

# UNIVERSIDAD DE SONORA

## DIVISIÓN DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y DE LA SALUD

### DEPARTAMENTO DE INVESTIGACIONES CIENTÍFICAS Y TECNOLÓGICAS

ESTUDIO CINÉTICO SOBRE LA LISIS ALCALINA DE *Escherichia coli* DH5 $\alpha$  PARA LA  
RECUPERACIÓN PRIMARIA DEL PLÁSMIDOS pVAX1-NH36



PUEBLA CLARK LUCINDA DEL CARMEN

Hermosillo, Sonora

Agosto de 2012.

# Universidad de Sonora

Repositorio Institucional UNISON



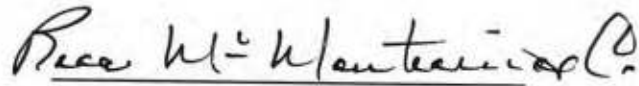
**"El saber de mis hijos  
hará mi grandeza"**



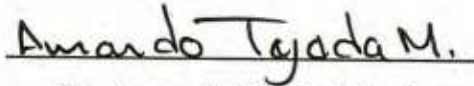
Excepto si se señala otra cosa, la licencia del ítem se describe como openAccess

## FORMATO DE APROBACIÓN

Los miembros del Comité de Tesis designado para revisar la Tesis de Puebla Clark Lucinda del Carmen, la han encontrado satisfactoria y recomiendan que sea aceptada como requisito para obtener el Título de Licenciado en Biología con Opción en Biotecnología.



Dra. Rosa María Montesinos Cisneros  
Director de Tesis



Dr. Armando Tejada Mansir  
Sinodal Secretario



M.C. Esther Carrillo Pérez  
Sinodal



M.C. Mirna Valenzuela Islas  
Suplente

## DEDICATORIA

Para Paulina, Miguelito, Rafita, Leonardo, Santiago y a mi nuevo sobrinito que viene en camino que han sido mi principal fuente de alegría y motivación durante todo este proceso, con la esperanza de que vean esto como un ejemplo de que con esfuerzo y dedicación, sin importar las dificultades, puedes lograr tus metas y que siempre hay que seguir luchando para superarse cada vez más.

Este trabajo también va dedicado a todas las personas que me apoyaron, aconsejaron, escucharon y creyeron en mí durante toda mi preparación académica.

## AGRADECIMIENTOS

Primeramente agradezco a Dios que me ha permitido salir adelante y superarme en todos los aspectos de mi vida, también le agradezco por la familia tan tenaz y con tanto amor que me ha prestado.

Agradezco a la Universidad de Sonora y al Departamento de Investigaciones Científicas y Tecnológicas por la oportunidad que nos brindan a los estudiantes de poder desarrollarnos académicamente dentro de su institución.

A la Dra. Rosa Ma. Montesinos, por ser un gran ejemplo no sólo como investigadora, sino también como persona. Gracias por su tiempo, paciencia y dedicación, su esfuerzo se ve reflejado en nuestros logros.

Al Dr. Tejeda por sus consejos y felicitaciones, por siempre estar dispuesto a ayudar con una sonrisa.

A la M.C. Esther Carrillo por sus observaciones y consejos que fueron de gran utilidad.

A la Dra. Patricia Guerrero por su apoyo y consejos en los procedimientos de este trabajo.

Atenas, Rodolfo, Dámariz y Cindy, gracias por toda su ayuda sin la cual no podría haber realizado este trabajo, gracias por hacer del laboratorio un lugar divertido y ameno para trabajar, gracias por su amistad.

Iván, Manuel, Bernardo, gracias por todo su apoyo y sobretodo su disposición para ayudar a los demás, éxito en sus proyectos.

Nidya y Yazmin, gracias por enseñarme sobre los procedimientos y manejos dentro del laboratorio.

A mi papá Rafael Puebla por ser mi mayor ejemplo de constancia y esfuerzo y el mejor papá que se pueda tener.

A mi mamá Lucinda Clark, porque con tu cariño de madre has sabido aconsejarme y confortarme durante toda mi vida, gracias por todos tus cuidados.

Agradezco a mis hermanos Rafael, Miguel, Jorge, por ser mi principal apoyo ante cualquier dificultad, gracias por todo su cariño y su ejemplo como personas trabajadoras, espero poder tener el mismo éxito que ustedes tienen en todos los aspectos de su vida.

A mis cuñadas Verónica, Georgina y Carolina, por incrementar la fuerza y tenacidad de nuestra familia, y por llenar nuestra casa de alegría con los sobrinos tan maravillosos que nos han dado.

Gracias Adrián por motivarme y apoyarme cada vez que el estrés y la presión tenían una presencia muy fuerte, gracias por todo el amor.

Lulu, Mónica, Melinda, Atenas, Valeria y Erandi, gracias por su amistad, su apoyo, consejos, alegría, todo. Los mejores colegas y amigos que se puedan tener; espero que el tiempo haga que nuestra amistad crezca más.

## CONTENIDO

	<b>Página</b>
<b>FORMATO DE APROBACIÓN</b>	i
<b>DEDICATORIA</b>	ii
<b>AGRADECIMIENTOS</b>	iii
<b>CONTENIDO</b>	v
<b>LISTA DE TABLAS</b>	viii
<b>LISTA DE FIGURAS</b>	ix
<b>RESUMEN</b>	xi
<b>I. INTRODUCCIÓN</b>	1
<b>II. ANTECEDENTES</b>	3
II.1. Terapia Génica y Vacunas de ADN	3
II.2. Plásmidos	4
II.2.1 Características	4
II.2.2. Plásmido pVAX1-NH36 para Leishmaniasis	7
II.3. Producción de Plásmidos	8
II.3.1. Fermentación por lote de la cepa hospedera	9
II.3.2. Recuperación primaria	10
II.3.2.1 Lisis	10
II.4. Análisis de Comparación	14
II.4.1. Cuantificación de proteínas totales (PT) por método de BCA	14

II.4.2. Electroforesis en gel de agarosa	15
II.4.3. Cromatografía líquida de alta presión (HPLC) con columna de interacción hidrofóbica para cuantificar ADNp	15
<b>III. JUSTIFICACIÓN</b>	16
<b>IV. HIPÓTESIS</b>	17
<b>V. OBJETIVOS</b>	18
V.1. Objetivo General	18
V.2. Objetivos Particulares	18
<b>VI. METODOLOGÍA</b>	19
VI.1. Materiales	19
VI.2. Equipo	20
VI.3. Métodos	20
VI.3.1 Preparación de inóculos	20
VI.3.2. Fermentación por lote	21
VI.4. Diseño Experimental	22
VI.4.1. Recuperación Primaria	23
VI.4.1.1. Lisis	23
VI.4.2. Determinación de PT con kit BCA (Ácido bicinconínico)	23
VI.4.3. Electroforesis de agarosa	25
VI.4.4. HPLC con columna de interacción hidrofóbica para cuantificación de ADNp.	26



<b>VII. RESULTADOS</b>	28
VII.1. Determinación de PT con kit BCA	28
VII.2. Electroforesis	29
VII.3. Cromatogramas Obtenidos por HPLC con Columna de Interacción Hidrofóbica	30
<b>VIII. DISCUSIÓN</b>	35
<b>IX. CONCLUSIONES</b>	37
<b>X. LITERATURA CITADA</b>	38
Apéndice I	42
Apéndice II	43

## LISTA DE TABLAS

Tabla I	Caracterización de ácidos nucleicos y otros componentes de una célula de <i>Escherichia coli</i> .	12
TablaII	Uso de molaridades y tiempo de exposición de NaOH por diferentes autores.	14
TablaIII	Tiempos de incubación y concentraciones del buffer de lisis	22
TablaIV	P Valores para las concentraciones obtenidas de pVAX1-NH36 para ambos experimentales.	32

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Isoformas de los plásmidos.	5
Figura 2	Representación esquemática de un ADNp para vacunas de ADN.	6
Figura 3	Esquema de pVAX1-NH36 y sus componentes	8
Figura 4	Fermentación por Lote	10
Figura 5	Ejemplo del proceso de lisis	13
Figura 6	Fermentador de 3L marca Applikon con su equipo de software ezControl	21
Figura 7	Centrifuga refrigerada ThermoScientific.	24
Figura 8	BCA ProteinAssay Kit de Pierce.	25
Figura 9	HPLC ÄktaPurifier de GE con la columna de Interacción Hidrofóbica instalada.	26
Figura 10	Gráfica de dispersión de las concentraciones de PT para cada lisado de ambos experimentos	28
Figura 11	Electroforesis correspondiente al Primer estudio experimental	29
Figura 12	Electroforesis correspondiente al Segundo estudio experimental	30

- Figura 13 Cromatogramas comparativos, 13.A para el primer estudio experimental y 31  
13.B para el segundo estudio experimental
- Figura 14 Primer estudio Experimental.Cinética de recuperación de pVAX1-NH36 33  
para cada lisado (por duplicado) a diferentes concentraciones de NaOH
- Figura 15 Segundo estudio Experimental\_Cinética de recuperación de pVAX1- 34  
NH36 para cada lisado (por duplicado) a diferentes concentraciones de  
NaOH

## RESUMEN

La Leishmaniasis es una enfermedad, provocada por parásitos del género *Leishmania* y transmitida por medio de mosquitos, ésta se trata de combatir por medio de vacunas ya que su incidencia va en aumento. El avance tecnológico en la ciencia permitió el desarrollo de mejores vacunas como las de ADN que dependen de plásmidos con un gen insertado dentro de su estructura polinucleotídica, para codificar una proteína contra cierta enfermedad, en este caso la Leishmaniasis; el plásmido utilizado para esta vacuna es el pVAX1-NH36; éste es insertado en células de *Escherichia coli* y se reproduce por medio de una fermentación, recuperación primaria o lisis, una recuperación secundaria y purificación. El método de recuperación primaria más utilizado es el de lisis alcalina, para el cual es necesario establecer un protocolo de tiempo de lisis y concentración de NaOH óptimos. Se trabajó con una cinética de rompimiento celular de tres molaridades de NaOH a seis tiempos de incubación celular, que permitió encontrar las condiciones de óptima recuperación de pVAX1-NH36. Se determinó la cinética de liberación de Proteína Total (PT) en las muestras obteniendo como resultado que el tiempo y la molaridad del buffer no determinan la cantidad de PT liberada; se analizó cualitativamente la cinética de recuperación del plásmido en electroforesis en gel de agarosa, presentando en el segundo estudio experimental mayor concentración de pVAX1-NH36 en lisados trabajados con alta molaridad de NaOH. Se cuantificaron las concentraciones del plásmido por medio de HPLC con columna de interacción hidrofóbica obteniendo, en el mismo experimental, mayor concentración de pVAX1-NH36 a quince minutos de incubación con la molaridad más alta, distinto a lo publicado por algunos autores. La cinética de recuperación primaria nos indica que el mejor tiempo de incubación celular con el buffer es de quince minutos, y la mejor molaridad de NaOH para éste es de 0.2.

## I. INTRODUCCIÓN

La Leishmaniasis es una enfermedad causada por la infección de un protozoo perteneciente al género *Leishmania*. Dado que el parásito se puede transmitir de insectos a mamíferos, incluyendo al hombre; la Leishmaniasis es muy común, sobre todo en lugares tropicales. Varias especies de este género llegan a afectar al humano, ya sea con lesiones cutáneas que sanan solas, hasta lesiones viscerales que resultan fatales. En el 2011 la Organización Mundial de la Salud reportó una incidencia anual de 1 a 1,5 millones de casos de Leishmaniasis cutánea y 500.000 de Leishmaniasis visceral; siendo esta última la causa de muerte de un gran número de personas. Gracias a la globalización, los constantes viajes, y la dificultad de mantener a los mosquitos contenidos en una sola área, el riesgo de que ésta parasitología se siga expandiendo es cada vez mayor, por lo que se deben buscar nuevos y mejores medios para atacar y prevenir la infección de estos parásitos. (Palatnik de Sousa, 2008; Berman, 1996).

Como principal medio de prevención contra enfermedades tenemos a la vacunación; las vacunas sirven como agentes de baja virulencia que ayudan a preparar a nuestro sistema inmune contra una enfermedad específica, generando una memoria en el sistema inmunológico que ayudará al mismo a reaccionar de manera vasta y oportuna si se llega a exponer de nuevo al agente patógeno (Mota, 2009).

Tanto la terapia génica como las vacunas de ADN se han convertido muy populares en los tratamientos para enfermedades, lo mismo en animales como humanos ya que utilizan materiales que están basados en genes. Esto disminuye el riesgo de infección para los productores y los costos de fabricación, son muy estables a temperatura ambiente por lo que facilita el almacenamiento y transporte. La respuesta que generan en el organismo permite la memoria inmunológica. (Mota, 2009; Carnes y Williams, 2007; Williams et al., 2009).

Dentro de los materiales que se utilizan en la fabricación de vacunas de ADN encontramos a los plásmidos, que trabajan como vectores no virales y son fáciles de modificar por medio de la ingeniería genética. (Eon-Duval et al., 2002; Diogo et al., 2005; Biombo y Doly, 1979; Fynan, 1993).

Para la producción de ADN plasmídico (ADNp) se deben llevar a cabo varios pasos: una fermentación de un cultivo celular, comúnmente de *Escherichia coli*, la recuperación primaria o lisis alcalina, la recuperación intermedia y parcialmente purificada de ADNp y la

purificación final por medio de cromatografía. Cada uno de estos pasos se deben llevar a cabo de manera rigurosa y con extremo cuidado cuando se busca la producción de plásmidos para fines terapéuticos, ya que en este caso debemos asegurarnos que éstos se encuentre libre de proteínas de la célula huésped, así como de ADN cromosómico, ARN y endotoxinas. (Freitas y Prazeres, 2008; Eon-Duval et al., 2002).

Uno de los pasos más críticos en el proceso de producción de ADNp es la lisis ya que determina la concentración de plásmido que se seguirá procesando y la dificultad de purificación como consecuencia de la mezcla de componentes celulares que se dan durante este proceso, ya que la bacteria se rompe liberando todo su contenido intracelular, incluyendo el ADNp.

En la actualidad existen varios métodos para la extracción de plásmidos: lisis por medio de calor, agitación mecánica, alcalina, etc. El método más utilizado es el de la lisis alcalina que resulta de varias modificaciones de la técnica propuesta por Birnboim y Doly en 1979. En ésta, se resuspende a las células en buffer TE enriquecido con glucosa, se realiza la lisis con un concentrado de NaOH y SDS para finalizar con una neutralización utilizando acetato de Potasio y recuperar el ADNp por medio de centrifugación para posteriormente purificarlo. (Birnboim y Doly, 1979; Chamsart y Karnjanasorn, 2006; O'Mahony et al., 2005).

Existe una gran diversidad de versiones de la misma técnica para la lisis alcalina originada por Birnboim y Doly en 1979. Hay quienes usan concentraciones de NaOH de 0.1M, y hay quienes usan concentraciones de 0.2M; también existe un debate en cuanto al tiempo de exposición que se le deben de dar a las células con este mismo buffer con rangos desde 40 segundos (Prazeres et al., 2001), hasta 4 horas (Freitas et al., 2007), por lo que en esta investigación se tiene como principal objetivo encontrar una combinación de tiempo de exposición y concentración de NaOH que permita minimizar los contaminantes derivados de la lisis, sin perjudicar la concentración de ADNp.



## II. ANTECEDENTES

### II.1. Terapia Génica y Vacunas de ADN

La terapia génica consiste en la introducción de uno o más genes funcionales a receptores humanos o no humanos; constituye una gran alternativa para la prevención, tratamiento, diagnóstico o cura contra distintos padecimientos (Prazeres et al., 2001). Inicialmente el propósito de la terapia génica radicaba en el tratamiento de enfermedades genéticas; sin embargo, se está estudiando su uso contra otras enfermedades, como son los desórdenes neurodegenerativos, artritis, enfermedades vasculares, SIDA, entre otras. La terapia génica ha tenido mayor auge en el tratamiento contra el cáncer (Mhashilkar et al., 2001).

Otra manera de preparar al sistema inmune es por medio de vacunas, a fin de que su respuesta resulte vasta y oportuna cuando el individuo sea invadido por el agente patógeno correspondiente a sus respectivas toxinas. El diseño de mejores vacunas requiere de la aplicación de nuevas herramientas científicas, porque la mayoría de los métodos tradicionales han venido resultando poco eficientes desde hace varias décadas. Desde el punto de vista inmunológico, una vacuna ideal es aquella que imita a la infección y/o a la intoxicación natural, desencadenando una respuesta inmune específica, eficiente, humoral y celular, así como de muy largo plazo, sin la necesidad de acompañarla con adyuvantes o de administrar refuerzos (Garza et al., 2007).

En el presente, las vacunas de ADN representan una alternativa para el control de varias enfermedades, incluyendo las infecciosas (Dumonteil, 2000). Una vacuna de ADN consiste en un polinucleótido que acarrea una secuencia que codifica un gen de interés, éste expresa una proteína cuando se introduce a la célula huésped; este tipo de vacuna solo presenta componentes seleccionados de un patógeno al sistema inmune, lo que lo hace altamente específico (Schalk et al., 2001).

Las vacunas de ADN pueden llegar a conferir una protección a largo plazo para enfermedades infecciosas dado a que el antígeno es producido constantemente por el gen en cuestión, sin necesidad de estarlos inyectando constantemente. La proteína expresada no sólo codifica para la respuesta inmune primaria, sino también a la respuesta inmune secundaria,



permitiendo la memoria inmunitaria (Kelly, 2003), propiedad que comparten con las vacunas de microorganismos vivos atenuados, pero sin el riesgo de contagio al productor, ni el de mutación o reversión patógena (Schalk et al., 2001).

La mayor preocupación respecto a este tipo de vacunas, es la integración del ADN inyectado al genoma del paciente, sin embargo se han realizado muchos estudios que demuestran que es muy raro o casi improbable que esto suceda, el mismo caso para la generación de enfermedades autoinmunes (Dumonteil, 2007).

Estas vacunas son fáciles de producir y de bajo costo ya que se utiliza un proceso genérico para su producción. También, son muy estables, lo que facilita el almacenamiento y distribución de estas vacunas. Por todas estas ventajas y propiedades, se está investigando este tipo de vacunación para enfermedades como tuberculosis, malaria, SIDA, influenza, virus de papiloma, Leishmaniasis, algunos cánceres, etc. (Dumonteil, 2000).

## **II.2. Plásmidos**

Las vacunas de ADN necesitan de vectores que transporten los genes terapéuticos que se desea introducir al organismo, para esto existen vectores virales y no virales. Dentro de los virales se encuentran los retrovirus, adenovirus y otros sistemas que presentan algunos problemas, sobre todo de seguridad tanto al productor como al paciente. Los vectores no virales, como los plásmidos, son mucho más seguros y fáciles de producir a gran escala, la inyección de este agente no viral genera una respuesta humoral y celular en el sistema inmune del paciente, características deseadas en la vacunación (Prazeres et al., 2001).

### **II.2.1 Características**

Los plásmidos son anillos pequeños formados por dobles cadenas de ADN, cada una de éstas es un polímero lineal de desoxirribonucleótidos ligados entre sí por enlaces fosfodiéster. A  $\text{pH} > 4$  los grupos fosfatos son ionizados y cada nucleótido contribuye con una carga negativa a la carga total de la molécula. Por lo tanto, los ácidos nucleicos son moléculas polianiónicas

con una carga neta igual al número de nucleótidos (Ferreira, 2005). Las bases aromáticas de los nucleótidos en el ADN, que tienen carácter hidrofóbico, están orientadas a la parte interna de la molécula, perpendiculares a la cadena de azúcar y fosfato, y apiladas una sobre la otra en el eje de la hélice.

Los plásmidos son replicones que son heredados establemente en un estado extracromosomal y se encuentran regularmente en una gran variedad de bacterias (Primrose et al., 2002). El ADNp es altamente isomórfico (Fig. 1), sus diferentes formas aisladas corresponden a estructuras moleculares distintivas e interconvertibles (Ferreira, 2005). La mayoría de los plásmidos existen como moléculas circulares de ADN de doble cadena.

Si ambas cadenas de ADN son círculos intactos, las moléculas son descritas como círculos covalentemente cerrados o ccc pDNA. Si solamente una cadena está intacta, entonces las moléculas se describen como círculos abiertos ocpDNA (de sus siglas en inglés). Cuando son aislados de las células, los plásmidos covalentemente cerrados, presentan frecuentemente una deficiencia de giros en la doble hélice, y su configuración es super-enrollada. No todos los plásmidos existen como moléculas circulares, pueden presentarse como moléculas lineales (Primrose et al., 2002).

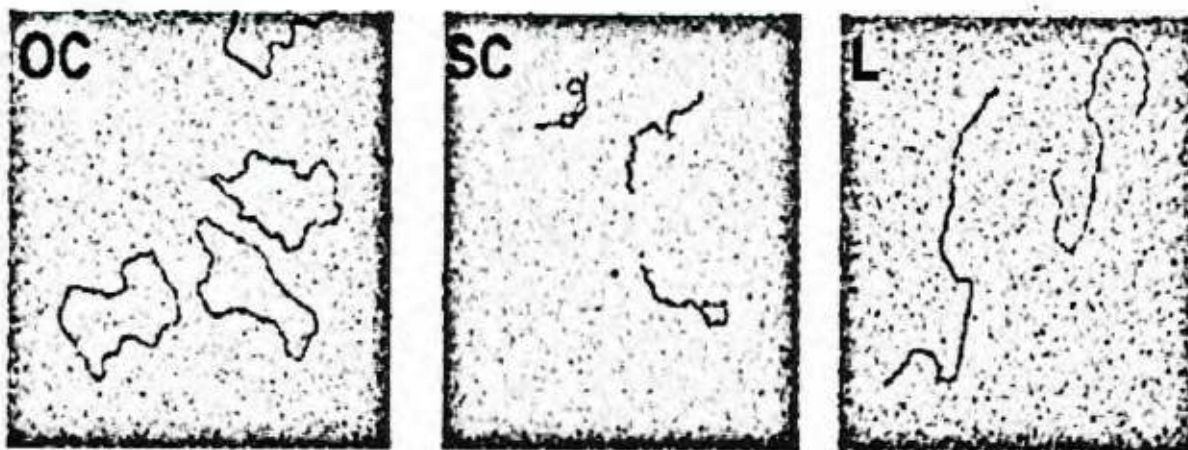


Figura 1. Isoformas de los plásmidos: circular abierto (OC), super-enrollado (SC) y lineal (L). (Adaptado de Molloy et al., 2004)

Los genes codificados en estos plásmidos se encuentran bajo el control de promotores, casi siempre de origen viral. Los promotores son secuencias cortas de ADN, a las cuales se le unen diversos factores de transcripción que ayudan a guiar y activar a las polimerasas que se encuentran en la mayor parte de las células eucariotas. Seguido de los promotores encontramos las secuencias de ADN que codifican para la síntesis del antígeno de interés (Fig. 2) estas secuencias son insertadas en el denominado “sitio de clonación” que se localiza generalmente corriente arriba del promotor (Mota, 2009). Los plásmidos tienen además diversos genes de resistencia a antibióticos, como lo son la ampicilina o kanamicina. Posteriormente podemos encontrar las secuencias inmunoestimuladoras o motivos CpG que están altamente conservados en las bacterias y el sistema inmune de los organismos eucarióticos ha evolucionado para reconocerlos como señales de peligro. Finalmente encontramos las secuencias de poliadenilación (poli A) que son las que finalizan la transcripción, garantizando que el ARN mensajero sea terminado apropiadamente, aportando a su vez estabilidad a los transcritos de ARN. (Garza et al., 2007; Kelly, 2003; Mota, 2009. Prazeres et al., 2001; Schalk et al., 2001).

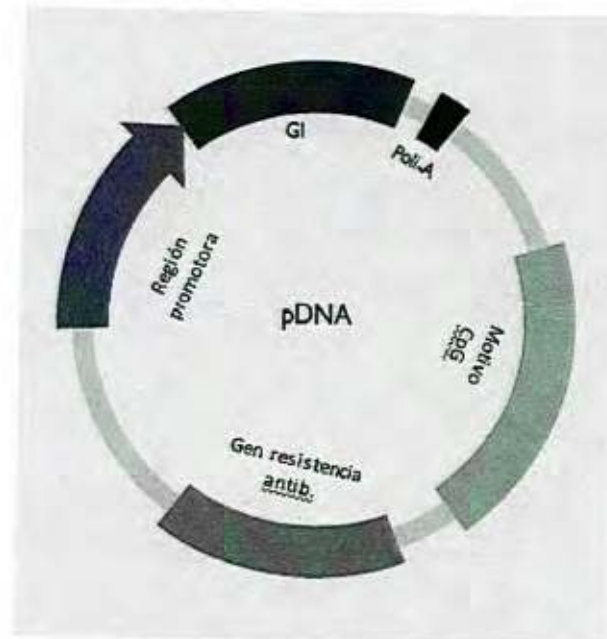


Figura 2. Representación esquemática de un ADNp usado para vacunas de ADN, con la región promotora seguida del gen de interés (GI), posteriormente se encuentra la secuencia poli A, incluye la secuencia inmunoestimuladora (CpG) y el gen de resistencia a antibióticos (Adaptada de Mota et al., 2009).



El ADNplasmídico (ADNp) está teniendo una mayor importancia en la experimentación con terapia génica (Williams et al., 2009), ya que debido a sus características los califican como vectores o unidades funcionales de las vacunas de ADN. Estos vectores con los genes que codifican a las proteínas de interés, son administrados al paciente ya sea por medio de una pistola de genes, inyección intramuscular, electroporación, etc. (Mota, 2009. Prazeres et al., 2001). El ADNp entrará a una célula en particular donde el gen será transcrito. El ARN se transcribe y traduce dando origen a una proteína modificada, por ejemplo en un antígeno, que posteriormente saldrá de la célula (Kelly, 2003).

Las soluciones de plásmido purificadas que se pretenden usar en humanos deben estar libres de ADN genómico, ARN, endotoxinas y proteínas de la célula hospedera. El ADNp deberá estar, preferentemente, en la forma super-enrollada, puesto que este isómero es un mejor agente de transfección que las formas circular abierta o lineal. (O'Mahony et al., 2005).

### **II.2.2. Plásmido pVAX1-NH36 para Leishmaniasis**

La Leishmaniasis es una enfermedad que puede afectar a la piel o a los órganos, producida por parásitos del género *Leishmania*. Está considerada dentro de la lista de las enfermedades más importantes de la organización mundial de la salud (OMS) que persiste mucho en las regiones tropicales y se está expandiendo gracias a la globalización (Berman, 1996). Por estos motivos se ha diseñado un plásmido que ayude a la prevención de esta enfermedad por medio de las vacunas de ADN. Uno de los plásmidos que se utilizan para este fin es el pVAX1 que se ha construido bajo los reglamentos establecidos por la FDA (Food and Drug Administration). Este vector permite un alto número de copias en *Escherichia coli* y permite una gran expresión de proteína de interés en células de mamíferos. El vector presenta los siguientes elementos que se muestran en la Figura 3: el origen de replicación (pUC ori), un promotor proveniente del citomegalovirus humano (pCMV), una señal de poliadenilación de la hormona bovina del crecimiento (BGH pA), un gen de resistencia a la kanamicina que permite la selección de *E. coli* como célula hospedadora para la replicación del vector, y finalmente el gen de interés (en este caso el gen NH36) (Invitrogen, 2012).

El plásmido pVAX1-NH36 está constituido por 4000 pares de bases (pb), 3000 pb corresponden al plásmido pVAX1 y 1000 pb al gen NH36 que codifica para la glicoproteína Nucleósido Hidrolasa que es expresada por la mayoría de las especies del género *Leishmania* (Aguilar-Be, 2005).

### II.3. Producción de Plásmidos

La producción de ADNp se lleva a cabo a través de 4 pasos básicos: fermentación, recuperación primaria, recuperación intermedia y purificación (Schalk et al., 2001).

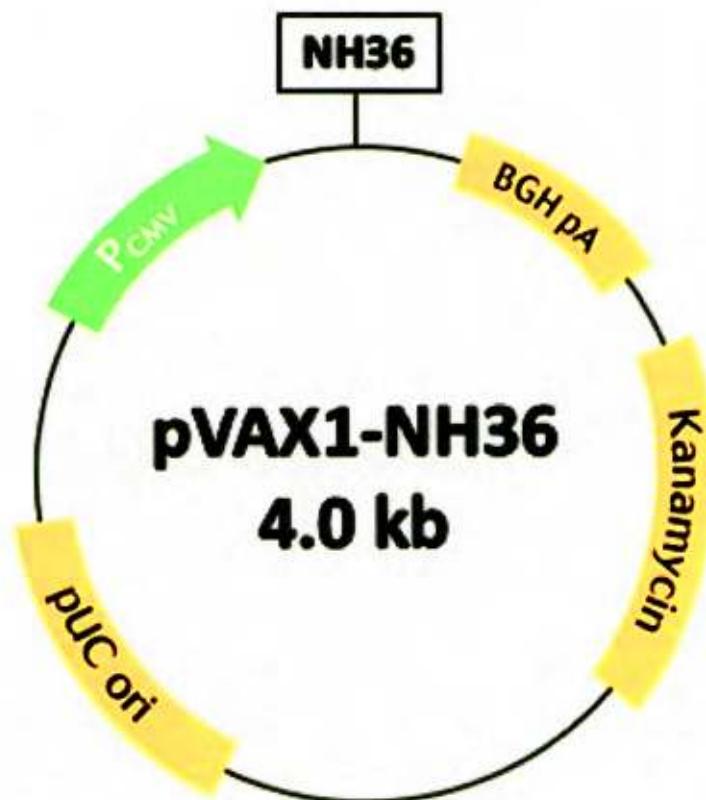


Figura 3. Esquema del plásmido pVAX1-NH36 y sus componentes. (Adaptado de Invitrogen, 2012).

### II.3.1. Fermentación por lote de la cepa hospedera.

Después de la construcción del plásmido por medio de ingeniería genética, y la transferencia a la cepa hospedera, se procede a una fermentación para que la bacteria transformada con el plásmido (comúnmente *Escherichia coli*) se reproduzca y genere una gran cantidad de células con el ADNp de interés.

Los requerimientos a escala laboratorio de pequeñas cantidades de plásmido purificado puede ser satisfecho por el cultivo de *E. coli* en matraces agitados. Para mayores requerimientos se utilizan biorreactores controlados para aliviar las limitaciones del cultivo en matraces agitados. En particular, el uso de biorreactores con control de oxígeno disuelto y pH, en modo de fermentación por lote alimentado, permite incrementos significativos en la producción de biomasa, frecuentemente relacionada con un alto rendimiento de plásmido (Listner et al., 2006).

La formulación del medio de cultivo afecta sustancialmente el comportamiento y la naturaleza de los procesos microbianos. Esto implica, que el tipo y la fuente de los nutrientes disponibles en el medio de cultivo pueden tener un profundo efecto en los rendimientos de la fermentación (Danquah y Forde, 2007).

Las fermentaciones realizadas con el objeto de producir una alta densidad celular requieren de un medio balanceado que suministre cantidades adecuadas de nutrientes necesarios para energía, biomasa y mantenimiento celular. (Carnes, 2005). El crecimiento de *E. coli* y la replicación de plásmido requiere de nutrientes como el carbono, nitrógeno y una fuente de minerales (Wang et al., 2001).

Una fermentación por lote consiste en la propagación celular con un medio de cultivo. La principal ventaja de la fermentación por lotes (Fig. 4) es su simplicidad. Todos los nutrientes para el crecimiento de la célula están presentes al momento de la inoculación. En este tipo de fermentación se recomienda el uso de un inóculo de entre 1 y el 5 % del volumen de cultivo para acortar la fase lag. Durante la fase de crecimiento exponencial, todos los nutrientes están en exceso; entonces la velocidad específica de crecimiento será la máxima ( $\mu_{max}$ ) tal como se predice en el modelo de Monod (Carnes, 2005).

### II.3.2. Recuperación primaria

El aislamiento o recuperación primaria consiste en separar las células del medio de cultivo, este proceso es llamado también cosecha celular. Para realizar esta separación, las operaciones utilizadas con mayor frecuencia son la centrifugación y la microfiltración. Como producto de estas operaciones se obtiene el paquete celular. Esta etapa consta generalmente de las operaciones de cosecha celular y lisis (Prazeres y Ferreira, 2004; Prather et al., 2003).

#### II.3.2.1. Lisis

La lisis celular es una operación durante la cual se rompe la membrana celular de la bacteria permitiendo la liberación de los componentes intracelulares (O'Mahony et al., 2005). La forma en que se lleva a cabo ésta reviste una gran importancia debido a que impacta las operaciones de purificación posteriores.

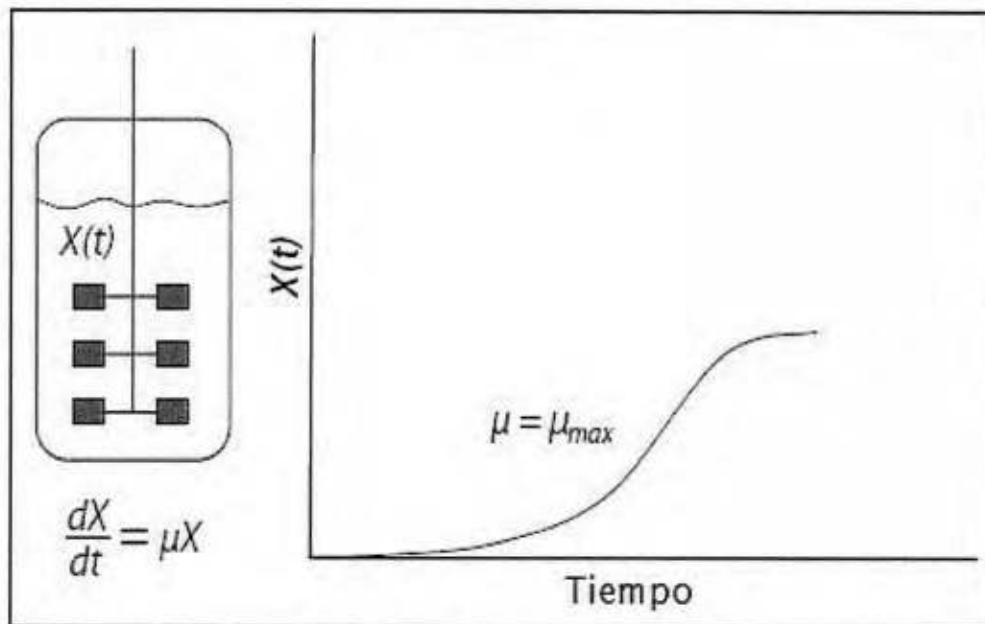


Figura 4. Fermentación por lote (Adaptado de Carnes, 2005)



La ruptura celular puede ser llevada a cabo por varios métodos, pero éstos se pueden clasificar en dos categorías: la físico-mecánica, que incluye la ruptura celular por agitación así como por calor, entre otras; y la ruptura celular química, ya sea por tratamiento alcalino, por detergentes, entre otros. Se deben considerar la posible desnaturalización del ADNp al elegir el método de lisis que se aplicará, sea cual sea, se debe optar por el que dañe menos el ADNp (Carnes y Williams, 2007). En la Tabla I se muestran los componentes celulares que resultan de la ruptura celular.

El método de lisis más utilizado es el alcalino. La lisis alcalina consta de una mezcla de detergentes alcalinos, generalmente NaOH 0.2 M mezclado con 1% de dodecil sulfato de sodio (SDS) para poder solubilizar las membranas celulares, el cual actúa eliminando las interacciones no-covalentes entre lípidos y proteínas. Durante este proceso se eleva el pH, lo que permite la desnaturalización del ADN genómico, donde se separan las cadenas de ADN y las bases hidrofóbicas son expuestas. En este procedimiento la desnaturalización del plásmido es reversible (Prazeres et al., 2001). Después del rompimiento celular y degradación del ADN genómico, se realiza una precipitación de SDS con el ADN genómico y proteínas (Fig. 5), por medio de una solución de acetato de potasio (O'Mahony et al., 2005; Diogo et al., 2005). El método de extracción de lisis alcalina fue diseñado para prevenir la "desnaturalización irreversible" del plásmido, pero al mismo tiempo los extractos deben ser lo suficientemente alcalinos para que la desnaturalización del ADN genómico ocurra (Birboim y Doly, 1979).



Tabla I. Caracterización de ácidos nucleicos y otros componentes de una célula de *Escherichia coli* (Adaptada de Diogo et al., 2005)

<sup>a</sup> Moléculas de pDNA con tamaño promedio de 5 a 20 kbp.

<sup>b</sup> Las células de *E. coli* en crecimiento rápido tienen, en promedio 4 moléculas de gDNA.

<b>Especies</b>	<b>Especies diferentes/célula</b>	<b>Peso promedio, <math>PM \times 10^{-3}</math></b>	<b>Observaciones</b>
Agua	1	0.018	-
Ácidos nucleicos			
DNA plasmídico	1	3300 <sup>a</sup>	Polianiónico, doble cadena, isoformas compactas
DNA genómico	1 <sup>b</sup>	2.8 x 10 <sup>6</sup>	Polianiónico, altamente fragmentado, cadena doble o sencilla
RNA de transferencia	40	28	Polianiónico, cadena sencilla
RNA ribosómico	3	500-1000	Polianiónico, cadena sencilla
RNA mensajero	400-800	660-90	Polianiónico, cadena sencilla
Proteínas	1100	8-200	Aniónica, neutral, catiónica, hidrofóbico, hidrofílico
Endotoxinas		10	Aniónica, parte lipídica
Iones y moléculas pequeñas	800-2000	<1	-

Muchos autores utilizan concentraciones distintas de NaOH y distintos tiempos de exposición celular a éste buffer, sin embargo se han realizado estudios como el de Meacle et al.,(2004), donde comprobaron que al utilizar concentraciones de NaOH mayores a 0.15 M, se llega a desnaturalizar el ADNp super-enrollado de manera irreversible, mencionan que este fenómeno también se presenta al aumentar el tiempo de exposición celular con el buffer (normalmente 10 minutos). Sin embargo, muchos autores manejan molaridades que pueden superar concentraciones de NaOH mayores de 0.2 M del buffer de lisis. (Tabla II), incluso en un estudio realizado por Freitas et al., (2007), menciona que puedes extender el tiempo de lisis hasta 4 horas para reducir significativamente la cantidad de ARN presente, sin comprometer la calidad del plásmido super-enrollado.

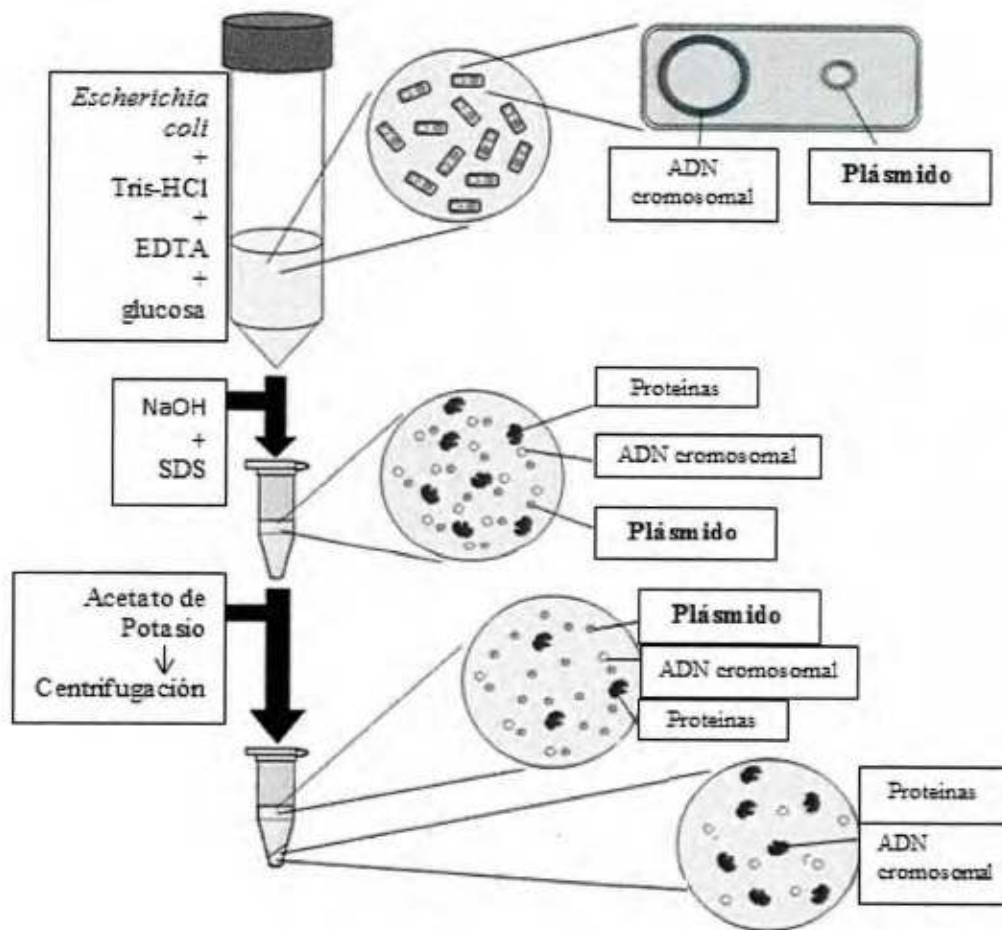


Figura 5. Ejemplo del proceso de lisis. Primeramente se realiza una resuspensión con EDTA y glucosa, después se procede a lisar las células con NaOH y SDS para neutralizar con una solución de acetato de potasio.

Tabla II. Uso de molaridades y tiempo de exposición de NaOH por diferentes autores

$\leq 0.1 \text{ M}$	$0.15 \text{ M}$	$0.2 \text{ M}$
Meacle et al., 2004 (10 min)	Varley et al., 1998 (10 min)	Birnboim y Doly, 1979 (5 min)
Freitas et al., 2007 (hasta 4 horas)	Chamsart et al., 2006	O'Kennedy et al., 1999  Diogo et al., 2000  Prazeres et al., 2001 (40 seg)  Eon et al., 2002 (30 min)  O'Mahony et al., 2005 (5 min)  Freitas et al., 2007 (10 min)

#### II.4. Análisis de Comparación

##### II.4.1. Cuantificación de proteínas totales (PT) por método de BCA

Para cuantificar proteína total, existen diversos métodos colorimétricos conocidos, como Biuret, Lowry y el ácido bicinconínico BCA (por sus siglas en inglés), siendo este último el que se distingue por su sensibilidad. La reacción se da en dos pasos, primeramente cualquier péptido compuesto de tres o más aminoácidos (cisteína, cistina, tirosina triptófano) lleva a cabo la reducción del el ion cuproso ( $\text{Cu}^{2+}$ ) a cúprico ( $\text{Cu}^{1+}$ ) en un medio alcalino, dando como resultado un color azul claro, esta reacción es conocida como de Biuret. Posteriormente el ácido bicinconínico, sal sódica, es capaz de formar un complejo púrpura intenso con inones

$\text{Cu}^{1+}$  en medio alcalino. Este complejo es soluble en agua y expone gran absorbancia a 562nm. Se puede obtener una cuantificación de la concentración de proteína en muestra por medio de una curva de calibración construida con diluciones de suero de albúmina bovina (BSA) por medio de una lectura de absorbancia a 562nm (Walker, 1996; Smith et al., 1985).

#### **II.4.2. Electroforesis en Gel de Agarosa**

Es uno de los métodos analíticos más rápidos y por lo tanto más usados para la comparación de varias muestras que corren de manera paralela (Stadler, et al., 2004). El gel se comporta como un tamiz molecular y permite separar moléculas cargadas en función de su tamaño y forma, permitiendo que las isoformas de ADNp se puedan separar y comparar con la ayuda de marcadores de peso molecular que son fragmentos de ADN de tamaño conocido (Arce, 2011).

#### **II.4.3. Cromatografía líquida de alta presión (HPLC) con columna de interacción hidrofóbica para cuantificar ADNp.**

HPLC es una técnica utilizada en muchos laboratorios de investigación e industriales, y en muchos de éstos se usa para medir la masa de plásmido. HPLC se usa comúnmente como parte de procesos de purificación para ADNp de uso terapéutico. Una técnica de HPLC de Interacción Hidrofóbica se ha desarrollado para la cuantificación de ADNp y permite conocer la pureza del mismo ya que una columna de Polietileno-divinil-benceno, permite la separación del ADNp de las moléculas que son más hidrofóbicas, que en este caso se consideran impurezas, como el ADN genómico, el ARN, proteínas, entre otros. Esta metodología es ideal para purificar y conocer la concentración de ADNp en lisados clarificados. (Diogo, et al., 2003).

### III. JUSTIFICACIÓN

Los plásmidos tienen un gran potencial para usarse en vacunas, por lo que es necesario contar con protocolos bien establecidos para su producción, recuperación primaria y purificación. La lisis alcalina de *Escherichia coli* DH5 $\alpha$ , que hospeda al plásmido, es una parte importante en la recuperación primaria del plásmido pVAX1-NH36 que codifica una proteína contra la Leishmaniasis, por lo que en esta investigación se estudiará la cinética de la lisis alcalina para la recuperación primaria del plásmido pVAX1-NH36.

#### IV. HIPÓTESIS

El estudio de la cinética de lisis alcalina de *Escherichia coli* DH5 $\alpha$  permitirá encontrar las condiciones de óptima recuperación del plásmido pVAX1-NH36.

## **V. OBJETIVOS**

### **V.1. Objetivo General**

Determinar la cinética de la lisis en la recuperación primaria de pVAX1-NH36 mediante el uso de tres molaridades de NaOH a seis tiempos de incubación, para encontrar las condiciones óptimas de lisis.

### **V.2. Objetivos Particulares**

Determinar la cinética de liberación de proteína total en los lisados.

Determinar cualitativamente la cinética de recuperación de pVAX1-NH36 utilizando el método de electroforesis en gel de agarosa.

Cuantificar el pVAX1-NH36 obtenido mediante el método de HPLC con columna de interacción hidrofóbica.



## VI. METODOLOGÍA

### VI.1. Materiales

Se utilizaron células de *Escherichia coli* DH5 $\alpha$  transformadas con pVAX1-NH36, donadas por el Dr. Jaime Ortega López del Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del IPN.

Para la cosecha celular se utilizó un Buffer de Resuspensión compuesto por glucosa a una concentración de 50 mM, Tris-HCl 25 mM pH=8, EDTA 10 mM.

Para el inóculo se prepararon 200mL de medio de cultivo Luria Bertani (LB) compuesto por Triptona 2g, Extracto de Levadura 1g y NaCl 1 g.

Para la fermentación por lote se prepararon 2L de medio de cultivo TerrificBroth (TB) enriquecido con glicerol compuesto de Extracto de Levadura 48g, Triptona 24g, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 4.62g, K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 25.08g y 60 mL de glicerol.

Para la lisis celular alcalina se utilizaron 3 Buffers distintos de lisis que se denominaron A), B), C), cada uno a concentraciones diferentes de NaOH:

A) NaOH 0.1M = 100mM, 1% SDS.

B) NaOH 0.15M = 150mM, 1% SDS.

C) NaOH 0.2M = 200 mM, 1% SDS.

Para poder detener la reacción de lisis se utilizó un Buffer de Neutralización compuesto por de Acetato de Potasio 500 mM con ácido acético glacial.

El llenado de la cámara de electroforesis se realiza con un buffer TAE 1X compuesto por Tris base 1.9M, Ácido acético glacial 57.1%, EDTA 0.05M. Las muestras se mezclaron con un Buffer de Carga 6 X compuesto por Azul de Bromofenol al 0.25%, Xylenecyanol FF al 0.25%, glicerol en agua al 30%, y 65% de agua desionizada.

Se realizó una prueba de Proteína Total (PT) utilizando el BCA ProteinAssay Kit de Pierce.

Los lisados fueron filtrados con membranas de celulosa de 0.45  $\mu$ m marca MILIPORE, para las pruebas de cuantificación del pVAX1-NH36.



## **VI.2. Equipo**

Para el crecimiento de los inóculos se utilizó una incubadora de la marca VWR™.

Se utilizó un fermentador de la marca Applikon®, que cuenta con una consola ez-Control en la cual se controlan los parámetros de pH, oxígeno disuelto OD, temperatura, agitación y nivel de volumen.

Para alimentación de inóculos se utilizó una bomba peristáltica marca MASTERFLEX® L/S.

La recuperación del pVAX1-NH36 se llevó a cabo con la ayuda de una centrifuga refrigerada marca ThermoScientificSorvallBiofugeStratos, las muestras fueron colocadas en tubos para centrifuga NALGENE de 50 mL.

La lectura de absorbancia para la prueba de PT se llevó a cabo en un espectrofotómetro marca PERKIN ELMER UV/VIS Lambda 2S.

Se utilizó un documentador de imágenes MultiDoc-It Digital ImagingSystem UVP para captar las fotos de la electroforesis.

Para filtrar los lisados se utilizó una bomba de vacío marca MILIPORE.

La cuantificación de pVAX1-NH36 se llevó a cabo en un cromatógrafo HPLC marca GE PharmaciaÄktaPurifier con columna de Interacción Hidrofóbica.

## **VI.3. Métodos**

### **VI.3.1 Preparación de inóculos**

Setomaron 3 mL de una solución estéril conteniendo células de *Escherichia coli* transformadas con el plásmido pVAX1-NH36 (conservadas en glicerol al 15% y a una temperatura de -40°C) y se inocularon en un volumen de 200mL de medio LB con kanamicina a una concentración de 50µg/mL, el inóculo fue incubado en un matraz de 2 L a 30°C y 250 rpm. La incubación se detuvo cuando el inóculo alcanzó una absorbancia  $\geq 1$ .

### VI.3.2. Fermentación por Lote

Se siguieron los protocolos de armado, esterilizado y de conexión del Biorreactor antes de iniciar el cultivo celular. Se realizaron dos fermentaciones por lote. En cada una de ellas se utilizó un volumen de 30 mL del inóculo en un volumen total de 2L de medio TB enriquecido con glicerol y kanamicina a una concentración de 50 $\mu$ g/mL; el proceso se llevó a cabo en un fermentador de 3.0 L marca Applikon equipado con un software de control (Fig. 6) a una temperatura de 37°C y una agitación de 250-1000 rpm según la demanda de DO<sub>2</sub>.

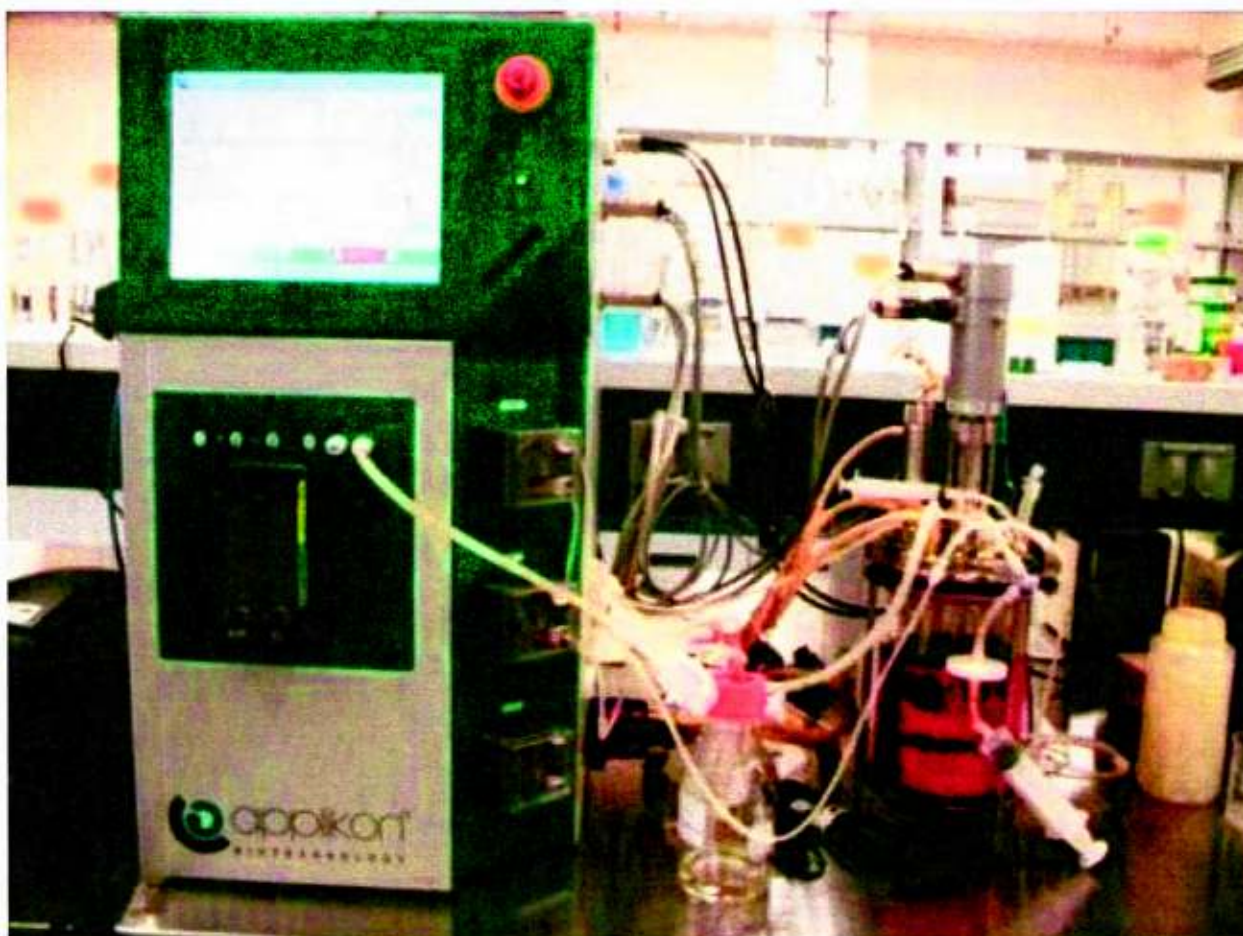


Figura 6. Fermentador de 3 L marca Applikon, con su equipo de software ezControl.

Se controló el pH para mantenerlo a 7 y el oxígeno disuelto estableciendo un punto de referencia de 30% de saturación con aire. Se detuvo la fermentación hasta que el cultivo alcanzó una absorbancia de 13.56. Para monitorear el cultivo se utilizó el software BioXpert Lite 1.01 el cual registró los datos cada minuto durante toda la corrida.

#### VI.4. Diseño Experimental

Con el objeto de cuantificar la recuperación del plásmido y la PT mediante el estudio de la cinética de rompimiento celular, se diseñó un experimento factorial en el cual se estudió el efecto de los factores molaridad de NaOH y tiempo de exposición de las células a esta solución. El factor molaridad fue estudiado en tres niveles y el factor tiempo en seis. Para realizar el análisis se utilizó el paquete estadístico SPSS (para una  $\alpha = 0.005$ ). Las muestras fueron procesadas en forma aleatoria. Los estudios se realizaron a temperatura ambiente y los factores con sus respectivos niveles se muestran en la Tabla III:

Tabla III. Tiempos de incubación y concentraciones del buffer de lisis.

TIEMPO	CONCENTRACIÓN DE NaOH		
	0.1 M	0.15 M	0.2 M
1 minuto	Muestra 1	Muestra 7	Muestra 13
2.5 minutos	Muestra 2	Muestra 8	Muestra 14
5 minutos	Muestra 3	Muestra 9	Muestra 15
10 minutos	Muestra 4	Muestra 10	Muestra 16
15 minutos	Muestra 5	Muestra 11	Muestra 17
20 minutos	Muestra 6	Muestra 12	Muestra 18



#### **VI.4.1. Recuperación primaria**

Se realizó una cosecha celular donde se trabajó con el volumen necesario de caldo, proveniente de la fermentación, para 18 muestras de modo tal que cada una tuviera el mismo índice de masa. Se eliminó el exceso de medio de cultivo por medio de centrifugación (4,400 g por un período de tiempo de 10 a 15 minutos a una temperatura de 4°C). Se determinó el peso de las células húmedas para resuspenderlas con el buffer de resuspensión, agregando 8mL de éste por gramo de célula húmeda.

##### **VI.4.1.1. Lisis**

Para llevar a cabo el rompimiento celular a cada muestrase le añadió un volumen de Buffer de Lisis, con la molaridad correspondiente, igualando el mismo volumen del Buffer de resuspensión agregado. Posteriormente se mezcló suavemente para evitar la desnaturalización el ADNp super-enrollado. Se dejó correr la lisis el tiempo correspondiente de cada muestra.

Para neutralizar el lisado se agregó un volumen de Buffer de Neutralización igualando el volumen añadido del buffer de lisis. La mezcla se dejó reposar por 10 minutos en un baño de agua con hielo. Posteriormente el lisado se centrifugó a 19,080 g por 30 minutos a 4°C (Fig. 7) para separar los restos celulares, las proteínas junto con el ADN genómico y ARN que se lograron desnaturalizar con la lisis. Se colectóel sobrenadante y éste se sometió de nuevo a otra centrifugación de 15 minutos en las mismas condiciones hasta obtener un lisado clarificado.

#### **VI.4.2. Determinación de PTcon kit BCA (ácido bicinonónico)**

Se construyó una curva estándar con concentraciones conocidas de suero de albúmina de bovino que se trataron con los reactivos de trabajo del Kit de BCA(Fig. 8), se utilizó como diluyente de la albúmina una combinación de buffer de lisis de NaOH 0.15M con buffer de neutralización para simularlas condiciones de concentración de NaOH y pH del medio en el

que se encontraban los lisados. Se realizaron lecturas de absorbancia por espectrofotometría a 562 nm, de cada muestra (0.1mL) especificada en el diseño experimental para conocer la concentración de proteína total.



Figura 7. Centrifuga refrigerada ThermoScientific, utilizada en los procedimientos de cosecha celular y después de la neutralización de la lisis.



### VI.4.3. Electroforesis de agarosa

Los lisados clarificados se filtraron con un equipo milipore y membranas de celulosa de 0.45  $\mu\text{m}$ ; posteriormente se realizó una separación de los componentes del lisado por la técnica de electroforesis para comparar el efecto de la concentración de NaOH en sus distintos tiempo sobre la liberación del plásmido. La separación se llevó a cabo por medio de un gel de agarosa al 0.8% en buffer TAE 1X pH= 7.6, mismo buffer que se utilizó para llenar la cámara de electroforesis; se colocó un volumen de la muestra de 4  $\mu\text{L}$  y 1 $\mu\text{L}$  de marcador de Peso Molecular (Supercolied DNA Ladder, de Invitrogen), cada uno mezclado en 0.8 $\mu\text{L}$  de buffer de carga 6X. Se llevó a cabo la electroforesis durante 50 minutos a 80 Volts, 70 Amperes. Se reveló el gel dentro de un recipiente con bromuro de etidio 0.5  $\mu\text{L}/\text{mL}$  durante 40 minutos.



Figura 8. BCA Protein Assay Kit de Pierce.

#### VI.4.4. HPLC con columna de interacción hidrofóbica para cuantificación de ADNp.

La separación del plásmido se llevó a cabo en una Columna de Interacción Hidrofóbica Tricorn, SOURCE 15 PHE de GE Healthcare de 0.46 x 10 cm, acoplada sistema ÄktaPurifier de GE (Fig. 9). La matriz está compuesta por poliestireno/divinilbenceno y el ligando fenil. La partícula es rígida, esférica, porosa, monodispersa con diámetro de 15  $\mu\text{m}$ . Se trabajó con un flujo de 1mL/min a una presión de 1.3MPa.



Figura 9. HPLC ÄktaPurifier de GE con la columna de Interacción Hidrofóbica instalada.



Para instalar la columna al sistema, se programó el equipo y se le pasó un flujo de agua desionizada a la columna para instalarla al detector de UV. Una vez que la columna estuvo instalada, se le siguió pasando agua para equilibrar la columna con un programa ya predeterminado. Después de le pasa el buffer de adsorción de Sulfato de Amonio 1.5M en Tris-HCl 10 mM pH=8 hasta que quedó equilibrada.

Se tomaron 10 mL de los lisados clarificados filtrados y se realizaron diluciones 1-5 con Sulfato de Amonio. Se utilizó como buffer de adsorción el mismo Sulfato de Amonio y un buffer de elución Tris-HCl 10 mM pH=8. La señal del pico de concentración del plásmido fue detectada por un detector de UV a una longitud de onda de 260nm con un tiempo de retención de 0.74-0.75 minutos. Se trabajó con el software Unicorn 5.11 en donde se registraron los cromatogramas y se aprecia la separación del pico de pVAX1-NH36 de los contaminantes del lisado. Las áreas de los picos correspondientes al pVAX1-NH36 fueron analizadas y cuantificadas por medio de una curva de calibración realizada previamente con concentraciones conocidas del plásmido puro, para conocer la concentración de éste en cada lisado y ver los efectos de la molaridad y tiempo de buffer de lisis.

## VII. RESULTADOS

### VII.1. Determinación de PT con Kit BCA

El estudio de la cinética de PT se muestra en la Figura 10. En ésta se presentan las concentraciones obtenidas de PT para cada lisado de ambos experimentales donde no se observa un comportamiento lineal entre las molaridades de NaOH ni los tiempos de lisis.

Las concentraciones obtenidas fueron analizadas en el paquete estadístico SPSS mediante un diseño factorial en donde se obtuvo que el p valor para el factor tiempo es de 0.364 y el p valor para el factormolaridad de NaOH es de 0.157, por lo que a los tiempos y molaridades de buffer de lisis utilizados en las muestras no existe una diferencia significativa en la concentración de PT liberada en la reacción.

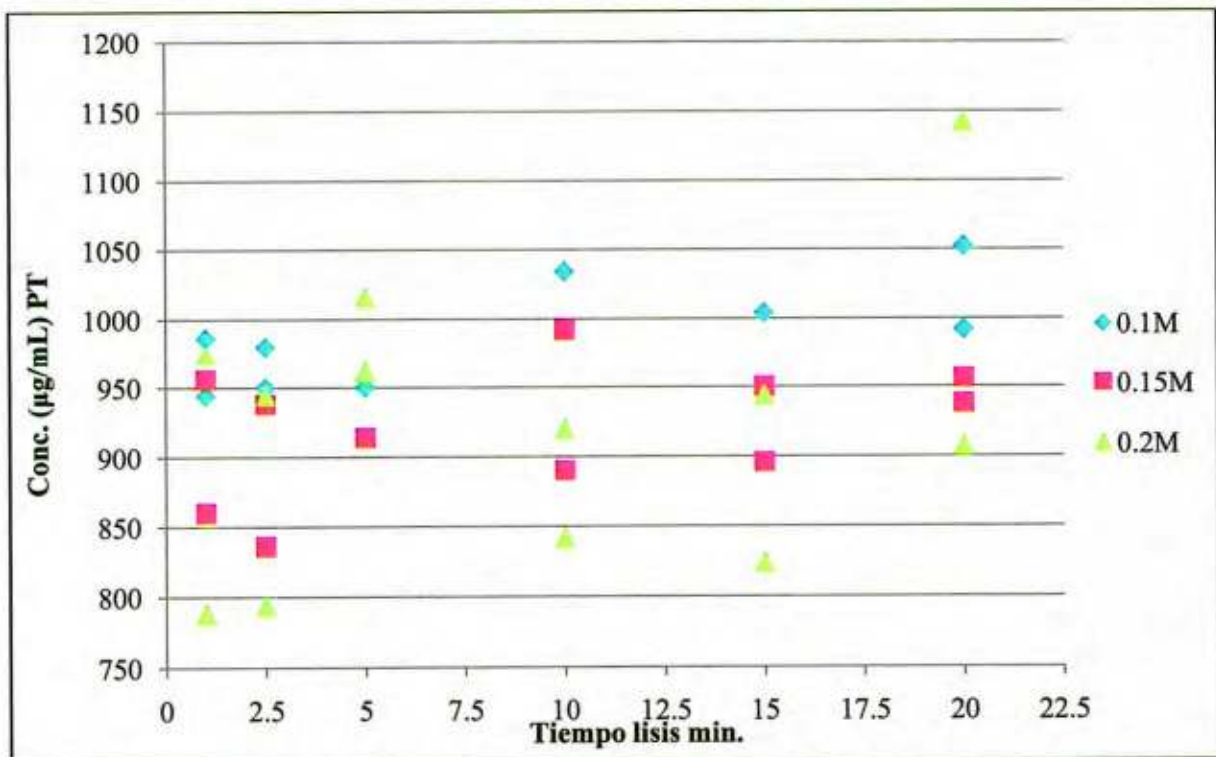


Figura 10. Gráfica de dispersión de las concentraciones de PT para cada lisado de ambos experimentos, a diferentes concentraciones de NaOH:  $\blacklozenge$  = NaOH 0.1M,  $\blacksquare$  = NaOH 0.15M y  $\blacktriangle$  = NaOH 0.2M.

## VII.2. Electroforesis

En la Figura 11 se presentan las muestras pertenecientes al primer estudio experimental que comprenden los 18 lisados a las molaridades de NaOH y los tiempos manejados. El carril 1 corresponde al marcador de peso molecular (Supercolied DNA Ladder, de Invitrogen), el carril 2 corresponde al pVAX1-NH36 purificado con Kit Sigma Maxi-Prep para utilizarlo como referencia; y los carriles del 3-20 corresponden a los lisados. En esta figura se observa una buena separación del plásmido en los distintos lisados y una buena separación de contaminantes. También se observa una buena concentración de plásmido en los carriles del 15-20.

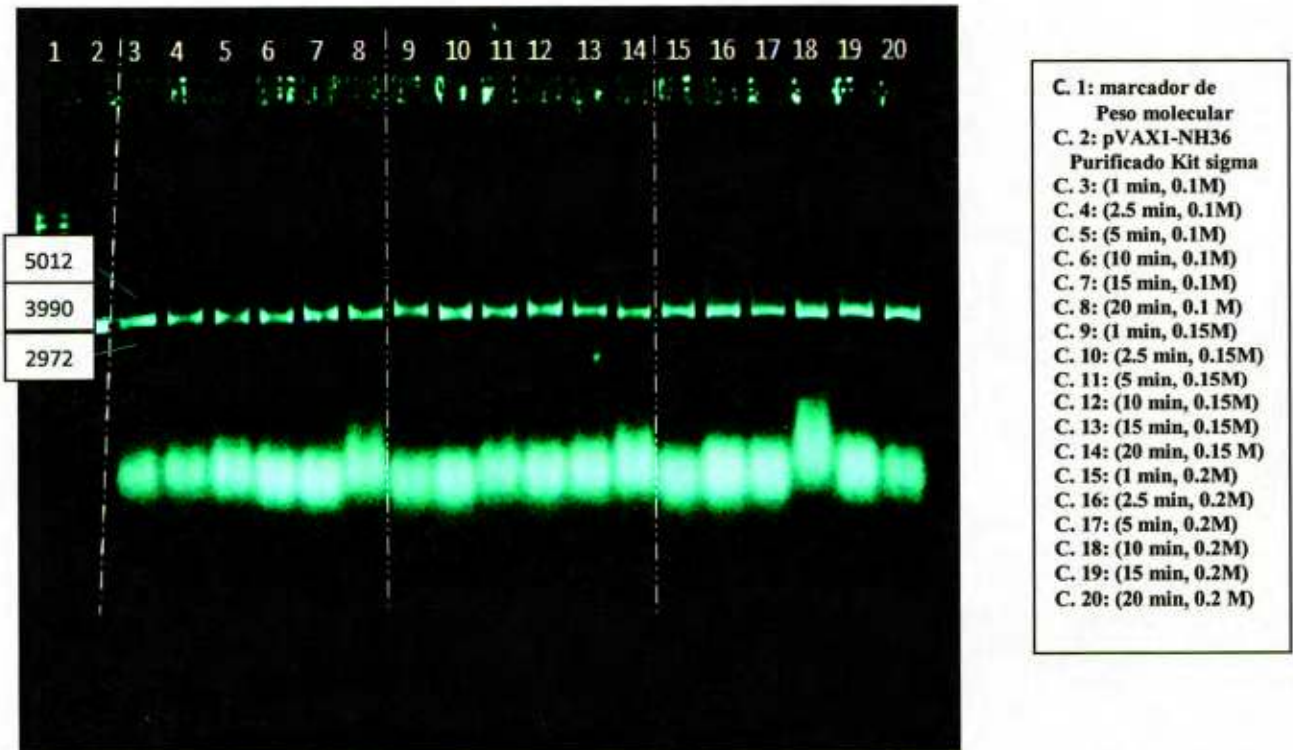


Figura 11. Electroforesis correspondiente al Primer estudio experimental. En los carriles 3-20 depositaron los lisados, las líneas dividen las molaridades de NaOH utilizadas (0.1M, 0.15M, 0.2M) cada una va de izquierda a derecha de 1 minuto a 20 minutos de acuerdo a los tiempos manejados de lisis.



La Figura 12 comprende al resultado del análisis de electroforesis de las muestras correspondientes al segundo estudio experimental de los otros 18 lisados que se trataron bajo las mismas condiciones que los anteriores. En los lisados se observa una buena separación del plásmido y sus contaminantes, es notoria una mayor concentración de pVAX1.NH36 en lisados trabajados con 0.2M de NaOH en el buffer de lisis; también resultó una mayor presencia de contaminantes en tiempos de incubación mayores a 10 minutos.

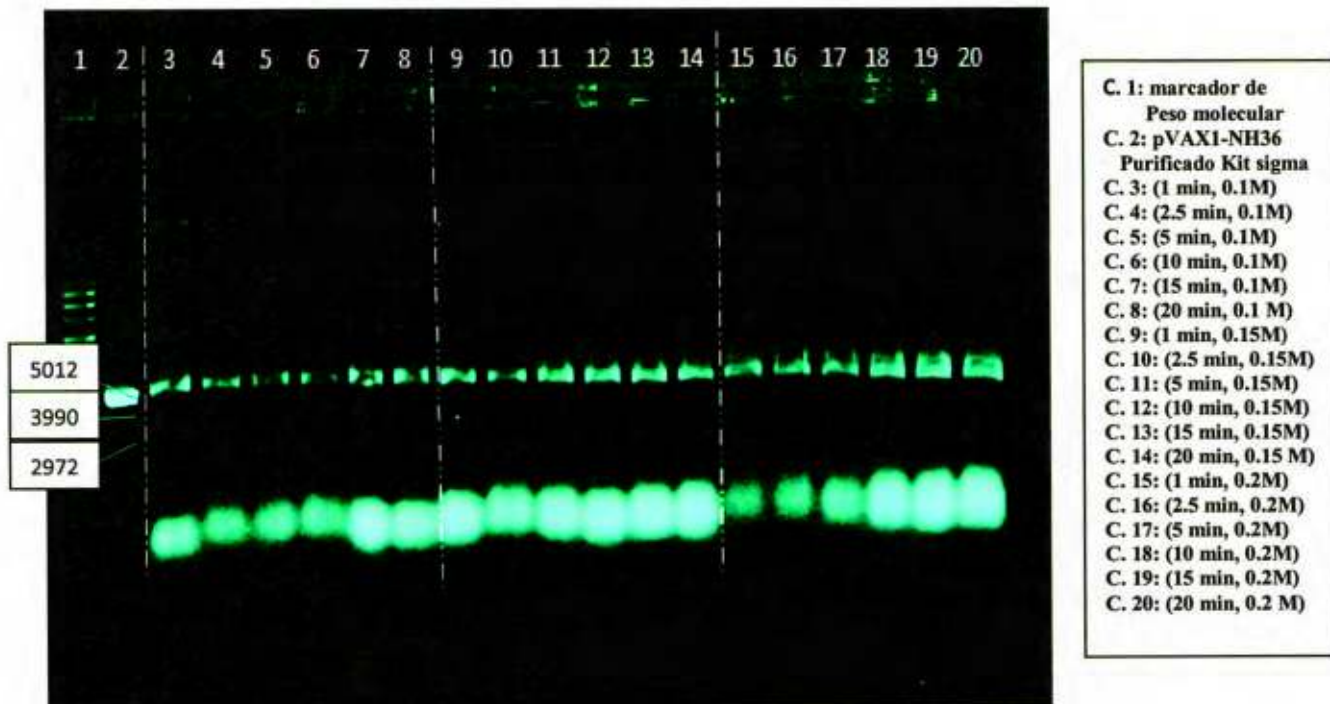


Figura 12. Electroforesis correspondiente al Segundo estudio experimental.

En los carriles 3-20 se depositaron los lisados, las líneas dividen las molaridades de NaOH utilizadas (0.1M, 0.15M, 0.2M) cada una va de izquierda a derecha de 1 minuto a 20 minutos de acuerdo a los tiempos manejados de lisis.

### VII.3. Cromatogramas Obtenidos por HPLC con Columna de Interacción Hidrofóbica

En la Figura 13.A (primer estudio experimental) y 13.B (segundo estudio experimental) se muestran 3 cromatogramas para las 3 molaridades de NaOH utilizadas cada una al mismo tiempo (10 minutos). Las muestras fueron diluidas 1:5 con sulfato de amonio 1.5M en Tris/HCl 10 mM pH=8.

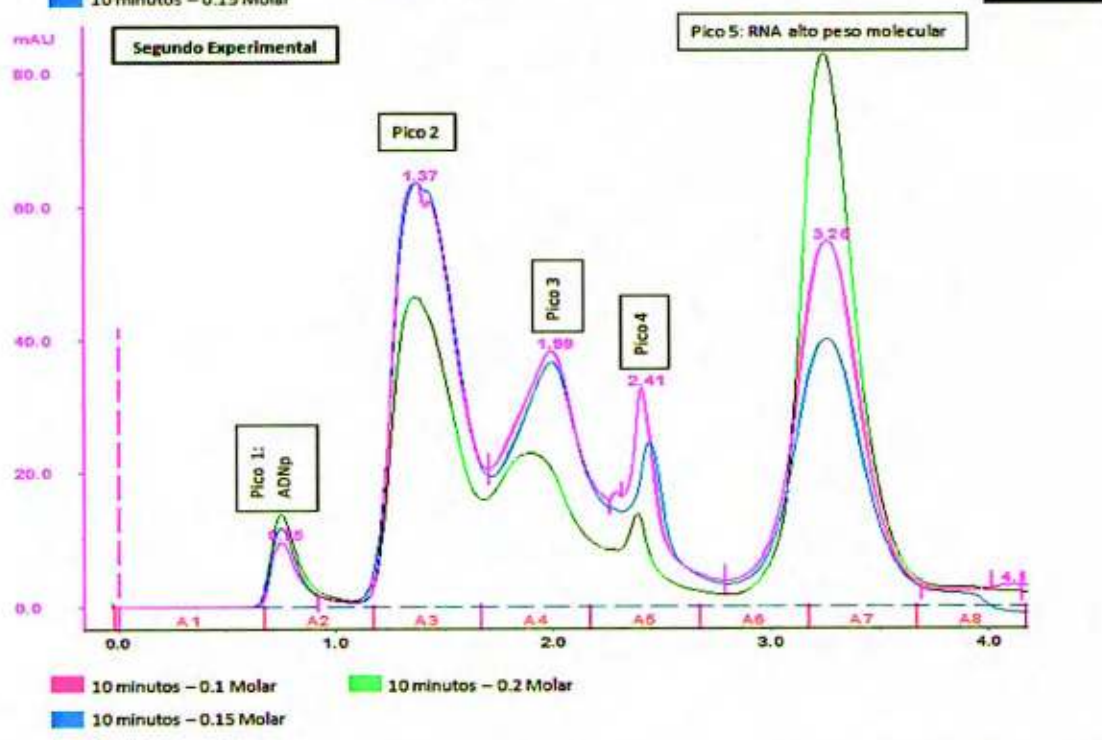
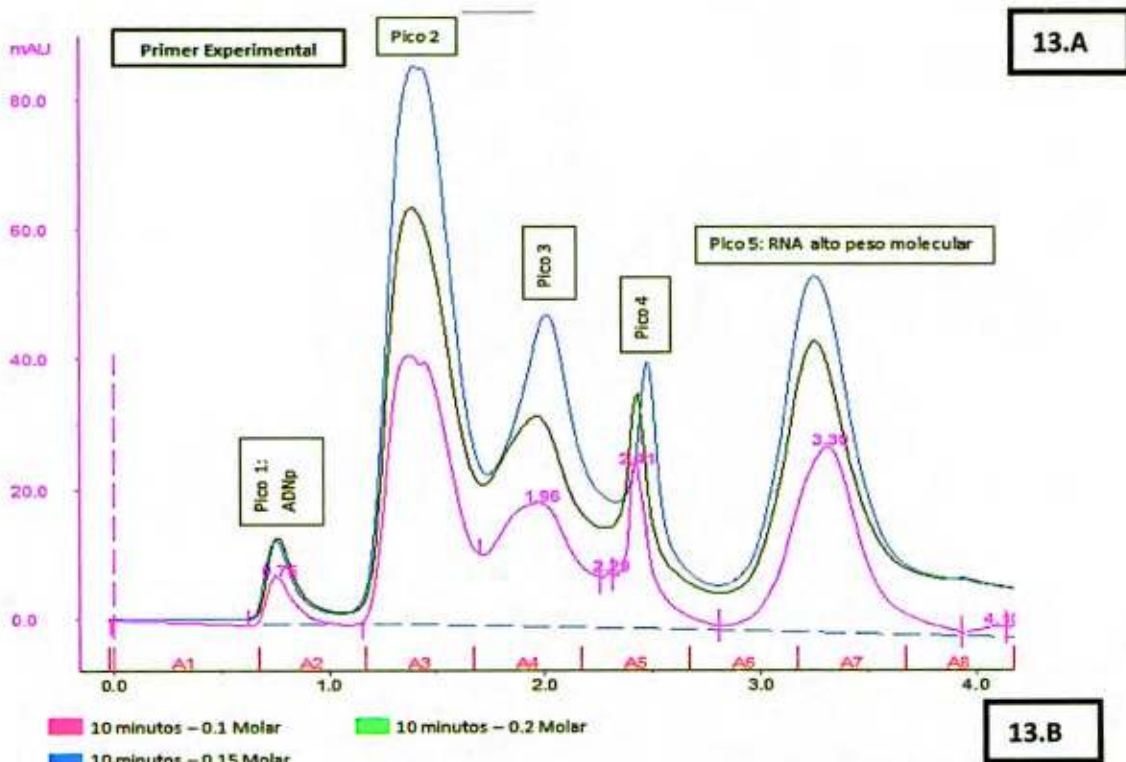


Figura 13. Cromatogramas comparativos, 13.A para el primer estudio experimental y 13.B para el segundo estudio experimental, el primer pico corresponde al pVAX1-NH36, los picos 2, 3 y 4 son atribuidos a contaminantes, siendo el pico 5 el de ARN de alto peso molecular.



El pico número uno es el correspondiente al ADNp, ya que su estructura super-enrollada, con las bases aromáticas de los nucleótidos orientadas a la parte interna de la molécula, no permite que ésta se adsorba por la columna siendo la primer molécula en salir tardando entre 0.74-0.75 minutos. La concentración de pVAX1-NH36 se obtuvo a través del área correspondiente en los cromatogramas, utilizando la ecuación de la recta de la curva estándar obtenida para este plásmido. La Tabla IV muestra los p valores arrojados por el paquete estadístico SPSS para los factores: tiempo y molaridad de NaOH obtenidos con las concentraciones de pVAX1-NH36 para cada experimental, en éste se obtuvo que para el primer estudio experimental el factor tiempo es significativo. Para el segundo estudio experimental se obtuvo que tanto el factor tiempo como el factor molaridad fueron significativos.

Tabla IV. p Valores para las concentraciones obtenidas de pVAX1-NH36 para ambos experimentales.

FACTORES	p Valor	
	Primer experimental	Segundo experimental
<b>Tiempo</b>	□□ 0.001	□□ 0.001
<b>Molaridad</b>	0.737	□□ 0.001

Los picos 2, 3, 4 y 5, corresponden a contaminantes los cuales se esperan sean eliminados en las operaciones posteriores a la lisis alcalina. Las áreas de estos picos fueron analizadas en el paquete estadístico SPSS, mediante el diseño factorial mencionado antes, los resultados indican que no hay diferencia significativa en el factor tiempo ni en el factor molaridad de NaOH para los niveles estudiados en los contaminantes liberados en la reacción.

La Figura 14 muestra la cinética de recuperación de pVAX1-NH36 para el primer estudio experimental, en éstase observa que la concentración de plásmido tiende a disminuir del minuto 1 al 5, mientras que de los 10 a los 15 minutos se observa un incremento de la concentración del plásmido al utilizar las concentraciones de NaOH de 0.1 y 0.2M y a los 20

minutos de lisis la concentración decrece para las tres concentraciones de NaOH utilizadas, lo cual es apoyado por el análisis estadístico.

En la Figura 15 correspondiente al segundo estudio experimental en donde se observa que la concentración de plásmido se incrementa en forma lineal del minuto 1 a los 15 minutos de incubación al utilizar NaOH 0.1 y 0.2 M, la mayor concentración de plásmido se obtuvo al utilizar la concentración de NaOH de 0.2 M, al igual que en el primer experimento se puede observar que la concentración del plásmido disminuyó a los 20 minutos de incubación para los tres buffers de lisis utilizados. Si no se considera este punto se obtiene una cinética lineal (Fig. 15). La Figura 15 muestra una clara diferencia en la concentración del plásmido obtenida tanto en las diferentes molaridades como también en los diferentes tiempos.

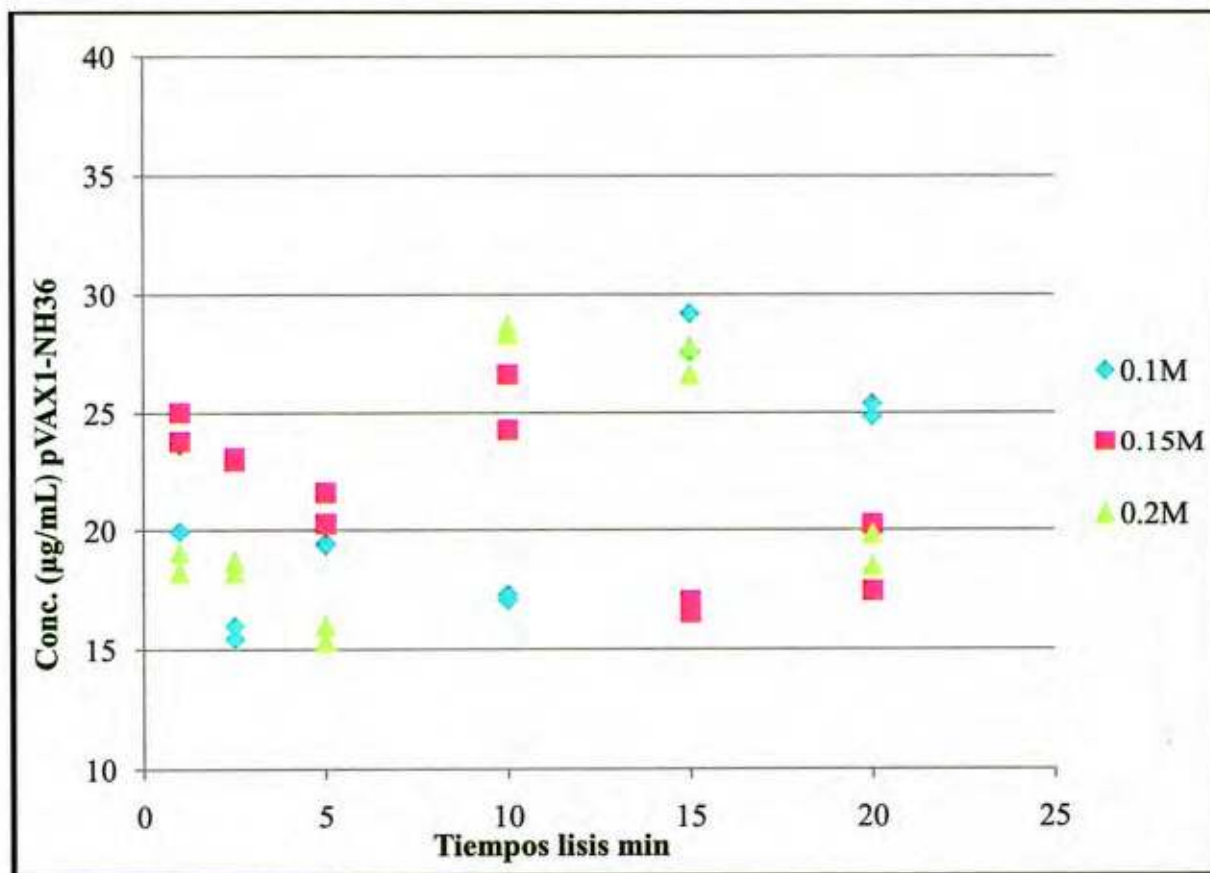


Figura 14. Primer estudio Experimental. Cinética de recuperación de pVAX1-NH36 para cada lisado (por duplicado) a diferentes concentraciones de NaOH:  $\blacklozenge$  = NaOH 0.1M,  $\blacksquare$  = NaOH 0.15M y  $\blacktriangle$  = NaOH 0.2M.

En la Figura 15 se puede observar que el tiempo de lisis en donde se alcanza la mayor concentración de pVAX1-NH36(35µg/mL) es a los 15 minutos de incubación con la más alta molaridad de buffer de lisis trabajada. Al utilizar NaOH 0.2M en el buffer de lisis la concentración obtenida es 1.5 veces mayor que cuando se utilizó NaOH 0.1M ya que la máxima concentración para esta molaridad fue de 23.15µg/mL.

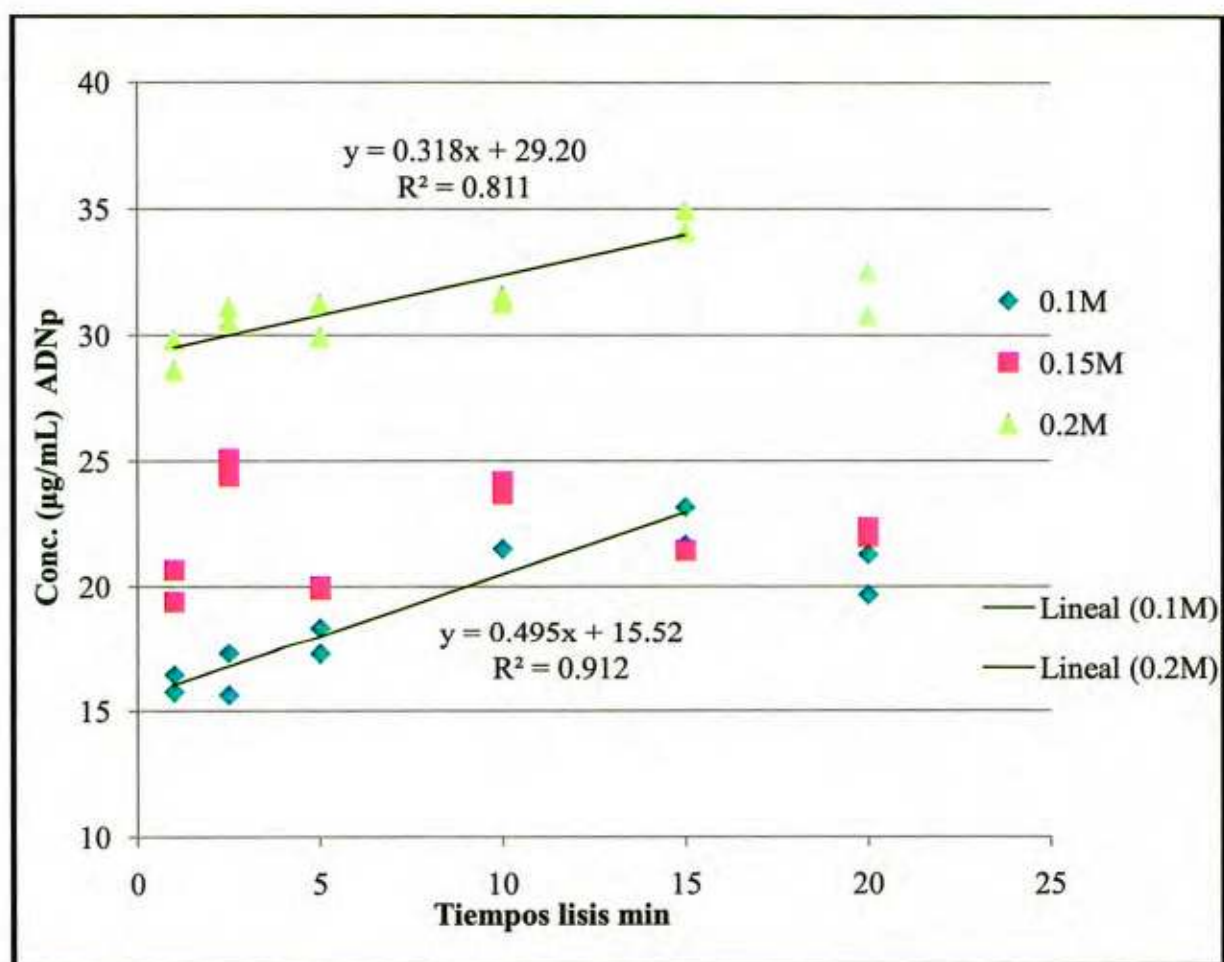


Figura 15. Segundo estudio Experimental. Cinética de recuperación de pVAX1-NH36 para cada lisado (por duplicado) a diferentes concentraciones de NaOH: ♦ = NaOH 0.1M, ■ = NaOH 0.15M y ▲ = NaOH 0.2M.



## VIII. DISCUSIÓN

El método de cuantificación de PT no sirvió como indicativo del rompimiento celular para la recuperación de pVAX1-NH36, ya que a las diferentes molaridades de NaOH y tiempos empleados para el estudio de la cinética de Lisis Alcalina, no presentan un patrón específico (Fig. 10), y los resultados arrojados por el paquete estadístico nos dicen que la concentración de PT no depende de la molaridad de NaOH en el buffer de lisis ni del tiempo de incubación que tienen las células en éste.

Al analizar los resultados, de la recuperación del plásmido, mostrados en la imagen del gel de electroforesis (Figs. 11 y 12), se observa una mayor amplitud de la banda de pVAX1-NH36 en los lisados procesados con 0.2M de NaOH. Así mismo, se observa una mayor presencia de contaminantes en los tiempos de 10, 15 y 20 minutos, siendo más notorio en la Figura 8 correspondiente al segundo estudio experimental; esto puede deberse a que en los ribosomas se lleva a cabo la síntesis de proteína y es aquí donde se encuentra una buena concentración de ARN (Tabla I), puede ser que al incrementar el tiempo de incubación con el buffer de lisis se llegue a desnaturalizar al ribosoma y se liberen los fragmentos de ARN que se encuentran dentro del mismo.

En el primero y segundo estudio experimental hay diferencias significativas en la concentración del plásmido en lo correspondiente al factor tiempo. Se observa en las figuras 14 y 15, que a los 20 minutos de incubación en cualquier molaridad hay una disminución en la concentración de pVAX1-NH36. Freitas et al. (2007) analizó lisados con NaOH 0.1M a 4 horas de incubación, donde observó que el rendimiento de los plásmidos que él trabajó se reducía de un 12 a 19% después de 20 a 30 minutos.

Para el primer estudio experimental se muestra un patrón aleatorio en las concentraciones de pVAX1.NH36; esto puede deberse a que los lisados estuvieron congelados (4°C) durante varias semanas antes de ser cuantificados, y durante este período hubo un fallo de energía eléctrica en el edificio. Freitas et al. (2007) establece que los lisados clarificados deben almacenarse solo unos cuantos días a 4°C para evitar la degradación de la isoforma super-enrollada del ADNp.

Para el segundo estudio experimental se encontró una diferencia significativa en las concentraciones del plásmido tanto en el tiempo de incubación como en la molaridad utilizada

en la lisis. El resultado obtenido en la cinética de recuperación de pVAX1-NH36 para este experimental es consistente con la electroforesis y con la comparación de los cromatogramas presentados en la Figura 13.B; los resultados obtenidos en estos estudios son distintos a lo establecido por Meacle et al. (2004) y quienes afirman que a molaridades de NaOH entre 0.075 y 0.1 se obtiene la mayor cantidad de plásmido con los mejores concentraciones (de 1.6 a 1.9  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ).

En la Figura 15 se observa que el cambio de la concentración de plásmido en el tiempo es mayor para 0.1M de NaOH en el buffer de lisis que para 0.2M; esto sugiere que a 0.2M y un minuto de incubación podría llevarse a cabo el rompimiento celular como lo ha sugerido Prazeres et al. (2001).

El tiempo de incubación de las células con el buffer de lisis que es utilizado por la mayoría de los autores es de 10 minutos, sin embargo los que resultados que hemos obtenido nos indican que a los 15 minutos se obtiene una mayor concentración de pVAX1-NH36, difiriendo de lo establecido por Meacle et al. (2004) que recomienda usar 0.09M de NaOH por 10 minutos donde obtuvieron una concentración de 1.9  $\mu\text{g}/\text{mL}$ . La mayor concentración de plásmido obtenida en esta investigación fue de 35  $\mu\text{g}/\text{ml}$  utilizando NaOH 0.2M y 15 minutos de lisis, dicha concentración es 18.42 veces mayor que la que obtuvo Meacle et al. (2004), por lo que se obtuvo un gran rendimiento de plásmido bajo las condiciones a las que se procesó esta muestra.



## IX. CONCLUSIONES

Para los tiempos de exposición y molaridades del buffer de lisis estudiados, no se observa que éstos influyan en la cantidad de PT liberada.

Al aumentar la molaridad de NaOH de 0.1 a 0.2 en el buffer de lisis, no se afecta la integridad de nuestro plásmido, al contrario se obtiene una mayor concentración de pVAX1-NH36; lo mismo para los tiempos de exposición de las células al buffer, resultando con una mayor concentración a los 15 minutos en vez de a 10.

La electroforesis en gel de agarosa indica que la mayor cantidad de plásmido se obtienen utilizando 0.2M de NaOH en el buffer de lisis.

La determinación cuantitativa del plásmido muestra una cinética lineal para la recuperación del pVAX1-NH36 para un tiempo óptimo de 15 minutos de incubación. Encontrándose una mayor concentración del plásmido recuperado con el buffer de lisis preparado con 0.2 M de NaOH y 15 minutos de incubación y la concentración obtenida fue 18.42 veces superior a la obtenida por Meacle et al. (2004). Esto está en concordancia con el análisis de electroforesis realizado.

## X. LITERATURA CITADA

- Arce C. N. 2011. Análisis del Comportamiento de la Producción del Plásmido pVAX1-NH36 Hospedado en *Escherichia coli* DH5 $\alpha$  en un Reactor Lote Alimentado. Tesis de Licenciatura en Biología. Universidad de Sonora, Departamento de Investigaciones Científicas y Tecnológicas. Hermosillo, Sonora, México.
- Aguilar-Be I., da Silva Z. R., Paraguai de Souza E., Borja-Cabrera G.P., Rosado-Vallado M., Mut-Martin M., García-Miss M.R., Palatnik de Sousa C.B., Dumonteil E. 2005. Cross protective efficacy of a prophylactic *Leishmania donovani* DNA vaccine against visceral and Visceral and Cutaneous Murine Leishmaniasis. *Infection and Immunity* 73(2): 812–819.
- Berman J. D. 1996. Human Leishmaniasis: Clinical, Diagnostic and Chemotherapeutic Developments in the Last 10 Years. *Clinical Infectious Diseases* 1997; 24:684-703.
- Birnboim H. C. y Doly J. 1979. A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *7(6)*: 1513-1523.
- Carnes A. E. y Williams J. 2007. Plasmid DNA manufacturing technology. *Nature Technology Corporation.Recent Patents on Biotechnology* 1(2), 1-16
- Carnes, A. E. 2005. Fermentation design for the manufacture of therapeutic plasmid DNA. *Bioprocess International* 3(9): 36-42.
- Chamsart S., Karnjanasorn T. 2006. Alkaline-Cell Lysis Through in-line Static Mixer Reactor for the Production of Plasmid DNA for Gene Therapy. *Biotechnology and Bioengineering* DDI 10.1002/bit. 21142.
- Danquah M.K., Forde G.M. 2007. Growth Medium Selection and Its Economic Impact on Plasmid DNA Production. *J. of Bioscience and Bioengineering* 104(6): 490-497.
- Diogo M. M., Ribeiro S., Queiroz J.A., Monteiro G.A, Perrin P., Tordo N.yPrazeres D.M.F. 2000. Scale-up of hydrophobic interaction chromatography for the purification of a DNA vaccine against rabies. *Biotechnology Letters* 22: 1397–1400.
- Diogo M. M., Queiroz J. A. yPrazeres D. M. F. 2003. Assessment of purity and quantification of plasmid DNA in process solutions using High-performance hydrophobic interaction chromatography. *Journal of Chromatography A* 998, 109-117.

- Diogo M. M., Queiroz J. A. y Prazeres D. M. F. 2005. Chromatography of plasmid DNA. *Journal of Chromatography A* 1069: 3-22.
- Dumonteil Eric. 2000. Vacunas de DNA: el presente y el futuro. *Rev. Biomed.* 11: 7-12.
- Dumonteil Eric. 2007. DNA Vaccines against Protozoan Parasites: Advances and Challenges. *Journal of Biomedicine and Biotechnology*. Article ID 90520.
- Eon-Duval. A., MacDuff R. H., Fisher C. A., Harris M. J., Brook C. 2002. Removal of RNA impurities by tangential flow filtration in an RNase-free plasmid DNA purification process. *Analytical Biochemistry* 316: 66-73.
- Ferreira G.N.M. 2005. Chromatographic Approaches in the Purification of Plasmid DNA for Therapy and Vaccination. *Chem. Eng. Technol.* 28(11): 1285-1294.
- Freitas S. S., Azzoni A. R., Santos J. A. L., Monteiro G. A., Prazeres D. M. F. 2007. On the stability of Plasmid DNA Vectors during cell culture and purification. *Mol. Biotechnol* 36: 151-158.
- Freitas S. S., Santos J. A. L., Prazeres D. M. F. 2008. Plasmid purification by hydrophobic interaction chromatography using sodium citrate in the mobile phase. *Separation and purification Technology SEPPUR* 9222 1-10.
- Fynan , Webster, Fuller, Haynes, Santoro, and Robinson. 1993. Immunology. DNA vaccines: Protective immunizations by parenteral, mucosal, and gene-gun inoculations. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 90: 11478-11482.
- Garza-Velasco R., Gallardo-Celis J., Perea-Menjía L. M. 2007. Vacunas de ADN: inducción de la respuesta inmunitaria. *Educación química*, ISSN 0187-893X 18(3): 181-187.
- Invitrogen, 2012. User guide pVAX1. Catalog no. V260-20, publication part number 25-0256.
- Kelly William J. 2003. Perspectives on plasmid-based gene therapy: challenges for the product and the process. *Minireview, biotechnol. Appl. Biochem.* 37, 219-223.
- Listner K., Bentley L., Chartrain M. 2006. A simple method for the production of plasmid DNA in bioreactors. *DNA Vaccines: Methods and Protocols*, Segunda Edición, Humana Press. 127 (5): 295-309.
- Meacle F. J., Lander R., Ayazi Shamlou P., Titchener-Hooker N. J. 2004. Impact of Engineering Flow Conditions on Plasmid DNA Yield and Purity in Chemical Cell Lysis Operations. *Wiley InterScience* DOI: 10. 1002/bit. 20114.

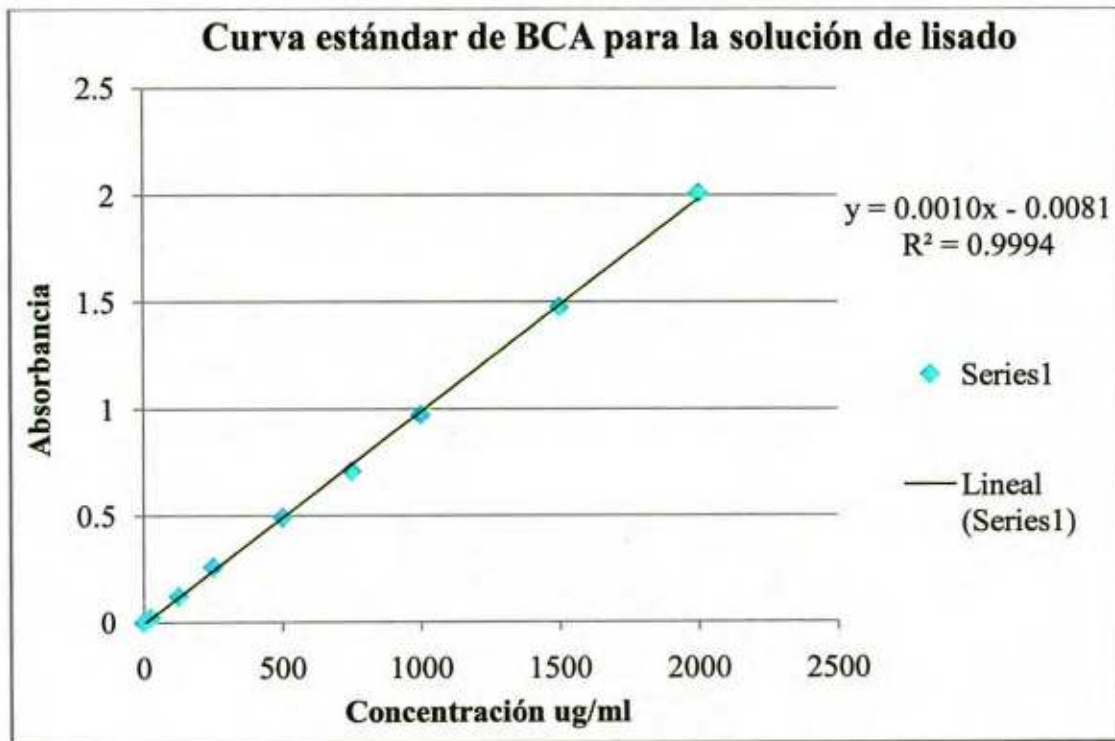
- Mhashilkar A., Chada S., Roth J. A., Ramesh R. 2001. Gene therapy, Therapeutic approaches and implications. Research review paper, *Biotechnology advances* 19, 279-297.
- Molloy K.J., Thompson M.M., Jones J.L. 2004. Unstable carotid plaques exhibit raised matrix metalloproteinase-8 activity. *J. Circ.* 110: 337-343.
- Mota-Sánchez J. 2009. Vacunas de AND: inducción de la respuesta inmunitaria. *Salud pública de México* 51(3): 463-469.
- Munguía Soto Rodolfo. 2011. Producción de pVAX1-NH36 para uso terapéutico mediante un proceso por lote alimentado controlado. Tesis de Maestría en Ciencias de la Ingeniería. Universidad de Sonora, posgrado en ciencias de la ingeniería. Hermosillo, Sonora, México.
- O'Mahony K., Freitag R., Hilbrig F., Müller P., Schumacher I. 2005. Proposal for a better integration of bacterial lysis into the production of plasmid DNA at large scale. *Journal of Biotechnology* 119, 118-132.
- Prather K.J., Sagar S., Murphy J., Chartrain M. 2003. Industrial scale production of plasmid DNA for vaccine and gene therapy: plasmid design, production, and purification. *Enzyme Microb. Technol.* 33, 865 – 883.
- Prazeres, Monteiro, Ferreira, Diogo, Ribeiro and Cabral. 2001. Purification of plasmids for gene therapy and DNA vaccination. *Biotechnology annual review*. Volume 7, 1049-001.
- Prazeres D.M.F., Ferreira G.N.M. 2004. Design of flowsheets for the recovery and purification of plasmids for gene therapy and DNA vaccination. *Chem. Eng. Process.* 43, 609 – 624.
- Primrose S.B., Twyman R.M., Old R.W. 2002. *Principles of Gene Manipulation*. Blackwell Science. 6<sup>a</sup> Ed. Estados Unidos.
- Schalk J. A. C., Hegger I., Jongen P.M. J. M. 2001. Gene therapeutics and DNA vaccines; quality and regulatory aspects. RIVM report 605200 001.
- Smith, P.K., Goldstein M.L., Gary S.P., Russell C.T. 1985. Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Anal. Biochem.* 150 (1): 76–85.
- Walker J. M. 1996. The Bicinchoninic Acid (BCA) Assay for Protein Quantitation. *The protein protocols handbook part I*, 11-14, DOI: 10.1007/978-1-60327-259-9\_3.
- Wang Zhijun, Le Guowei, Shi Yonghui, We Grzegorz. 2001. Medium design for plasmid DNA production based on stoichiometric model. *Process Biochemistry* 36: 1085–1093.



Williams J. A., Luke J., Langtry S., Anderson S., Hodgson C. P., Carnes A. E. 2009. Generic Plasmid DNA Production Platform Incorporating Low Metabolic Burden Seed-Stock and Fed-Batch Fermentation Processes. WileyInterScience DOI 10.1002/bit. 22347.

## Apéndice I

Curva estándar de BCA para la cuantificación de PT. Se utilizó como diluyente, de la albúmina de suero de bovino, una combinación de buffer de lisis de 0.15M de NaOH con buffer de neutralización para imitar el medio en el que se encontraban los lisados.



T-160052

## Apéndice II

Curva patrón para la cuantificación de pVAX1-NH36.

