



"El saber de mis hijos
hará mi grandeza"

UNIVERSIDAD DE SONORA

DIVISIÓN DE INGENIERÍA

DEPARTAMENTO DE INGENIERÍA QUÍMICA Y METALURGIA

**ESTUDIO DE LA CLARIFICACIÓN DE LISADOS DE *E. coli*
PARA RECUPERAR EL PLÁSMIDO pVAX1-NH36 POR MEDIO
DE MICROFILTRACIÓN TANGENCIAL**

TESIS PROFESIONAL

Que para obtener el título de:

INGENIERO QUÍMICO

PRESENTA:

ESPERANZA DEL ROCÍO MENDOZA SÁNCHEZ

Hermosillo, Sonora

Diciembre 2017

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



"El saber de mis hijos
hará mi grandeza"

UNIVERSIDAD DE SONORA

DIVISIÓN DE INGENIERÍA

DEPARTAMENTO DE INGENIERÍA QUÍMICA Y METALURGIA

ESTUDIO DE LA CLARIFICACIÓN DE LISADOS DE *E. coli* PARA RECUPERAR EL PLÁSMIDO pVAX1-NH36 POR MEDIO DE MICROFILTRACIÓN TANGENCIAL

TESIS PROFESIONAL

Que para obtener el título de:

INGENIERO QUÍMICO

PRESENTA:

ESPERANZA DEL ROCÍO MENDOZA SÁNCHEZ

Hermosillo, Sonora

Diciembre 2017

OFICIO DE AUTORIZACIÓN DE EXAMEN DE GRADO

RESUMEN

Los avances tecnológicos han permitido desarrollar productos que mejoren la calidad de vida del ser humano, como ejemplo de ello tenemos las vacunas basadas en ADN plasmídico (ADNp). Para el desarrollo de este tipo de vacunas se parte de bacterias que han sido modificadas mediante la inserción, en el ADNp, de un gen que codifica para una proteína que realiza la acción inmunizante. Para la producción y purificación del ADNp se ha establecido un bioproceso, dentro del cual encontramos cuatro etapas: a) Propagación celular: que incluye la preparación del medio, el inóculo y la fermentación; b) Recuperación primaria: ruptura celular y clarificación para remoción de desecho celulares; c) Recuperación intermedia: recuperación y concentración del producto; d) Purificación final.

En la etapa de recuperación primaria se encuentra la clarificación del lisado, que a nivel laboratorio se realiza generalmente por centrifugación. Sin embargo, esta técnica emplea alta inversión en costos de energía y tiempo, además puede ser difícil de escalar. Debido a estos inconvenientes que presenta la centrifugación, se realizó la propuesta de utilizar una técnica más sencilla y barata como la microfiltración de flujo tangencial para la clarificación de lisados neutralizados conteniendo plásmido pVAX1-NH36.

En la clarificación por microfiltración se inició con una filtración a vacío, seguido de un lavado de flóculos. El filtrado obtenido se alimenta a la microfiltración de flujo tangencial para obtener el lisado clarificado. Al final de la microfiltración se realizó el lavado de membrana con el fin de evaluar la presencia de plásmido retenido. Este procedimiento de clarificación se comparó con la clarificación por centrifugación. Se realizaron los balances de masa correspondientes, así como estudios por electroforesis y cromatografía de interacción hidrofóbica para evaluar la presencia de ADNp en los lisados clarificados y la remoción de sólidos en suspensión por medio de la medición de la turbidez.

DEDICATORIA

Por todo el apoyo que he tenido a lo largo de mi vida académica, la motivación por aprender y las ganas de salir adelante, le dedico esta investigación a mi padre el Dr. José Antonio Mendoza, sin tu constante ayuda no hubiera podido aguantar este camino difícil de culminar mi etapa de estudios profesionales, mil gracias por todo y a mi madre la Lic. Norma Sánchez, por todo su amor y apoyo durante toda la carrera. También la ayuda y el apoyo de mis hermanas Adriana (Pirina) y la Dra. Marlyn (Ladishka).

El primer de muchos pasos es para ustedes, la base de toda mi vida y mi aprendizaje. Gracias por siempre motivarme a ser una persona exitosa, y sobre todo por darme las fuerzas necesarias para superar cualquier tipo de obstáculo.

AGRADECIMIENTO

Agradezco mucho a mi tutora de tesis la Dra. Patricia Guerrero Germán, por su constante paciencia, apoyo y consejos para terminar este trabajo de investigación, demostrarme que siempre se puede tener tiempo para todo. A mis sinodales Dr. Armando Tejeda Mansir por permitirme trabajar en su laboratorio, mi maestro Gilberto García Navarrete por sus consejos durante toda mi carrera y al Dr. Jesús Armando Lucero Acuña por su aportación en la culminación de mi investigación.

Agradezco al Departamento de Investigaciones Científicas y Tecnológicas de la Universidad de Sonora (DICTUS) por prestarme sus instalaciones y laboratorios para llevar a cabo mis experimentos de investigación. Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por el apoyo económico que me brindó durante esta investigación y al Departamento de Ingeniería Química y Metalurgia por permitirme usar los equipos que fueron necesarios.

También agradezco a mis amigos de la carrera Luis Ureña, Miguel Ángel y Elizabeth Montaña por su tiempo y apoyo durante las pruebas experimentales de esta investigación.

Finalmente, a mi novio Gustavo Rivera por su amor, apoyo y ayuda de manera constante a lo largo de mis estudios.

TABLA DE CONTENIDOS

RESUMEN.....	IV
DEDICATORIA	V
AGRADECIMIENTO	VI
TABLA DE CONTENIDOS.....	VII
LISTA DE FIGURAS.....	X
LISTA DE TABLAS	1
CAPÍTULO I	2
INTRODUCCIÓN Y OBJETIVOS	2
1.1 Introducción	2
1.2 Justificación	3
1.3 Objetivo General	3
1.4 Objetivos Específicos	3
CAPÍTULO II.....	4
ANTECEDENTES	4
2.1 Terapia Génica y Vacunas Basadas en ADNp.....	4
2.2 Características del ADNp	4
2.3 Proceso de Producción de ADNp.....	6

2.3.1 Fermentación.....	7
2.3.2 Lisis Alcalina.....	8
2.3.3 Clarificación.....	9
CAPÍTULO III	14
MATERIALES, EQUIPOS Y METODOLOGÍA	14
3.1 Materiales.....	14
3.2 Equipos.....	15
3.3 Metodología	18
3.3.1 Cultivo y cosecha celular	18
3.3.2 Lisis Alcalina.....	18
3.3.3 Clarificación de lisado neutralizado.....	20
3.3.4 Determinación de la resistencia de la membrana.....	22
3.3.5 Análisis de muestras.....	25
CAPÍTULO IV.....	27
RESULTADOS Y DISCUSIÓN	27
4.1 Determinación de la resistencia de la membrana en el sistema experimental de microfiltración	27
4.2 Clarificación de lisado neutralizado	29
4.2.1 Microfiltración de flujo tangencial.....	31
4.2.2 Centrifugación.	35
CAPÍTULO V	37

CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES	38
5.1 Conclusiones.....	38
5.2 Recomendaciones.....	39
CAPÍTULO VI.....	40
BIBLIOGRAFÍA	40

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Imágenes por microscopía electrónica de transmisión (TEM) de isofomas de plásmidos.	5
Figura 2. Del gen al paciente: el debate de la terapia genética.....	6
Figura 3. Alternativas típicas del proceso de producción de plásmidos.	7
Figura 4. Operaciones unitarias usadas para remover sólidos (flóculos y precipitados) del lisado neutralizado.	9
Figura 5. Mecanismos de filtración.....	10
Figura 6. Flujos de la filtración.....	11
Figura 7. Esquema de los tipos de filtración de acuerdo con el medio filtrante y la remoción de sólidos según el tamaño de partícula.	12
Figura 8. Equipo de cosecha. Incubadora VWR®.	15
Figura 9. Centrífuga. Thermo Scientific®.....	15
Figura 10. Sistema de filtración a vacío.	16
Figura 11. Sistema de microfiltración de flujo tangencial experimental.....	16
Figura 12. Diagrama de distribución de fluidos del sistema de microfiltración de flujo tangencial experimental.....	17
Figura 13. Equipos de medición de turbidez y cámara.....	17
Figura 14. Diagrama de etapas involucradas en la clarificación por centrifugación y microfiltración.	19

Figura 15. Sistema final de microfiltración de flujo tangencial.....	21
Figura 16. Sistema de recirculación total	22
Figura 17. Cromatograma típico de análisis HIC-HPLC (muestra analizada lisado neutralizado).....	26
Figura 18. Grafico Flux en función de la presión transmembrana (Δ PTM).....	27
Figura 19. Diagrama de etapas con puntos clave. Los puntos señalados representan donde se realizó el balance de masa.	29
Figura 20. Electroforesis de muestras durante las etapas de clarificación de lisados neutralizados.....	30
Figura 21. Cromatograma de filtrado a vacío.	31
Figura 22. Cromatograma de HIC para el clarificado por centrifugación.	35
Figura 23. Cromatogramas de HIC para el filtrado a vacío, microfiltración de flujo tangencial y centrifugación.	37

LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Resultados del filtrado a vacío.....	31
Tabla 2. Mediciones representativas en la filtración a vacío y lavado de flóculos.....	32
Tabla 3. Resultados de mediciones de la microfiltración.....	33
Tabla 4. Datos representativos de volumen, turbidez, pH y masa medidos en la etapa de microfiltración y lavado de membrana	33
Tabla 5. Valores experimentales en la clarificación por centrifugación.....	35
Tabla 6. Concentración másica de plásmido encontrada en la clarificación por microfiltración y en la centrifugación.	36

CAPÍTULO I

INTRODUCCIÓN Y OBJETIVOS

1.1 Introducción

Los avances en la tecnología han permitido al hombre desarrollar métodos científicos que mejoren la calidad de vida de la sociedad actual. Alguna de estas mejoras ha sido el uso de los bioprocesos, que es definido como el proceso industrial que involucra la manipulación de organismos vivos o cualquiera de sus componentes celulares, con el fin de obtener servicios o bienes. A partir de estos bioprocesos se pueden realizar distintas formas de combatir enfermedades mortales para el ser humano.

El plásmido DNA (vacunas de ADN o terapia génica) podría ser utilizado para aplicaciones preventivas como vacunas (contra virus, bacterias o parásitos), agentes terapéuticos (contra enfermedades infecciosas, alergias) o vacunas contra el cáncer (Carnes y Williams., 2007).

La demanda de ADN plasmídico (ADNp) ha aumentado enormemente en respuesta a los rápidos avances en su uso en terapia génica y vacunas (Guerrero y col., 2008). La producción y purificación de plásmidos incluye etapas de fermentación, aislamiento primario, recuperación intermedia y purificación (Prazeres y col., 1999).

El bioproceso consiste en una secuencia de operaciones unitarias diseñadas para la recuperación de ADN plasmídico provenientes de las células hospederas y para remover impurezas y contaminantes. Operaciones unitarias como la centrifugación, filtración, la floculación, entre otras, son usadas solas o combinadas, para remover flóculos y restos celulares en el lisado. Aunque la centrifugación se usa ampliamente a escala de laboratorio, no es un proceso muy atractivo debido a la alta fuerza cortante generada, (Prazeres y col., 2001) y el interés en la filtración ha estado en constante crecimiento (Karim y col., 2008).

Comúnmente la técnica más empleada para la recuperación intermedia es la centrifugación, pero este proceso de clarificación implica costo de energía, tiempo, y se desarrolla a nivel laboratorio, por lo que en este trabajo se realizará el proceso de la microfiltración de flujo tangencial, un método sencillo de trabajar que en comparación de la centrifugación es de bajo consumo energético, menor tiempo de operación y puede escalarse.

1.2 Justificación

Se propone utilizar una técnica por filtración para clarificar lisados neutralizados, basándose en filtración a vacío y microfiltración de flujo tangencial, que en comparación con la clarificación por centrifugación proporcione una recuperación de plásmido de manera menos costosa y con menor tiempo de operación.

1.3 Objetivo General

Estudiar la recuperación del plásmido pVAX1-NH36 a partir de lisados neutralizados de *E. coli* por medio de microfiltración de flujo tangencial.

1.4 Objetivos Específicos

- Evaluar la filtración del lisado neutralizado utilizando un filtro con tamaño de poro de 11 μm , así como el lavado de los flóculos retenidos para la recuperación de plásmido.
- Realizar la clarificación del lisado celular por medio de microfiltración de flujo tangencial, utilizando una membrana de fibra hueca con tamaño de poro de 0.45 μm .
- Analizar el comportamiento de las operaciones de microfiltración por medio de turbidez, electroforesis y cromatografía analítica de interacción hidrofóbica.
- Realizar una comparación entre la técnica de clarificación propuesta y la clarificación por centrifugación, mediante balances de masa y turbidez.

CAPÍTULO II

ANTECEDENTES

2.1 Terapia Génica y Vacunas Basadas en ADNp

Los genes insertados en los plásmidos prometen una nueva generación de vacunas y terapias genéticas. Utilizando la información del diseño de bioprocesos basado en estudios fundamentados de las propiedades del sistema, será posible crear procesos eficientes y consistentes para estos agentes terapéuticos (Kong y col.,2006).

Este tipo de vacuna es prometedora para el tratamiento del cáncer y enfermedades. Las vacunas de ADN tienen ventajas potenciales en comparación con las vacunas actuales, algunas de estas ventajas son: facilidad de preparación, estabilidad y seguridad para el huésped (Huygen, 2005).

Las plataformas de vacunas de ADN son adecuadas para abordar o detectar amenazas de enfermedades infecciosas antes de que se conviertan en pandemia. Esto es evidenciado por ser utilizado en numerosas aplicaciones de laboratorio, por ejemplo en ensayos completos o activos utilizando vacunas de ADNp para tratamiento del cáncer, hepatitis B y C, malaria, influenza, Dengue y virus del Ébola (Ghanem y col., 2012).

2.2 Características del ADNp

Los plásmidos son moléculas extracromosómicas de ADN de cadena cerrada, de doble hélice que se caracterizan por que se pueden replicar de manera independiente del ADN genómico. Cada plásmido tiene por lo menos una secuencia de ADN que sirve como origen de replicación, es decir, un punto de partida para la réplica del ADN que permite al plásmido duplicarse (Diogo y col., 2005).

Los plásmidos utilizados con fines terapéuticos y de prevención contienen genes insertados y generalmente son de mayor tamaño que las proteínas. El ADNp tiene el potencial de expresar proteínas al agregarse al ADN de una célula. En muchos casos, genes enteros son incorporados y expresados en las células objetivo, produciéndolas correspondientes proteínas terapéuticas (Schalk y col., 2006).

El desarrollo y la configuración de procesos para la purificación de ADNp se basan en una comprensión de su composición molecular, estructura y topología (Prazeres, 2001). En una fracción de moléculas de ADNp también pueden existir isoformas como: (A) circular abierto, (B) unión de un superenrollada con un circular abierto, (C) relajados (D) superenrollado, como se muestran en la Figura 1.

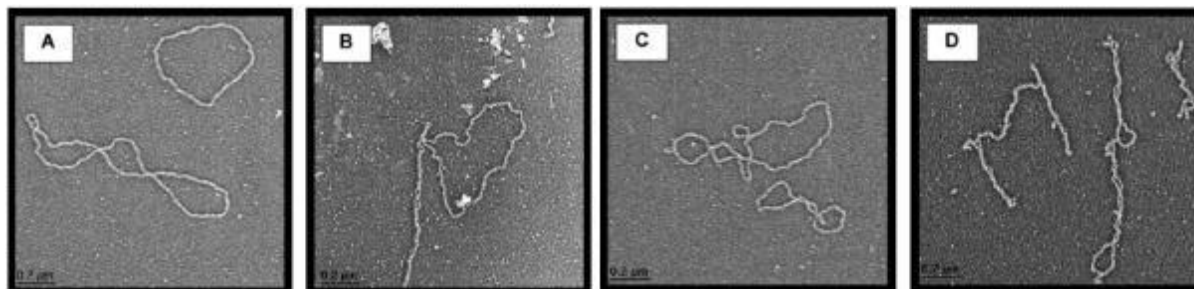


Figura 1. Imágenes por microscopía electrónica de transmisión (TEM) de isoformas de plásmidos. Adaptada de Smith y col., 2007.

Existe una comprensión actual de que los vectores plasmídicos deberían estar principalmente en la forma superenrollada que se cree que es más eficaz en la transferencia de expresión de genes cuando se compara con otras variantes (Prazeres y col., 2001).

Aunque los genes terapéuticos pueden ser transportados por varios tipos de vectores virales, los vectores ADNp se han considerado más seguros, más simples de usar y más fáciles de producir a gran escala. El consiguiente uso de vectores ADNp en ensayos preclínicos y clínicos de terapia génica y vacunación con ADN ha aumentado la necesidad de producir grandes cantidades de ADNp altamente puro (Diogo y col., 2005).

La existencia de procesos de fabricación rentables capaces de entregar grandes cantidades de ADN de plásmido de alta calidad (ADNp) es esencial para generar suficiente material para ensayos y apoyar la comercialización futura. Sin embargo, el desarrollo de procesos de fabricación de ADNp a menudo se ve obstaculizado por dificultades en la predicción del rendimiento en escala de proceso del cultivo de *E. coli* sobre la base de los resultados obtenidos a escala de laboratorio (Geisa y col., 2014).

2.3 Proceso de Producción de ADNp

Aunque los plásmidos se producen en *Escherichia coli* como la mayoría de las proteínas, los informes de los métodos de procesamiento para su producción a gran escala no son abundantes. El desarrollo y operación de procesos de producción y purificación a gran escala, capaces de cumplir con las especificaciones del producto (cantidad y calidad) y las normas establecidas por las agencias reguladoras constituye por lo tanto un desafío para la Industria de la Biotecnología (Prazeres y col., 2001).

Para la producción de plásmido se sigue una serie de operaciones que consta de la inserción del gen modificado a la célula hospedera, pasando por un proceso de fermentación y después de un purificado, para finalmente terminar en la formulación y administración al paciente (Figura 2).

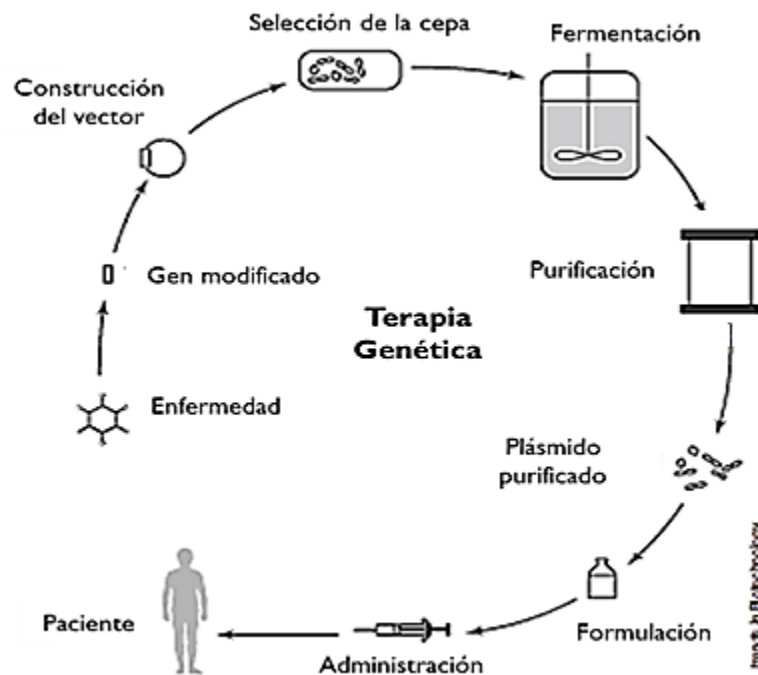


Figura 2. Del gen al paciente: el debate de la terapia génica. Adaptada de Prazeres y col., 1999.

Una vista general de los pasos a seguir en el procesamiento del plásmido se muestra en la Figura 3. En donde se distinguen las etapas la fermentación, cosecha, lisis celular, clarificación, recuperación y purificación. Cada etapa es revisada de forma singular (Carnes y Williams, 2007).

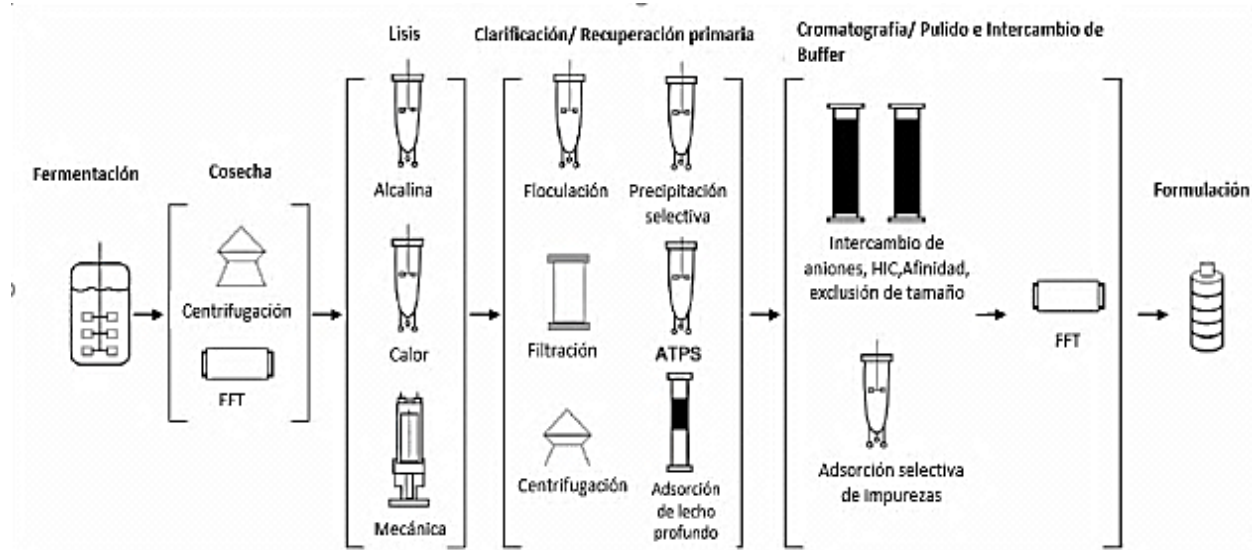


Figura 3. Alternativas típicas del proceso de producción de plásmidos. Las operaciones unitarias comúnmente utilizadas para cada fase del proceso se pueden combinar para hacer una variedad de rutas de procesamiento. Adaptada de Carnes y Williams, 2007.

2.3.1 Fermentación

La etapa de la fermentación es muy importante, ya que en ella se establecen las condiciones necesarias para la propagación celular.

La productividad del plásmido en *E. coli* es proporcional a la concentración celular final y por lo tanto son deseables los cultivos de alta densidad celular. Las ventajas adicionales de tales cultivos son el reducido volumen de cultivo, el procesamiento mejorado, la reducción de los desechos, la reducción de los costos de producción y la reducción de la inversión en equipo (Prazeres y col., 2001).

Fermentación por lotes

La fermentación por lotes tiene la principal ventaja de la simplicidad. Todos los nutrientes que se utilizarán para el crecimiento celular y la producción de plásmidos a lo largo del período de cultivo están presentes en el momento de la inoculación. Durante la fase exponencial todos los nutrientes están en exceso, ésta la tasa de crecimiento específico será esencialmente la tasa máxima de crecimiento específico, μ_{max} , según lo establecido por la cinética de Monod. (Carnes y Williams, 2007).

Fermentación discontinua

La fermentación discontinua es especialmente útil para la producción de plásmidos. La adición controlada de un nutriente limitante permite el control de la tasa de crecimiento. Además, la fermentación en lote alimentado produce un mayor rendimiento de biomasa porque el sustrato se suministra en una proporción tal que se consume casi por completo. Como resultado, la conversión del sustrato a biomasa es muy eficiente y la concentración de sustrato residual es aproximadamente cero, nunca alcanzando concentraciones inhibitorias. El desbordamiento metabólico del exceso de sustrato se reduce, evitando la formación excesiva de acetato inhibidor. Después de la fermentación se continúa con la cosecha para la recuperación de células del caldo. Esta etapa se puede realizar por centrifugación o por filtración. La biomasa se procesa en la siguiente etapa, la lisis (Carnes y Williams, 2007).

2.3.2 Lisis Alcalina

El método de lisis alcalina estándar se usa ampliamente sin restricción en laboratorios de biología. Los detalles de la lisis alcalina, sus modificaciones y su uso a escalas mayores han sido cuidadosamente analizados (Carnes y Williams, 2007). La biomasa se resuspende, para agregar la segunda solución de NaOH y SDS, causante de la lisis, al solubilizar la membrana y pared celular provocando que se libere el material celular.

El método de ruptura celular para el aislamiento del plásmido debe ser elegido con el mínimo de daño ocasionado en el ADN, en la mayoría de los casos también es necesario evitar que se rompa el cromosoma del ADN de la célula hospedera en pequeños fragmentos que son difíciles de separar del ADNp (Carnes y Williams, 2007). Generalmente, se ha utilizado un tiempo de lisis de cinco minutos con el método de lisis alcalina estándar, se conocen tiempos más largos que causan la desnaturalización irreversible del ADN

plasmídico. Se informó que los tiempos de reacción más largos conducían a la degradación por cizallamiento del ADN cromosómico (Carnes y Williams, 2007).

Después de la lisis, se procede a neutralizar el lisado con acetato de potasio, en donde se forman precipitados, materiales altamente gelatinosos por naturaleza que tienden a formar flóculos. Estos flóculos son removidos mediante centrifugación a nivel laboratorio, pero se prefiere la filtración para removerlos en procesos a gran escala (Nunes y col., 2012).

2.3.3 Clarificación

La solución obtenida en la neutralización del lisado alcalino contiene gran cantidad de flóculos, para eliminar estos componentes se puede utilizar cualquier operación de separación sólido- líquido. Las operaciones que han sido utilizadas para estos objetivos son la filtración, flotación y centrifugación, de forma individualmente o en forma combinada como se muestra en la Figura 4, (Prazeres, 2001).

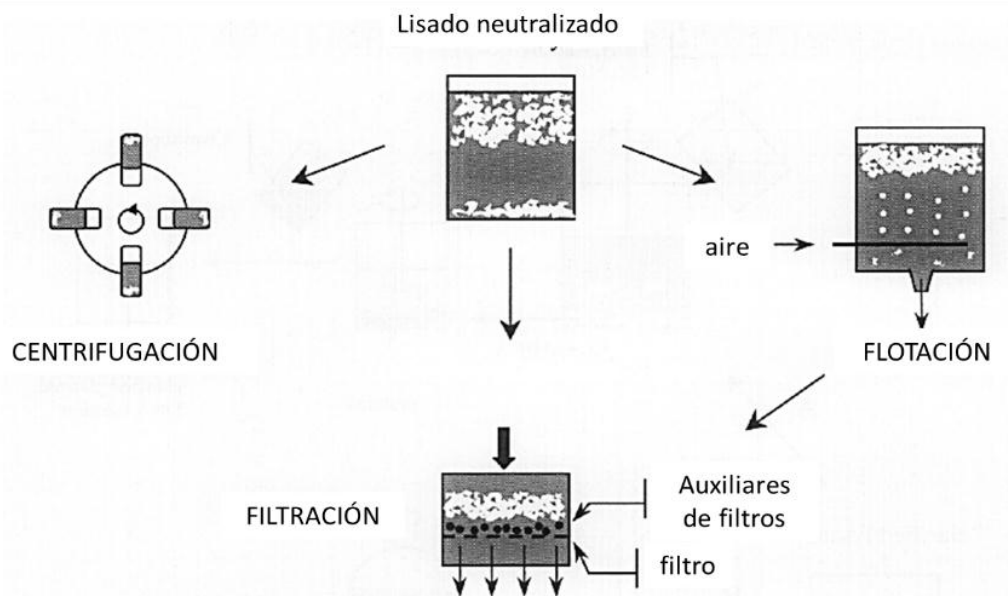


Figura 4. Operaciones unitarias usadas para remover sólidos (flóculos y precipitados) del lisado neutralizado. Adaptada de Prazeres y col, 2001.

La centrifugación es la operación de preferencia, sin embargo, en operaciones a grandes escalas se prefiere la filtración. Como alternativa a la centrifugación se ha estudiado la filtración con diferentes tipos de materiales de poros en un rango de 5-160 μm . Para mejorar la clarificación y la pureza del plásmido se pueden utilizar auxiliares (tierras diatomeas, celulosa) como revestimiento de materiales de filtración. (Theodossiou y col., 1997)

Filtración

La filtración a través de diferentes tipos de materiales (acero inoxidable, polipropileno, poliéster, rayón, papel de filtro) ha sido estudiada como una alternativa a la centrifugación. Durante la filtración, una cierta cantidad de plásmido se pierde siempre al líquido arrastrado en la fase sólida a menos que se lleve a cabo una extensa eliminación de agua (Prazeres y col., 2001).

Recordando que la filtración es la separación de las partículas sólidas del fluido mediante un medio permeable y poroso denominado filtro, el fluido atraviesa el medio permeable a través de los poros, mientras que el sólido queda retenido. En la filtración a vacío se acostumbra a utilizar el papel filtro como medio filtrante, la fuerza que hace caer el filtrado es la succión que se genera. En esta situación, la fuerza que empleamos es mucho más grande que el peso de la solución que se filtra (Grau y col., 2001).

La filtración puede ser utilizada para recuperar un sólido como en una cosecha celular o remover un sólido como en los flóculos del clarificado. En los procesos biotecnológicos se utilizan tres tipos de mecanismos de filtración (Figura 5) a) filtración con formación de torta o filtración convencional b) filtración de lecho profundo y c) filtración con membranas (Tejeda y Col., 2011).

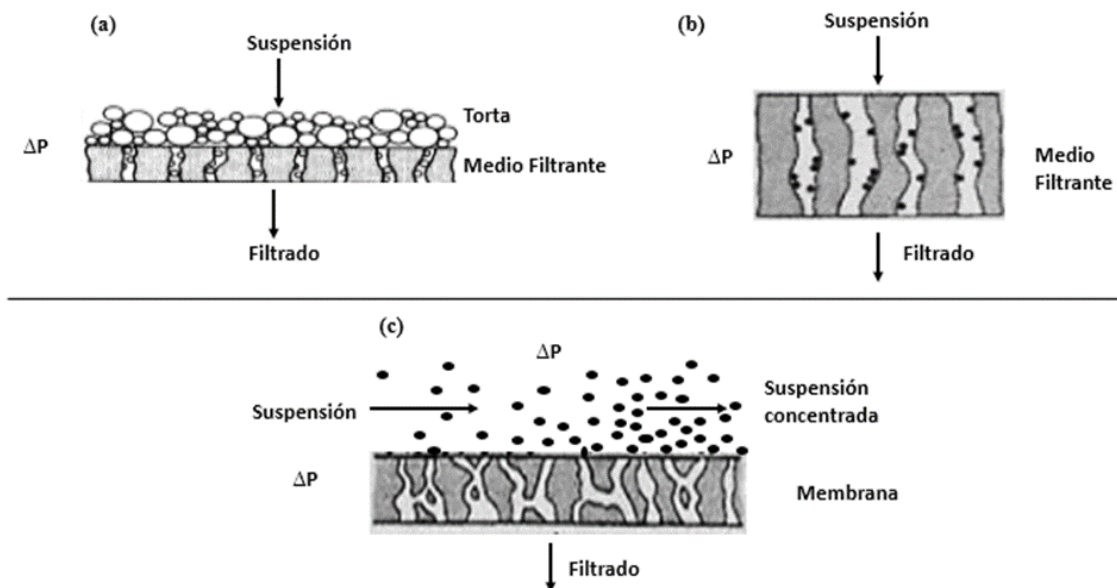
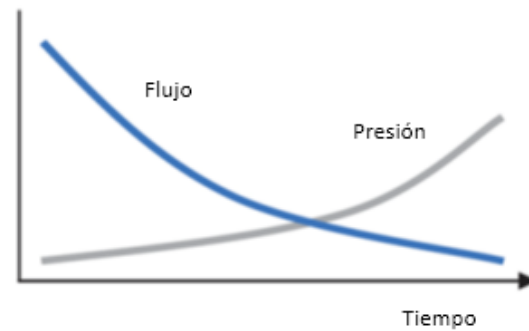


Figura 5. Mecanismos de filtración. a) Filtración con formación de torta, b) Filtración de lecho profundo y c) Filtración con membrana. Adaptada de Tejeda y col.,2011.

Cualquiera que sea el tipo de filtro utilizado, durante la filtración el sólido se va depositando sobre un medio filtrante, formando una torta porosa a través de la que circula casi laminarmente el fluido.

En la filtración de flujo cruzado o ultrafiltración, los sólidos (desde $5\ \mu\text{m}$ hasta $0.03\ \mu\text{m}$) son separados en flujo tangencial al medio filtrante y separados continuamente sin acumulación sobre el medio filtrante (membranas). En este caso, no todo el caudal de líquido pasa a través del medio filtrante, sino que existirá salida tanto de un líquido filtrado (sin solutos) como de una corriente de rechazo, más concentrada en solutos. A continuación, se muestra cómo funciona el flujo normal y el flujo cruzado con respecto al tiempo y a la presión ejercida en la membrana (Figura 6).

Flujo normal de la filtración



Flujo cruzado de la filtración

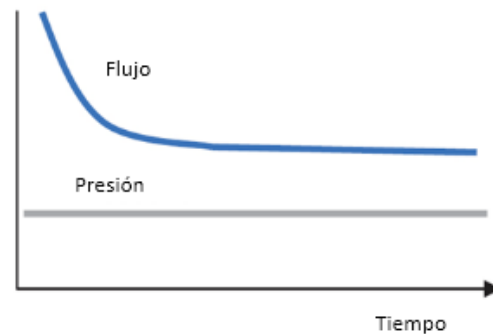
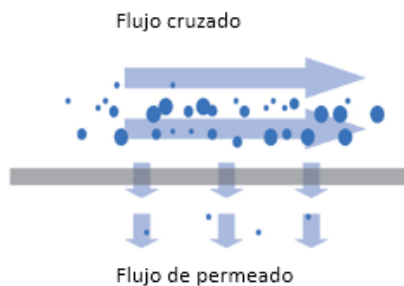


Figura 6. Flujos de la filtración. a) Filtración con flujo cruzado, b) Filtración de flujo normal. Adaptada del manual de la membrana GE Healthcare®.

Se observa que el flujo normal de la filtración trae consigo mayor tiempo de espera junto con el aumento de la presión, por lo que no se lograría con el propósito de tener una técnica de menor tiempo, por esa razón se eligió tener un flujo cruzado en la etapa de microfiltración.

Microfiltración

Actualmente existen varios procesos que emplean una membrana para lograr una separación dada. Uno de estos procesos es la microfiltración que emplea membranas con poros grandes (0.1-10 μm), ya sea de tipo convencional o asimétricas (Tejeda y col., 2011). El Figura 7 se muestra una clasificación de la filtración de acuerdo con el tipo de medio filtrante y al tamaño de partícula que puede retener.

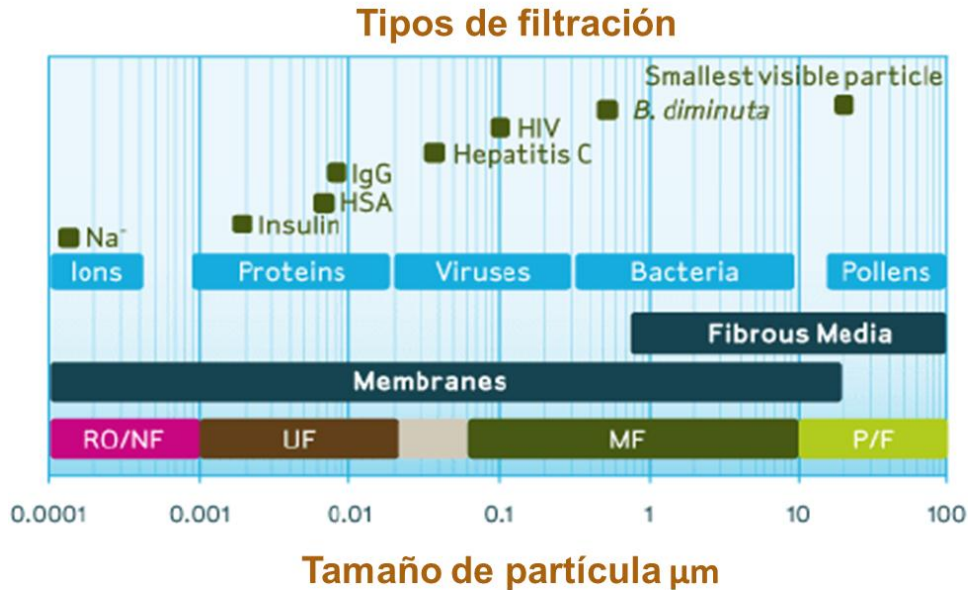


Figura 7. Esquema de los tipos de filtración de acuerdo con el medio filtrante y la remoción de sólidos según el tamaño de partícula. P/F = Filtración, MF = Microfiltración, UF = Ultrafiltración, RO/NF = Osmosis Inversa/Nanofiltración. Adaptada de Manual Micropore.

La microfiltración se emplea para separar de caldos biológicos partículas mayores a 1.0 μm como coloides y células. El rango de presión de operación es restringido debido a las características de los equipos que se emplean, y es del orden de 160- 500KPa. Un rango característico de la microfiltración es que puede manejar flux mucho mayores que la ultrafiltración del orden de 50-1000 L/m²-h (Tejeda y col., 2011)

Membranas

La filtración por membrana se realiza utilizando membranas especiales de tamaño de poro muy pequeño que generalmente operan con flujo paralelo a la membrana (cruzado), de tal manera que no hay un depósito de sólidos sobre la membrana sino una concentración del caldo (Tejeda y col., 2011).

Una membrana puede estar definida como una barrera permeable selectiva entre dos fases homogéneas. Una molécula o una partícula es transportada a través de la membrana de una fase a otra fase porque una fuerza actúa en esa molécula o partícula. El transporte a través de las membranas toma lugar cuando una fuerza motriz es aplicada a los componentes en la alimentación. En casi todos los procesos de membrana la fuerza motriz es una diferencia de presiones o de concentraciones (o actividad) diferenciada a través de la membrana (Mulder, 1996).

Existen varios estudios en los que la filtración estéril a través de membranas de tamaño de poro 0.2 μ m es típicamente la última operación de la secuencia del proceso. No obstante, la filtración por membrana a menudo es utilizada en los puntos intermedios durante la purificación (Kong y col., 2006).

CAPÍTULO III

MATERIALES, EQUIPOS Y METODOLOGÍA

3.1 Materiales

En los estudios de microfiltración flujo tangencial de lisados neutralizados se utilizó la cepa *E. coli* hospedando el plásmido pVAX1-NH36 proporcionada por el Centro de Investigaciones y Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional (CINVESTAV).

Para el proceso de fermentación se utilizó medio TB (Terrific Broth) que consta de 13g/L de glicerol, 24g/L de levadura, 12gr/L de triptona, 2.31 gr/L KH_2PO_4 , 12.54g/L K_2HPO_4 , 1μL/mL de kanamicina (para evitar crecimiento de bacterias no deseadas) y en el rompimiento celular tres soluciones buffer que se utilizan bajo el siguiente orden:

1. Solución P1 de re suspensión. Se compone de glucosa a una concentración de 50mM, Tris-HCl con concentración de 25mM y EDTA a 10mM. Este buffer se utiliza en un principio para resuspender y poder hacer el rompimiento de la membrana celular.
2. Solución P2 de lisis alcalina. Compuesta de 0.2M de NaOH y 1% SDS, con un pH controlado de 8. Esta solución buffer es la causante de la ruptura celular, permitiendo que el plásmido quede expuesto para su posterior recuperación.
3. Solución P3 de neutralización. Utilizada para evitar la desnaturalización del plásmido causada por la ruptura celular. Hecha de acetato de potasio 3 M en ácido acético glacial y agua desionizada.

Para la preparación de las soluciones Buffer, las pruebas de resistencia de la membrana y la regulación de flujos de entradas/salidas se utilizó agua desionizada. En los lavados de flóculos y lavado de membrana se utilizó la solución Buffer TRIS 10mM con un pH=8.

Para el análisis cualitativo de plásmido se utilizó un gel de agarosa al 8% diluida en solución TAE 1X (Tris 40mM, Ácido Acético 20 mM Y EDTA 1mM) donde se colocaron las muestras obtenidas del experimento para realizar la electroforesis y para la tinción de las muestras el buffer de carga Acid Sample Buffer 5x® con la relación de 4μL de muestra por cada 1μL de tinte.

Por último, para determinar la concentración de ADNp se utilizó solución de Sulfato de Amonio 1.5M en TRIS 10 mM /HCL pH=8 como buffer de adsorción y TRIS 10mM/HCL pH=8 como buffer de elución ambas desgasificadas y filtradas. Las muestras para analizar fueron diluidas en el buffer (1:5).

3.2 Equipos

Se han utilizado los siguientes equipos en la cosecha de la bacteria *E. coli*, como en la incubadora VWR® mostrada en la Figura 8.



Figura 8. Equipo de cosecha. Incubadora VWR®.

Un equipo de centrifugación marca Thermo Scientific® señalado en la Figura 9, para llevar a cabo la obtención de biomasa y posteriormente la clarificación por centrifugación.



Figura 9. Centrifuga. Thermo Scientific®.

Continuando con el sistema de filtración a vacío (Figura 10), el cual consiste en: Una bomba de vacío conectada a un matraz Kitasato de 1L por medio de una manguera Masterflex®; un embudo de porcelana, un tapón de hule y 3 capas de papel filtro 125 mm de diámetro con tamaño de poro 11µm marca Whatman® acomodados de tal forma que logren una eficiente eliminación de sólidos.

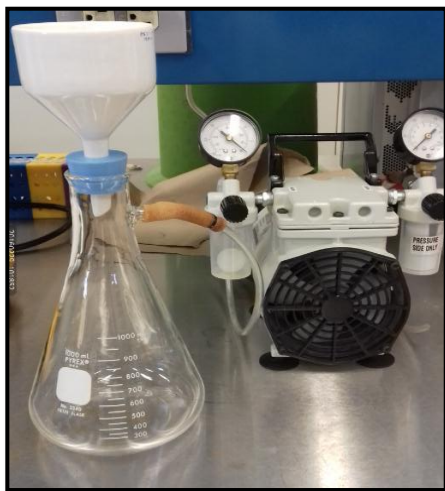


Figura 10. Sistema de filtración a vacío.

Para la adaptación del sistema de purificación de ADN plasmídico en la etapa de microfiltración de flujo tangencial se utilizaron los siguientes equipos: Un equipo de monitoreo de presión GE Healthcare® (A) con 3 transductores ubicados en las entradas y salidas del sistema (B); bomba peristáltica PT no.150 3015 (C) ; Una membrana GE Healthcare® con área de 16 cm² y con tamaño de poro 0.45 micras (D); una válvula de pellizco(E); Una bomba peristáltica Cole-Parmer® (F) ; Manguera Masterflex® 96400-14 (G) y por ultimo un controlador de velocidades marca Masterflex® Cole-Parmer®(H) .El sistema se muestra en la Figura 11.

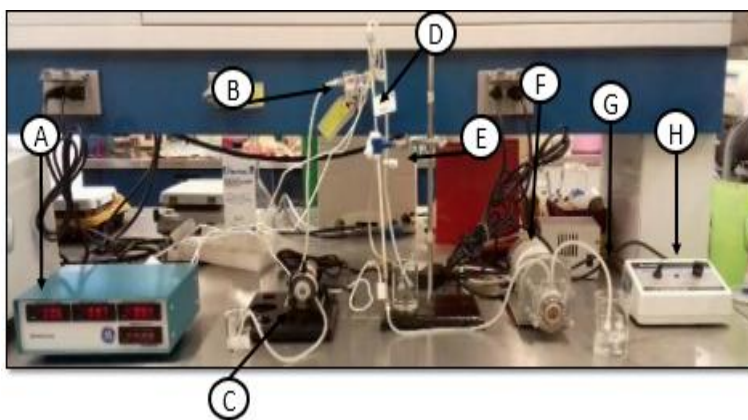


Figura 11. Sistema de microfiltración de flujo tangencial experimental.

En la Figura 12 se muestra un diagrama de la dirección de los flujos de alimentación, filtrado y retenido del sistema de microfiltración de flujo tangencial experimental. El volumen filtrado representa el lisado clarificado.

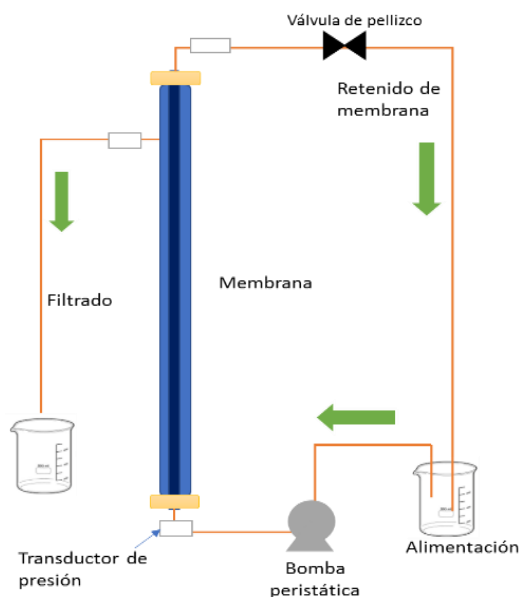


Figura 12. Diagrama de distribución de fluidos del sistema de microfiltración de flujo tangencial experimental.

Para medir la turbidez se utilizó el equipo Oakton® T-100, y para los estudios por electroforesis se utilizó el GT Minigel Casting System, MultiDoc Digital Imaging System® y en la determinación de concentración de ADNp se utiliza el equipo de cromatografía de alta resolución (HPLC) marca Aktapurifier 10-UPC® y la columna de interacción hidrofóbica (HIC) Source 15PHE®.



Figura 13. Equipos de medición de turbidez y cámara. a) Turbidímetro Oakton. b) MultiDoc Digital Imaging System

3.3 Metodología

3.3.1 Cultivo y cosecha celular

Se inicia con el cultivo de la bacteria *E. coli* que contiene el plásmido pVAX1-NH36 de 4,000 pares de bases (pb) y un peso molecular de $3.3-13.2 \times 10^3$ kDa, utilizando un volumen aproximado de 500mL, de los gramos de célula húmeda que se obtienen, se reparte en cinco partes iguales. Una parte para la centrifugación y las cuatro partes restantes para la microfiltración de flujo tangencial con flujo de 25mL/min en la alimentación y flujo de 1 mL/min en el filtrado.

En el momento de inocular se consideró mantener todo en ambiente estéril, descongelando el inóculo y colocándolo en un micro tubo para agregarle kanamicina a razón de 1 μ L/mL. Posteriormente se pasó a la incubadora durante 12 horas con condiciones de temperatura a 37°C y 300 rpm.

Obteniendo el cultivo, se procedió con la cosecha, donde se separaron cinco frascos para centrifugar a 3500g durante 15 minutos con una temperatura de 4°C, todos los frascos previamente pesados. Pasando los 15 minutos se desechó el sobrenadante y se registraron nuevamente los pesos de cada uno de los frascos para calcular la cantidad de célula proveniente del cultivo, de esta forma es como se logró tener el peso de la biomasa.

3.3.2 Lisis Alcalina

Con el propósito de trabajar con la biomasa bajo las mismas condiciones en las operaciones de recuperación por centrifugación y microfiltración, de los diferentes cultivos, la biomasa se homogenizó y se separó en cantidades proporcionales para comparar con mayor precisión cada una de las operaciones.

Con la separación de la biomasa en partes iguales se inició con el primer paso de la recuperación primaria: la lisis alcalina. Para este procedimiento se tiene la relación de por cada gramo de célula obtenido serán 8mL de solución buffer, por lo tanto, se inició con la solución buffer de resuspensión, mezclando hasta resuspender la biomasa, posteriormente se vertió 8 mL de buffer de lisis, el cual ayuda a la desintegración de la pared y la membrana celular a un pH alto con un agente alcalino, dejando como resultado el lisado alcalino, se agitó lentamente y se dejó actuar durante 10 minutos.

Por último, se añadió 8 mL de la solución buffer neutralizante, se dejó enfriar durante 5 minutos a una temperatura de 4°C para evitar desnaturalizar el plásmido y así dar como resultado el lisado neutralizado.

A partir de la lisis alcalina se siguió con la etapa de clarificación, se realizó de dos formas: por microfiltración de flujo tangencial y por centrifugación, señalados en la Figura 14.

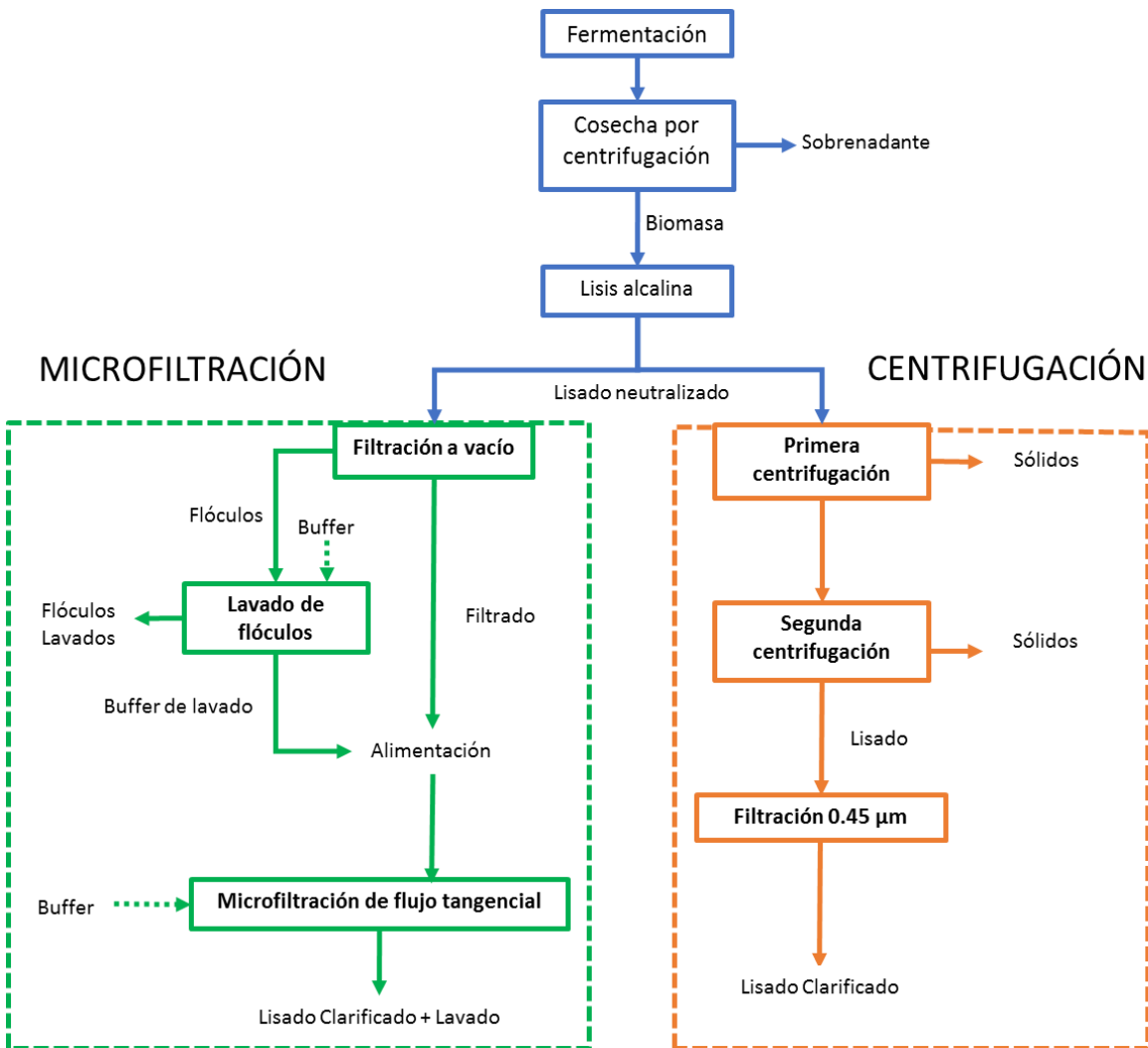


Figura 14. Diagrama de etapas involucradas en la clarificación por centrifugación y microfiltración.

Los volúmenes recuperados en cada una de las operaciones de clarificación tuvieron mediciones sobre el volumen, el pH, la turbidez y la concentración de plásmido, con la finalidad de obtener información suficiente para realizar el balance de masa y comparar la concentración en cada una de las operaciones.

3.3.3 Clarificación de lisado neutralizado

Clarificación por microfiltración. La primera parte de la propuesta de microfiltración es una filtración a vacío del lisado neutralizado. Utilizando un sistema de filtración a vacío se colocaron en el embudo de porcelana tres capas de papel filtro con un tamaño de poro de 11 μm . Se colectó el volumen filtrado, que constituye la alimentación a la microfiltración de flujo tangencial.

Sin embargo, debido al tamaño del poro en el filtro en la operación de filtración a vacío, las partículas sólidas se unen a la matriz del lecho o se unen a partículas ya retenidas (Tejeda y col, 2011) y esto hace posible que haya material plásmido atrapado dentro de la torta, por lo que se continuó con un lavado de flóculos con la solución buffer TRIS 10mM con pH=8.

El lavado consistió en verter un volumen de buffer TRIS igual a la mitad del volumen de filtrado, sobre los filtros con flóculos, en el sistema de filtración a vacío, con la finalidad de evaluar la posible recuperación de plásmido. Dependiendo de la masa de plásmido obtenida se determinará si es relevante para mezclarlo con el volumen de filtrado. En caso de mezclar ambos volúmenes estos constituyen la alimentación de la microfiltración.

El sistema de microfiltración de flujo tangencial utilizado se muestra en la Figura 15, el flujo de alimentación fue 25 mL/min y en el filtrado el flujo de 1mL/min. Los flujos se verificaron midiendo el tiempo y volumen en pruebas con agua desionizada.

El sistema de microfiltración de flujo tangencial se inició alimentando el filtrado de la etapa anterior, activando las bombas peristálticas y el controlador de velocidad al mismo tiempo. En la primera corrida se tuvo para la alimentación y salida de retenido dos recipientes separados, sin embargo, el utilizar un flujo pequeño en la alimentación no permitió que el líquido saliera completamente por el filtrado, por lo que la mayor parte salió por el retenido.

Dado la situación anterior fue necesario configurar el sistema de microfiltración, como se muestra en la Figura 15 para que existiera un recirculado de la salida del retenido.

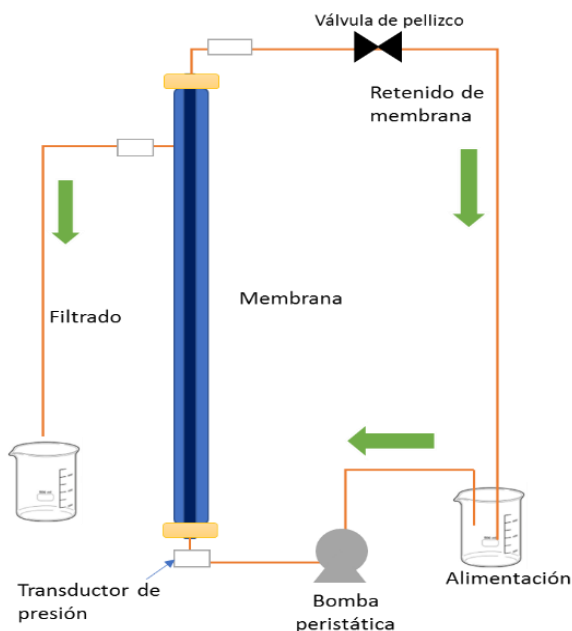


Figura 15. Sistema final de microfiltración de flujo tangencial.

Con la nueva configuración del sistema de microfiltración de flujo tangencial se dejó correr el volumen hasta que en la alimentación no existiera ningún líquido por filtrar. En cada corrida los volúmenes de filtrado fueron recolectados en diferentes recipientes midiendo valores de tiempo y volumen, además de llevar un control con el flujo de salida del filtrado para descartar un posible taponamiento en la membrana.

En cada corrida de filtración a vacío y microfiltración de flujo tangencial, se midieron los volúmenes, turbidez y pH y muestras de ellos se analizaron por electroforesis y por cromatografía de interacción hidrofóbica.

Clarificación por centrifugación. Consiste en centrifugar dos veces el volumen de lisado neutralizado a 12,000g durante 30 minutos y a una temperatura de 4°C.

Aquí el interés lo encontramos en el sobrenadante, por lo que en cada centrifugación que se hizo se recuperó únicamente el sobrenadante, desechando los sólidos que representaban los flóculos formados

por las soluciones buffer. Una vez pasando las dos centrifugaciones se coloca en un sistema de filtración con tamaño de poro de $0.45\mu\text{m}$ para tener como resultado el lisado clarificado por centrifugación.

Se midió el volumen del clarificado, el pH, la turbidez, se analizó por electroforesis y por cromatografía de Interacción hidrofóbica.

3.3.4 Determinación de la resistencia de la membrana

Para desarrollar la propuesta de clarificación por microfiltración se analiza primeramente el parámetro de la resistencia de la membrana con el propósito de conocer las condiciones en las que se encuentra la membrana y su correcto funcionamiento.

Para calcular la resistencia de la membrana se utilizó el sistema en modo recirculación total (Figura 16) en este sistema se hizo pasar agua desionizada en la alimentación de la membrana con un flujo de 25 mL/min regulada con una bomba peristáltica, y midiendo el tiempo de salida del permeado con un cronómetro para obtener datos del cambio de volumen con el tiempo. Esto con ayuda de una válvula de pellizco, de manera que se pudiera contar el tiempo que tardaba en llenar para cada ajuste de presión un volumen de 5 mL .

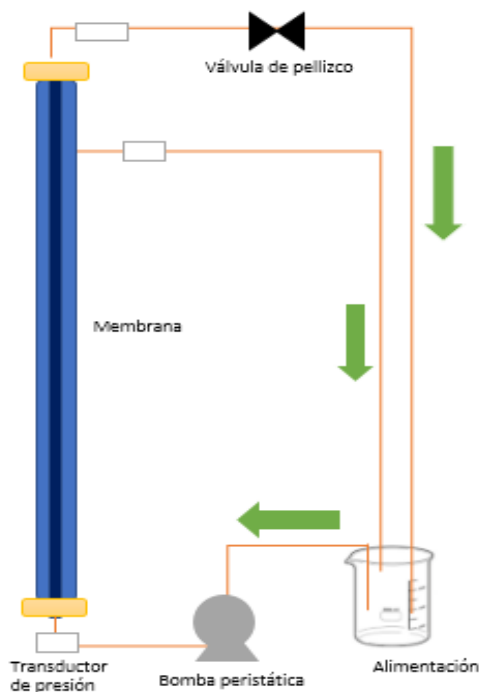


Figura 16. Sistema de recirculación total .

Con los datos obtenidos fue posible obtener la fuerza impulsora de la etapa de microfiltración, que es el gradiente de presión transmembrana (ΔP_{TM}), el cual puede ser definido por la Ecuación 1, según Tutunjian (1985), que relaciona el gradiente de presión del flujo tangencial como:

$$\Delta P_{TM} = \frac{(P_i + P_o)}{2} - P_f \quad (1)$$

Donde:

P_i =Presión de alimentación

P_o = Presión del retenido

P_f = Presión del filtrado

Para calcular el flux de la microfiltración se utiliza la variable J , describe la velocidad del permeado a través del lecho filtrante con la Ecuación 2 (Tejeda y col.,211):

$$J = \frac{V}{tA} \quad (2)$$

Donde J = Flux en $\text{cm}^3/\text{s}\cdot\text{cm}^2$.

V = Volumen en cm^3 .

t = Tiempo en segundos.

A = área de la membrana en cm^2 .

Por otro lado, la ley de Darcy describe el movimiento de fluidos newtonianos a través de medios porosos, y se expresa como:

$$J = \frac{\Delta P_{TM} - \sigma \Delta \pi}{\mu(R_f + R_m)} \quad (3)$$

Donde:

J = Flux en $\text{cm}^3/\text{s}\cdot\text{cm}^2$.

$\Delta \pi$ = contrapresión osmótica.

σ =Coeficiente de retención del soluto por la membrana.

Como el fluido pasa por una membrana de microfiltración, el término $\sigma\Delta\pi$ se desprecia al no haber presión osmótica, y dado que el fluido que pasa es agua, no hay formación de ninguna torta, por lo tanto, el término R_f es cero, y la Ecuación 3 se reduce a la siguiente forma

$$J = \frac{\Delta PTM}{\mu R_m} \quad (4)$$

Donde:

J= Flux en cm/s

ΔPTM = Gradiente de presión transmembrana en kg_i/cm^2

μ = Viscosidad del agua en $kg/cm\cdot s$

R_m = Resistencia de la membrana en cm^{-1}

Al graficar los valores de J en función de ΔPTM se obtiene una línea recta, y de la pendiente se tiene la resistencia de la membrana a través de la Ecuación 4, usando los términos como:

Y=J

X= ΔPTM y

$$m = \frac{1}{\mu R_m}$$

3.3.5 Análisis de muestras

Turbidez. Con las muestras resultantes, se analizó el comportamiento de cada una de las operaciones involucradas en la recuperación por microfiltración y centrifugación por medio de turbidez. El funcionamiento del turbidímetro se basa en el fenómeno óptico que ocurre cuando una luz incidente pasa a través de agua y se dispersa por existencia de partículas extrañas suspendidas en ella medidas en Unidad de Turbidez Nefelométrica (Ahmad y col., 2009).

Para analizar los volúmenes se colocaron 10 mL de la muestra en un recipiente especial dentro del aparato de turbidez, en un lapso de 7 segundos y se tenía la medición de los grados de turbidez (NTU). En cada muestra fue importante lavar y limpiar cuidadosamente los frascos donde se colocaban los filtrados para evitar mediciones erróneas por contaminación de otra muestra, además de calibrar el turbidímetro con las soluciones de calibración (manual "Oakton manual Turbidity", Anexo B) antes de cada corrida.

Electroforesis. El análisis por electroforesis se realizó para conocer si la muestra contenía plásmido de interés en las células, donde se utilizó un gel de agarosa al 0.8% con TAE 1X. Para elaborar el gel fue necesario hervir la agarosa con la solución TAE 1X para verterse en el recipiente de electroforesis y formar los pozos donde posteriormente se llenaron con las muestras a analizar.

En la electroforesis el acomodo de las muestras empieza con el primer pozo conteniendo 1 μ L de tinte, 3 μ L de agua desionizada y 1 μ L de marcador de peso molecular (Invitrogen) que se utiliza para reconocer el plásmido y los demás componentes de la célula (señalados en el rango según los pares de bases que se presenten). Es a partir del segundo pozo donde se colocan las muestras, las cuales están constituidas por 8 μ L de muestra y 2 μ L de tinte. Una vez colocadas todas las muestras el equipo se ajusta a 55 Voltios, 400 mA, durante 90 minutos.

Pasando el tiempo de electroforesis, se procede con el revelado de las muestras, se sumerge el gel en un baño de bromuro de etidio durante 15 minutos, y después en agua otros 15 minutos. Finalmente, el gel se coloca en la cámara de rayos UV y se fotografía el gel.

Cromatografía de interacción hidrofóbica. Para determinar la concentración de plásmido de forma cuantitativa se realizó una cromatografía líquida en columna de interacción hidrofóbica (HIC) siguiendo la metodología de Diogo y col., 2003.

Para llevar a cabo esta operación se requiere una solución de 1.5M de sulfato de amonio en Tris 10mM/HCl pH 8 (buffer A) y una solución Tris 10mM/HCl, pH 8 (buffer B). Inicialmente la columna se equilibra con el buffer A. Subsecuentemente, 30 μ L de una muestra apropiadamente diluida en el mismo buffer (1:5) fue inyectada y eluida a 1 mL/min. Después de ese paso, se utiliza se realiza una elución isocrática el buffer B, por 0.5 min, para eluir las especies ligadas débilmente en la matriz. Enseguida se reequilibrada la columna con el buffer A por 5.5 min mientras la absorbancia se monitorea a 260 nm.

En esta metodología se muestra que en un cromatograma analítico el pico a los 0.71 min de retención corresponde a la elución ADNp (todas las isoformas), los picos (1.28 y 1.98 min) se atribuyen a las impurezas menos hidrofóbicas como ARN de bajo peso molecular, ADNg y proteínas y el pico a los 3.54 min corresponde a las impurezas más hidrofóbicas como ARN de alto peso molecular y ADNg como se muestra en la Figura 17 (Diogo y col., 2003).

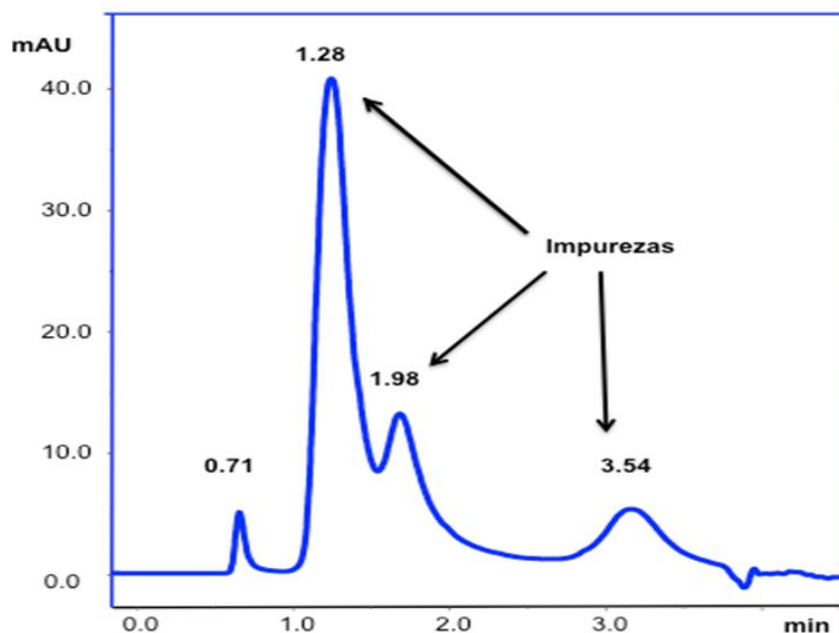


Figura 17. Cromatograma típico de análisis HIC-HPLC (muestra analizada lisado neutralizado). Adaptada de Diogo y col., 2003.

Finalmente se compararon los resultados obtenidos de la clarificación por centrifugación con la microfiltración de flujo tangencial por medio de balances de masa.

CAPÍTULO IV

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1 Determinación de la resistencia de la membrana en el sistema experimental de microfiltración

Con el sistema de microfiltración operado como se muestra en la Figura 16 se realizaron pruebas con agua desionizada a un flujo de 25 mL/min, con la finalidad de conocer la resistencia de la membrana, la cual dio como resultado la gráfica del Flux en función de la presión transmembrana de la Figura 18:

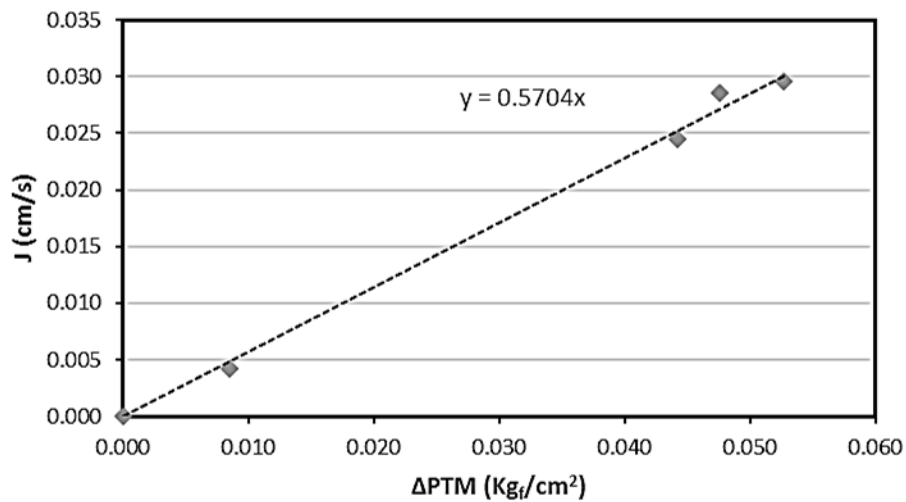


Figura 18. Grafico Flux en función de la presión transmembrana (ΔPTM).

De este grafico utilizamos el valor de la pendiente $m = 0.5704 \frac{\text{cm}^3}{\text{kg}_f \cdot \text{s}}$, conociendo la viscosidad del agua $\mu = 10^{-5} \frac{\text{kg}}{\text{cm} \cdot \text{s}}$, y para el balance de unidades utilizando el factor de conversión $g_c = 980.7 \frac{\text{Kg} \cdot \text{cm}}{\text{Kg}_f \cdot \text{s}^2}$.

Despejando R_m de la Ecuación 4, se tiene que:

$$R_m = \frac{g_c}{\mu * m} = \frac{980.7 \frac{Kg*cm}{Kg_f*s^2}}{10^{-5} \frac{kg}{cm*s} * 0.5704 \frac{cm^3}{kg_f*s}}$$

$$R_m = 1.72x10^8 cm^{-1}$$

Una vez finalizadas las corridas, se hizo pasar una solución de NaOH 0.1M para remover cualquier “taponeamiento” y se lava con agua desionizada. Se repitió el procedimiento para medir la resistencia de la membrana y evaluar si había sufrido alguna ruptura o quedaba alguna incrustación. En este resultado se obtuvo un valor de $R_m = 1.81x10^8 cm^{-1}$

Como la resistencia de la membrana fue prácticamente el mismo valor que la resistencia inicial, se considera que la membrana no sufrió cambio alguno, por lo que las mediciones realizadas en este experimento siguieron con las mismas condiciones.

4.2 Clarificación de lisado neutralizado

Se realizaron varios cultivos de *E. coli* para obtener la biomasa, continuar con la cosecha y después trabajar con 5.46 g de célula húmeda, la cual se repartió en 4.36 g de célula húmeda para las corridas de clarificación por microfiltración y 1.10 g de célula húmeda para la clarificación por centrifugación.

La biomasa para los estudios de microfiltración (4.36 g) se repartió en 4 partes, en cada una se realizó la lisis alcalina obteniéndose 4 volúmenes de lisado neutralizado e individualmente se sometió a las operaciones del proceso de clarificación por microfiltración propuesto. Los resultados mostrados son el promedio de lo obtenido en cada una de estas etapas, para la técnica del lavado de flóculos y el lavado de membrana se utilizó la solución de buffer Tris 10mM a razón de la mitad del volumen obtenido del filtrado y microfiltrado.

Para la determinación de plásmido en la etapa de clarificación por microfiltración y por centrifugación, se realizó un análisis en los puntos señalados en rojo en la Figura 19, primero se analizaron por electroforesis en gel de agarosa para determinar la presencia de plásmido en cada una de las operaciones realizadas y posteriormente se midió la turbidez, el pH y se determinó la concentración de ADNp.

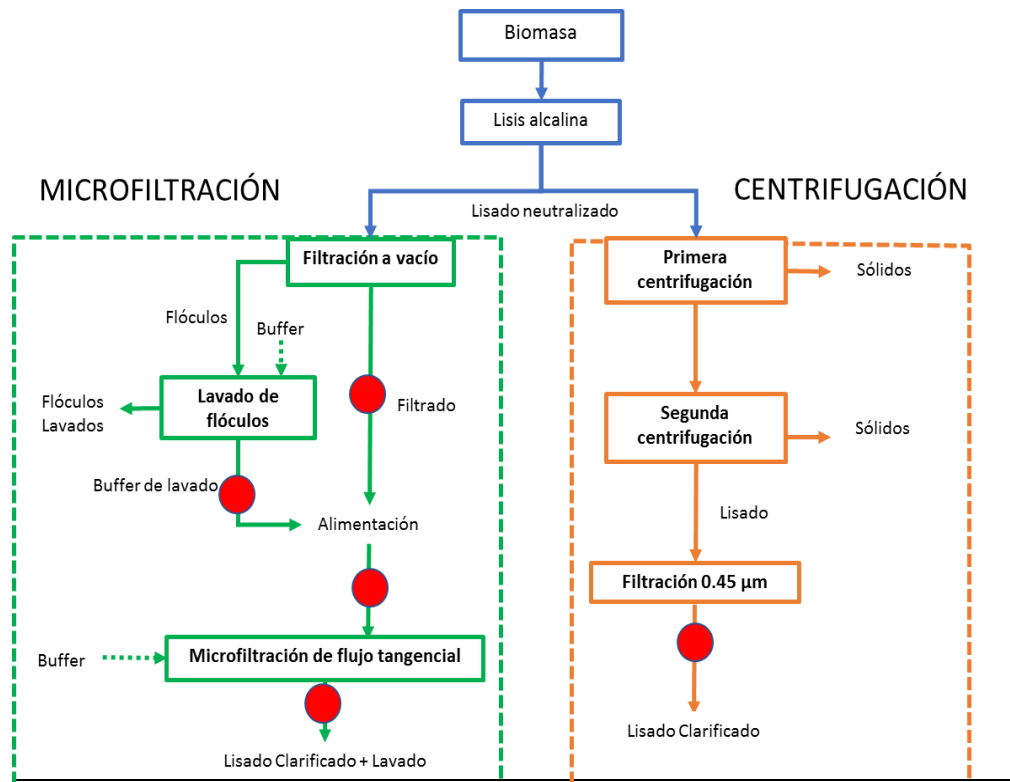


Figura 19. Diagrama de etapas con puntos clave. Los puntos señalados representan donde se realizó el balance de masa.

El análisis por electroforesis, se desarrolló para determinar la presencia de ADNp, los resultados se muestran en la Figura 20. La banda que corresponde al plásmido se identifica a los 4,000 pares de base (pb). Entre más marcada sea la banda de los 4,000 pb, más presencia de plásmido se encontrará en la solución.

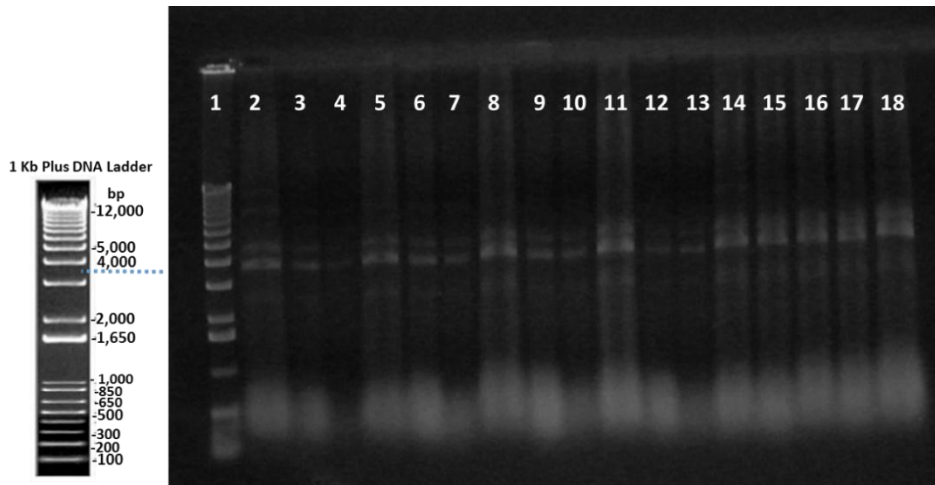


Figura 20. Electroforesis de muestras durante las etapas de clarificación de lisados neutralizados. Carril 1: Ladder. Carriles 2,5,8,11: Filtración a vacío. Carriles.3,6,9,12: Lavado de flóculos. Carriles 4,7,10,13: Lavado de membrana. Carriles 14,15,16,17 Microfiltración. Carril 18 centrifugación.

En los carriles 2, 5, 8 y 11 se encuentran las soluciones correspondientes a cada filtrado al vacío, se observa que la línea que corresponde al plásmido está notoriamente marcada, mostrando la presencia de plásmido en el filtrado.

En los carriles 3, 6, 9 y 12 de la Figura 20 se encuentran los volúmenes de cada lavado de flóculos, donde se puede observar ligeramente marcada la banda del plásmido, indicando que en esta operación hay plásmido retenido en los flóculos, el cual es recuperado a través de la solución buffer TRIS 10 mM. En los carriles 14,15,16 y 17 que corresponden al volumen del clarificado por microfiltración se observa plásmido marcado con la misma intensidad que el clarificado por centrifugación, lo cual puede interpretarse que en ambas operaciones se logra recuperar una cantidad similar de plásmido.

Al verificar que en los clarificados por filtración se encontró plásmido, se procede al análisis de su concentración por cromatografía de interacción hidrofóbica. Para los cálculos de rendimiento expresados por unidad de peso seco de células se consideró que la masa de células húmedas (wcw) es equivalente a masa de células secas (dcw) por medio de la relación celular de peso seco /peso húmedo, (dcw/wcw) reportada por Ciccolini y col., (2002), donde $1 \text{ g dcw} = 4.05 \text{ g wcw}$.

4.2.1 Microfiltración de flujo tangencial

Filtración a vacío. Los volúmenes de lisado neutralizado (proveniente de 4.36 g wcv = 1.08 g dcw en total) se filtró a través de tres capas de papel filtro en cuatro corridas y se colectó el filtrado.

Al finalizar esta operación se recolectaron los filtrados de las cuatro corridas, y se determinó su concentración de ADNp por medio de cromatografía de interacción hidrofóbica. En la Figura 21 se muestra un cromatograma de una muestra de filtrado, con el área generada por la elución del plásmido a los 0.7 minutos se calcula la concentración en $\mu\text{g ADNp/mL}$. La concentración promedio en los filtrados de las cuatro corridas se puede obtener mediante el promedio aritmético, como se muestra en la Tabla 1, dado que los volúmenes de cada muestra son semejantes.

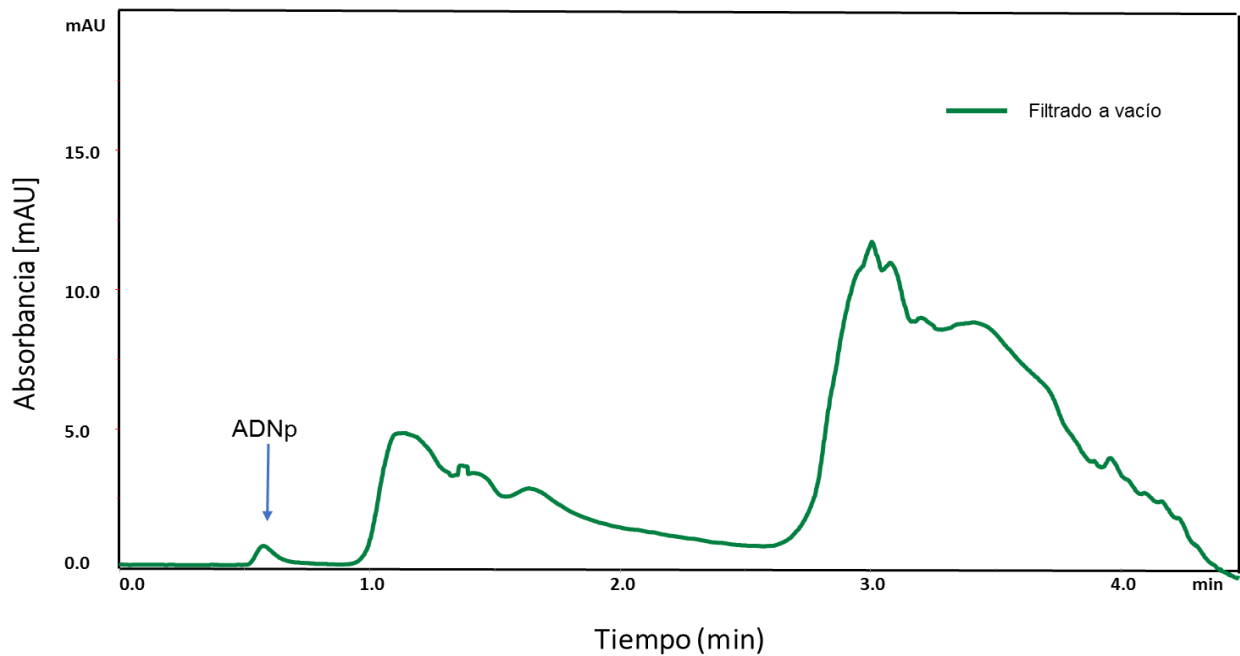


Figura 21. Cromatograma de HIC para el filtrado a vacío.

Tabla 1. Resultados del filtrado a vacío.

Solución	Volumen (mL)	Concentración ($\mu\text{g ADNp / mL}$)	Masa ($\mu\text{g ADNp}$)
Filtrado a vacío #1	21	5.67	119.42
Filtrado a vacío #2	22	4.56	100.32
Filtrado a vacío #3	25	5.20	130.00
Filtrado a vacío #4	24.5	5.79	141.78
TOTAL	92.5	21.23	491.52
Concentración promedio		5.30 ± 0.5	

La masa de plásmido en cada filtrado se determinó multiplicando la concentración por su respectivo volumen. La masa total de ADNp de cada corrida se obtuvo sumando las masas individuales de cada una y ésta se dividió entre el volumen total para obtener la concentración promedio. Este fue igual al promedio aritmético ($5.31 \mu\text{g/mL} \pm 0.5$). Para determinar el rendimiento de ADNp, se dividió la masa total de ADNp obtenido entre los gramos de células procesados expresado en peso seco. Estos resultados se muestran en la Tabla 2.

Lavado de flóculos. Después de la filtración se continuó con el lavado de flóculos retenidos en el filtro con la solución buffer Tris 10mM para determinar la presencia de plásmido retenido en los flóculos y mediante el arrastre de esta solución recuperarlo. El volumen utilizado fue aproximadamente la mitad del volumen obtenido del filtrado (49.7 mL). En el lavado de flóculos, no se calculó el promedio aritmético de las concentraciones, ya que los volúmenes de lavado fueron diferentes entre sí.

Tabla 2. Mediciones representativas en la filtración a vacío y lavado de flóculos.

Operación	Volumen (mL)	Turbidez (NTU)	pH	Masa ($\mu\text{g ADNp}$)	Concentración promedio ($\mu\text{g ADNp/mL}$)	Rendimiento ($\mu\text{g ADNp / g dcw}$)
Filtración a vacío	92.5	2.8	5.32	491.53	5.31	456.68
Lavado de flóculos	49.7	4.6	5.12	40.75	0.82	37.86
Total	142.2	-	-	532.27	3.74	494.54

De los resultados mostrados en la Tabla 2 se observa que en el lavado de flóculos se recupera aproximadamente el 8% en masa de plásmido que queda retenido en los flóculos, por lo tanto, para recuperar una mayor cantidad de plásmido la operación de lavado de flóculos puede considerarse durante la experimentación para integrarse a la alimentación de la microfiltración.

En cuanto a la turbidez observamos un aumento en la operación del lavado de flóculos de casi el doble que la filtración a vacío, lo que podría indicar mayor presencia de partículas en suspensión que fueron arrastradas. Con respecto al pH, las mediciones resultantes fueron constante, adecuado para no desnaturalizar el plásmido.

Microfiltración de flujo tangencial. De los pasos anteriores continuamos con la recuperación por microfiltración, Se siguió el mismo procedimiento descrito anteriormente en la filtración a vacío para determinar la concentración promedio (como promedio aritmético de las cuatro corridas) y la masa de ADNp los resultados se muestran en la Tabla 3. En el lavado de la membrana la concentración promedio no se calculó como promedio aritmético, debido a la diferencia de volúmenes de cada muestra.

Tabla 3. Resultados de mediciones de la microfiltración.

Solución	Volumen (mL)	Concentración ($\mu\text{g ADNp / mL}$)	Masa ($\mu\text{g ADNp}$)
Microfiltración #1	27	3.78	102.08
Microfiltración #2	28	3.17	88.79
Microfiltración #3	36	3.78	136.11
Microfiltración #4	37.9	3.35	126.91
TOTAL	128.9	14.08	453.91
Concentración promedio		3.52 \pm 0.3	

En la Tabla 4 se muestra concentración promedio de ADNp en los volúmenes de las cuatro corridas de microfiltración, calculada como la suma de las masas dividida entre el volumen total. Este fue igual al promedio aritmético (3.52 $\mu\text{g/mL} \pm 0.3$). También se observa que el clarificado por microfiltración tuvo

una turbidez con un valor bajo, indicando la eliminación de partículas suspendidas y se recuperó la mayor parte del plásmido contenido en el filtrado a vacío.

Tabla 4. Datos representativos de volumen, turbidez, pH y masa medidos en la etapa de microfiltración y lavado de membrana.

Operación	Volumen (mL)	Turbidez (NTU)	pH	Concentración promedio ($\mu\text{g ADNp/mL}$)	Masa ($\mu\text{g ADNp}$)	Rendimiento ($\mu\text{g ADNp /g dcw}$)
Microfiltración	128.90	0.50	5.19	3.52	453.91	421.73
Lavado de membrana	52.90	-	-	0.78	41.08	38.17
Total	181.80	-	-	2.72	494.99	454.22

Los resultados del lavado de membrana indican que se recupera plásmido retenido en las mangueras y membrana del sistema de microfiltración, el cual sólo es empujado al exterior por la solución buffer Tris 10 mM, por lo tanto, la etapa de lavado de membrana debe considerarse durante la experimentación para recuperar más plásmido. Con respecto a la turbidez este valor disminuyó en el clarificado obtenido por microfiltración con respecto al del filtrado. Este un resultado esperado porque la microfiltración tangencial elimina más partículas suspendidas.

En el lavado de membrana no fue necesario medir el pH ni la turbidez, ya que sólo se buscó conocer si había plásmido atrapado. Como resultado final la recuperación total de plásmido en las etapas fue de 494.99 $\mu\text{g ADNp/g dcw}$.

4.2.2 Centrifugación.

A partir de una masa del mismo cultivo celular de 1.10 g w/w = 0.27g d/w, se sometió a la etapa de lisis alcalina, y el volumen del lisado neutralizado obtenido se clarificó por medio de centrifugación. La muestra obtenida se analizó por medio de cromatografía de interacción hidrofóbica y como resultado se tuvo el cromatograma de la Figura 21, donde el área generada por la elución del plásmido (0.71 min) es proporcional a su concentración.

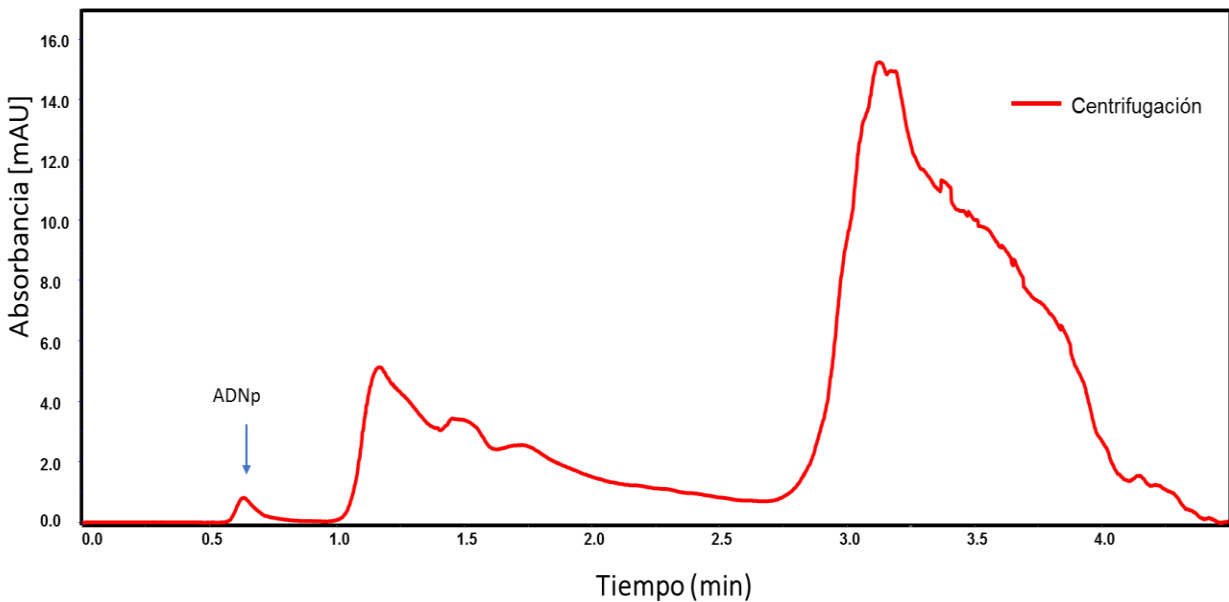


Figura 22. Cromatograma de HIC para el clarificado por centrifugación.

Al volumen obtenido se le determinó la masa de plásmido multiplicando la concentración por su volumen. Para determinar la el rendimiento de ADNp, se dividió la masa de ADNp obtenido entre los gramos de células procesados expresado en peso seco, se le midió turbidez, pH y concentración que se muestran en la Tabla 5.

Tabla 5. Valores experimentales en la clarificación por centrifugación.

Operación	Volumen (mL)	Turbidez (NTU)	pH	Concentración (μg ADNp/mL)	Masa (μg ADNp)	Rendimiento (μg ADNp /g dcw)
Centrifugación	19	0.70	5.20	6.97	132.38	487.86

El lisado clarificado por centrifugación tuvo un pH igual al clarificado de la microfiltración. En cuanto a la turbidez podemos ver que se tiene un valor mayor al clarificado por microfiltración demostrando que esta operación elimina más partículas en suspensión. En la concentración másica de ADNp, el resultado es ligeramente mayor que la concentración promedio obtenida en la microfiltración.

En la Tabla 6 se muestra un resumen de las recuperaciones de plásmido pVAX1-NH36 en cada una de las etapas de clarificación.

Tabla 6. Concentración másica de plásmido encontrada en la clarificación por microfiltración y en la centrifugación.

Operación	Masa ADNp (μg ADNp/ g dcw)
Filtración a vacío	456.68
Lavado de Flóculos	37.86
Total	494.54
Microfiltración	421.73
Lavado de membrana	38.16
Total	454.22
Centrifugación	487.86

En el volumen total de la filtración a vacío recupera una cantidad un poco mayor que en el producto de la centrifugación. Dado que el volumen de la filtración es la alimentación a la microfiltración, se debió tener la misma masa como producto de la microfiltración. La pérdida que se tuvo en el producto de esta última operación puede atribuirse a factores humanos como posiblemente el error en la medición en los volúmenes.

Eliminación de impurezas. Los procesos de lisis, traen consigo una serie de restos celulares que constituyen las impurezas insolubles, por lo cual se hizo una comparación de los cromatogramas (Figura 23) de todas las operaciones involucradas en el clarificado por microfiltración y por centrifugación, con la finalidad de observar la disminución efectiva de impurezas.

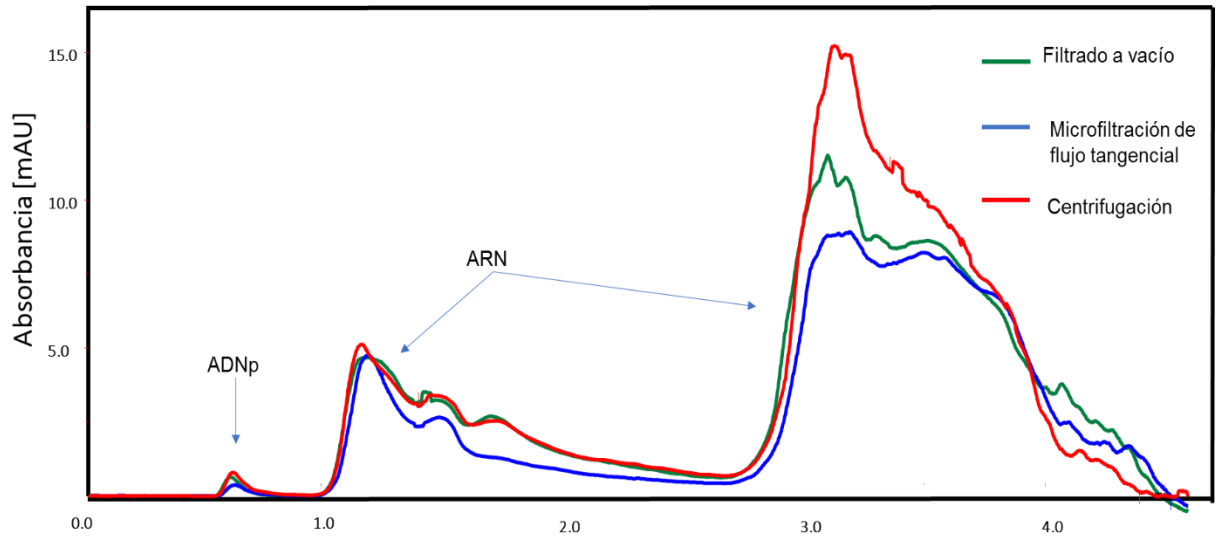


Figura 23. Cromatogramas de HIC para el filtrado a vacío, microfiltración de flujo tangencial y centrifugación.

Además del cálculo de la concentración con el área generada por la elución del ADN, se comparan las impurezas. Se observa en los cromatogramas una mayor variación en el área correspondiente al ARN de alto peso molecular, identificado como el pico de elución a los 3.5 minutos. El clarificado por filtración a vacío y por microfiltración de flujo tangencial tienen menor proporción en esa área, en comparación al clarificado por centrifugación. Esto puede deberse a que el ARN se retiene en los flóculos y en el papel filtro por tratarse de una molécula grande.

CAPÍTULO V

CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

5.1 Conclusiones

En esta investigación se tuvo que la filtración del lisado neutralizado al pasar por el papel filtro de 11 μm , logra recuperar plásmido con altas concentraciones, siendo esta técnica una de las más económicas, dado que su principio se basa en la gravedad y no requiere de equipos costosos para generar vacío en la succión.

Con respecto a la clarificación por microfiltración, se puede concluir por medio de los análisis que por medio de esta operación se recupera una cantidad de plásmido similar en la clarificación por centrifugación, la cual hace de esta propuesta una opción apta para el clarificado de lisados neutralizados, además de tener una mejora notable en la eliminación de partículas suspendidas en el lisado clarificado.

Otra ventaja que tiene la operación de microfiltración propuesta con respecto a la centrifugación es el tiempo requerido para la operación. Ya que en la microfiltración el tiempo requerido es mucho menor y por consecuencia los costos de energía son también menores que la centrifugación, además cabe destacar que esta propuesta se puede escalar a nivel industrial, ya que resulta una etapa muy barata debido a que la mayoría de las técnicas se rige por el principio de gravedad y difusión de partículas de menor tamaño debido a un gradiente de concentración.

También se encontró por medio de los análisis, que en la membrana y en las manguera se encuentra plásmido atrapado después de la operación, que es posible recuperar mediante la adición de solución buffer, según los resultados de la muestra de electroforesis y de la cromatografía de interacción hidrofóbica.

5.2 Recomendaciones

Se recomienda a los siguientes investigadores optimizar el tiempo de operación en la filtración a vacío por unidad de volumen de lisados neutralizados, debido a que para volúmenes semejantes se puede tener diferentes mediciones de tiempo.

En la etapa de lavado de flóculos se recomienda estudiar la retención de plásmido atrapado en los flóculos retenidos, utilizando diferentes volúmenes de buffer de lavado, con la finalidad de obtener información acerca de los parámetros adecuados para la remoción del plásmido, ya que en esta investigación se encontró que si había plásmido retenido en los flóculos. Así mismo se recomienda que el volumen colectado como lavado, se vuelva a filtrar utilizando filtros nuevos para la eliminación de partículas suspendidas que se arrastran junto con el plásmido retenido en los flóculos.

Adicionalmente se recomienda realizar el lavado de membrana con aire a un flujo mayor que el utilizado en alimentación, dentro del límite permitido para la membrana, para ocasionar el vaciado de las mangueras que conectan al sistema de microfiltración de flujo tangencial y recuperar el plásmido sin diluirlo con buffer.

También se sugiere utilizar la filtración como operación posterior en lisis mecánica (molino de perlas) para la remoción de las partículas suspendidas, ya que este estudio demostró la remoción de partículas suspendidas por medio de los filtros.

CAPÍTULO VI

BIBLIOGRAFÍA

AHMAD B.O., MOHD B.M.J, Turbidimeter Design and Analysis: A Review on Optical Fiber Sensors for the Measurement of Water Turbidity, 2009. Sensors; 9: 8311-8335

CARNES A.E., WILLIAMS J.A. Plasmid ADN Manufacturing Technology. Recent Patents on Biotechnology 2007,1, 1-16

CICCOLINI, L.A.S., SHAMLOU, P.A., TITCHENER-HOOKER, N.J., WARD, J.M., Dunnill, P. Rheological properties of chromosomal and plasmid ADN during alkaline lysis reaction, 1999. Bioprocess Eng.21, 231 – 237.

DIOGO, M. M., QUEIROZ, J. A., PRAZERES, D.M.F. Review: Chromatography of plasmid DNA., 2005. Journal of Chromatography A, 1069,p 3-22.

DIOGO M.M, QUEIROZ J.A. ,PRAZERES D.M.F .Assessment of purity and quantification of plasmid DNA in process solutions using high-performance hydrophobic interaction chromatography. Journal of Chromatography, A., 2003. 998:109-117.

GEISA A.L. GONCALVES, KRISTALA L.J. PRATHER, GABRIEL A. MONTEIRO, DUARTE M.F. PRAZERES. Engineering of Escherichia coli strains for plasmid biopharmaceutical production: Scale-up challenges. Elsevier Science, Vaccine 32 ,2014, 2847–2850.

GHANEM A., HEALEY R., ADLY F.G. Current trends in separation of plasmid DNA vaccines: A review.2007. Elsevier. Analytica Chimica Acta 760,1-15.

GRAU V.M.D,GORCHS A.R.,Técnicas Básicas de Experimentación en Química en Formato Digital,2009. Universidad Politecnica de Catalunya, Barcelona. Grupo de Recursos para la Didáctica de la Química. 115-121.

GUERRERO G.P., PRAZERES D.M.F, GUZMÁN R., MONTESINOS-CISNEROS R.M., TEJEDA A. Purification of plasmid DNA using tangential flow filtration and tandem anion-exchange membrane chromatography.2008. Bioprocess Biosyst Eng. 32: 615-623.

HUYGEN K. Plasmid DNA vaccination,2005. Elsevier. Microbes and Infection 7, 932-938.

KARIM M.N., GRAHAM H., HAN B., CIBULSKAS A. Flocculation enhanced microfiltration of *Escherichia coli* lysate, 2008. *Biochemical Engineering Journal*, 512-519.

KONG S., TITCHENER-HOOKER N., LEVY M.S. Plasmid DNA processing for gene therapy and vaccination: Studies on the membrane sterilisation filtration step, 2006. *Journal of Membrane Science* 280(2006) 824-831.

MULDER M., *Basic Principles of Membrane Technology*, Center for membrane Science and technology, University of Twente, 1996.

NUNES J.C., MORAO A.M., NUNES C. PESSOA DE AMORIM M.T., ESCOBAR I.C., QUEIROZ J.A. Plasmid DNA recovery from fermentation broths by a combined process of micro and ultrafiltration: Modeling and application, 2012. *Journal of membrane science*; 1-12.

PRAZERES D.M.F., FERREIRA G.N. M., MONTEIRO G. A., COONEY C.L.Y CABRAL J.M.S. Large-scale production of pharmaceutical-grade plasmid ADN for gene therapy: problems and bottlenecks, 1999. Elsevier Science. *Tibtech*, 17.1-6

PRAZERES D.M.F, MONTEIRO G.A, FERREIRA G.N.M, DIOGO M.M, RIBEIRO S.C.Y CABRAL J.M.S, Purification of plasmids for gene therapy and ADN vaccination, 2001. Elsevier Science B.V., M.R El-Gewely, 7.1-30.

SCHALK, J.; MOOI, F.; BERBERS, G.; VAN AERTS, L.; OVELGÖNNE, H.; KIMMAN, T. Preclinical and Clinical Safety Studies on ADN Vaccines, 2006. *Human Vaccines* 2, 45-53

SMITH C.R., DE PRINCE R.B, DACKOR J., WEIGI D., GRIFFITH J., PERSMARK M. Separation of topological forms of plasmid DNA by anion-exchange HPLC: Shifts in elution order of linear DNA, 2007. *Journal of Chromatography B*, 854, 121-127

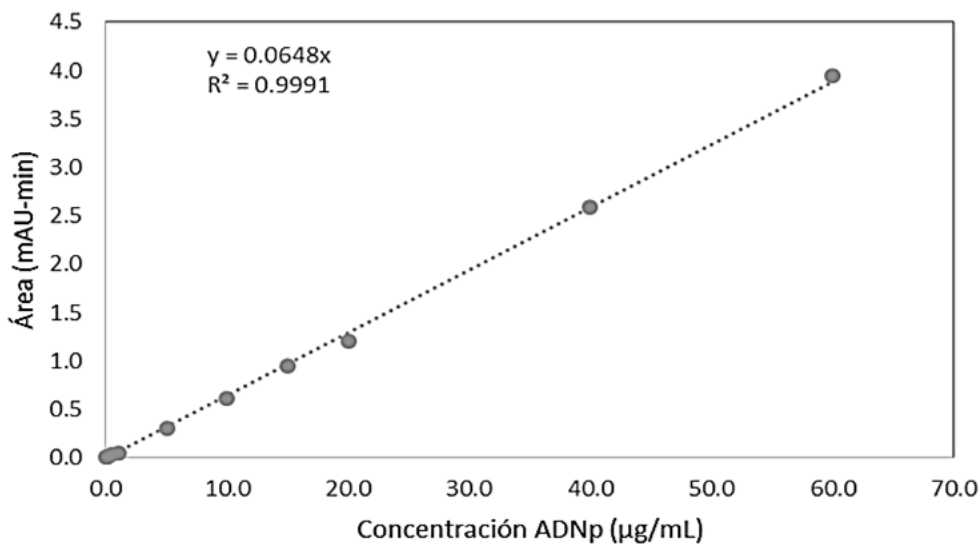
TEJEDA M.A, MONTESINOS C.R.M, GUZMÁN Z.R. *Bioseparaciones*, 2011. Segunda Edición. Ed. Pearson. México. 10, 466-468.

THEODOSSIOU I., COLLINS I. J., WARD J.M, THOMAS O.R.T, DUNNILL P., The processing of a plasmid based gene from *E. coli* primary recovery by filtration. 1997. *Bioprocess Eng*; 16: 175- 183.

TUTUNJIAN, R.S. Ultrafiltration process in biotechnology, 1985. En: *Comprehensive Biotechnology*. Murray M.Y. (Ed.). Pergamon Press. New York. 26, 411-437.

ANEXO A: CURVA DE CALIBRACIÓN DEL PLÁSMIDO PVAX1-NH36.

Esta curva de calibración se obtiene con purificados de plásmido utilizando el kit comercial de purificación.



Curva de calibración del plásmido pVAX1-NH36

En los purificados se mide la absorbancia y con este valor se determina su concentración, conociendo la relación de 1 unidad de absorbancia, corresponde a 50 µg/mL de plásmido. Al tener varias concentraciones se utiliza la técnica de HPLC-HIC en las muestras de plásmido puro para determinar el área correspondiente a cada concentración. Se grafican las áreas contra concentración y finalmente se obtiene la pendiente:

$$m = \frac{\text{Área}}{\text{Concentración pDNA puro}}$$

ANEXO B: MANUAL DE INSTRUCCIONES TN-100/T-100

Calibración de turbidímetro.

El turbidímetro portable TN-100/T-100 fue calibrado y probado antes de dejar la fábrica. Por lo tanto, es posible usar directamente el instrumento al sacarlo de su caja. Sin embargo, una calibración del instrumento es recomendado para ayudar a familiarizarse con la operación del instrumento y el procedimiento de calibración. Es recomendable una re-calibración al menos una vez al mes para una precisión óptima.

Se recomienda que se realice una completa calibración usando las cuatro soluciones estándar dadas para asegurar un rango total óptimo.

Soluciones de calibración.

Se recomienda que se usen los siguientes materiales durante la calibración para lograr el estado óptimo en este manual.

CAL. 1: 800 NTU solución de calibración

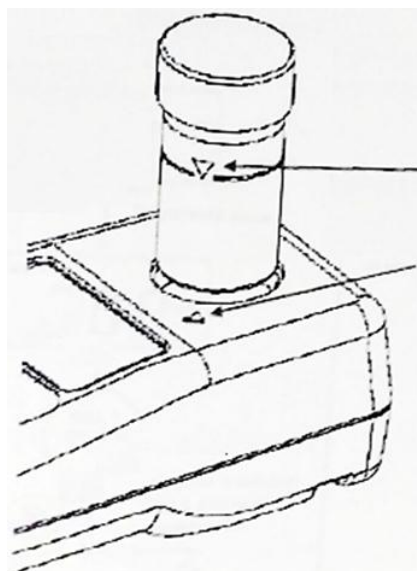
CAL. 2: 100 NTU solución de calibración

CAL.3: 20.0 NTU solución de calibración

CAL 4.: 0.02 NTU solución de calibración

Procedimiento de calibración.

Coloque el turbidímetro TN 100/T-100 en una superficie plana equilibrada, seleccione la función de calibración del instrumento presionando el botón CAL. El anunciador (CAL) aparecerá momentáneamente y el medidor le pedirá la primera solución de calibración CAL 1 (800 NTU). Inserte la solución Cal 1 (800 NTU) en el orificio de muestra, alineando la marca del vial con la marca del medidor (Figura 22).



Coloque la marca del vial con la marca del turbidímetro TN-100 /T-100.

Figura 22. Alineación del vial con el turbidímetro.

Presione hasta que el vial quede completamente dentro del instrumento, presione el botón READ/ENTER.

El anunciador (CAL 1 800 NTU) parpadeará por aproximadamente 12 segundos. Cuando el instrumento haya completado la calibración hasta ese punto, te pedirá que insertes la próxima solución de calibración dentro del instrumento (CAL 2 100 NTU), repita la secuencia de calibración para cada solución de calibración.

Después de que haya calibrado exitosamente la solución CAL 4 (0.02 NTU), la pantalla mostrará (STBY), y el medidor está listo para la siguiente medición.

3. Información general.

El turbidímetro TN 100/T-100 a prueba de agua te permite medir la turbidez de una muestra colectada. La turbidez es reportada en Unidades Nefelométricas de Turbidez (por sus siglas en inglés NTU). La lectura fuera de 1000 NTU está fuera del rango del instrumento.

3.1. Procedimiento de medición de turbidez.

Una óptima medición de la turbidez depende de buenas técnicas de medición. Factores como la limpieza de los viales, el posicionamiento del vial en el muestreador, la calibración, la base del turbidímetro y otros, tienen que tomarse en consideración.

3.1.2. Preparación de los viales.

Tome el líquido con el tubo de plástico otorgado, tome un vial seco y limpio , tenga cuidado de manejar el vial por la tapa. Vierta en el vial aproximadamente 10 cm^3 del agua, tape el vial con la tapa de enrosque negra y agítelo suavemente varias veces. Deseche la muestra utilizada y repita el procedimiento de lavado dos o más veces.

Llene el vial lavado con la porción remanente (10 cm^3 aproximadamente) de la muestra hasta la marca indicada en el vial Tape el vial con la tapa de enrosque negra.

Limpie el vial con la tela suave libre de hilo. Asegure que el exterior del vial esté seco y libre de manchas, aplique una delgada película de aceite de silicona (incluido) en el vial de muestra (Figura 23), limpie con la tela suave para obtener una mejor distribución sobre toda la superficie del vial, ahora se encuentra listo para colocar el vial dentro del muestreador.

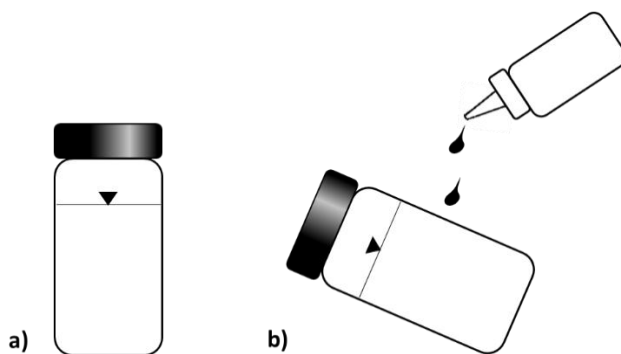


Figura 23. a) vial muestreador. b) Aplicación de una delgada película de aceite de silicona.