 1986. The purification of eukaryotic polypeptides synthesized in *Escherichia coli*. *Biochem. J.* **240**: 1-12.

**Mattanovich D., R. Weik, S.Thim, W. Kramer, K. Bayer and H. Katinger.** 1996. Optimization of recombinant gene expresion in *E.coli*. *Annals N Y Acad Sci.* **15**: 182-190.

**Mendelhall W., R. Scheaffer and D. Wackerly.** 1995. Mathematical statistic with application. 5<sup>th</sup> ed. Duxbury, Press. Chapter 15.

**McCarty M.** 1980. Streptococci: 608-622. In B. D. Davis, R. Dulbecco, H. N. Eisen, and H. S. Ginburg (ed.), *Microbiology*, 3<sup>rd</sup> ed. Harper & Row, Publishers, Inc., New York, N.Y.

- Minas W. and J.E. Bailey.** 1995. Co-overexpression of *PrIF* increases cell viability and enzyme yields in recombinant *Escherichia coli* expressing *Bacillus stearothermophilus*  $\alpha$ -amylase. *Biotechnol. Prog.* **11**: 403-411.
- Miraballes I., A. Martín and R. Hidalgo.** 1997. Chloro-activated latex for covalent coupling of antibodies. Application to immunoassays. *J. Biomater. Sci. Polym. Ed.* **10**: 765-777.
- Montgomery, D.C.** 1991. Diseño y análisis de experimentos. Editorial Grupo iberoamérica: 175-509.
- Moore J., A. Engelberg and A. Beiroch.** 1988. Using PC/Gene for protein and nucleic acid analysis. *Biotechniques* **6**: 566-572.
- Morino T., M. Morita, K. Seya, Y. Sukenaga, K. Kato and T. Nakamura.** 1988. Construction of a runaway vector and its use for a high-level expression of a cloned human superoxide dismutase gene. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **28**: 170-175.
- Morrow R.** 1981. A quantitative method of assesing the health impact of different diseases in less developed countries. *Int. J. Epidemiol.* **46**: 715-742.
- Moscoso del Prado J. and C. Serrano.** 1989. An ELISA method for the quantification of anti-streptolysin-O antibodies. *J. of Immunol. Meths.* **124**: 219-223.
- Muñoz C., A. Nieto, A. Gaya, J. Martínez and J. Vives.** 1986. New experimental criteria for optimization of solid-phase antigen concentration and stability in ELISA. *J. Immunol. Methods.* **94**: 137.
- Nakatsuka K.** 1993. Serum anti-streptococcal IgA, IgG and IgM antibodies in IgA-associated diseases. *Acta Paediatr. Jpn.* **35**:118-123.

**Narciandi R.E., F.J. Morbe, U. Knupfer, R. Wenderoth and D. Riesenber.** 1994. Production of K1 (Streptokinase) using batch and fed-batch culture of recombinant *E.coli*. *Advances in Bioprocess Engineering*.447-453.

**Neill S. M and T.B. Mallory.** 1926. Studies on the oxidation and reduction of immunological substances. IV. Streptolysin. *J. Exp. Med.* **44**: 241.

**Neubauer P., K. Hofmann, O. Holst, B. Mattiasson, and P. Kruschke.** 1992. Maximizing the expression of a recombinant gene in *E.coli* by manipulation of induction time using lactose as inducer. *Appl. Microbiol, Biotechnol.* **36**: 739-744.

**Niedermeyer W.** 1985. Interaction of streptolysin-O with biomembranes. *Toxicon.* **23**: 425-439.

**Nieto A., A. Gaya, C. Moreno y J. Vives.** 1984. Nuevo método para determinar la adsorción de proteínas a las placas de poliestireno usadas en ELISA. *Inmunología* **3**: 25.

**Nilsson J., P. Nilsson, Y. Williams, L. Petterson, M. Uhlén and P. Nygren.** 1994. Competitive elution of protein A fusion proteins allows specific recovery under mild conditions. *Eur. J. Biochem.* **224**: 103-108.

**Nyri L. and M. Charles.** 1977. Economic status of fermentation processes. *Ann. Rep. Ferm. Processes.* **1**: 365-381.

**O'Connor G.M, F. Sánchez-Riera and C.L. Cooney.** 1992. Design and evaluation of control strategies for high cell density fermentations. *Biotechnology and Bioengineering.* **39**:393-304.

**Old R.W. and S.B. Primrose.** 1989. Principles of gene manipulation. Blackwell Scientific Publications, U.K: 205-223.

**Olins P.O., C.S. Devine, S.H. Rangwala and K.S. Kavka.** 1988. The T7 phage gene 10 leader RNA, a ribosome-binding site that dramatically enhances the expression of foreign genes in *Escherichia coli*. *Gene* **73**: 227-235.

**O.M.S.** 1980. Lucha comunitaria contra la cardiopatía reumática en los países en desarrollo. Estrategias de prevención y lucha. *Crónica O.M.S.* **34**: 425-432.

**O.M.S.** 1986. Prevención y lucha contra las enfermedades cardiovasculares en la comunidad. Informe de un comité de expertos de la OMS. *OMS*, serie de informes técnicos. N° 732.

**O.M.S.** 1988. Fiebre reumática y Cardiopatía reumática. Informe de un grupo de estudio de la OMS. Serie de informes técnicos 764. *OMS*, Ginebra.

**Okita B., E. Arcuri, K. Turner, D. Sharr, B Del Tito, J. Swanson, A. Shatzman and D. Zabriskie.** 1989. Effect of induction temperature on the production, and of malaria antigens in recombinant *E.coli*. *Biotechnol. Bioeng.* **34**: 854-862.

**Oxer M., C. Bentley, J. Doyle, T. Peakman, I. Charles and A. Jakoff.** 1991. High level heterologous expresssion in *E.coli* using the anaerobically-actived *nirB* promoter. *Nucleic Acids Res.* **19**: 2889-2892.

**Pape M.** 1977. The competition between microbial and chemical processes for the manufacture of basic chemicals and intermediates. In *Microbial energy conversion*: 510- 530. Pergamon Press, Oxford.

**Park S. and D.D. Ryu.** 1990. Effect of operating parameters on specific production rate of a cloned-gene product and performance of recombinant fermentation process. *Biotechnol. Bioeng.* **35**: 287-295.

**Peña F.J.** 1983. Importancia de la determinación de la ASLO, anti-DNasa y anti-DNasa B, en el serodiagnóstico de las enfermedades reumáticas. *Análisis Clínicos, VIII.* **32**: 192- 202.

**Peterson C.** 1992. Control of functional mRNA stability in bacteria: multiple mechanism of nucleolytic and non-nucleolytic inactivation. *Mol. Microb.* **6**:277-282.

**Petrides D.E. Sapidou and J. Calandranis.** 1995. Computer-aided process analysis and economic evaluation for biosynthetic human insulin production a case study. *Biotechnol. Bioeng.* **48**: 529-541.

**Phillips, D.H., M.J. Johnson.** 1961. *J. Biochem. Microbiol. Technol. Eng.* **4**: 261.

**Pinkney M.V. Kapur, J. Smith, U. Weller, M. Palmer, M. Glanville, M. McBner, J.M. Musser, S. Bhakdi and M.A. Kehoe.** 1995. Different forms of streptolysin O produced by *Streptococcus pyogenes* and by *Escherichia coli* expressing recombinant toxins cleavage by streptococcal cysteine protease. *Infect. Immun.* **63**:2776-2779.

**Pirt S.J.** 1975. Principles of Microbe and Cell cultivation. First Edition, Blackwell Scientific Publications. Chapter 9.

**Pratten C.F.** 1971. Economic of scale in manufacturing industry, Department of applied economics occasional papers 28. University Press, Cambridge.

**Rantz L.A. and E. Randall.** 1945. A modification of the technique for determination of the antistreptolysin titer. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* **59**:22-25.

**Raskin P. and R.S. Clements.** 1991. The use of human insulin derived from Baker's yeast by recombinant DNA technology. *Clin. Ther.* **13**: 569 - 578.

**Riesenberg D., K. Menzel, V. Schulz, K. Schumann, G. Veith, G. Zuber and W.A. Knorre.** 1990. High cell density fermentation of recombinant *Escherichia coli* expressing human interferon alpha 1. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **34**: 77-82.

- Rinas U., H. Kracke-Helm and K. Schugerl.** 1989. Glucose as a substrate in recombinant strain fermentation technology. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **31**: 163-167.
- Ripley P.** 1979. Process engineering aspects of the treatment and disposal of distillery effluent. *Proc. Biochem.* **14**: 8-10.
- Robbins J. and K. Taylor.** 1989. Optimization of *E.coli* growth by controlled addition of glucosa. *Biotechnology and Bioengineering* **34**: 1289-1294.
- Rodríguez R., J. González, O. Hernández, F. Cáceres, P. Nordet y A. Hernández.** 1999. Fiebre reumática: incidencia en Pinar del Río de 1986 a 1996. *Rev. Cubana Cardiol. Cir. Cardiovasc.* **13**: 98-103.
- Rodríguez G.** 2002. Géneros: Streptococcus y Enterococcus. En Temas de Bacteriología y Virología para C.E.F.A. Departamento de Bacteriología y Virología. Fac. de Medicina. Oficina del libro FEFMUR: 251-264.
- Ron D. and H. Dressler.** 1992. pGSTag a versatile bacterial expression plasmid for enzymatic labelling of recombinant proteins. *BioTechniques* **13**: 866-869.
- Rosenberg M. and D. Court.** 1979. Regulatory sequences involved in the promotion and termination of RNA transcription. *Annu. Rev. Genet.* **13**: 319-353.
- Rudolph R. and H. Lilie.** 1996. *In vitro* folding of inclusion body proteins. *FASEB. J.* **10**: 49-56.
- Ryan W. and S.J. Parulekar.** 1990. Effects of culture conditions on plasmid stability and production of a plasmid-encoded protein in batch and continuous cultures of *Escherichia coli* JM 103 [pUC108]. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **589**: 91-110.

- Ryan W., P. Collier, L. Loredó, J. Pope and R. Sachdev.** 1996. Growth kinetics of *Escherichia coli* and expression of a recombinant protein and its isoforms under heat shock conditions. *Biotechnol. Prog.* **12**: 596-601.
- Ryu D.Y. and J.Y. Oldshue.** 1977. A reassessment of mixing cost in fermentation processes. *Biotech. Bioeng.* **19**: 621-629.
- Saiki R.K., C.A. Chang, C.H. Levenson, T.C. Warren, C.D. Boehm, H.H. Kazazian and H.A. Erlich.** 1988a. Diagnosis of sickle cell anemia and  $\beta$ -thalassemia with enzymatically amplified DNA and non-radioactive allele-specific oligonucleotide probes. *N. Engl. J. Med.* **319**: 537
- Saiki R.K., D.H. Gelfand, S. Stoffel, S.J. Scharf, R. Higuchi, G.T. Horn, K.B. Mullis and H.A. Erlich.** 1988b. Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science* **239**: 487.
- Sambrook J., E.F. Fritsch and T. Maniatis.** 1989. Molecular cloning: a laboratory manual. 2nd.ed. New York: Cold Spring Harbor, Laboratory Press: 21-105.
- Savic D., W.M. McShan and J.J. Ferretti.** 2002. Autonomous expression of the *slo* gene of the bicistronic *nga-slo* operon of *Streptococcus pyogenes*. *Infect. Immun.* **70**: 2730-2733.
- Savic D and J.J. Ferretti.** 2003. Novel genomic rearrangement that affects expression of the *Streptococcus pyogenes* Streptolysin-O (*slo*) gene. *Journal of Bacteriology* **185**: 1857-1869.
- Scandella C., and T. Petterson.** 1991. Industrial purification of recombinant human superoxido dismutasa. *Bioseparation* **1**: 367.
- Schoner B., R. M. Belagaje and R.G. Schoner.** 1990. Enhanced translational efficiency with two-cistron expression system. *Methods Enzymol.* **185**: 94-103.

- Seo J. and J.E. Bailey.** 1985. Effects of recombinant plasmid content on growth properties and cloned gene product formation in *Escherichia coli*. *Biotechnol. Bioeng.* **27**: 1668-1674.
- Shin C.S., M. S. Hong. C. S. Bae and J. Lee.** 1997. Enhanced production of human mini-proinsulin in fed-batch cultures at high cell density of *Escherichia coli* BL21 (DE3)[pET-3aT2M2]. *Biotechnol. Prog.* **13**: 249-257.
- Shugerl K., J. Lucke, J. Lehmann and F. Wagner.** 1978. Application of tower bioreactors in cell mass production. *Adv. Biochem. Bioeng.* **8**: 63-131.
- Siegel A. C., E. Johnson and G.H. Stollerman.** 1961. Controlled studies of streptococcal pharyngitis in a pediatric population. I. Factors related to the attack rate of rheumatic fever. *N. Engl. J. Med.* **265**: 559-566.
- Siegel R. and D.D. Ryu.** 1985. Kinetic study of instability of recombinant plasmid pPLc23trpA1 in *E. coli* using two stage continuous culture system. *Biotechnol. Bioeng.* **27**: 28-33.
- Smith R.A. and J.S. Parkinson.** 1980. Overlapping genes at the *cheA* locus of *Escherichia coli*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **77**:5370-5374.
- Smith P.K., R.I. Krohn, G.T. Hermanson, A.K. Mallia, F.H. Gartner, M.D. Provenzano, E.K. Fujimoto, N.M. Goeke, B.J. Olson and D.C. Klenk.** 1985. Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Anal. Biochem.* **150**:76-85.
- Smith D. B.** 1993. Purification of glutathione-S-transferase fusion proteins. *Methods in Molecular and Cellular Biology* **4**:220-229.
- Smyth R. A. and J. L. Duncan.** 1978. Thiol-activated (oxygen- labile) cytolysins, p. 129-183. *In* J. Jeljaszewicz, and T. Wadström (ed.), Bacterial toxins and cell membranes. Academic Press, Inc., New York.

**Spanjaard R. A. and J. Van Duin.** 1988. Translation of the sequence AGG-AGG yields 50% ribosomal frameshift. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **85**:7967-7971.

**Spiller D.G., R.V. Giles, J. Grzybowski, D.M. Tidd and R.E. Clark.** 1998. Improving the intracellular delivery and molecular efficacy of antisense oligonucleotides in chronic myeloid leukaemia cells: a comparison of streptolysin-O permeabilization, electroporation, and lipophilic conjugation. *Blood.* **91**:4738-4746.

**Spivey M.J.** 1978. The acetone/butanol/ethanol fermentation. *Proc. Biochem.* **13**: 2-4, 25.

**Stader M.L. and T.J. Silhavy.** 1990. Engineering *Escherichia coli* to secrete heterologous gene products. *Methods Enzymol.* 185: 166-187.

**Stanbury P.F and A. Whitaker.** 1987. Principles of fermentation technology. Pergamon press. Capítulo **12**: 231-245.

**Stollerman G.H., M. Markowitz, L. Wannamaker, A. Taranta and R. Whittemore.** 1965. Jones criteria (revised) for guidance in the diagnosis of rheumatic fever. *Circulation* **32**: 664-668.

**Stollerman G.** 1989. El retorno de la fiebre reumática. *Hosp. Prac, ed.esp.* **4**: 43-61.

**Stollerman G.** 1992. Rheumatic fever. In Braunwald, E. Heart Disease. Saunders. Philadelphia: 1721-1742.

**Stowell J.D. and J.B. Bateson.** 1984. Economic aspects of industrial fermentation. In Bioactive microbial products. Development and Production. Academic Press, London. **2**: 117-139.

- Strasser T.** 1981. The community control of rheumatic fever and rheumatic heart disease: report of a WHO international cooperative project. *Bulletin of WHO* **59**: 285.
- Strasser T.** 1985. Cost-effective control of rheumatic fever in the community. *Edu. Health Serv. Deliv. Regul.* **5**: 159-164.
- Stueber D. and H. Bujard.** 1982. Transcription from efficient promoters can interfere with plasmid replication and diminish expression of plasmid specified genes. *EMBO J.* **1**: 1399-1404.
- Sumino, Y., S. Akiyama and H. Fukuda.** 1972. Performance of the shaking flask. *Ferment. Technol.* **50**: 203-208.
- Talmadge K. and W. Gilbert.** 1982. Cellular location affects protein stability in *Escherichia coli*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **79**: 1830-1833.
- Taranta A. y M. Markowitz.** 1982. La fiebre reumática M.T.P. 1982 Press Limited Boston.
- Taylor I. J. and P.J. Senior.** 1978. Single cell proteins: a new source. *Endeavour* **2**: 31-34.
- Tempest D.W. and O. Neijssel.** 1987. Growth yield and energy distribution. In *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium*: cellular and molecular biology. Neidhardt, F. et. Al., Eds. *American Society for Microbiology*. Washington, D.C. **1**: 797-806.
- Thain A., K. Gaston, O. Jenkins and A. Clarke.** 1996. A method for the separation of GST fusion proteins from co-purifying Gro EL. *Trends in genetics* **12**: 209-210.

**Tierney L., S. McPhee and M. Papadakis.** 2001. Fiebre reumática aguda y cardiopatía reumática. En: Diagnóstico clínico y tratamiento. Manual Moderno. 36a ed. México, 424-426.

**Todd E. W.** 1932. Antigenic streptococcal hemolysin. *J. Exp. Med.* **55**: 267.

**Torres R.P.** 1994. Febre reumática. Epidemiologia e prevenção. *Arq. Bras. Cardiol*, **63**: 439-440.

**Towbin H., T. Staehelin and J. Gordon.** 1979. Electrophoretic transfer of protein from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **76**:4350-4354.

**Trejo, G., A. Jiménez, M. Rodríguez, A. De Jesús and G. Gutiérrez.** 2001. Influence of cobalt and other microelements on the production of betalains and the growth of suspension cultures of *Beta vulgaris L.* *Plant Cell, Tissue Organ Culture* **67**: 19-23.

**Tunac J.B.** 1989. High-aereation capacity shake-flask system. *J. Ferment. Bioeng.* **68**: 157-159.

**Uhlén M., T. Morks and L. Abrahmsen.** 1988. Protein engineering to optimize recombinant protein purification. Industrial Biochemistry and Biotechnology Group Colloquium. Organized and Edited by F.A.O Marton (Celltech Ltd, Slough) and R.B. Freedman (University of Kent): 101-115.

**Uhlén M. and T. Moks.** 1990. Gene fusions for purpose of expression: an introduction. *Methods Enzymol.* 185: 129-143.

**Van de Walle M. and S. Shiloach J.** 1998. Proposed mechanism of acetate accumulation in two recombinant *Escherichia coli* strains during high density fermentation. *Biotechnol Bioeng.* **57**: 71-78.

- Vasina J.A., M.S. Peterson MS and F. Baneyx.** 1998. Scale-up and optimization of the low-temperature inducible *cspA* promoter system. *Biotechnol Prog.* **14**: 714-721.
- Vásquez J. R., L. Evnin, J. Higaki and C. S. Craik.** 1989. An expression system for trypsin. *J. Cell. Biochem.* **39**: 265-276.
- Veasy L., S. Wiedneier and G. Orsmond.** 1987. Resurgence of acute rheumatic fever of the area of the USA. *N. Engl. J. Med.* **316**: 421-427.
- Wang D., C.I. Cooney, A.L. Demain, P. Dunnill and M.D. Liley.** 1979. Fermentation and enzyme technology. Wiley, N.Y. Capítulos 9 y 10.
- Wannamaker L.W.** 1972. Perplexity and precision in the diagnosis of streptococcal pharyngitis. *Am. J. Dis. Child.* **124**: 352-358.
- Wannamaker L.W.** 1973. The chain that links the heart to the throat. *Circulation* **48**: 9-18.
- Wegrzyn G. and A. Wegrzyn.** 2002. Stress responses and replication of plasmids in bacterial cells. *Microbiol Cell Factories* **1**: 2-11.
- Weiss, B., A. Jacquemin-Sablon, T. Live, G.C. Fareed and C.C Richardson.** 1968. Enzymatic breakage and joining of deoxyribonucleic acid. VI Further purification and properties of polynucleotide ligase from *Escherichia coli* infected with bacteriophage T4. *J. Biol. Chem.* **243**: 4543.
- Weller U., L. Müller, M. Messner, M. Palmer, A. Valeva, J. Trantum-Jensen, P. Agrawal, C. Bjermann, A. Dobereiner, M. Kehoe and S. Bhakdi.** 1996. Expression of active streptolysin O in *Escherichia coli* as a maltose binding-protein-streptolysin-O fusion protein. The N-terminal 70 amino acids are not required for haemolytic activity. *Eur. J. Biochem.* **236**:34-39.

**Wernan W.C. and C.R. Wilki.** 1973. New method for evaluation of dissolved oxygen response for  $K_a$  determination. *Biotech. Bioeng.* **15**: 571.

**Whitnack E., and G.H. Stollerman.** 1985. Antistreptococcal antibodies in the diagnosis of Rheumatic Fever. In: Laboratory Diagnostic Procedures in the Rheumatic Diseases. Journe, Stratton, 273.

**Williams D.C., R.M. Van Frank, W. L. Muth and J.P. Burnett.** 1982. Cytoplasmic inclusion bodies in *Escherichia coli* producing biosynthetic human insulin proteins. *Science.* **215**: 687-689.

**Wong H. and S. Chang.** 1986 Identification of a positive retroregulator that stabilizes mRNA in bacteria. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **83**: 3233-3237.

**World Health Organization Expert Committee.** 1966. Prevention of rheumatic fever. WHO *Tech. Rep. Ser* **342**:1-27.

**World Health Organization.** 1998. Rheumatic fever and rheumatic heart disease. Report of a WHO study group. Technical Report Series **764**:3-11.

**Wright J.F.** 1999. Bioassays and biological stability. *Dev Biol Stand.* **97**:73-80.

**Wyngaarden J.B. y L.H. Smith.** 1987. CECIL. Tratado de Medicina Interna. 17<sup>o</sup> Ed. VII: 1696-1701.

**Yamada S., M. Wada and I. Chibatta.** 1978. Oxygen transfer in shake flask cultures and the conversion of survive by *Acetobacter suboxydans*. *J. Ferment. Technol.* **56**: 20-28.

**Yamada S., M. Seki, H. Kato and S. Yamashita.** 1995. Expression of streptolysin-O gene in *Bacillus subtilis*. *Biosci. Biotech. Biochem.* **59**: 363-366.

**Yang X. M.** 1992. Optimization of a cultivation process for recombinant protein production by *E.coli* . *J. Biotechnol.* **23**: 271-289.

**Yanisch-Perron, C. J. Vieira and J. Messing.** 1985. Improved M13 phage cloning vectors and host strains: Nucleotide sequences of the M13mp18 and pUC19 vectors. *Gene* **33**: 103.

**Yary E.F.** 1996. A review of the epidemiology and prevention of rheumatic heart disease. *Cardiovascular review* :10-26.

**Yee L. and H .W. Blanch.** 1992. Recombinant protein expression in high cell density fed-batch cultures of *Escherichia coli*. *Biotechnonology* **10**: 1550-1555.

**Zabriskie D.W., D.A. Wareheim and M. Polansky.** 1987. Effects of fermentation feeding strategies prior to induction of expression of a recombinant malaria antigen in *Escherichia coli*. *J. Ind. Microbiol.* **2**: 87-95.

**Zhang F., M.A. Saarinen, L.J. Itle, S.C. Lang, D.W. Murhammer and R.J. Linhardt.** 2002. The effect of dissolved oxygen (DO) concentration on the glycosylation of recombinant protein produced by the insect cell-baculovirus expression system. *Biotechnol Bioeng.* **77**: 219-224.

# ANEXOS

## TRATAMIENTO ESTADÍSTICO

### Diseño Factorial $2^k$

Un factor es cualquier aspecto de un experimento o proceso que es capaz de modificar el resultado (respuesta). Entonces, la modificación de la respuesta, es el efecto del factor.

En este diseño se trabaja con “k” factores a dos niveles cada uno. A estos niveles se los denomina arbitrariamente “inferior” y “superior”, y se denotan “-“ y “+” respectivamente. Los factores en cambio, se designan con letras mayúsculas (A, B, etc) y sus interacciones como AB, AC, BC, etc.

Para analizar el efecto de cada uno de los factores y de las interacciones entre ellos, se realizan  $2^k$  corridas experimentales que corresponden a todas las combinaciones posibles. Los efectos principales de los k – factores y sus respectivas interacciones de segundo orden y de orden superior representan las filas de tratamientos en el cuadro de análisis de varianza (ANOVA) correspondiente a este diseño.

Cabe mencionar que para llevar a cabo el tratamiento de datos a través del cuadro de ANOVA es necesario disponer de repeticiones que permitan una estimación estadística del error aleatorio. En caso de que no se disponga de repeticiones sólo se puede examinar la magnitud y dirección de los efectos de los factores, a través de los contrastes. Esto permite determinar cuales factores es probable que sean importantes.

**$2^k$  completo replicado:**

- \* Los k factores se presentan en dos niveles codificados como – y +
- \* Combinaciones posibles:  $2^k$
- \* Con “r” replicas, dando un total de  $r \cdot 2^k$  tratamientos elementales

## Diseño 2-factorial

En éste tipo de diseño se trabaja sólo con dos factores, de donde deriva su nombre: diseño 2-factorial (también conocido como diseño bifactorial).

A diferencia de otros diseños, en este caso se permiten varios niveles distintos para cada factor. A su vez los dos factores involucrados pueden ser de efectos fijos (cuando pueden ser prefijados por el experimentador), de efectos aleatorios (en este caso no es posible prefijarlos) o un tercer caso en que un efecto es fijo y el restante es aleatorio. En todos los diseños bifactoriales planteados en esta tesis se trabaja con efectos fijos.

En este diseño los tratamientos corresponden a todas las combinaciones posibles de los dos factores en todos los niveles que se presentan. Al igual que otros diseños, se requieren repeticiones para la estimación del error estadístico y de ese modo poder completar el cuadro de ANOVA.

**Bifactorial de efectos fijos:**

El factor A presenta "a" niveles

El factor B presenta "b" niveles

Se deben realizar  $a*b$  tratamientos elementales

Con "r" repeticiones, da un total de  $r*a*b$  tratamientos

## Anexo correspondiente al capítulo 4

Se trabajó con diseños bifactorial de efectos fijos.

### A.1.-Expresión de GST-SLOR en matraces

#### A.1.1.- Evaluación de los factores porcentaje de medio de cultivo y temperatura de inducción en la expresión de GST-SLOR citoplásmica en fase soluble

**Factor A:** Temperatura de inducción

**Factor B:** Porcentaje de medio de cultivo respecto al volumen total del matraz

Factor	Niveles				
	1	2	3	4	5
A	28°C	37°C	-	-	-
B	5%	10%	20%	50%	75%

Cuadro de Observaciones

Tratamientos	Réplicas (mg/mL)		Totales (mg/mL)
A1B1	< 0.010	< 0.010	-
A1B2	< 0.010	< 0.010	-
A1B3	0.011	0.012	0.023
A1B4	0.211	0.245	0.456
A1B5	0.202	0.209	0.411
A2B1	0.028	0.032	0.060
A2B2	0.056	0.063	0.119
A2B3	0.179	0.187	0.366
A2B4	0.514	0.567	1.081
A2B5	0.440	0.403	0.843

Cuadro de ANOVA

Fuentes de Variación		S C	G de L	C M
Tratamientos	A	0.1247	1	0.1247
	B	0.4619	4	0.1155
	AB	0.0535	4	0.0134
Error		0.0027	10	0.0003
Total		0.6429	19	

Cuadro estadístico y valores tabulados

Hipótesis Nula	Modelo I factores A y B fijos	Valores críticos de $F_{0.95}$	Valores críticos de $F_{0.99}$
A homogéneo	452.461	4.960	10.040
B homogéneo	418.949	3.480	5.990
no existe interacción AB	48.532	3.480	5.990

### A.1.2.- Evaluación de la expresión de GST-SLOr citoplásmica en fase soluble a distintas temperaturas de inducción y concentración de inductor

**Factor A:** Temperatura de inducción

**Factor B:** Concentración de inductor

Factor	Niveles			
	1	2	3	4
A	28°C	37°C	-	-
B	0.00 mM	0.01 mM	0.10 mM	1.00 mM

Cuadro de Observaciones

Tratamientos	Réplicas (mg/mL)		Totales (mg/mL)
A1B1	0.044	0.029	0.073
A1B2	0.177	0.169	0.346
A1B3	0.154	0.163	0.317
A1B4	0.150	0.201	0.351
A2B1	< 0.010	< 0.010	-
A2B2	0.740	0.700	1.440
A2B3	0.560	0.570	1.130
A2B4	0.660	0.620	1.280

Cuadro de ANOVA

Fuentes de Variación		S C	G de L	C M
Tratamientos	A	0.4771	1	0.4771
	B	0.4639	3	0.1547
	AB	0.2044	3	0.0681
Error		0.0031	8	0.0004
Total		1.1486	15	

Cuadro estadístico y valores tabulados

Hipótesis Nula	Modelo I factores A y B fijos	Valores críticos de $F_{0.95}$	Valores críticos de $F_{0.99}$
A homogéneo	1217.377	5.320	11.260
B homogéneo	394.536	4.070	7.590
no existe interacción AB	173.844	4.070	7.590

### A.1.3.- Expresión de GST-SLOR en diferentes cepas de *E. coli* con distintos volúmenes de medio de cultivo y distintas temperaturas de inducción

#### A.1.3.1.- Inducidas a 28°C

**Factor A:** Cepa de *E. coli*

**Factor B:** Porcentaje de medio de cultivo respecto al volumen total del matraz

Factor	Niveles			
	1	2	3	4
A	XL	JM109	DH1	RB791
B	10%	20%	50%	-

Cuadro de Observaciones

Tratamientos	Réplicas (mg/mL)		Totales (mg/mL)
A1B1	0.056	0.049	0.105
A1B2	< 0.010	< 0.010	-
A1B3	< 0.010	< 0.010	-
A2B1	< 0.010	< 0.010	-
A2B2	< 0.010	< 0.010	-
A2B3	0.168	0.153	0.321
A3B1	< 0.010	< 0.010	-
A3B2	< 0.010	< 0.010	-
A3B3	0.840	0.900	1.740
A4B1	< 0.010	< 0.010	-
A4B2	< 0.010	< 0.010	-
A4B3	0.169	0.150	0.319

Cuadro de ANOVA

Fuentes de Variación		S C	G de L	C M
Tratamientos	A	0.2833	3	0.0944
	B	0.4521	2	0.2260
	AB	0.6290	6	0.1048
Error		0.0021	12	0.0002
Total		1.3665	23	

Cuadro estadístico y valores tabulados

Hipótesis Nula	Modelo I factores A y B fijos	Valores críticos $F_{0.95}$	Valores críticos $F_{0.99}$
A homogéneo	535.103	3.490	5.950
B homogéneo	1281.116	3.890	6.930
no existe interacción AB	594.111	3.000	4.820

### A.1.3.2.- Inducidas a 37°C

**Factor A:** Cepa de *E. coli*

**Factor B:** Porcentaje de medio de cultivo respecto al volumen total del matraz

Factor	Niveles			
	1	2	3	4
A	XL	JM109	DH1	RB791
B	10%	20%	50%	-

Cuadro de Observaciones

Tratamientos	Réplicas (mg/mL)		Totales (mg/mL)
A1B1	< 0.010	< 0.010	-
A1B2	< 0.010	< 0.010	-
A1B3	< 0.010	< 0.010	-
A2B1	< 0.010	< 0.010	-
A2B2	0.333	0.349	0.682
A2B3	0.705	0.609	1.314
A3B1	< 0.010	< 0.010	-
A3B2	0.220	0.320	0.540
A3B3	< 0.010	< 0.010	-
A4B1	< 0.010	< 0.010	-
A4B2	0.301	0.385	0.686
A4B3	0.320	0.298	0.618

Cuadro de ANOVA

Fuentes de Variación		S C	G de L	C M
Tratamientos	A	0.38160	3	0.1272
	B	0.3072	2	0.1536
	AB	0.3647	6	0.0608
Error		0.0135	12	0.0011
Total		1.0670	23	

Cuadro estadístico y valores tabulados

Hipótesis Nula	Modelo I factores A y B fijos	Valores críticos $F_{0.95}$	Valores críticos $F_{0.99}$
A homogéneo	113.018	3.490	5.950
B homogéneo	136.489	3.890	6.930
No existe Interacción AB	54.002	3.000	4.820

#### A.1.4.- Expresión de GST-SLOr en distintas cepas *E. coli* a diferentes temperaturas de inducción

**Factor A:** Temperatura de Inducción

**Factor B:** Cepa de *E. coli*

Factor	Niveles				
	1	2	3	4	5
A	28°C	37°C	-	-	-
B	TG2	XL	JM109	DH1	RB791

Cuadro de Observaciones

Tratamientos	Réplicas(mg/mL)		Totales (mg/mL)
A1B1	0.175	0.180	0.355
A1B2	< 0.010	< 0.010	-
A1B3	0.168	0.153	0.321
A1B4	0.840	0.900	1.740
A1B5	0.169	0.150	0.319
A2B1	0.698	0.710	1.408
A2B2	< 0.010	< 0.010	-
A2B3	0.705	0.609	1.314
A2B4	< 0.010	< 0.010	-
A2B5	0.320	0.298	0.618

Cuadro de ANOVA

Fuente de Variación		S C	G de L	C M
Tratamientos	A	0.0183	1	0.0183
	B	0.5764	4	0.1441
	AB	1.2845	4	0.3211
Error		0.0070	10	0.0007
Total		1.8864	19	

Cuadro estadístico y valores tabulados

Hipótesis Nula	Modelo I factores A y B fijos	Valores críticos $F_{0.95}$	Valores críticos $F_{0.99}$
A homogéneo	26.042	4.960	10.040
B homogéneo	205.073	3.480	5.990
no existe interacción AB	457.013	3.480	5.990

## Anexo correspondiente al capítulo 5

Se trabajó con diseños  $2^3$  completo sin repeticiones

### A.2.-Expresión de GST-SLOr en fermentador

#### A.2.1.- Evaluación de las factores $k_L a C_L^*$ y glucosa en FC, inducción

**Factor A:**  $k_L a C_L^*$  en FC

**Factor B:** Glucosa en FC

**Factor C:** Inducción

Factor	Niveles	
	-	+
A	6 mmol/L/h	80 mmol/L/h
B	0*	1*
C	0**	1**

0\* = sin glucosa; 1\* = con glucosa

0\*\* = sin inducción; 1\*\* = con inducción

Experiencias	A	B	C	Resultados (GST-SLOr mg/L)
1	-	-	-	0.840
2	+	-	-	< 0.010
3	-	+	-	0.060
4	+	+	-	0.390
5	-	-	+	1.315 (*)
6	+	-	+	0.270 (*)
7	-	+	+	0.570 (*)
8	+	+	+	15.967 (*)

(\*) Datos promediados

Factor		Contraste
Principal	A	3.460
	B	3.640
	C	4.208
Interacciones	AB	4.403
	AC	3.715
	BC	3.835
	ABC	3.818

### A.2.2.- Evaluación de los factores $k_L a C_L^*$ en FI, glucosa en FC, inducción

**Factor A:**  $k_L a C_L^*$  en FI

**Factor B:** Glucosa en FC

**Factor C:** Inducción

Factor	Niveles	
	-	+
A	6 mmol/L/h	80 mmol/L/h
B	0*	1*
C	0**	1**

0\* = sin glucosa; 1\* = con glucosa

0\*\* = sin inducción; 1\*\* = con inducción

Experiencias	A	B	C	Resultados (GST-SLOr mg/L)
1	-	-	-	0.840
2	+	-	-	< 0.010
3	-	+	-	0.169 (*)
4	+	+	-	< 0.010
5	-	-	+	1.315 (*)
6	+	-	+	0.270 (*)
7	-	+	+	15.967 (*)
8	+	+	+	0.225 (*)

(\*) Datos promediados

Factor		Contraste
Principal	A	-4.449
	B	3.484
	C	4.192
Interacciones	AB	-3.506
	AC	-3.944
	BC	3.819
	ABC	-3.842

### A.2.3.- Evaluación de los factores $k_L a C_L^*$ en FC, glucosa en FI, inducción

**Factor A:**  $k_L a C_L^*$  en FC

**Factor B:** Glucosa en FI

**Factor C:** Inducción

Factor	Niveles	
	-	+
A	6 mmol/L/h	80 mmol/L/h
B	0*	1*
C	0**	1**

0\* = sin glucosa; 1\* = con glucosa

0\*\* = sin inducción; 1\*\* = con inducción

Experiencias	A	B	C	Resultados (GST-SLOr mg/L)
1	-	-	-	0.840
2	+	-	-	0.028 (*)
3	-	+	-	0.060
4	+	+	-	0.195 (*)
5	-	-	+	1.315 (*)
6	+	-	+	3.100 (*)
7	-	+	+	0.570 (*)
8	+	+	+	15.967 (*)

(\*) Datos promediados

Factor		Contraste
Principal	A	4.126
	B	2.877
	C	4.957
Interacciones	AB	3,639
	AC	4.465
	BC	3.184
	ABC	3.166

#### A.2.4.- Evaluación de los factores $k_L a C_L^*$ y glucosa en FI, inducción

**Factor A:**  $k_L a C_L^*$  en FI

**Factor B:** Glucosa en FI

**Factor C:** Inducción

Factor	Niveles	
	-	+
A	6 mmol/L/h	80 mmol/L/h
B	0*	1*
C	0**	1**

0\* = sin glucosa; 1\* = con glucosa

0\*\* = sin inducción; 1\*\* = con inducción

Experiencias	A	B	C	Resultados (GST-SLOr mg/L)
1	-	-	-	0.448 (*)
2	+	-	-	< 0.010
3	-	+	-	0.390
4	+	+	-	< 0.010
5	-	-	+	3.100 (*)
6	+	-	+	0.270 (*)
7	-	+	+	15.967 (*)
8	+	+	+	0.225 (*)

(\*) Datos promediados

Factor		Contraste
Principal	A	-4.852
	B	3.191
	C	4.681
Interacciones	AB	-3.213
	AC	-4.433
	BC	3.220
	ABC	-3.242

### A.3.-Estudio de formulación de producto final

#### A.3.1.- Evaluación de los factores BSA, sacarosa y cisteína

Se realizó un diseño experimental  $2^3$  completo replicado (8 combinaciones posibles, con su correspondiente repetición, obteniéndose un total de 16 corridas).

**Factor A:** BSA

**Factor B:** Sacarosa

**Factor C:** Cisteína

Factor	Niveles	
	-	+
A	0 mg/mL	1 mg/mL
B	0 mg/mL	1 mg/mL
C	0%	0.48%

Experiencias	Formulaciones (código)	A (BSA)	B (sacarosa)	C (cisteína)	Hemólisis Total
1	<i>A</i>	-	-	-	200
2	<i>B</i>	+	-	-	<200
3	<i>H</i>	-	+	-	400
4	<i>C</i>	+	+	-	1600
5	<i>F</i>	-	-	+	200
6	<i>D</i>	+	-	+	<200
7	<i>G</i>	-	+	+	<200
8	<i>E</i>	+	+	+	200
9	<i>A</i>	-	-	-	200
10	<i>B</i>	+	-	-	<200
11	<i>H</i>	-	+	-	400
12	<i>C</i>	+	+	-	800
13	<i>F</i>	-	-	+	200
14	<i>D</i>	+	-	+	<200
15	<i>G</i>	-	+	+	<200
16	<i>E</i>	+	+	+	400

Media = 287.500

Sigma = 412.9164

Cuadro de ANOVA

	<b>S C</b>	<b>G de L</b>	<b>C M</b>	<b>F</b>
<b>A</b>	122500	1	122500	2.882
<b>B</b>	562500	1	562500	13.235 <sup>(1)y (2)</sup>
<b>C</b>	422500	1	422500	9.941 <sup>(2)</sup>
<b>AB</b>	562500	1	562500	13.235 <sup>(1) y (2)</sup>
<b>AC</b>	62500	1	62500	1.470
<b>BC</b>	422500	1	422500	9.941 <sup>(2)</sup>
<b>ABC</b>	62500	1	62500	1.470
<b>Error</b>	340000	8	42500	
<b>Total</b>	2557500	15		

(1) significativo al 99%

(2) significativo al 95%

Valores tabulados de  $F$ :

$$F_{0,95}(1,8) = 5.320$$

$$F_{0,99}(1,8) = 11.260$$

### A.3.2. Evaluación de los factores sacarosa y glicina

Se trabajó con dos factores a distintos niveles. Se realizó diseño bifactorial replicado de efectos fijos (4 niveles para el factor A y 3 niveles para el factor B por lo cual se requieren 12 tratamientos).

**Factor A:** Sacarosa

**Factor B:** Glicina

Factor	Niveles			
	1	2	3	4
A	0 mg/mL	1 mg/mL	5 mg/mL	10 mg/mL
B	0 mg/mL	0.1 mg/mL	1 mg/mL	-

Tratamientos	Formulaciones (código)	Hemólisis total (Réplicas)	Totales
A1B1	A	200 - 200	400
A1B2	K	400 - 200	600
A1B3	L	800 - 800	1600
A2B1	H	400 - 400	800
A2B2	M	1600 - 1600	3200
A2B3	N	1600 - 800	2400
A3B1	I	800 - 800	1600
A3B2	Ñ	200 - 200	400
A3B3	O	400 - 400	800
A4B1	J	1600 - 3200	4800
A4B2	P	400 - 400	800
A4B3	Q	1600 - 800	2400

Cuadro de ANOVA

Fuente de variación		S C	G de L	C M
Tratamientos	A	3591666.670	3	1197222.220
	B	490000.000	2	245000.000
	AB	5843333.330	6	973888.889
Error		1940000.000	12	161666.667
Total		11865000.000	23	

Cuadro estadístico y valores tabulados

<b>Hipótesis Nula</b>	<b>Modelo I factores A y B fijos</b>	<b>Valores críticos de <math>F_{0.95}</math></b>	<b>Valores críticos de <math>F_{0.99}</math></b>
A homogéneo	7.405	3.490	5.950
B homogéneo	1.515	3.890	6.930
no existe interacción AB	6.024	3.000	4.820