



EL SABER DE MIS HIJOS
HARÁ MI GRANDEZA

UNIVERSIDAD DE SONORA

DIVISIÓN DE INGENIERÍA

DEPARTAMENTO DE INGENIERÍA QUÍMICA
Y METALURGIA

ESTUDIO DE LA CINÉTICA DE ROMPIMIENTO DE
E.coli PARA RECUPERACIÓN DE PLÁSMIDO EN UN
MOLINO DE PERLAS

Tesis

Que para obtener el título de:

INGENIERO QUÍMICO

Presentan

Manuel Francisco López Sánchez
Luis Alejandro Ureña Búrquez

Hermosillo, Sonora

Abril 2016

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

Dedicatoria

Con gran afecto, a nuestras respectivas familias

Agradecimientos

Agradezco a mis padres, por el tiempo que han estado apoyándome en mi etapa de estudiante.

Agradezco a mis tíos, abuelos y primos, por el amplio apoyo que me han regalado durante todos estos años.

Agradezco asimismo a mis amigos por regalarme momentos tan amenos como los que hemos vivido.

Agradecemos a la Dra. Patricia Guerrero, por la gran oportunidad que nos ha brindado, y por toda la ayuda proporcionada durante el desarrollo de la tesis.

Agradecemos a la institución por brindarnos educación y, con ello una oportunidad para vivir sin limitaciones materiales.

CONTENIDO

CAPÍTULO 1. INTRODUCCIÓN Y OBJETIVOS	1
I.1 Introducción	1
I.2 Objetivos	3
I.2.1 Objetivo General	3
I.2.2 Objetivos Específicos	3
CAPÍTULO 2. ANTECEDENTES	4
II.1. Biotecnología	4
II.2. Tipos de Bioprocesos	4
II.3. Síntesis del Bioproceso	5
III.3.1. Consideraciones técnicas	5
II.4. Plásmidos	6
II.5. Plásmido pVAX1-NH36: Características y utilización	12
II.6. Proceso de obtención de plásmido	13
II.7. Métodos de rompimiento celular	19
II.7.1. Métodos mecánicos	19
II.7.2. Métodos no mecánicos	21
II.8. Molinos de perlas de alta velocidad	22
II.9. Modelo de liberación de plásmido en un molino de perlas en operación por lotes.	24
CAPÍTULO 3. METODOLOGÍA EXPERIMENTAL	26
III.1 Preparación y esterilización del medio de cultivo	26
III.1.1 Preparación del banco celular	26
III.1.2 Cultivo de <i>E. coli</i> conteniendo pVAX1-NH36	27
III.1.3 Cosecha de <i>E. coli</i> conteniendo pVAX1-NH36	28
III.1.4 Resuspensión de la biomasa	28
III.1.5 Rompimiento de células por medio de lisis alcalina.	28
III.1.6 Rompimiento de células por medio de lisis mecánica.	29
III.1.7 Análisis de muestras	31
III.1.7.1 Electroforesis en gel de agarosa	31
III.1.7.2 Cromatografía de interacción hidrofóbica de alta resolución.	32
III.1.8 Balance de masa en el molino de perlas de alta velocidad	33

III.2 Propuesta de lavado de las perlas de vidrio.	35
III.3 Equipos	39
CAPÍTULO 4 RESULTADOS Y DISCUSIÓN	43
IV.1 Análisis de la calidad de los lisados	43
IV.2 Determinación de la concentración de plásmido liberado durante la lisis	47
IV.2.1 Prueba 5	51
IV.2.2 Prueba 6	52
IV.2.3 Prueba 7	54
IV.2.4 Prueba 8	55
IV.3 Perlas	61
IV.3.1 Perlas nuevas	61
IV.3.2 Perlas en las que se utilizaron 18 mL de agua	61
IV.3.3 Perlas que estuvieron 24 h en ácido	62
IV.3.4 Perlas que fueron decantadas	62
CAPÍTULO 5 CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES	64
BIBLIOGRAFÍA	72

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Representación esquemática de la heterogeneidad del ADN plasmidico	7
Figura 2. Transporte de los vectores de la terapia génica.	11
Figura 3. Función y objetivo de la terapia génica.	12
Figura 4. Alternativas típicas para el proceso de producción de plásmido.	14
Figura 5. Métodos de ruptura celular microbiana	19
Figura 6. Cromatograma típico de análisis HIC-HPLC	33
Figura 7. Diagrama de flujo del procedimiento realizado en este trabajo desde el cultivo celular hasta la lisis alcalina.	36
Figura 8. Diagrama de flujo del procedimiento realizado en este trabajo desde la lisis mecánica hasta el análisis de las muestras.	37
Figura 9. Diagrama de flujo del procedimiento para el análisis de las muestras	38
Figura 10. Báscula Adventure Pro AV213 marca OHAUS	39
Figura 11. Báscula Pioneer PA64 marca OHAUS	39
Figura 12. Placa de agitación marca Thermo Scientific Cimarec	39
Figura 13. Autoclave Hirayama modelo HV-50	39
Figura 14. Molino Mezclador Retsch MM-400	40
Figura 15. Cámara UV marca UVP modelo Multi Doct-it	40
Figura 16. Agua Direct-Q UV	40
Figura 17. Incubadora VWR modelo 1575-1575R	40
Figura 18. Horno Binder	41
Figura 19. Centrífuga Thermo Scientific Biofuge Stratos	41
Figura 20. Electroforesis Biorad Powerpac Basic	41
Figura 21. Espectrofotómetro Perlix Elmer Lambda 2S	41
Figura 22. Medidor de pH marca Sumphony modelo SB70P	42
Figura 23. HPLC Äkta Purifier FPLC System	42
Figura 24. Gel de electroforesis de muestras de lisado tomados durante la prueba 1.	44
Figura 25. Gel de electroforesis de muestras de lisado tomados durante la prueba 2.	45
Figura 26. Gel de electroforesis de muestras de lisado tomados durante la prueba 3 y 4.	46
Figura 27. Gel de electroforesis de muestras de lisado tomados a 5 min.	47
Figura 28. Cromatograma analítico de una muestra de lisado obtenido en el molino de perlas.	48
Figura 29. Cromatograma analítico de una muestra de lisado, sustrayendo el correspondiente blanco.	49
Figura 30. Concentración liberada de ADNp de células de <i>E. coli</i> en un molino de bolas por lotes, prueba 5.	51
Figura 31. Concentración liberada de ADNp de células de <i>E. coli</i> en un molino de bolas por lote, prueba 6.	52

Figura 32. Concentración liberada de ADNp durante las pruebas 5 y 6	53
Figura 33. Concentración liberada de ADNp de células de <i>E. coli</i> en un molino de bolas por lote, prueba 7.....	54
Figura 34. Concentración liberada de ADNp de células de <i>E. coli</i> en un molino de bolas por lote, prueba 8.....	55
Figura 35. Concentración liberada de ADNp durante las pruebas 7 y 8.	56
Figura 36. Cromatograma de lisado alcalino (azul) y lisado mecánico (rosa). .	58
Figura 37. Cromatograma de la prueba 4 a diferentes tiempos (0.5, 2,3.5 y 5 min) de una lisis mecánica.	59
Figura 38. Cromatograma de la prueba 7 a diferentes tiempos (0.5, 2,3.5 y 5 min) de una lisis mecánica.	60
Figura 39. Perlas de 0.1-0.25 mm.....	61
Figura 40. Perlas de 0.25-0.5 mm.....	61
Figura 41. Perlas de 0.1-0.25 mm.....	61
Figura 42. Perlas de 0.25-0.5 mm.....	61
Figura 43. Perlas de 0.1-0.25 mm.....	62
Figura 44. Perlas de 0.25-0.5 mm.....	62
Figura 45. Perlas de 0.1-0.25 mm.....	62
Figura 46. Perlas de 0.25-0.5 mm.....	62

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Características de ácidos nucleicos y otros componentes en una célula de <i>E. coli</i>	8
Tabla 2. Condiciones de las pruebas a realizar.	30
Tabla 3 Pureza, constantes específicas de velocidad y Cm obtenidas en las pruebas de rompimiento mecánico de <i>E. coli</i>	57

RESUMEN

En la actualidad, se están desarrollando vacunas y terapias génicas basadas en ADN plasmídico, o plásmidos, que permiten ahorrar tiempo y recursos valiosos para su formulación y posterior aplicación. Tales plásmidos son obtenidos mediante cultivo celular de microorganismos que son recombinados para hospedarlos, tales como *Escherichia coli* (*E. coli*). Con el fin de obtener el producto intracelular se han estado utilizando agentes químicos para hacer esto posible, pero recientemente se han estado utilizando métodos mecánicos de ruptura celular para lograr una obtención más pura y sin la utilización de sustancias dañinas para el plásmido. En este estudio se utilizó el molino mezclador Retsch con perlas de vidrio para realizar una lisis mecánica y determinaron los parámetros más adecuados para la recuperación de plásmido. Las pruebas para efectuar el rompimiento mecánico de *E. coli*, conteniendo pVAX1-NH36, se realizaron tomando dos concentraciones celulares, dos velocidades de agitación, dos tamaños de perlas y un tiempo de proceso de 5 minutos. Posteriormente se analizaron las muestras tomadas cada 30 segundos: por cromatografía líquida de alta resolución en interacción hidrofóbica (HPLC-HIC), para calcular el porcentaje de recuperación de plásmido y por electroforesis para verificar la existencia de plásmido. También se realizó lisis alcalina a modo de comparación entre ambos métodos, en cuanto a la recuperación de plásmido. Se obtuvieron resultados de pureza de 4.51% y 4.48% de plásmido, estando presente la isoforma superenrollado, lo que permitió determinar los parámetros adecuados, entre los estudiados, para el proceso.

NOMENCLATURA

Símbolo

ADN	Ácido Desoxirribonucleico
ADNg	Ácido Desoxirribonucleico genómico
ADNp	Ácido Desoxirribonucleico plásmidico
ARN	Ácido Ribonucleico
ARNm	Ácido Ribonucleico mensajero
ARNr	Ácido Ribonucleico ribosomal
ARNt	Ácido Ribonucleico de transferencia
CIH	Cromatografía de Interacción Hidrofóbica
FFT	Filtración de Flujo Tangencial
TB	Terrific broth
SDFA	Sistema de Dos Fases Acuosas

CAPÍTULO 1. INTRODUCCIÓN Y OBJETIVOS

I.1 Introducción

Actualmente las vacunas y terapia génica basadas en ADN plasmídico (ADNp) ofrecen grandes oportunidades contra ciertas enfermedades, ya que el ADNp es un vector no viral de los genes terapéuticos, son producidos por una rápida y confiable fermentación bacteriana, pues no dependen en huevos de gallina u otros procesos de cultivo de células costosos en tiempo y trabajo. (Ghanem et al, 2013)

Los plásmidos son moléculas de ADN extracromosómico que se replican y transcriben independientemente del ADN cromosómico y pueden presentarse en diversas isoformas. Están presentes generalmente en bacterias y células eucariotas, su tamaño varía desde 3 000 a 10 000 pares de bases (pb) (Prazeres et al, 2001).

La relativa estabilidad del ADNp, hace que los fármacos derivados no requieran del control de temperatura como sus contrapartes virales, haciendo así más sencillo su manejo. Estos y otros factores han hecho que el interés de la comunidad científica hacia esta alternativa despierte.

En el caso de las vacunas basadas en ADN genéticamente modificado, se utilizan para provocar en los organismos respuestas inmunológicas contra enfermedades. Producen uno o dos proteínas específicas (antígenos) de un patógeno causante de enfermedad y cuando ésta es inyectada en las células del cuerpo, su funcionamiento detecta el ADN y lo convierte en proteínas patógenas que son percibidas como forasteras. Cuando tales proteínas son procesadas por la célula huésped y liberadas al exterior de la célula, el sistema inmunológico se

alerta y se dispara así una serie de respuestas inmunológica (Ghanem et al, 2013).

Los plásmidos son producidos generalmente en una célula hospedera, *Escherichia coli* (*E. coli*) genéticamente modificado para contener el plásmido cuyo cultivo se fermenta durante cierto tiempo. Una vez que se ha hecho el cultivo, es necesario romper la célula a través de la lisis para así liberar el plásmido. Una de las alternativas para llevar a cabo tal operación, llamada lisis alcalina, consiste en la adición de un agente de lisis, que típicamente es un agente alcalino y un detergente, para romper las células hospederas y liberar el plásmido. Otra alternativa involucra medios mecánicos en lugar de químicos, y es llamada lisis mecánica. Generalmente, el rompimiento mecánico de las bacterias es impracticable debido al alto daño al que se somete las cadenas de ADN, sin embargo, bajo condiciones optimizadas, el rompimiento de bacterias a través del uso de un molino de perlas resultó en casi un 90% de plásmido solubilizado sin daño (Carnes y Williams, 2007).

I.2 Objetivos

I.2.1 Objetivo General

Estudiar la ruptura celular de *E. coli* hospedando el plásmido pVAX1-NH36, por medio de molienda con perlas de vidrio.

I.2.2 Objetivos Específicos

1. Analizar el grado de ruptura de la *E. coli* durante el tiempo de molienda a diferentes velocidades de agitación.
2. Evaluar el grado de ruptura de la *E. coli* durante el tiempo de molienda utilizando diferentes concentraciones celulares.
3. Evaluar el grado de ruptura de la *E. coli* durante el tiempo de molienda con diferente tamaño de perla.
4. Comparar los resultados de la lisis mecánica con la lisis alcalina

CAPÍTULO 2. ANTECEDENTES

II.1. Biotecnología

El cultivo de células con miras a obtener productos útiles al humano, es una actividad que el hombre ha realizado durante toda su historia. Este cúmulo de actividades se ha englobado dentro de lo que se conoce hoy en día como Biotecnología.

Actualmente, la Biotecnología puede ser definida como la aplicación de la ciencia y la tecnología en organismos vivos o no vivos para la producción de conocimiento, bienes y servicios.

El mercado actual de productos biotecnológicos es del orden de miles de millones de dólares. Los bioprocesos comprenden una amplia gama de productos como lo son: aminoácidos, nucleótidos, vitaminas, solventes y ácidos orgánicos, antibióticos, entre otros (Tejeda et al, 2011).

II.2. Tipos de Bioprocesos

Actualmente, los bioprocesos se dividen en tres grandes grupos, relacionados al tipo de bioseparaciones que involucran. El primer grupo engloba el conjunto de bioprocesos desarrollados mediante cultivos de organismos no recombinantes, cuyos productos se obtienen tanto intracelularmente como si son secretadas en el medio de cultivo. En este grupo, pertenecientes a los primeros bioprocesos empleados por la humanidad, se encuentran los bioprocesos de la biotecnología tradicional así como la producción de etanol, enzimas, ácido cítrico y antibióticos. El segundo grupo comprende aquellos que son producidos intracelularmente utilizando células recombinantes de *Escherichia coli*. Esta generación engloba procesos importantes como lo son la obtención de insulina humana, hormona del

crecimiento y el alfa interferón, entre otros. Tales productos se caracterizan por encontrarse en baja concentración dentro de la célula, tener elevado peso molecular y requerir un alto grado de pureza. El tercer grupo de la biotecnología la podemos definir por bioprocesos mediante los cuales se obtienen productos extracelulares en células recombinantes, la mayoría siendo eucariotas. En esta generación se percibe la capacidad de no sólo producir exógenamente el producto deseado, sino que éste se obtiene en forma activa. Productos obtenidos de esta generación son la eritropoyetina (EPO), los anticuerpos monoclonales, entre otros (Tejeda et al, 2011).

II.3. Síntesis del Bioproceso

III.3.1. Consideraciones técnicas

Para llevar a cabo de forma adecuada los bioprocesos, es de gran importancia considerar las características técnicas básicas del bioproceso como: la secuencia de operaciones unitarias del bioproceso, la escala de bioproceso, el número de etapas por operación unitaria y los procesos unitarios.

Una vez que se ha realizado el bioproceso, es necesario separar el producto de interés de los contaminantes que pueden haberse producido a la par, para ello se efectúan las operaciones de bioseparación, que aprovechan las diferencias que existen entre las propiedades fisicoquímicas de los componentes del caldo de cultivo.

La recolección de productos biotecnológicos derivados de cultivo celular o fermentación frecuentemente se produce por una combinación de varias etapas de operaciones unitarias, u operaciones de bioseparación, concatenadas. Para el caso de obtención intracelular del producto deseado, el primer paso para la recolección es la concentración celular, seguido del rompimiento de la célula para

liberar el producto en la solución. Posteriormente, los restos celulares son removidos y el producto es clarificado por medio de filtración (Tejeda et al, 2011).

II.4. Plásmidos

Los plásmidos son moléculas extracromosómicas de ADN cerradas y de doble hélice, presentes en bacterias, que pueden ser hallados en diferentes conformaciones topológicas. Cada hebra de ADN es un polímero lineal de desoxirribonucleótidos unidos por enlaces de fosfodiéster. En una molécula de plásmido, los dos extremos de ADN están enlazados covalentemente, formando un lazo cerrado. Una de sus propiedades centrales es su capacidad de replicarse de manera independiente del ADN genómico. El peso molecular promedio de una molécula de plásmido es igual al número de pares de bases multiplicado por 660 Daltons (Da), el peso molecular promedio de un par de base. Particularmente, los plásmidos utilizados actualmente en pruebas clínicas tienen un peso molecular que ronda de los 5 a los 20 kilo par de bases (kpb), pero plásmidos más grandes pueden ser una interesante vía de investigación (Levy et al, 2006).

Aunque el plásmido puede presentarse en diferentes conformaciones morfológicas (véase Figura 1), aquella que se denomina superenrollada juega un papel preponderante respecto al resto, siendo aceptado por la FDA que la forma superenrollada es más efectiva terapéuticamente que el resto (Carnes y Williams, 2007). Moléculas de plásmido multiméricas, como el caso de la forma superenrollada de los plásmidos, son de particular interés para propósitos biofarmacéuticos, porque contienen múltiples copias de un gen funcional y así es más eficiente en los experimentos de transfección que la forma monoméricas. Los experimentos desarrollados mostraron que la expresión genética fue 14 veces más alta comparada con su forma monomérica (Voß et al, 2003).

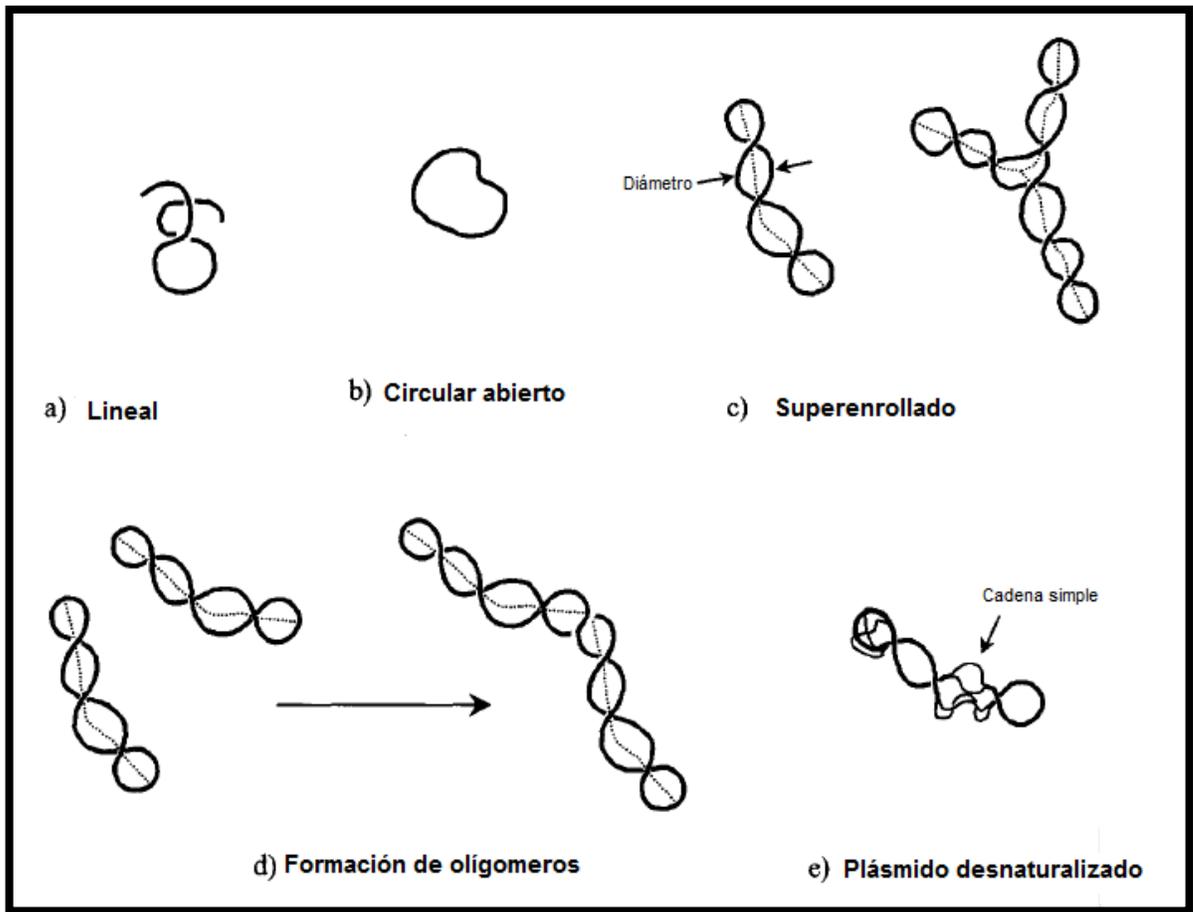


Figura 1. Representación esquemática de la heterogeneidad del ADN plasmídico. (Prazeres et al, 2001).

Tabla 1. Características de ácidos nucleicos y otros componentes en una célula de *E. coli*. Adaptado de (Diogo et al, 2005) y (Prazeres et al, 2004).

Molécula	Especies diferentes por célula	Contenido en el lisado (%) en peso seco	Peso molecular (PM) (kDa)	Observaciones
Ácidos nucleicos				
ADNp	1	< 3	3.3 – 13.2 x 10 ^{3b}	Polianiónico, cadena doble
ARN		21	28 – 1 000	Polianiónico, cadena sencilla
ARNt	40		28	
ARNr	3		500 – 1 000	
ARNm	400 – 800		660 – 990	
ADNg	1 ^a	3	2.8 x 10 ⁶	Polianiónico, altamente fragmentado, cadena doble o sencilla
Proteínas	1 100	55	8 – 200	Aniónica, catiónica, neutra, hidrofóbica, hidrofílica
Endotoxinas		3	10	Aniónica, parte lípidica
Iones y moléculas pequeñas	800 - 2000	15	< 1	

a Las células de *E. coli* en crecimiento rápido tienen, en promedio, 4 moléculas de ADNg.

b Moléculas de ADNp con tamaño promedio de 5 a 20 kpb.

Desde hace relativamente pocos años, se han estado desarrollando nuevas vacunas y terapias, llamadas terapias génicas, utilizando ADN plasmídico, que han suscitado una gran demanda de estas macromoléculas biológicas en condiciones de alta pureza, de acuerdo con los lineamientos de los organismos reguladores para su administración en seres vivos.

Las vacunas desarrolladas utilizando tales plásmidos ofrecen una vía relativamente rápida para el desarrollo y producción de nuevas vacunas, si las comparamos con las vacunas tradicionales basadas en virus, pues además de ofrecer mayor flexibilidad en cuanto a sus opciones de transporte y depósito, no dependen de procesos de cultivo celular que son costosas en tiempo y trabajo. Así, donde las opciones convencionales presentan el inconveniente de necesitar largos tiempos de preparación, las vacunas basadas en ADN plasmídico ofrecen una oportunidad de velocidad sin precedentes, pues nuevas vacunas pueden ser formuladas en días y producidas en masa en un lapso de 2 a 3 semanas. Esto permite una respuesta más rápida contra los nuevos agentes biológicos patógenos que puedan presentarse (Prazeres et al, 2001)

Más específicamente, las vacunas basadas en ADN plasmídico son moléculas genéticamente modificadas que son utilizadas para producir respuestas inmunológicas deseadas en los organismos contra las enfermedades. Están hechas, como anteriormente se ha dicho, de pequeñas y circulares piezas de ADN bacteriano llamado plásmido. Cuando la vacuna es administrada en las células del cuerpo por alguno de los métodos hasta ahora utilizados (véase Figura 2), la “maquinaria interna” de la célula hospedera “lee” el ADN y lo convierte en proteínas patógenas. Estas proteínas son detectadas como extranjeras, así, cuando la célula hospedera las procesa y las libera en su superficie, el sistema inmunológico es alertado y se disparan una serie de respuestas inmunológicas (véase Figura 3). Una vez que el sistema inmunológico

ha desplegado su respuesta inmunológica primaria para destruir el patógeno, se habrá obtenido una inmunidad de memoria a la enfermedad. Una gran ventaja de las vacunas basadas en ADN plasmídico, es que la vacunación estimula tanto a los anticuerpos como los componentes mediados por células del sistema inmunológico, siendo que las vacunas convencionales sólo estimulan la respuesta de los anticuerpos (Prazeres et al, 2001). Para su administración pueden utilizarse una gran variedad de métodos

Dada su especial condición para tratar no sólo los síntomas de las enfermedades (fenotipo), sino atacarlas desde un nivel genético (genotipo) (Voß et al, 2003), la terapia génica es una interesante alternativa para la prevención, diagnóstico, tratamiento e incluso cura de defectos genéticos como fibrosis cística, cáncer y SIDA.

Actualmente, una gran cantidad de terapias génicas están en pruebas clínicas. Sin embargo, aún posee problemas en su despliegue. Los problemas comunes que se muestran en las pruebas incluyen transporte genético ineficiente, focalización celular errónea, corta duración de la estimulación. Vectores virales, además, han mostrado efectos adversos como reacciones inmunológicas severas en el caso de sistemas adenovirales o el desarrollo de condiciones similares a la leucemia (Voß et al, 2003). En la vacunación genética, se espera un potencial de respuesta más alto para el transporte de genes basado en plásmidos, donde la expresión de un antígeno codificado lleva a una respuesta inmunológica en el organismo en tratamiento (Danko, 1994).

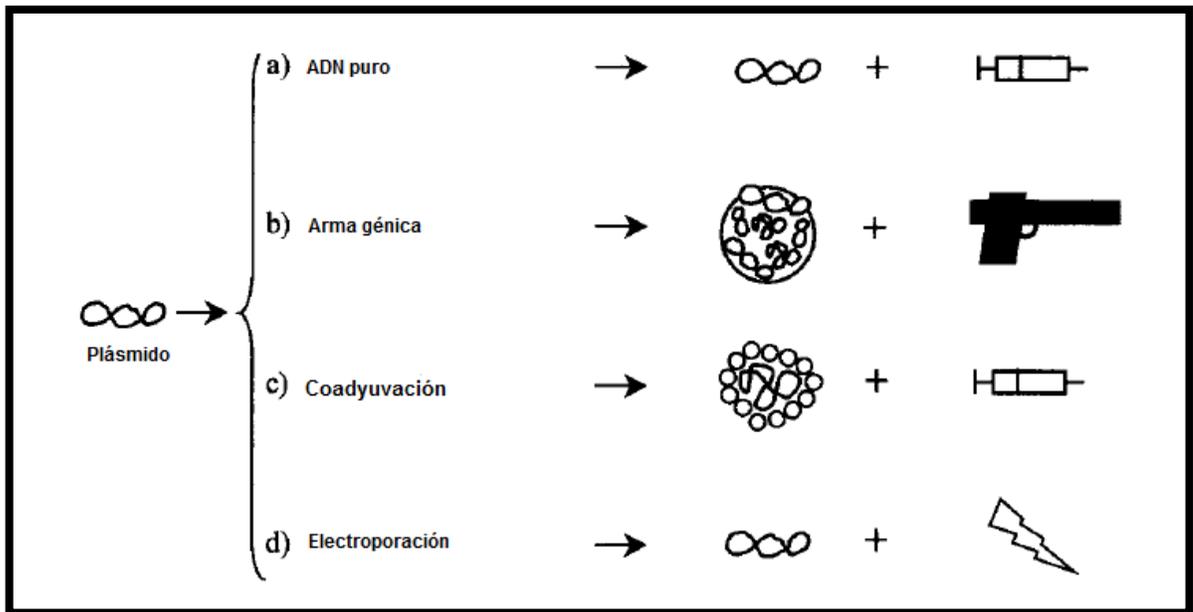


Figura 2. Transporte de los vectores de la terapia génica. A) ADN puro: el plásmido en una solución salina es inyectado directamente (músculo o tumor) en el paciente. B) Arma génica: el plásmido es revestido en partículas doradas y es inyectado en la piel por un vapor de helio a alta presión. C) Coadyuvación: el plásmido es combinado con agentes de transfección que amplifiquen la absorción y es inyectado. D) Electroporación: acoplando corriente eléctrica amplifican el transporte de plásmido a través de un patrón de pequeñas aberturas en las capas externas de la piel o mucosa (Prazeres et al, 2004).

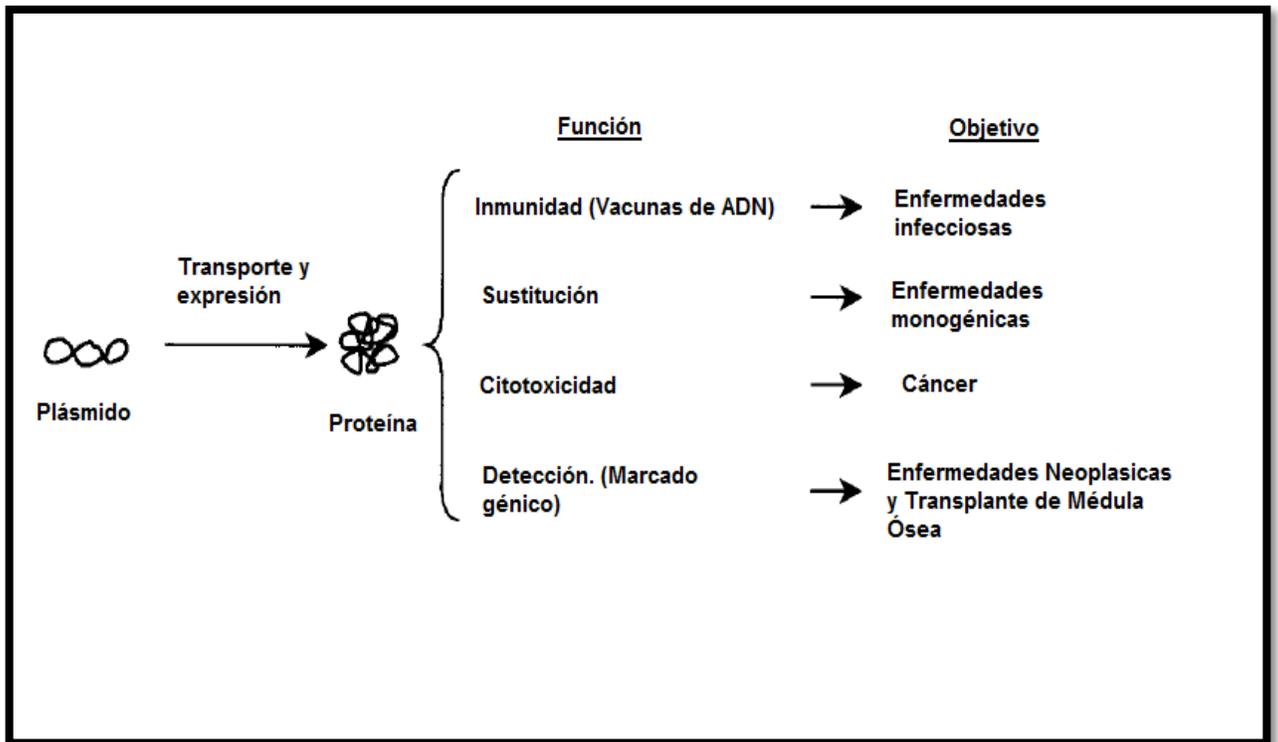


Figura 3. Función y objetivo de la terapia génica: Desde el transporte hasta el objetivo que va a cumplir (Prazeres et al, 2004).

II.5. Plásmido pVAX1-NH36: Características y utilización

El plásmido pVAX1 de 2,999 pb contiene: a) promotor inmediato temprano del citomegalovirus humano, el cual hace posible la expresión eficiente de alto nivel de la proteína recombinada, b) señal de poliadenilación de las hormonas bovinas de crecimiento, para promover la terminación de la transcripción y la poliadenilación del ARN mensajero, c) gen de resistencia a la kanamicina, para la selección del vector en *E. coli*, y d) origen de replicación pUC, para obtener un alto número de copias y crecimiento en *E. coli*. A tal plásmido se le introduce posteriormente el gen NH36, dando como resultado el plásmido pVAX1-NH36, que pesa ahora 4000 pb (pVAX Catalog., 2012). El gen NH36 ha probado producir fuertes respuestas inmunológicas y significativa protección en ratones

contra la infección que produce el parásito protozoario *Leishmania donovani*, pues es responsable de codificar la glicoproteína *Nucleósido Hidrolaza*, la cual es sintetizada por la mayoría de los parásitos protozoarios del género *Leishmania*. Así, se procura hacer de tal plásmido una vía óptima de tratamiento para infecciones provocadas por tales parásitos, que provocan, entre otras dolencias, infección del hígado, bazo, y médula ósea, así como inmunosupresión (Aguilar-Be et al, 2005).

II.6. Proceso de obtención de plásmido

El proceso de obtención de ADN plasmídico para utilización farmacéutica inicia con la clonación de secuencias terapéuticas dentro de un vector de plásmido usando técnicas de laboratorio estándar. El plásmido resultante usualmente es transformado en *E. coli* como organismo hospedero para la replicación del plásmido (Voß et al, 2003).

El proceso para la obtención de ADN plasmídico a nivel laboratorio (el escalamiento a nivel industrial aún presenta retos considerables), consta generalmente de cinco etapas: fermentación, cosecha, lisis, clarificación y purificación final, de acuerdo a la Figura 4 (Carnes y Williams, 2007). Todos los procesos descritos, así como las etapas en las que están incluidos pueden estar sujetos a cambios según la empresa o los equipos disponibles (Prazeres et al, 2001), (Tejeda et al, 2011).

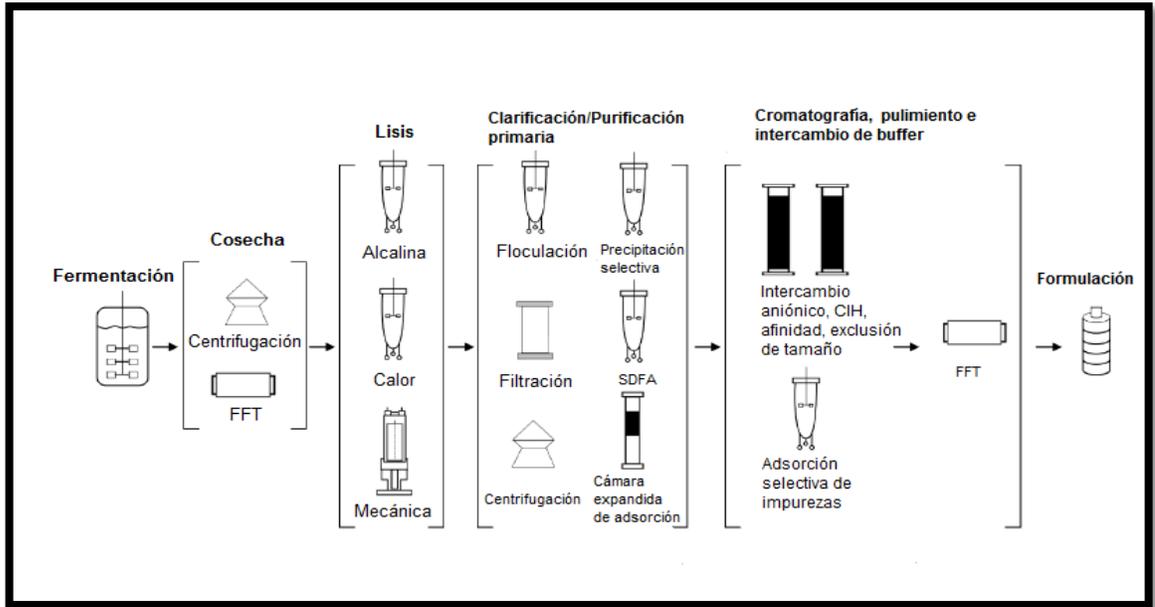


Figura 4. Alternativas típicas para el proceso de producción de plásmido. Comúnmente las operaciones unitarias utilizadas en cada fase del proceso necesitan ser combinadas para crear variación en las rutas de procesamiento (Carnes y Williams, 2007).

En la primera etapa, la cepa hospedera que contiene el plásmido de interés se propaga mediante fermentación en un caldo de cultivo previamente esterilizado. El objetivo principal a tomar en el diseño de un proceso de fermentación adecuado es para maximizar la producción de plásmido superenrollado. La optimización del rendimiento mejora asimismo la pureza del plásmido en las etapas posteriores (Carnes y Williams, 2007). Como podrá imaginarse, es crítico que la fermentación produzca plásmido de alta calidad, así, la composición del medio utilizado durante la fermentación puede drásticamente afectar tanto la calidad como el rendimiento del plásmido. Son requeridos medios de fermentación de alta densidad celular que contengan fuentes de carbono y nitrógeno, sales diversas, y metales traza, adicionalmente vitaminas y/o aminoácidos utilizados como activadores del crecimiento (Prazeres et al, 2001), (Tejeda et al, 2011).

El fermentador se inocula con la *E. coli* hospedera y con una solución de kanamicina que es utilizada para evitar el crecimiento de *E. coli* sin plásmido o de otros microorganismos (Tejeda et al, 2011). La fermentación se realiza en un biorreactor o incubadora por un tiempo determinado (varía según la concentración inicial de la *E. coli* hospedera) a 37 °C (Prazeres et al, 2001),

El rendimiento de la fermentación dependerá, entre otros factores experimentales, de la interacción entre el organismo hospedero, el vector de plásmido que hospeda y el medio de crecimiento. Kennedy y col. investigaron el crecimiento de la cepa de *E. coli* DH5 α hospedando el plásmido recombinado pSVb dentro de recipientes agitados, y biorreactores por lote y por lote alimentado, resultando que en este último obtenía rendimientos de 8 a 25 veces mayores, respectivamente. Además, en los cultivos realizados en el biorreactor por lotes, el porcentaje de plásmido superenrollado fue en decremento conforme transcurría el tiempo, pero permaneció relativamente constante en los cultivos realizados en el biorreactor por lote alimentado (Kennedy et al, 2003). Por la

misma línea, Silva y col. trabajaron con DH5 α hospedando el plásmido pVAX1-LacZ, el cual fue cultivado en un medio semi-definido haciendo uso de estrategias de inducción de ADN plasmídico. (Silva et al, 2004).

Las siguientes etapas, aquellas que buscan recolectar y purificar el producto, consisten en una serie de operaciones unitarias diseñadas para liberar moléculas de ADN plasmídico de las células hospederas y para remover impurezas y contaminantes hasta que las especificaciones de un producto aceptable sean alcanzadas. Siendo los componentes principales de la célula hospedera (*E. coli*) agua, proteínas y ácidos nucleicos, el ADN plasmídico oscila entre el 0.5 y el 5.0% (p/p) del total de la masa celular (Carnes y Williams, 2007).

En la tercera etapa, lisis o recuperación primaria, la biomasa se cosecha por centrifugación. Después de la centrifugación la pasta se resuspende. El buffer de resuspensión usualmente contiene agentes que tienen la propiedad de romper los enlaces iónicos y de hidrógeno entre peptidoglicanos, lípidos y/u otras proteínas de la cubierta celular. Por ejemplo, el ácido etilendiaminotetraacético (EDTA por sus siglas en inglés) es usualmente usado como un agente quelante. La remoción de cationes divalentes (más que nada Ca²⁺ Y Mg²⁺) de la pared celular, membrana exterior y membrana plasmática desestabiliza su estructura, facilita la lisis, y reduce la actividad de nucleasas Mg²⁺ endógenas dependientes, previniendo la degradación del plásmido. Además, para proteger el plásmido contra el corte, glucosa (o sucrosa) es usualmente incluida en el buffer (Prazeres et al, 2004).

Variaciones del procedimiento de lisis alcalina originalmente descrito por Birnboim y Doly (1979) son con mayor frecuencia la opción a escala laboratorio. La lisis alcalina se inicia con la adición de un reactivo de lisis a la suspensión de *E. coli*. Tal reactivo debe poseer una base (ejemplo, 0.2 M NaOH) y un detergente (ejemplo, 1% dodecil sulfato de sodio). El papel del detergente es para

solubilizar material de las membranas celulares, eliminando interacciones interfaciales no covalentes entre proteínas y lípidos. La base utilizada incrementa el valor de pH, promoviendo así la desnaturalización irreversible del ADN genómico, pero manteniendo reversible la desnaturalización del plásmido. En el transcurso del proceso, las hebras complementarias de ADN genómico son completamente separadas y las bases hidrofóbicas son expuestas. Agitar durante la lisis es extremadamente importante. El reactivo de lisis debe ser añadido y agitado rápidamente de manera que los extremos en el pH sean evitados (y con ello la desnaturalización irreversible del plásmido). Una vez que las células han sido lisadas, la intensidad de la agitación debe ser reducida para evitar el corte de las moléculas de plásmido y para mantener el ADN genómico con el mayor peso molecular posible, para así maximizar su precipitación en las etapas subsecuentes (Birnboim y Doly, 1979).

Terminada la lisis, se neutraliza con acetato de potasio (3 M, pH 5), que causa la renaturalización de moléculas de plásmido y precipita restos moleculares, ADN genómico y proteínas contaminantes. Este precipitado se filtra. Normalmente, la lisis alcalina y la neutralización son llevadas a cabo subsecuentemente en el mismo recipiente, tardando cada operación de 5 a 10 min.

La ruptura celular y liberación del plásmido también puede ser realizado por métodos mecánicos como sonicación, molino de perlas y homogeneización, o químicos, como la lisis alcalina. Carlson et al, 1995, evaluaron cinco métodos diferentes de ruptura celular mecánica para extraer plásmidos de células bacterianas. Los métodos utilizados fueron: sonicación, nebulización, homogeneización, microfluidización, y molino de perlas. Los métodos probados de molino de perlas y microfluidización fueron los que presentaron más altos potenciales, recuperando aproximadamente 90% y 50%, respectivamente. El resto de los métodos resultaron en altas cantidades de degradación de plásmido, probando así no ser efectivos en sus condiciones actuales (Carlson et al, 1995).

Otro estudio buscó la cinética de liberación de enzimas (invertasa, fosfatasa ácida, alcohol dehidrogenasa y fosfatasa alcalina) por medio de molino de perlas, probando que una cinética de primer orden en dos pasos consecutivos se ajustaba bien a los datos experimentales. Se encontró además que la liberación de las enzimas estaba íntimamente relacionada con la locación de la misma dentro de la célula hospedera (Melendres et al, 1993).

En un estudio efectuado por Bakir y Hamamci (1997), se utilizó subsecuente congelación-descongelación como pretratamiento para incrementar la eficiencia del molino de perlas en el rompimiento y extracción de proteínas de *E. coli*, comprobando que bajo todas las condiciones utilizadas durante la investigación, las cantidades de proteína y enzimas liberadas se incrementaron con la congelación-descongelación.

La clarificación/Purificación primaria o pre-purificación es la siguiente fase del proceso, en la que se separan los productos de interés de las demás sustancias producidas durante la lisis. Las operaciones más empleadas en esta fase son: floculación, precipitación selectiva, filtración, separación de fases en sistemas acuosos, entre otras. (Carnes y Williams, 2007).

Una vez que se ha conseguido la purificación primaria, se procede a llevar a cabo la purificación. Esta operación está diseñada para incrementar la pureza del plásmido con el mínimo de pérdida de rendimiento. La técnica más empleada es la cromatografía, en sus diferentes modalidades: intercambio aniónico, interacción hidrofóbica, afinidad exclusión de tamaño. El uso de una de ellas o la combinación de varias y el número de etapas dependerá grandemente de un caso a otro (Carnes y Williams, 2007) (Prazeres et al, 2001).

II.7. Métodos de rompimiento celular

Para efectuar el rompimiento celular con el objetivo de liberar las sustancias contenidas en la célula hospedera, existen una gran variedad de métodos posibles. En la Figura 5 se ilustra una clasificación de estos métodos.

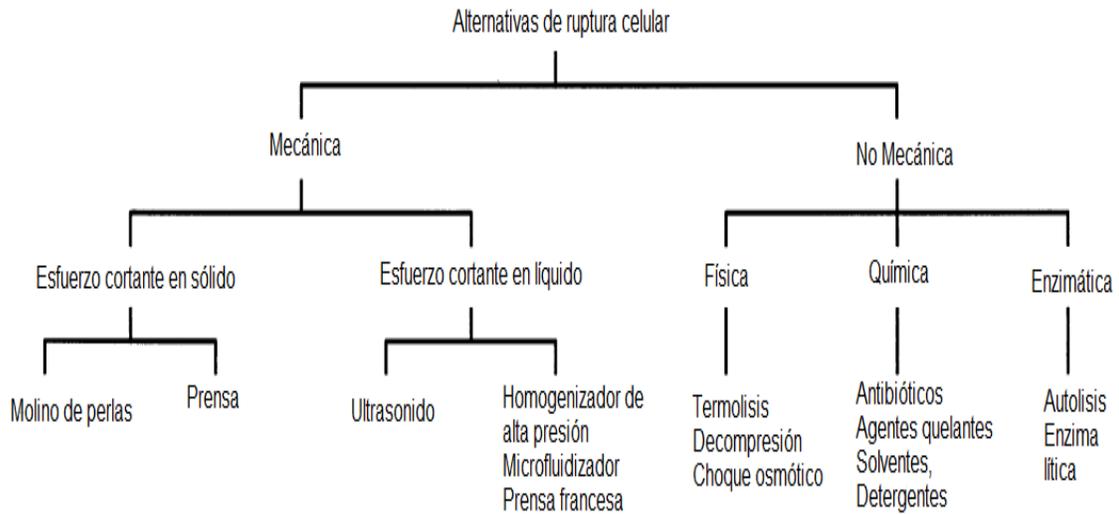


Figura 5. Métodos de ruptura celular microbiana (Geciova et al., 2001).

II.7.1. Métodos mecánicos

Lo que caracteriza estos métodos es que la masa celular es sometida a un alto estrés producido por alta presión, abrasión durante agitación rápida con perlas de vidrio, o ultrasonido. Entre los mecanismos de ruptura utilizados se encuentran la cavitación, el corte, el pinzamiento, o alguna combinación entre ellas. Generalmente, es necesario enfriar la suspensión celular sometida al procesamiento para remover el exceso de calor generado por disipación de energía mecánica (Geciova et al, 2001).

Por poseer las paredes celulares de los microorganismos una alta resistencia mecánica, aunado al reducido tamaño de los microorganismos (1 – 10 μm), la ruptura celular es una tarea compleja, haciendo que sean necesarias varias etapas para obtener altos porcentajes de liberación, siendo demostrado que con algunos equipos, tales como el molino de perlas, puede ser obtenido hasta 90% de liberación (Tejeda et al, 2011).

La diferencia entre los métodos mecánicos de esfuerzo cortante en sólidos y esfuerzo cortante en líquidos se refiere al número de interfaces que existen entre la suspensión celular y el medio, si el método mecánico particular involucra un agente sólido para llevar a cabo la ruptura celular, entra dentro de la primera categoría, en caso contrario, de la segunda.

Dentro de los métodos mecánicos por esfuerzo cortante en sólidos se pueden encontrar el molino de perlas, la prensa y la prensa Hughes. Estos dos últimos métodos consisten en la congelación de la masa celular, a la que posteriormente se le hace pasar por alta presión (150-230 MPa) a través de un orificio estrecho, y puede ser utilizado por lotes o semicontinualmente (Walker y Rapley,2000).

Dentro de los métodos por esfuerzo cortante en líquidos se encuentran algunos de los más importantes métodos de rompimiento celular, ampliamente utilizados a nivel industrial y de laboratorio por sus eficiencias de rompimiento altas, operación continua, escalabilidad y manejo de altos volúmenes de trabajo, tales como los homogeneizadores de alta presión y los microfluidizadores.

El concepto fundamental de los homogeneizadores consiste en una bomba de desplazamiento positivo, llamada de alimentación que transporta la masa celular a la bomba de alta presión, donde se le comprime a una presión que varía entre 55 y 200 MPa. Una válvula acoplada a la bomba se abre una vez que la presión

excede un valor determinado. Así, la suspensión adquiere una velocidad muy alta. El fluido fluye radialmente a través de la válvula y choca contra un anillo de impacto, produciendo así el rompimiento de la pared celular (Geciova et al, 2001).

Los microfluidizadores son básicamente homogeneizadores que difieren en su mecanismo de ruptura celular. El mecanismo de rompimiento empleado por los microfluidizadores utiliza una bomba de alta presión manejada por aire y una cámara especial de rompimiento conectada a un dispositivo de contrapresión. Después de ser dividida en dos corrientes al ser pasada a presión por dos microcanales de sección transversal de $2 \times 100 \mu\text{m}$, ambas son impactadas a alta velocidad en una pared estacionaria de la cámara donde sucede la ruptura celular, donde se mezclan. Con la pérdida casi instantánea de energía cinética se produce el rompimiento celular (Tejeda et al, 2011).

II.7.2. Métodos no mecánicos

Se distinguen los métodos no mecánicos por no hacer uso de fuerzas de corte para liberar el contenido de la célula huésped, en vez de eso, buscan el rompimiento o permeabilización de la pared celular a través de mecanismos distintos, que poseen la ventaja de ser más gentiles y específicos (Geciova et al, 2001). Los métodos no mecánicos, a su vez, se dividen en métodos físicos, químicos y enzimáticos.

Dentro de los métodos físicos, se encuentran la termólisis, la decompresión y el choque osmótico. El primero involucra el tratamiento por medio de calor de la masa celular. El segundo se basa en la introducción de un gas a condiciones de presión subcrítica o supercríticas que causa el rompimiento de la célula una vez que el gas se expande al liberar la presión (Geciova et al, 2001). Mientras que el tercero, consiste en la carga de un volumen dado de células dentro de agua

pura, la célula se expande debido a que contiene solutos que ocasionan un flujo osmótico del agua hacia su interior (Tejeda et al, 2011).

Pasando a los métodos químicos, se basan más que en el rompimiento, en la permeabilización de la célula a través de una gran variedad de agentes químicos que difieren en su selectividad y eficiencia hacia diferentes especies microbianas. La permeabilización puede ser, así, llevada a cabo por antibióticos, agentes quelantes, detergentes, entre otros (Geciova et al, 2001).

Los métodos enzimáticos tienen la ventaja de ser específicos y causar bajos daños al producto deseado. El método de enzima lítica consiste en el empleo de enzimas que atacan la pared celular y causan el rompimiento celular. De las enzimas más frecuentemente utilizadas en este proceso es la lisosoma (Tejeda et al, 2011). Mientras que en el método restante, autólisis, se utilizan antibióticos para interferir con la síntesis de peptidoglicano (cuya red en la pared celular ha demostrado ser la principal resistencia contra el rompimiento) (Geciova et al, 2001), y así provocar la liberación del plásmido.

II.8. Molinos de perlas de alta velocidad

Los molinos de perlas ofrecen en sus características grandes ventajas, como lo son altas eficiencias, baja presión de operación, manejo adecuado de soluciones concentradas, capacidad de operación por lotes o continuos, y requerir poco mantenimiento. Debe, sin embargo, tenerse en cuenta que las perlas de vidrio utilizadas durante la operación del equipo pueden dejar de ser útiles y deben ser reemplazadas.

Los más importantes parámetros operacionales del molino de perlas son: velocidad del agitador, velocidad de alimentación de la suspensión celular, diseño

del agitador, tamaño de las perlas de vidrio, carga de las perlas de vidrio, concentración celular y la temperatura.

Perlas de diámetro variante entre 0.1 y 0.15 mm son consideradas óptimas para la ruptura de bacterias, mientras que aquellas que varían entre 0.25 y 0.75 mm son principalmente utilizadas para la ruptura de levaduras (Geciova et al, 2001).

Hay una gran variedad de equipos, todos con diferentes especificaciones y diseños, describiendo a aquellos que trabajan en operación continua solamente, la mayoría de ellos constan fundamentalmente de un cilindro en posición horizontal llamado cámara de molienda, un agitador que consiste en una flecha giratoria sobre la que se monta un sistema de discos, barras o anillos que provocan el movimiento de la solución, además de la cantidad requerida de perlas de vidrio, que son los elementos que realizarán la ruptura celular (Tejeda et al, 2011).

Para su utilización, la suspensión celular y las perlas de vidrio se introducen por uno de los extremos de la cámara de molienda. Se enciende y el agitador mueve la masa celular y las perlas de vidrio a la velocidad requerida, por el tiempo necesario. Algunos modelo de molino presentan discos o impulsores, montados sobre la flecha, que poseen perforaciones cubiertas con membranas que permiten el paso del material celular pero no de las perlas. Los molinos de perlas son usualmente utilizados a nivel industrial para la ruptura de bacterias, levaduras, algas, etc (Tejeda et al, 2011).

Otros modelos, de operación por lotes, carecen de flecha, discos y entradas y salidas, en vez de eso, la suspensión celular junto con las perlas es cargada en un par de recipientes de metal inoxidable y que están en posición horizontal. Una vez montados los recipientes en el equipo y puesto en encendido, el equipo agita la suspensión en forma de arco circular a la velocidad deseada. Las bolas que se

encuentran en el interior se mueven por inercia chocando con gran energía contra el material que se encuentra en las concavidades a ambos extremos del recipiente. El material es mezclado intensamente debido al movimiento de los recipientes y a la trayectoria de las bolas. El gran efecto de choque con fricción que se produce entre las bolas provoca así el rompimiento de las células.

II.9. Modelo de liberación de plásmido en un molino de perlas en operación por lotes.

Para determinar el grado de ruptura de una masa celular que fue sometida a agitación dentro de un molino de perlas de alta velocidad hay dos caminos posibles: directamente e indirectamente. La forma directa consiste en contar el número de células intactas por unidad de volumen, mientras que la indirecta mide la cantidad de un componente clave liberado durante el rompimiento (Tejeda et al, 2011).

Por su simplicidad, el método indirecto es el más comúnmente usado. El rompimiento celular en molinos de perlas de alta velocidad en operación por lotes sigue una cinética de primer orden. El balance de masa de proteína (o el componente de interés), puede ser expresado mediante la ecuación:

$$V_M \frac{dC}{dt} = k(C_m - C)V_M \quad (1)$$

Donde:

V_M : Volumen libre del molino [L^3]

C_m : Concentración máxima de plásmido obtenible [M/L^3]

C : Concentración de plasmido liberado en el tiempo t . [M/L^3]

t : Tiempo de operación. [t]

k: Constante de velocidad específica de primer orden [t^{-1}]

La constante de velocidad depende del tipo de célula, del tipo y velocidad del agitador, de la carga y tamaño de las perlas, de la concentración celular y de la temperatura.

La ecuación anterior se integra en $t = 0, R = 0$:

$$\int_0^C \frac{dC}{C_m - C} = k \int_0^t dt \quad (2)$$

Obteniéndose así la ecuación de la operación por lotes:

$$\ln \left(\frac{C_m}{C_m - C} \right) = kt \quad (3)$$

Así, observando la ecuación, graficas de

$$\ln \left(\frac{C_m}{C_m - C} \right) \text{ vs } t$$

producirán rectas de pendiente k y ordenada en el origen igual a cero (Tejeda et al, 2011)

CAPÍTULO 3. METODOLOGÍA EXPERIMENTAL

III.1 Preparación y esterilización del medio de cultivo

Para iniciar el cultivo se necesita un medio para el crecimiento de *E. coli*. En este trabajo se utilizó medio de cultivo Terrific broth (TB) (Glicerol 13 g/L, Levadura 24 g/L, Triptona 17.143 g/L, Fosfato de potasio monobásico 2.31 g/L y Fosfato de potasio dibásico 12.54 g/L)

Una vez preparado el medio se procede a verterlo en un recipiente teniendo cuidado de no exceder el 20% de su capacidad, se tapa con tapón de algodón que permita el paso de aire, y se esteriliza durante quince minutos en autoclave.

Una vez que el medio de cultivo se enfrió, en ambiente estéril se inyecta kanamicina concentración 50 mg/mL en proporción de 1 μ L por cada mL de medio.

III.1.1 Preparación del banco celular

De un banco externo, se toma una cantidad específica de un cultivo de *E. coli*, se procederá a inocular el medio TB estéril y se introducirá a una incubadora para su desarrollo, a las siguientes condiciones: Temperatura de 37 °C y 250 rpm. Para obtener la curva de crecimiento bacteriano, se tomó una muestra en ambiente estéril y se midió su densidad óptica (DO) para conocer la concentración; esto se repitió cada hora y se construyó la curva con las mediciones obtenidas. Una vez que las bacterias entraron a su fase de estacionaria entre las ocho y doce horas, con una densidad óptica de 8.19 aproximadamente, se detuvo la incubación y en eppendorf se tomaron muestras

de 80 microlitros (μL) del cultivo de *E. coli* y 20 μL de glicerol. Las muestras se congelaron con el fin de preservar la célula el mayor tiempo posible.

III.1.2 Cultivo de *E. coli* conteniendo pVAX1-NH36

Obtenido el banco celular para el trabajo, se procedió a cultivar y cosechar *E. coli* hospedera del plásmido buscado. Para ello, se prepara 30 mL de medio TB y se esteriliza de la forma antes mencionada, se inocula con una muestra del banco y se incuba a las mismas condiciones del paso anterior. Basándose en la curva de crecimiento bacteriano, se detiene la incubación una vez que las bacterias hayan entrado en su fase estacionaria y antes de que entren a la fase de declinación y se mide su densidad óptica. Con ese dato se calculó con la Ec. (4)

$$\text{Índice de masa} = C_1 V_1 = C_2 V_2 \quad (4)$$

Donde

C_1 = densidad óptica del inoculo

V_1 = volumen del inoculo

C_2 = densidad óptica del cultivo

V_2 = volumen del cultivo

el volumen de inoculo, V_1 , necesario para inocular V_2 y obtener el índice de masa establecido e igual a 100. Este volumen se añade a un matraz que contiene medio TB preparado y esterilizado de antemano, acción que fue llevada a cabo en ambiente estéril. El matraz inoculado fue puesto a incubar a las condiciones especificadas.

III.1.3 Cosecha de *E. coli* conteniendo pVAX1-NH36

Cumplido el tiempo necesario para el crecimiento bacteriano, se detuvo la incubación. El cultivo de *E. coli* fue pesado y centrifugado a 6000 rpm durante 30 minutos. Terminada la centrifugación se desechó el sobrenadante y se volvió a pesar para conocer el peso de las células húmedas obtenidas.

III.1.4 Resuspensión de la biomasa

Se utiliza buffer de resuspensión (pH = 8, Tris 25mM, Glucosa 50 mM y EDTA 10mM) para las células húmedas.

Las concentraciones celulares utilizadas en el presente trabajo fueron de $5 \frac{g}{L}$ y $15 \frac{g}{L}$. Se agregó la cantidad necesaria de buffer de resuspensión a las células húmedas para lograr las concentraciones indicadas, seguido de una agitación suave con vórtex para lograr homogeneidad.

III.1.5 Rompimiento de células por medio de lisis alcalina.

Para resuspender las células húmedas destinadas a ser rotas por medio de lisis alcalina, se prepararon buffer de resuspensión con glucosa y se agregó hasta conseguir la concentración de 8 mL/g de célula húmeda. Una vez hecho esto, se agregó la misma cantidad de solución de lisis (Hidróxido de sodio 0.2 M y 1% de SDS), se agitó levemente y se refrigeró la muestra por diez minutos. Posteriormente se agregó solución de neutralización (pH=5.5, Acetato de potasio 3 M) en la misma cantidad utilizada de las anteriores soluciones. Hecho esto se esperó nuevamente diez minutos con la muestra en refrigeración.

Terminados los pasos anteriores, el lisado fue centrifugado a 6,000 rpm por un tiempo de veinte minutos, dos veces. El sedimento era desechado.

III.1.6 Rompimiento de células por medio de lisis mecánica.

El equipo utilizado y puesto en marcha para la realización de las pruebas fue el molino mezclador MM 400 de la marca Retsch. Las pruebas se realizaron variando tres parámetros: velocidad de agitación, tamaño de perlas y concentración celular.

Las concentraciones celulares utilizadas fueron de $5 \frac{g}{L}$ y $15 \frac{g}{L}$. Los tamaños de perlas utilizados fueron de 0.1-0.25 mm de diámetro (T1) y de 0.25-0.5 mm de diámetro (T2).

En cuanto a las velocidades empleadas durante la operación del equipo, se eligieron las velocidades de 10 s^{-1} y 20 s^{-1} .

Con todo esto, el número total de pruebas fue de ocho. Se muestra a continuación una tabla con la recopilación total de ellas.

Tabla 2. Condiciones de las pruebas a realizar.

Prueba	Velocidad de agitación	Concentración celular	Tamaño de perlas
	(s ⁻¹)	($\frac{g}{L}$)	
1	20	5	T1
2	10	5	T1
3	20	5	T2
4	10	5	T2
5	20	15	T2
6	10	15	T2
7	20	15	T1
8	10	15	T1

El equipo está diseñado para agitar dos contenedores de 30 mL de acero inoxidable simultáneamente al momento de la operación. Por cada experimento programado, se agregaron 18 mL de perlas de vidrio, junto con 9 mL de cultivo de *E. coli* en cada recipiente, tomándose el segundo recipiente como duplicado del experimento. Una vez colocadas las perlas y la solución, se envolvía el borde enroscado del recipiente con teflón para que no hubiera fugas ni daños y se cerraba.

Las muestras se tomaban cada treinta segundos hasta un total de cinco minutos, haciendo un total de veinte muestras por prueba. Para tomar cada muestra se paraba el equipo, abrían los recipientes y se recolectaban 300 μ L de muestra por recipiente, que se guardaban en eppendorf. El líquido extraído se compensaba con solución de resuspensión nueva. Una vez concluida la prueba, se apagaba el equipo, se recolectaban las perlas dentro de ambos recipientes, etiquetándose por separado para su posterior limpieza, y se procedía a lavar los recipientes.

Con el propósito de eliminar restos celulares y en especial perlas tomadas durante la prueba, las muestras se centrifugaron a 10,000 rpm durante treinta minutos, después de los cuales se recuperaba el sobrenadante.

III.1.7 Análisis de muestras

III.1.7.1 Electroforesis en gel de agarosa

Con el fin de determinar las isoformas del ADNp presentes en el lisado, se realiza un análisis de electroforesis en gel de agarosa. Se procede a formar un gel de agarosa al 8% con TAE 1X (Tris 40 mM, Ácido Acético 20 mM y EDTA 1mM). Se calienta la mezcla hasta que empiece a hervir y posteriormente se agrega al recipiente donde se llevará a cabo la electroforesis. Una vez que el gel se enfría, se procede a llenar los pozos con las muestras a analizar.

El primer pozo se deposita 1 μ L de marcador de peso molecular (Invitrogen) que se utiliza para reconocer cuantos pares de bases tiene y es distintivo en el rango de bases que muestra, 1 μ L de tinte y 3 μ L de agua desionizada. El resto de los pozos, con excepción del último, fueron llenados con las muestras tomadas de la lisis mecánica, estando conformadas propiamente con 8 μ L de muestra y 2 μ L de tinte. El último pozo fue llenado con la muestra de lisis alcalina como comparación.

Una vez llenos los pozos, se conectó el equipo de electroforesis al recipiente. El equipo se utilizó a 55 voltios, 400 mA, durante 90 minutos, después de los cuales se apagaba y el gel se sumergía primero en un baño de bromuro de etidio de 15 minutos, y después en un lavado de agua.

Acabado el lavado, el gel se introducía en una cámara de rayos UV y se le tomaba una foto.

III.1.7.2 Cromatografía de interacción hidrofóbica de alta resolución

Para determinar la concentración del ADNp se utilizó cromatografía líquida de alta resolución en columna de interacción hidrofóbica (HPLC-HIC) en el equipo Äkta Purifier con una columna HIC Source 15PHE (Fenil-Poliestireno) de 0.46 x 10 cm marca GE Healthcare®, siguiendo la metodología de Diogo et al, 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, pH8 (buffer B). Inicialmente la columna se equilibra con buffer A. Subsecuentemente, 30 µL 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 el buffer B, por 0.5 min, para eluir las especies ligadas débilmente en la matriz. La columna fue entonces reequilibrada con el buffer A por 5.5 min. La absorbancia fue monitoreada 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 (Diogo et al, 2003).

El porcentaje de pureza HPLC del plásmido, en una muestra, se definió como la razón porcentual del área del pico de plásmido, entre el área total (la suma de las áreas de todos los picos en el cromatograma). El área total en los cromatogramas de las muestras se corrigió restando el área total del correspondiente blanco (buffers de resuspensión), preparados igual que las muestras. En la Figura 6 se muestra un cromatograma típico esperado por esta técnica.

La concentración del ADNp fue determinada por medio de una curva de calibración, construida con estándares de plásmido purificado con un kit comercial, con concentraciones de 12 a 50 µg/mL, asociando la concentración de una muestra, al área del pico eluido a los 0.7 min (Anexo C).

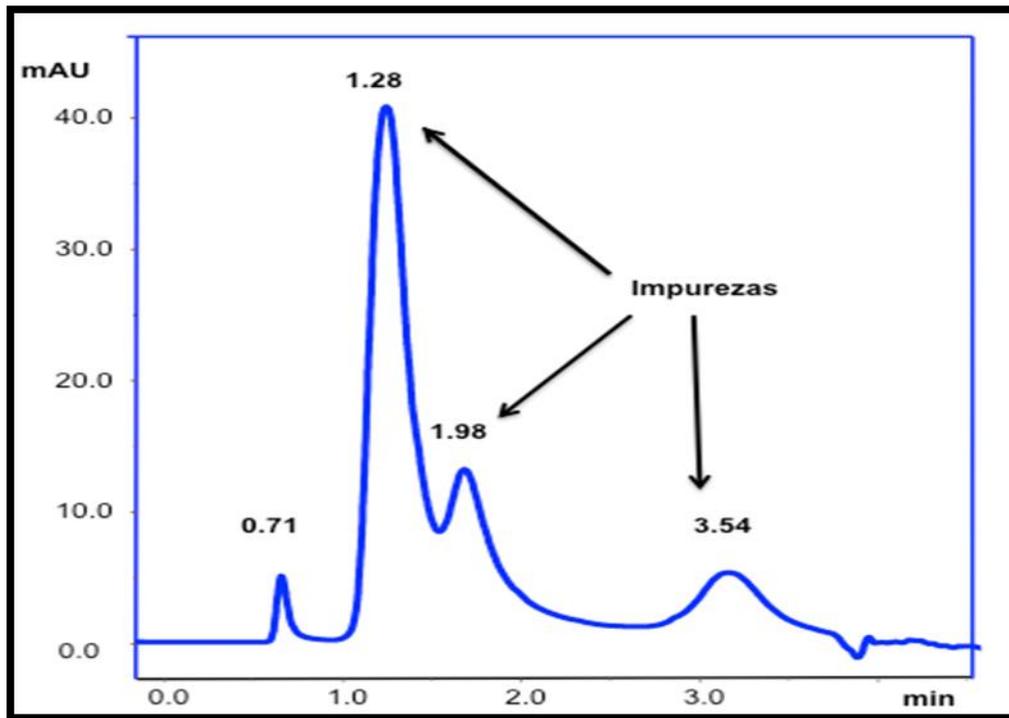


Figura 6. Cromatograma típico de análisis HIC-HPLC (muestra analizada lisado alcalino). (Diogo et al, 2003)

III.1.8 Balance de masa en el molino de perlas de alta velocidad

El balance de masa de plásmido liberado puede ser expresado mediante la ecuación que establece que la velocidad de liberación masa de plásmido (células rotas) es proporcional a la masa de plásmido presente no liberada:

$$V_M \frac{dC}{dt} = k(C_m - C)V_M \quad (1)$$

Donde:

V_M : Volumen libre del molino [L^3]

C_m : Concentración máxima de plásmido obtenible [M/L^3]

C : Concentración de plásmido liberado en el tiempo t . [M/L^3]

t : Tiempo de operación. [t]

k : Constante de velocidad específica de primer orden [t^{-1}]

La ecuación anterior se integra en $t = 0, C = 0$:

$$\int_0^C \frac{dC}{C_m - C} = k \int_0^t dt \quad (2)$$

Obteniéndose así la ecuación:

$$\ln\left(\frac{C_m}{C_m - C}\right) = kt \quad (3)$$

Así, observando la ecuación, graficas de

$$\ln\left(\frac{C_m}{C_m - C}\right) \text{ vs } t$$

producirán rectas de pendiente k y ordenada en el origen igual a cero (Tejeda et al, 2011).

Para estimar el valor de C_m , se utiliza el valor obtenido en el último tiempo y con este valor se procede a calcular $\ln\left(\frac{C_m}{C_m - C}\right)$ y al graficar se obtiene el valor de k .

III.2 Propuesta de lavado de las perlas de vidrio.

Se propone la siguiente metodología para lavar las perlas de vidrio, después de que fueron utilizadas en el proceso de molienda:

- Baño de hipoclorito de sodio disuelto en agua por 20 minutos en un volumen donde el total de las perlas queden sumergidas.
- El hipoclorito de sodio es desechado.
- Lavado con ácido clorhídrico 1 N. Se agrega como mínimo de ácido la mitad del volumen de perlas a lavar, asegurándose que el total de las perlas queden sumergidas. Se esperan al menos treinta minutos.
- Se desecha el ácido.
- Tres lavados consecutivos con agua desionizada, agito para que el agua llegue a todas las perlas de vidrio.
- Las perlas son esparcidas en aluminio e introducidas al horno Blinder durante 1 h.

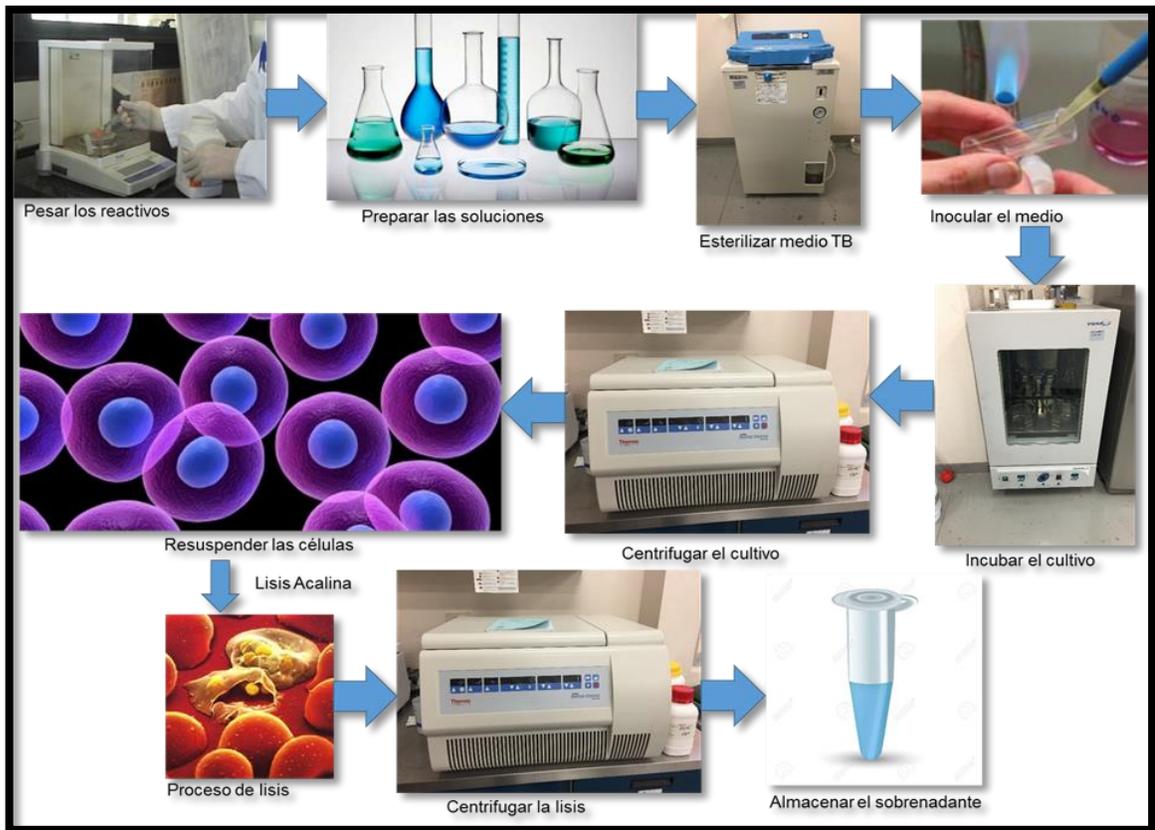


Figura 7. Diagrama de flujo del procedimiento realizado en este trabajo desde el cultivo celular hasta la lisis alcalina.

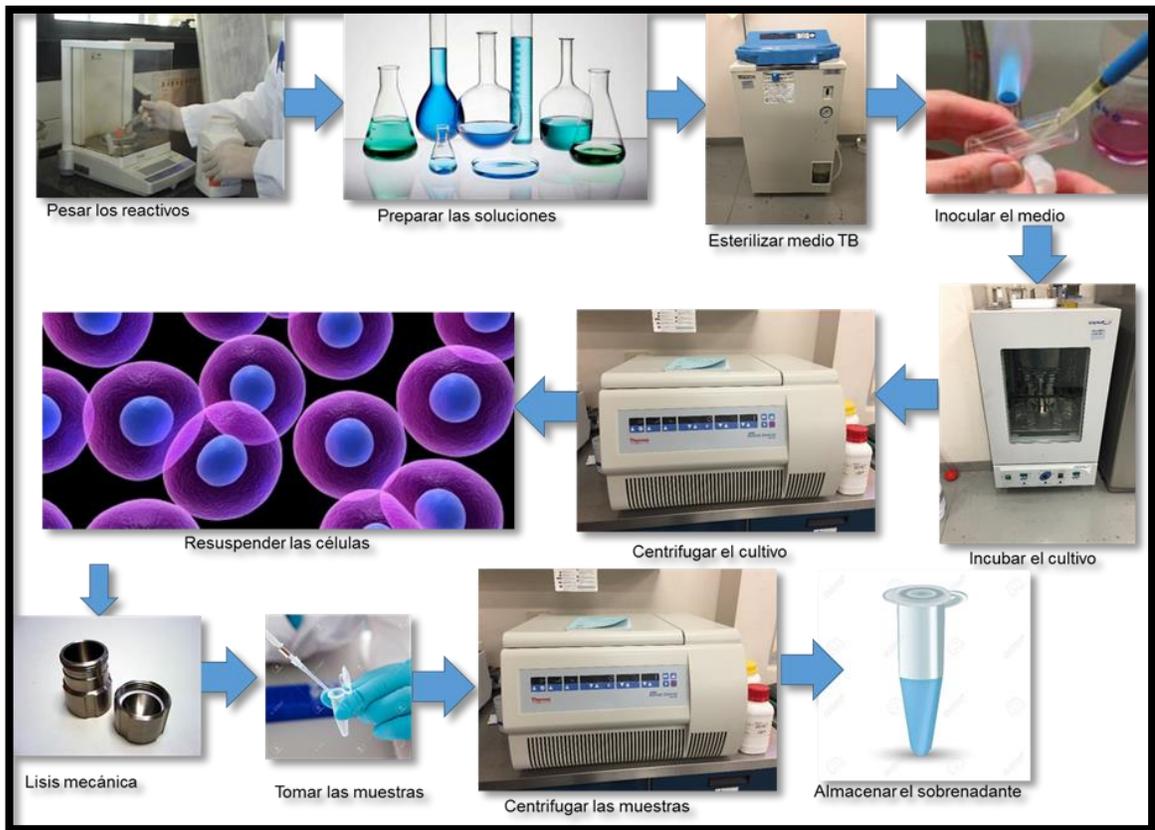


Figura 8. Diagrama de flujo del procedimiento realizado en este trabajo desde la lisis mecánica hasta el análisis de las muestras.

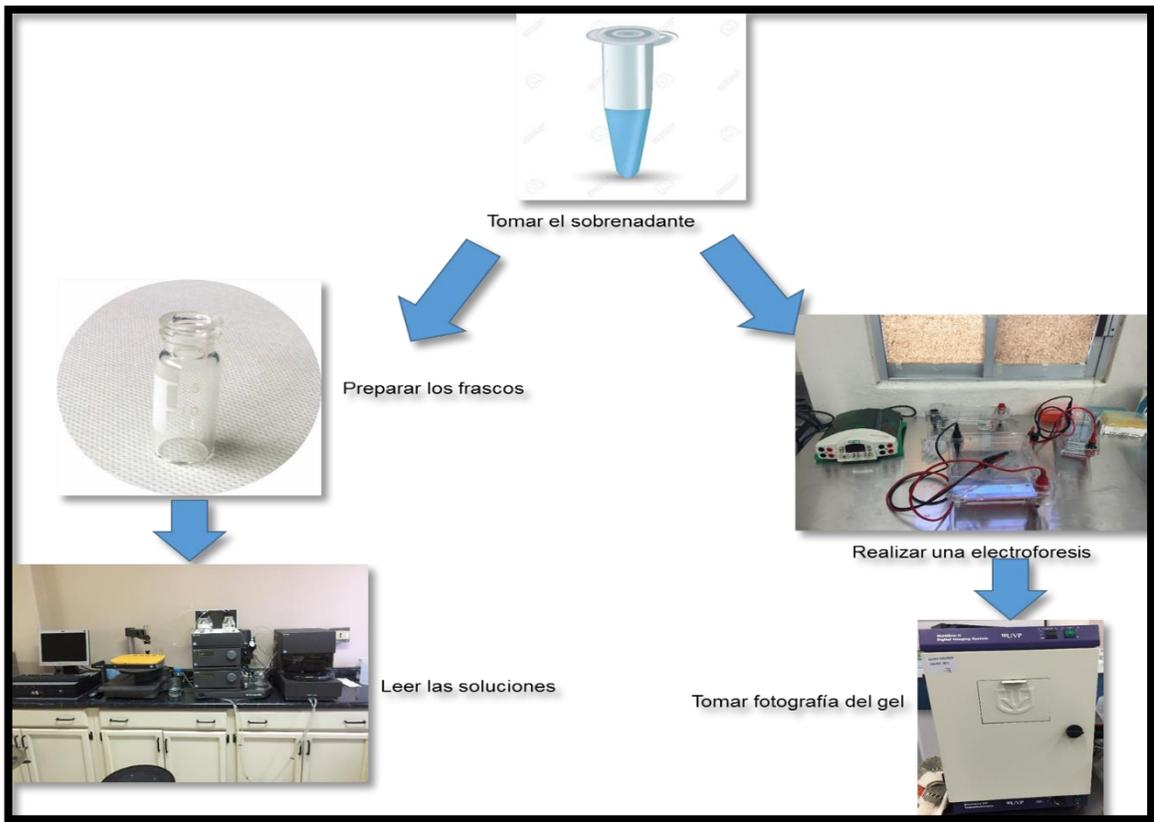


Figura 9. Diagrama de flujo del procedimiento para el análisis de las muestras

III.3 Equipos

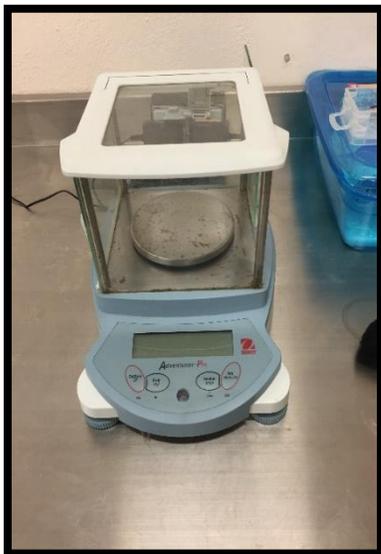


Figura 10. Báscula Adventure Pro AV213 marca OHAUS



Figura 11. Báscula Pioneer PA64 marca OHAUS



Figura 12. Placa de agitación marca Thermo Scientific Cimarec



Figura 13. Autoclave Hirayama modelo HV-50



Figura 14. Molino Mezclador Retsch MM-400



Figura 15. Cámara UV marca UVP modelo Multi Doct-it



Figura 16. Agua Direct-Q UV



Figura 17. Incubadora VWR modelo 1575-1575R



Figura 18. Horno Binder



Figura 19. Centrífuga Thermo Scientific Biofuge Stratos



Figura 20. Electroforesis Biorad Powerpac Basic



Figura 21. Espectrofotómetro Perlix Elmer Lambda 2S



Figura 22. Medidor de pH marca Sumphony modelo SB70P

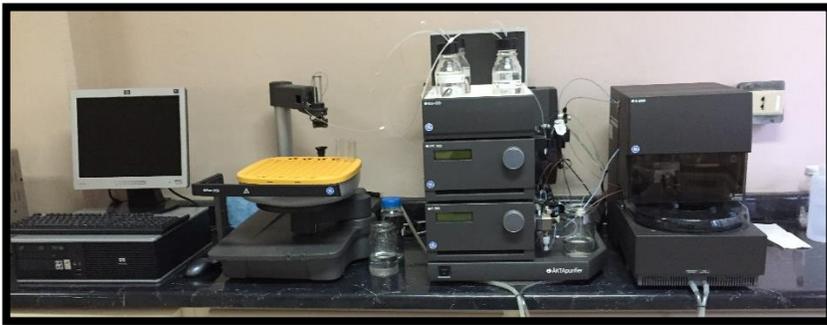


Figura 23. HPLC Äkta Purifier FPLC System

CAPÍTULO 4 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

IV.1 Análisis de la calidad de los lisados

La prueba 1 se realizó con las siguientes condiciones: concentración celular de 5 g/L, una velocidad de agitación de 20 Hz y las perlas T1. Las muestras tomadas cada treinta segundos hasta un total de cinco minutos, se analizaron por electroforesis en gel de agarosa. En la Figura 24 se muestra el gel de electroforesis de las muestras tomadas durante la prueba 1 para comprobar la existencia de plásmido superenrollado en la muestra recolectada y al compararla con su respectivo marcador de peso molecular. Se puede observar que con los parámetros de la prueba, se ha dañado el plásmido superenrollado como se muestra en los carriles 2-5 y 11-13, solo hay presencia de plásmido circular abierto, en los carriles 6-10 se observa la presencia del plásmido superenrollado pero es menor en comparación con la muestra de lisado alcalino, que se encuentra en el carril 20.

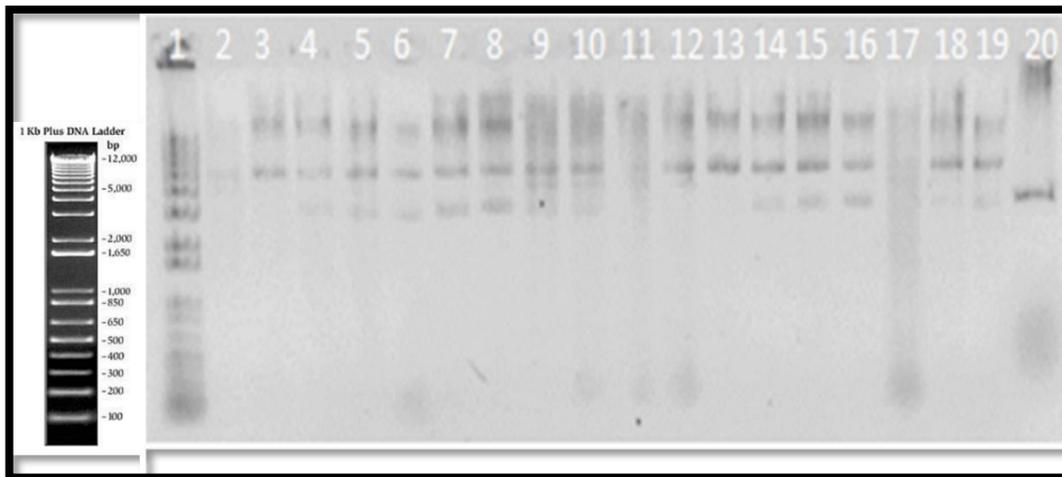


Figura 24. Gel de electroforesis de muestras de lisado tomados durante la prueba 1. Línea 1: marcador de peso molecular; Líneas 2-9: muestras cada 30 segundos de molienda; Línea 10: muestra de molienda final; Líneas 11-18; muestras cada 30 segundos de molienda (duplicado); Línea 19: muestra de molienda final (duplicado); Línea 20: lisis alcalina.

La prueba 2 se realizó con las siguientes condiciones: concentración celular de - 5g/L, una velocidad de agitación de 10 Hz y las perlas T1. Las muestras tomadas cada treinta segundos hasta un total de cinco minutos, se analizaron por electroforesis en gel de agarosa. En la Figura 25 se muestra el gel de electroforesis de las muestras tomadas durante la prueba 2 para comprobar la existencia de plásmido superenrollado en las muestras recolectadas y al compararla con su marcador de peso molecular respectivo. Se puede observar que con los parámetros de la prueba se ha dañado el plásmido superenrollado como se muestra en los carriles 2 al 10 solo la presencia de plásmido circular abierto y en los carriles 11 al 19, baja concentración de plásmido superenrollado, en comparación con la muestra de lisado alcalino, que se encuentra en el carril 20.

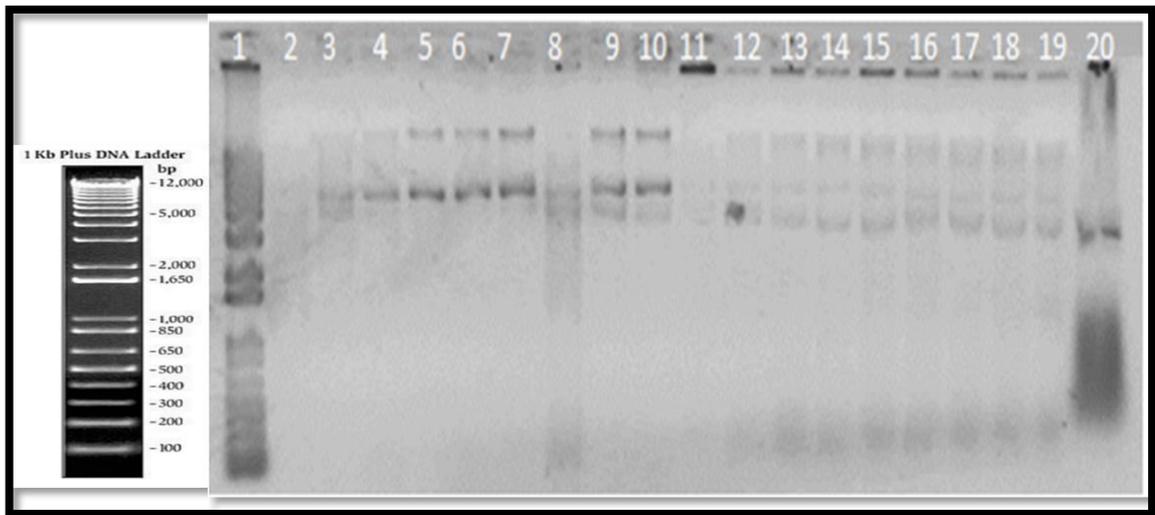


Figura 25. Gel de electroforesis de muestras de lisado tomados durante la prueba 2. Línea 1: marcador de peso molecular; Líneas 2-9: muestras cada 30 segundos de molienda; Línea 10: muestra de molienda final; Líneas 11-18; muestras cada 30 segundos de molienda (duplicado); Línea 19: muestra de molienda final (duplicado); Línea 20: lisis alcalina.

La prueba 3 se realizó con las siguientes condiciones: concentración celular de 5 g/L, una velocidad de agitación de 20 Hz y las perlas T2. La prueba 4 se realizó con las siguientes condiciones: concentración celular de 5 g/L, una velocidad de agitación de 10 Hz y las perlas T2. Las muestras tomadas cada treinta segundos hasta un total de cinco minutos, se analizaron por electroforesis en gel de agarosa. En la Figura 26 se muestra el gel de electroforesis de las muestras tomadas durante la prueba 3 y 4 para comprobar la existencia de plásmido superenrollado en la muestra recolectada y al compararla con su respectivo marcador de peso molecular. Se puede observar que con los parámetros de la prueba, se ha dañado el plásmido superenrollado como se muestra en los carriles 2-10, solo hay presencia de plásmido circular abierto en la prueba 3, en los carriles 6-10 se observa la presencia del plásmido superenrollado pero es menor en comparación con la muestra de lisado alcalino, que se encuentra en el carril 20.

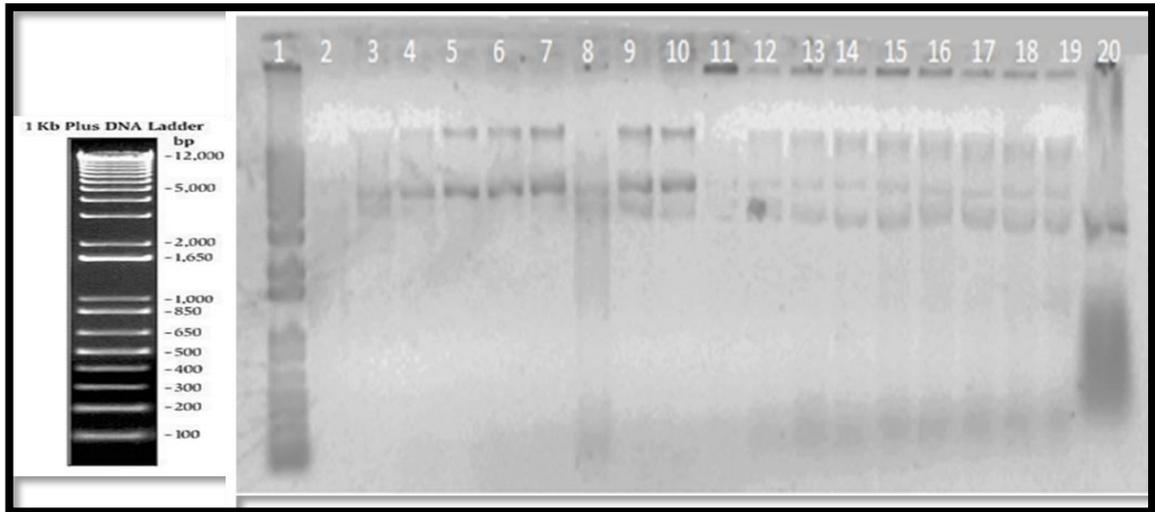


Figura 26. Gel de electroforesis de muestras de lisado tomados durante la prueba 3 y 4. Línea 1: marcador de peso molecular; Líneas 2-9: muestras cada 30 segundos de molienda de la prueba 3; Línea 10: muestra de molienda final de la prueba 3; Líneas 11-18; muestras cada 30 segundos de molienda de la prueba 4; Línea 19: muestra de molienda final de la prueba 4; Línea 20: lisis alcalina.

En la Figura 27 se muestra el gel de electroforesis con muestras de lisados mecánicos tomados en el tiempo final del proceso de cada una de las pruebas y de un lisado alcalino. Aquí se puede observar que en los carriles 2 al 5, muestras de lisado correspondiente a las pruebas 1, 2, 3 y 4: se puede apreciar que no hay presencia de plásmido superenrollado pero si hay plásmido circular abierto. En los carriles 6 al 9, se encuentran muestras de lisado correspondiente a las pruebas 5, 6, 7 y 8: este resultado puede mostrar que hay presencia de plásmido superenrollado y también circular abierto.

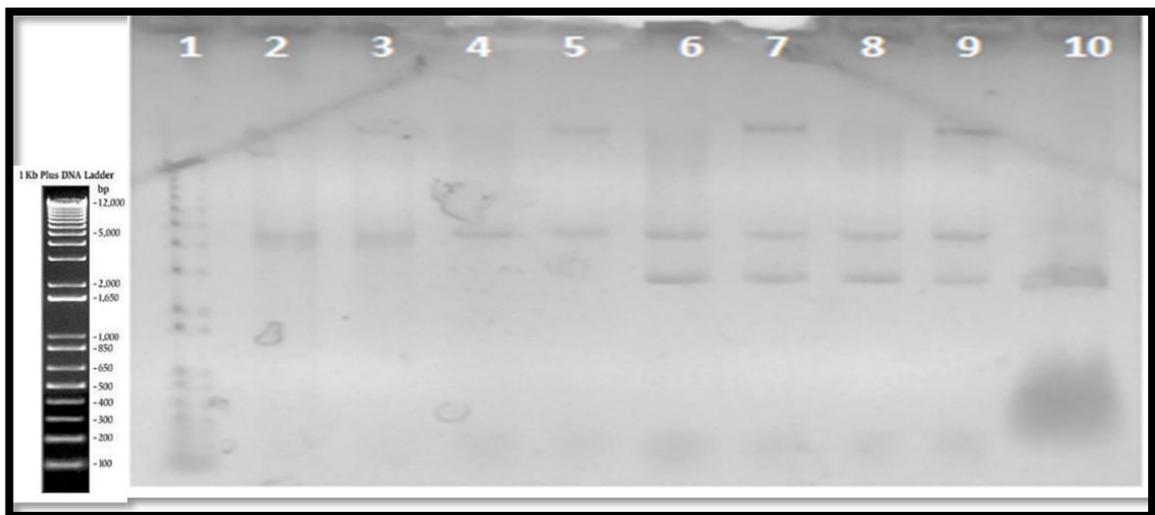


Figura 27. Gel de electroforesis de muestras de lisado tomadas a 5 min. Línea 1: marcador de peso molecular; Líneas 2-9: muestras a tiempo final de molienda de las pruebas 1,2,3,4,5,6,7 y 8; Línea 10: lisis alcalina.

Con el gel de electroforesis de las Figuras 24, 25, 26 y 27, se puede observar que las pruebas con presencia de plásmido superenrollado son las de alta concentración, las cuales serán estudiadas a continuación.

IV.2 Determinación de la concentración de plásmido liberado durante la lisis

Se determinó la concentración y pureza de plásmido en las muestras de lisado de las pruebas en que se encontró plásmido superenrollado. Para determinar la concentración del ADNp se utilizó cromatografía líquida de alta resolución en columna de interacción hidrofóbica (HPLC-HIC). A los cromatogramas obtenidos, de las muestras de lisado tomadas a cada intervalo de tiempo, (Figura 28), se le resta a cada una el cromatograma del blanco, obteniéndose de esta forma, el cromatograma analítico de cada muestra (Figura 29):

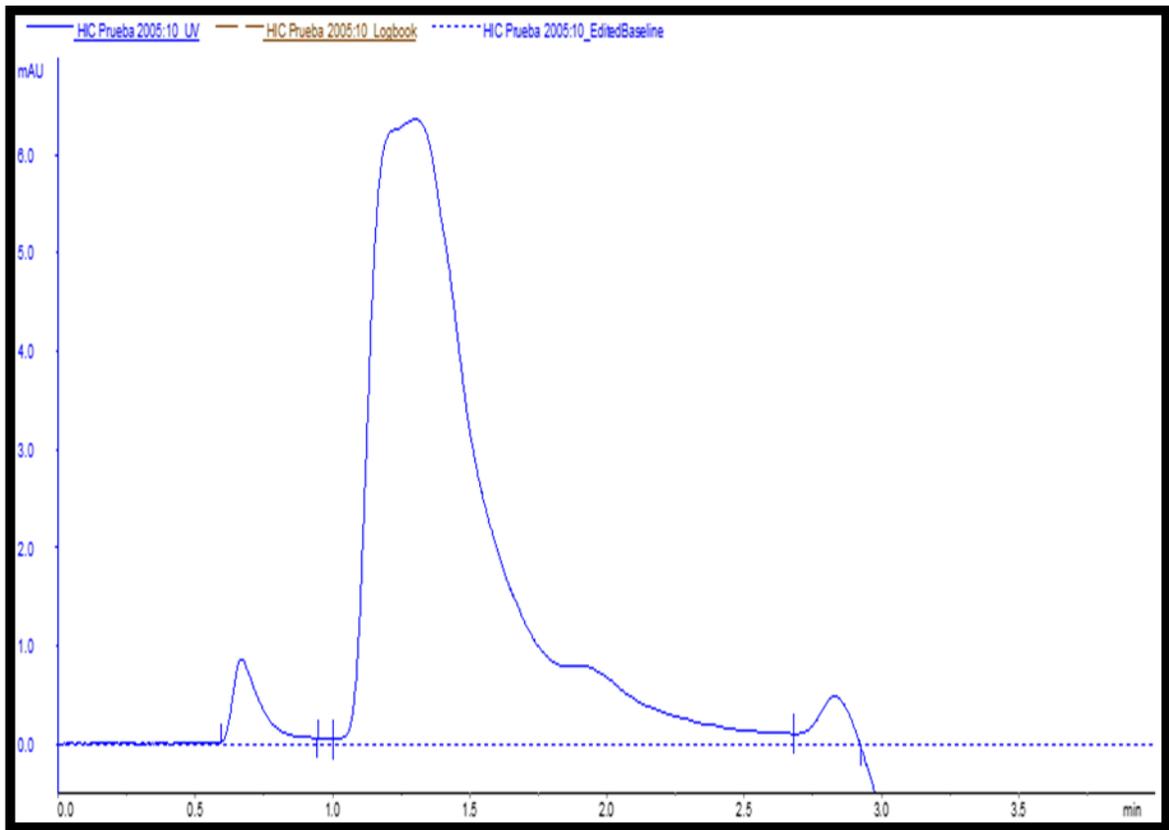


Figura 28. Cromatograma analítico de una muestra de lisado obtenido en el molino de perlas

En la Figura 29, se observa el cromatograma de una muestra de lisado menos el blanco, donde el primer pico (0.67 min) representa la concentración de plásmido, los demás picos representan las impurezas presentes en la muestra, de acuerdo a la metodología de Diogo et al., (2003).

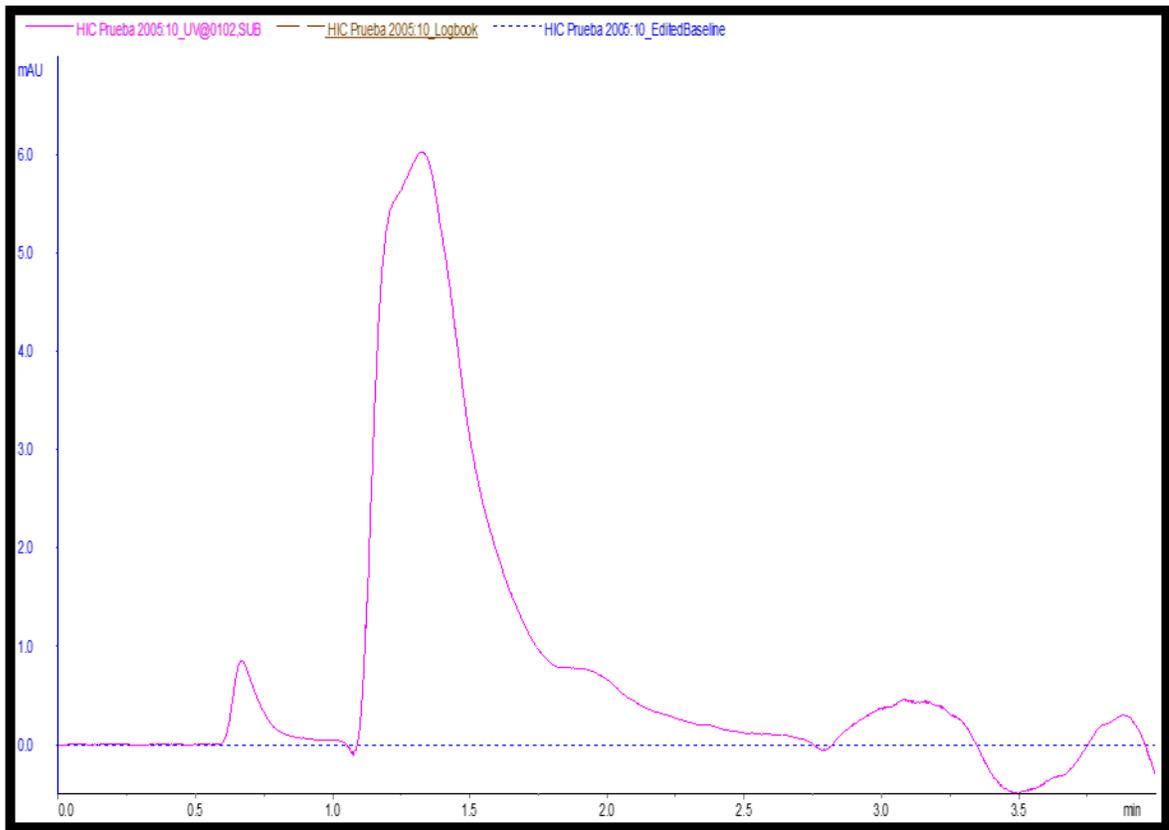


Figura 29. Cromatograma analítico de una muestra de lisado, sustrayendo el correspondiente blanco.

Para obtener la concentración de plásmido liberado es necesario utilizar la ecuación de la curva de calibración del pVAXI-NH36 (anexo C):

$$A=mC$$

Donde

A = Área del pico de plásmido en mAU-min

m = pendiente = 0.0648

C = concentración en $\mu\text{g/mL}$

$$C = \frac{(\text{Área plasmido})}{0.064} \quad (4)$$

Este paso se realiza para todas las muestras tomadas en las diferentes pruebas, para obtener la concentración de plásmido liberado a través del tiempo del proceso, con esto se ajusta al modelo y a continuación se encuentra los resultados.

IV.2.1 Prueba 5

La prueba 5 se realizó con las siguientes condiciones: concentración celular de 15 g/L, una velocidad de agitación de 20 Hz y las perlas T2. Los valores de la concentración liberada de ADNp fueron calculados, mediante la Ec. (4). Con las concentraciones, se procede a calcular $\ln\left(\frac{C_m}{C_m-C}\right)$ y al graficar se obtiene el valor de k, el resultado se muestra en la Figura 30.

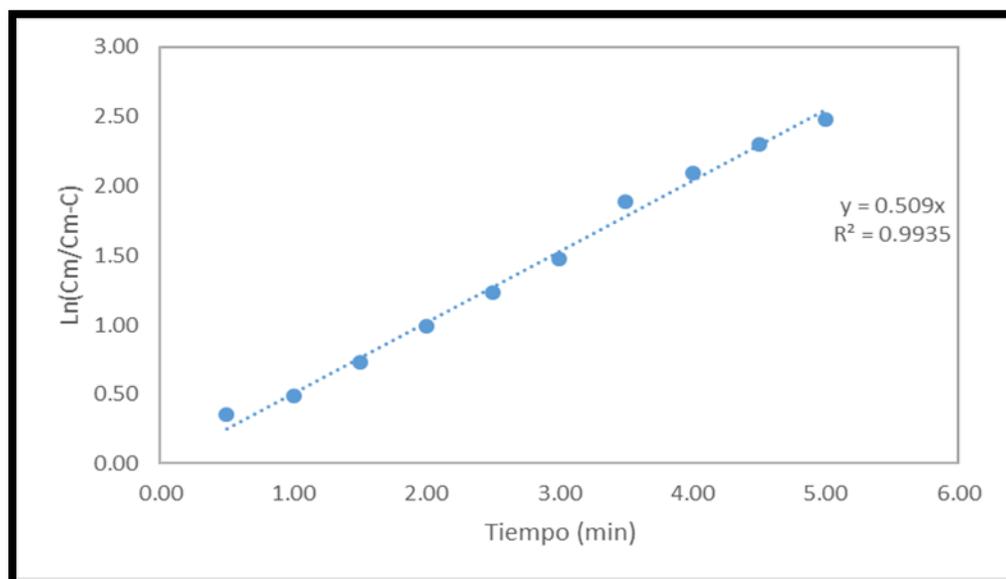


Figura 30. Concentración liberada de ADNp de células de *E. coli* en un molino de bolas por lotes, prueba 5.

Estimando el valor de $C_m = 21 \mu\text{g/mL}$, para la prueba 5, en la Figura 30 se muestra que la ruptura celular sigue una cinética de primer orden, con una constante de velocidad $k=0.509 \text{ min}^{-1}$.

IV.2.2 Prueba 6

La prueba 6 se realizó con las siguientes condiciones: concentración celular de 15 g/L, una velocidad de agitación de 10 Hz y las perlas T2. Los valores de C_m y k se determinaron de la misma manera que la prueba 5, el resultado se muestra en la Figura 31.

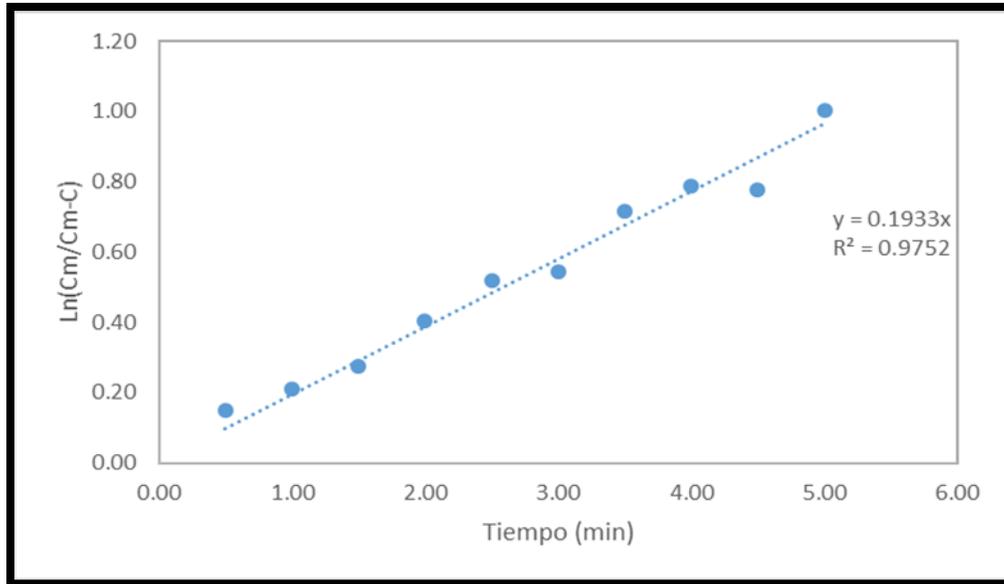


Figura 31. Concentración liberada de ADNp de células de *E. coli* en un molino de bolas por lote, prueba 6.

Estimando el valor de $C_m = 17 \mu\text{g/mL}$, para la prueba 6, en la Figura 31 se muestra que la ruptura celular sigue una cinética de primer orden, con una constante de velocidad $k=0.1933 \text{ min}^{-1}$.

En la Figura 32 se muestra la comparación de la concentración liberada de ADNp en las pruebas 5 y 6. Se puede apreciar que en el caso de la prueba 5 se tiene una mayor concentración que en la prueba 6, ya el valor de C_m en la prueba 5 es mayor, lo que ocasionará que tal prueba tenga una mayor liberación de plásmido y, por ende, aumente la concentración.

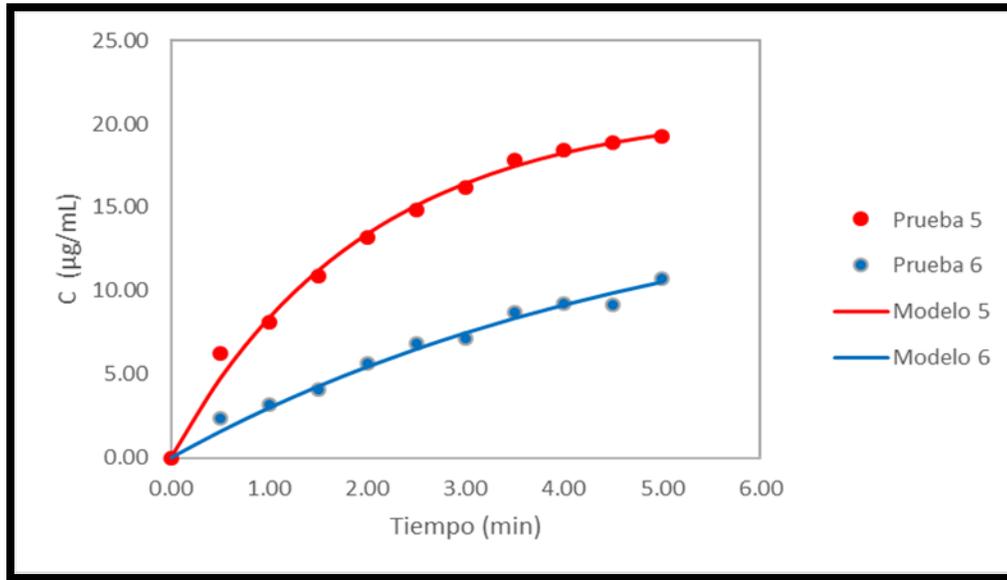


Figura 32. Concentración liberada de ADNp durante las pruebas 5 y 6

IV.2.3 Prueba 7

La prueba 7 se realizó con las siguientes condiciones: concentración celular de 15 g/L, una velocidad de agitación de 20 Hz y las perlas T1. Los valores de C_m y k se determinaron de la misma manera que la prueba 5, el resultado se muestra en la Figura 33.

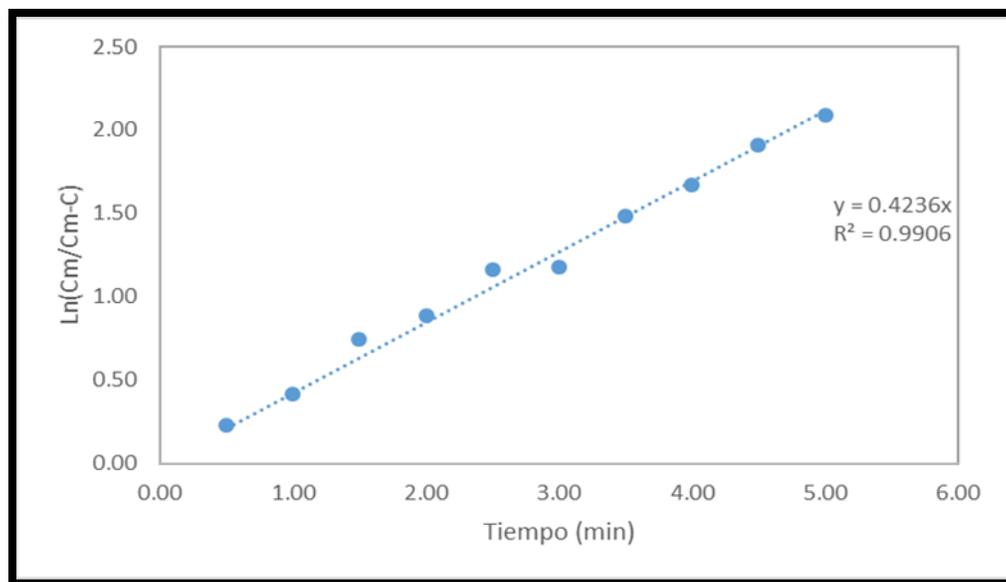


Figura 33. Concentración liberada de ADNp de células de *E. coli* en un molino de bolas por lote, prueba 7.

Estimando el valor de $C_m = 18 \mu\text{g/mL}$, para la prueba 7, en la Figura 33 se muestra que la ruptura celular sigue una cinética de primer orden, con una constante de velocidad $k=0.4236 \text{ min}^{-1}$.

IV.2.4 Prueba 8

La prueba 8 se realizó con las siguientes condiciones: concentración celular de 15 g/L, una velocidad de agitación de 10 Hz y las perlas T1. Los valores de C_m y k se determinaron de la misma manera que la prueba 5, el resultado se muestra en la Figura 34.

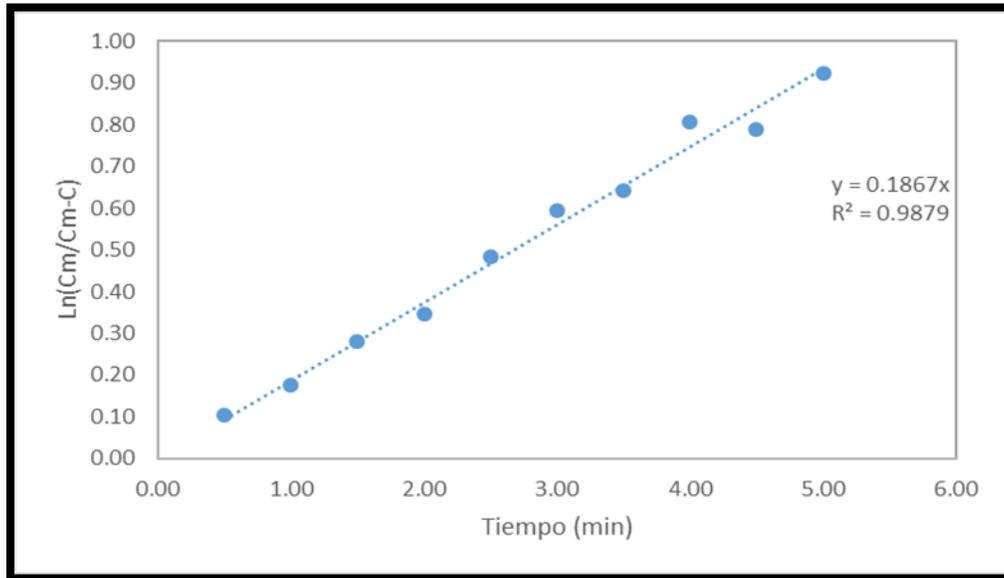


Figura 34. Concentración liberada de ADNp de células de *E. coli* en un molino de bolas por lote, prueba 8.

Estimando el valor de $C_m = 18 \mu\text{g/mL}$, para la prueba 8, en la Figura 34 se muestra que la ruptura celular sigue una cinética de primer orden, con una constante de velocidad $k=0.1867 \text{ min}^{-1}$.

En la Figura 35 se muestra la concentración liberado de ADNp en las pruebas 7 y 8. Se puede apreciar que en el caso de la prueba 7 se tiene una mayor concentración liberada que en la prueba 8, sin embargo la concentración máxima estimada en ambos casos es igual, esto podría indicar que independiente del valor de C_m , se obtiene mayor recuperación con la velocidad de agitación alta.

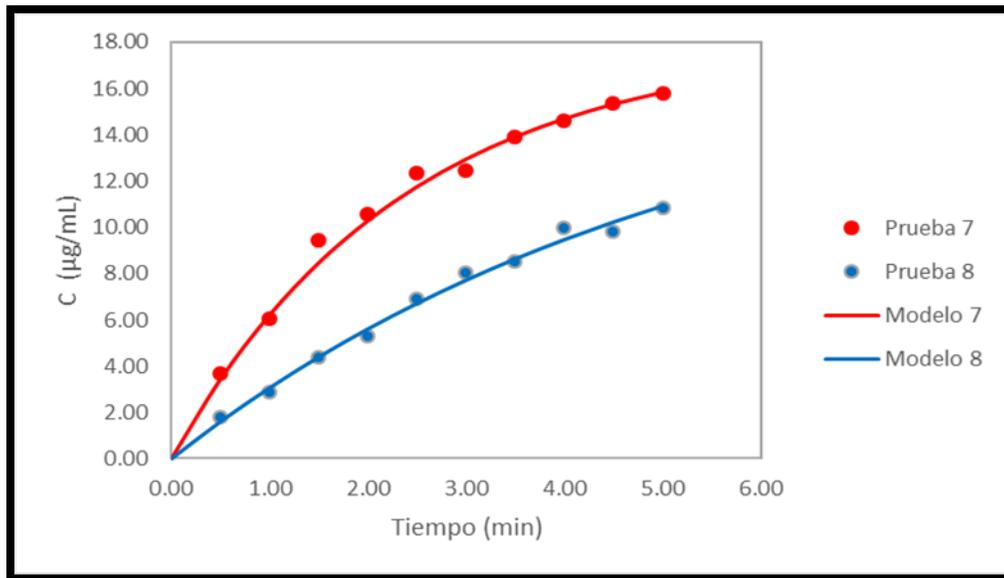


Figura 35. Concentración liberada de ADNp durante las pruebas 7 y 8.

Al comparar la Figura 32 y Figura 35 se puede apreciar que existen dos pruebas que poseen una concentración muy alta, la prueba 5 y 7, con un valor de 19.25 y 15.78 µg/mL respectivamente.

En la Tabla 3 se encuentran los valores de concentración liberada al tiempo de 5 minutos de rompimiento, concentración máxima posible y las constantes de velocidad, que indican la velocidad con la que aumenta la concentración liberado de plásmido por cada minuto que transcurre. Las constantes de velocidad de las pruebas 5 y 7 poseen la mayor concentración de las pruebas que poseen ADNp y, en ambos casos, son mayores a la lisis alcalina.

Tabla 3 Pureza, constantes específicas de velocidad y Cm obtenidas en las pruebas de rompimiento mecánico de *E. coli*.

Prueba	Pureza	k	Cm	R ²
	(%) ADNp	(min ⁻¹)	(µg/mL)	
5	4.51	0.5090	21	0.9935
6	3.32	0.1933	17	0.9752
7	4.48	0.4296	18	0.9906
8	3.65	0.1867	18	0.9879
Lisis Alcalina	3.51			

En la Figura 36 se presenta los cromatogramas de un lisado alcalino y un lisado mecánico. Para fines comparativos, se aumentó el cromatograma del lisado mecánico 3.4 veces para igual la concentración del plásmido, con respecto al lisado alcalino.

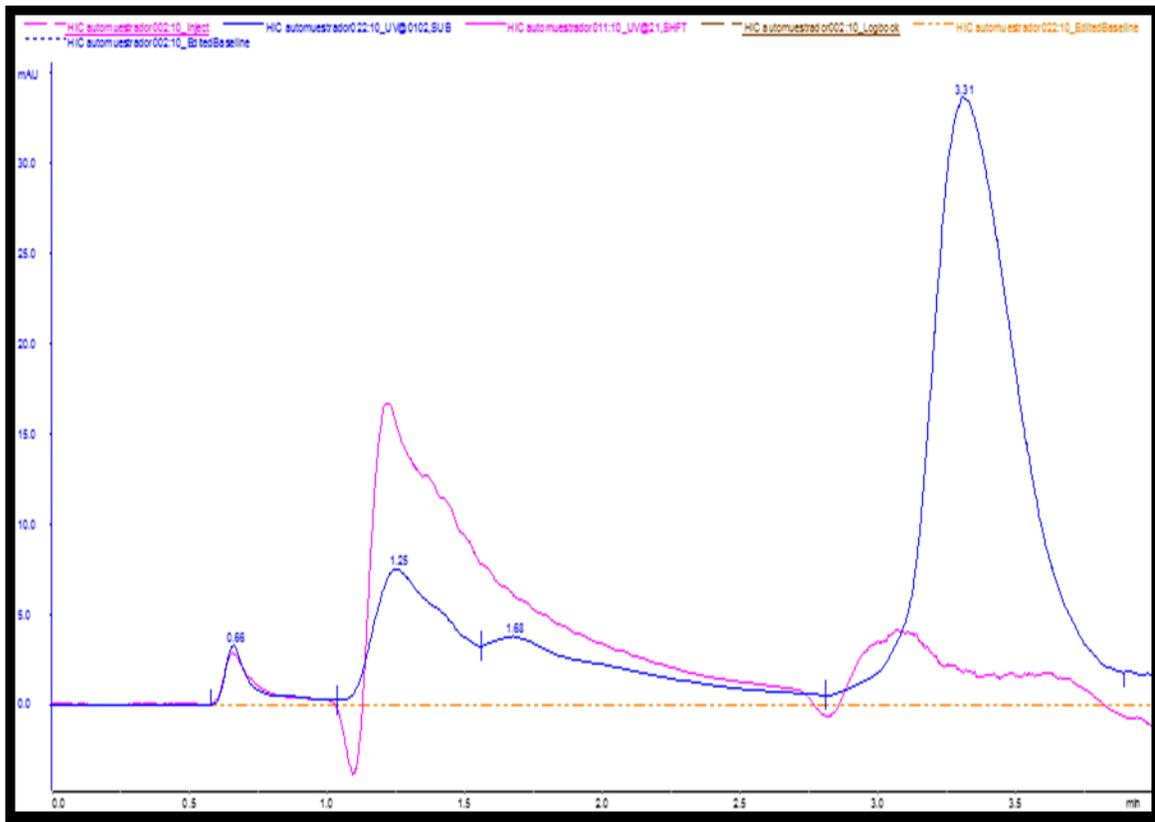


Figura 36. Cromatograma de lisado alcalino (azul) y lisado mecánico (rosa). Para fines comparativos el cromatograma de lisado mecánico esta aumentado 3.4 veces

En los cromatogramas de la Figura 36, primer pico de la curva representa el plásmido recuperado de acuerdo a la metodología de Diogo et al, (2003), el segundo pico se encuentran las proteínas, ARN de bajo peso molecular y ADN genómico, el tercer pico que representa el ARN de alto peso molecular. Se puede apreciar que el cromatograma de la lisis mecánica posee el segundo pico más pronunciado que en el caso de la lisis alcalina y en este es superior por una notable diferencia el pico correspondiente al ARN de bajo peso molecular.

En la Figura 37 se observan los cromatogramas de muestras de lisado mecánico durante el tiempo de proceso de la prueba 4. Se puede notar que el primer y segundo pico aumenta con el tiempo del proceso, lo que manifiesta que se va liberando el contenido celular. El primer pico, correspondiente al ADNp, es muy pequeño en comparación al segundo, esto concuerda con el resultado mostrado en la Figura 26, donde el gel de electroforesis muestra poca presencia de plásmido liberado durante la lisis mecánica en la prueba 4. También se puede observar en la Figura 37 que el pico correspondiente al ARN de alto peso molecular, es muy pequeño.

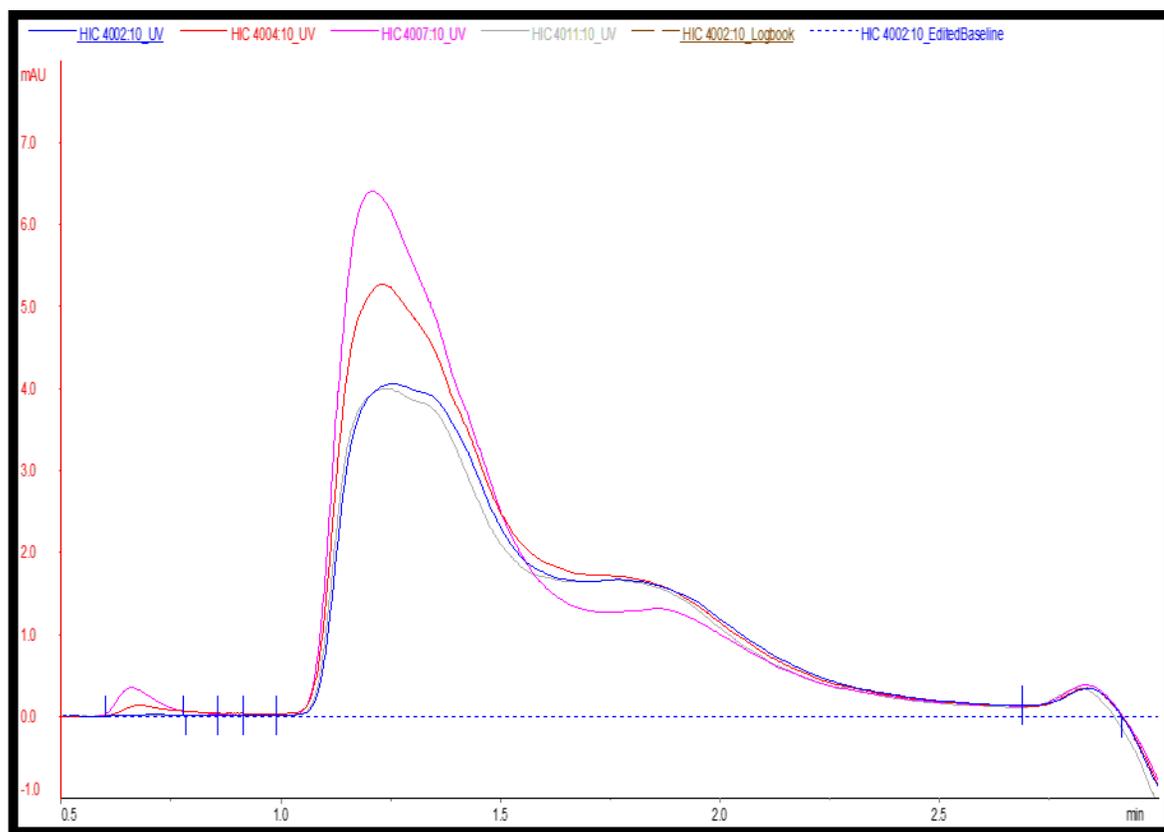


Figura 37. Cromatograma de la prueba 4 a diferentes tiempos (0.5, 2,3.5 y 5 min) de una lisis mecánica.

En la Figura 38 se observan los cromatogramas de muestras de lisado mecánico durante el tiempo de proceso de la prueba 7. Se puede notar que el primer y segundo pico aumenta con el tiempo del proceso, lo que manifiesta que se va liberando el contenido celular. El primer pico, correspondiente al ADNp, es pequeño en comparación al segundo, pero en comparación con la Figura 37 se puede apreciar un primer pico mayor en la prueba 7, este resultado está concordancia lo mostrado en la Figura 27, gel de electroforesis, en línea 8, se encuentra la muestra de lisado de la prueba 7, esta fue una de las pruebas donde hubo más recuperación de plásmido.

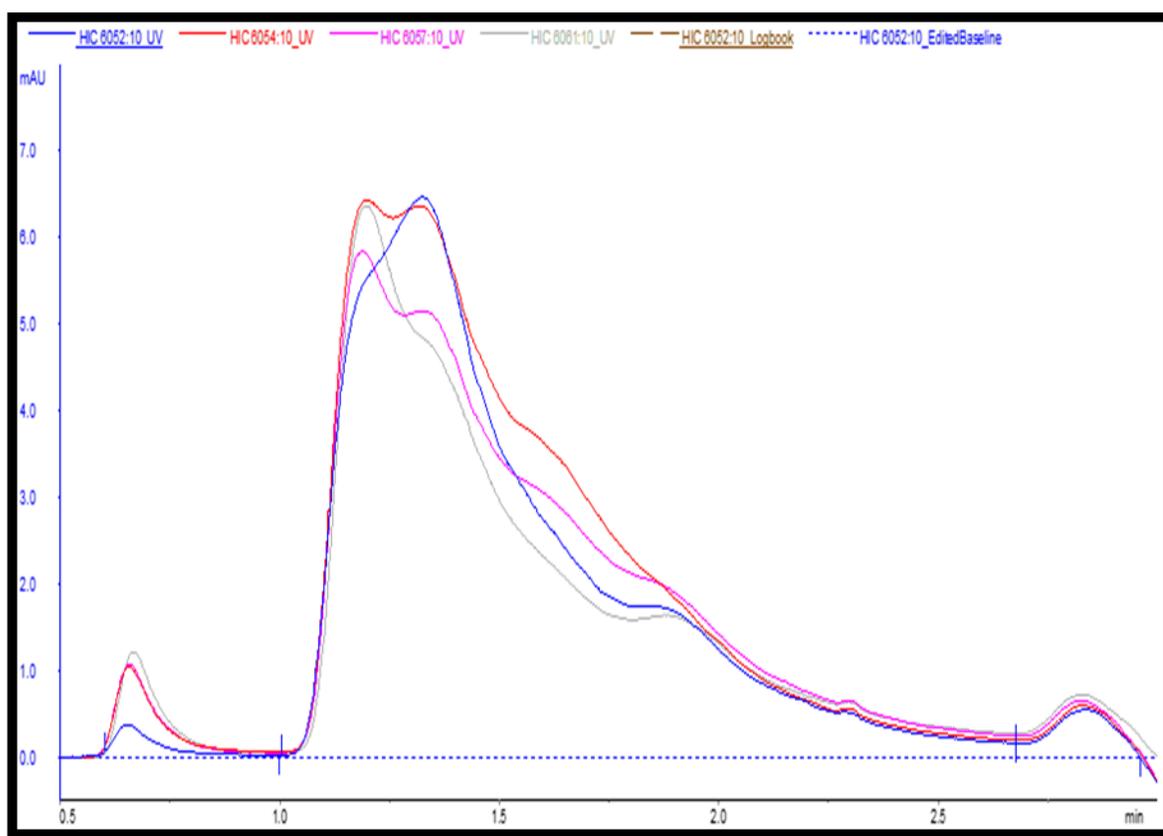


Figura 38. Cromatograma de la prueba 7 a diferentes tiempos (0.5, 2,3.5 y 5 min) de una lisis mecánica.

IV.3 Perlas

IV.3.1 Perlas nuevas

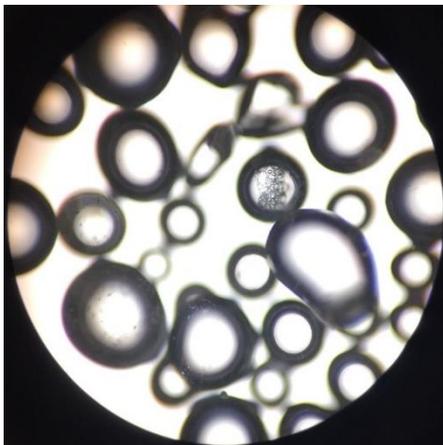


Figura 39. Perlas de 0.1-0.25 mm

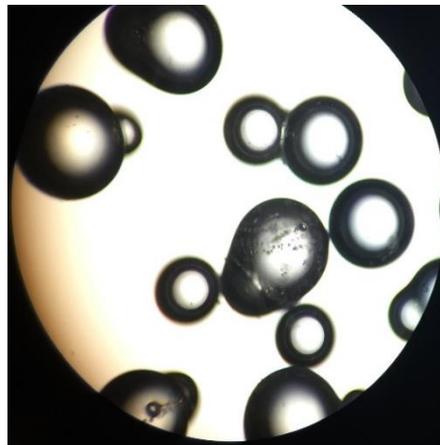


Figura 40. Perlas de 0.25-0.5 mm

IV.3.2 Perlas en las que se utilizaron 18 mL de agua

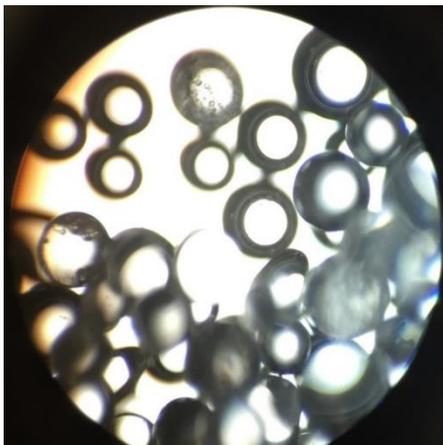


Figura 41. Perlas de 0.1-0.25 mm

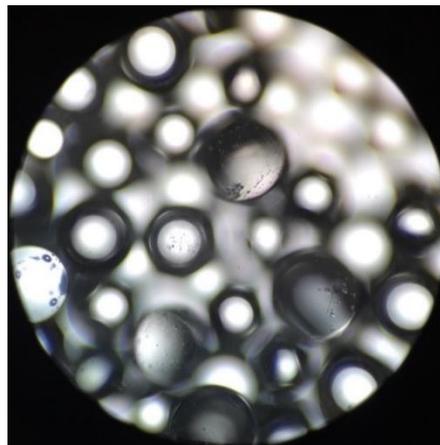


Figura 42. Perlas de 0.25-0.5 mm

IV.3.3 Perlas que estuvieron 24 h en ácido

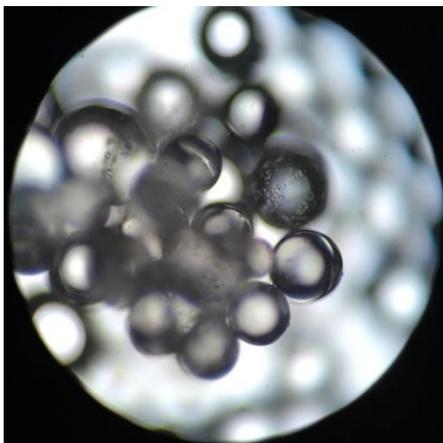


Figura 43. Perlas de 0.1-0.25 mm

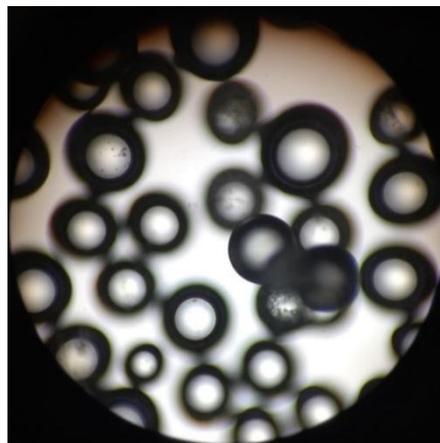


Figura 44. Perlas de 0.25-0.5 mm

IV.3.4 Perlas que fueron decantadas

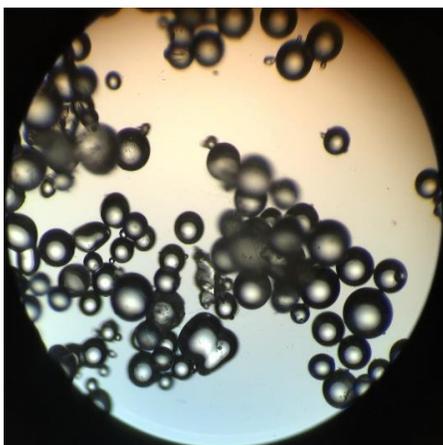


Figura 45. Perlas de 0.1-0.25 mm

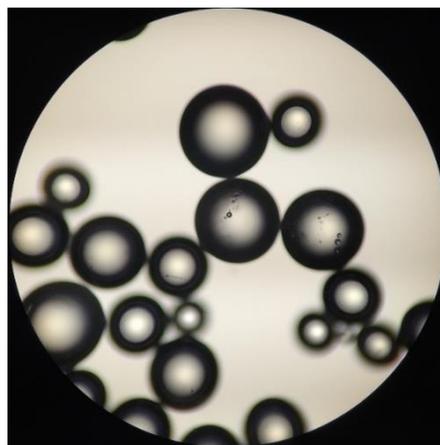


Figura 46. Perlas de 0.25-0.5 mm

Al comparar los diferentes procesos del tratamiento de perlas se puede decir que algunos procesos dañan la limpieza de las perlas, como en el caso de la decantación, pero no se puede dar un veredicto final ya que se tomó una pequeña muestra para ser analizada. Además se puede afirmar la suposición de que las perlas tienen agujeros y parte de la suspensión se introduce en la perlas.

CAPÍTULO 5 CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

Analizando los resultados obtenidos, estos sugieren que la variable preponderante para obtener plásmido de mayor calidad es la concentración celular y que la adecuada de las opciones puestas a prueba es la de 15 g/L. Se puede observar en la electroforesis final (Figura 27) que tal concentración es la que conllevó a mayores cantidades de plásmido superenrollado obtenido dado a una mayor presencia de células.

En cuanto a las variables restantes, velocidad de agitación y tamaño de perlas, los resultados se muestran menos determinantes. La velocidad alta, 20 Hz, alcanzó valores notoriamente más altos de concentración liberado de plásmido, sin embargo, en cuanto a presencia de plásmido superenrollado, fueron sólo ligeramente más altas que en el caso de la velocidad baja.

En el caso del tamaño de perlas, el tamaño que oscila entre 0.1 y 0.25 mm fue el más exitoso, obteniendo valores de concentración de plásmido mucho mayores que aquellas perlas de tamaño superior, lo que llevaría a decidir utilizar este tamaño de perlas, pero por los resultados de la tabla de concentración liberada (Tabla 3), se aprecia que los valores más altos tienen diferente tamaño de perlas, tal resultado es debido más bien a la influencia preponderante de las otras variables y no tanto al tamaño utilizado de perlas, pues ambos fueron obtenidos con la velocidad alta y la concentración alta (aquellos valores que hallamos propicias en ambas variables), independientemente del tamaño de perlas.

Al comparar ambos métodos de ruptura celular utilizados en este trabajo se llega a apreciar que la lisis mecánica presenta una baja concentración de ARN de alto peso molecular, lo cual posiblemente facilite las etapas de purificación. Este

resultado es probable que sea debido al movimiento de las perlas y que se descomponga el ARN de alto peso molecular y lo convierta a de bajo peso molecular. En cuanto a la pureza del ADNp obtenido en ambos lisados, es semejante, con la ventaja que en la lisis mecánica no se utilizan agentes químicos.

Recomendaciones

1. Se recomienda experimentar con mayores velocidades y lapsos más prolongados de los empleados en este trabajo para determinar los parámetros más adecuados para la liberación de plásmido.
2. Se recomienda investigar sobre la ausencia de ARN de alto peso molecular en los lisados mecánicos.
3. Se recomienda verificar las perlas antes de utilizarlas en la molienda en cuanto a la posible presencia de contaminantes.
4. Se recomienda lavar las perlas de vidrio después de su uso y verificar si hay plásmido adherido a ellas.
5. Se recomienda experimentar con perlas de otros materiales como acero o zirconio que no sean porosos.

APÉNDICE

A

Reactivos

Tabla A.1 Reactivos utilizados en este trabajo.

Reactivos	Marca	Pureza
Glicerol	Sigma Aldrich	≥99%
EDTA	Sigma	100%
Fosfato de potasio dibásico	Sigma	
Fosfato de potasio monobásico	Sigma	≥99%
Triptona	Fluka analytical	
Tris	Fluka	
Levadura	Sigma	
Agarosa	Sigma	≥99%
Kanamicina	Sigma	0.9% sal
Ácido Clorhídrico	Meyer	36.5-38%
Glucosa	Sigma	
Hidróxido de sodio	Sigma	1 N
Dodecilsulfato sódico	Sigma	≥98.5%
Acetato de potasio	Sigma	95%
Ácido Acético glacial	Meyer	≥99.7%
Sulfato de amonio	Sigma	99%

APÉNDICE

B

Curva de crecimiento bacteriano

Cinética de crecimiento

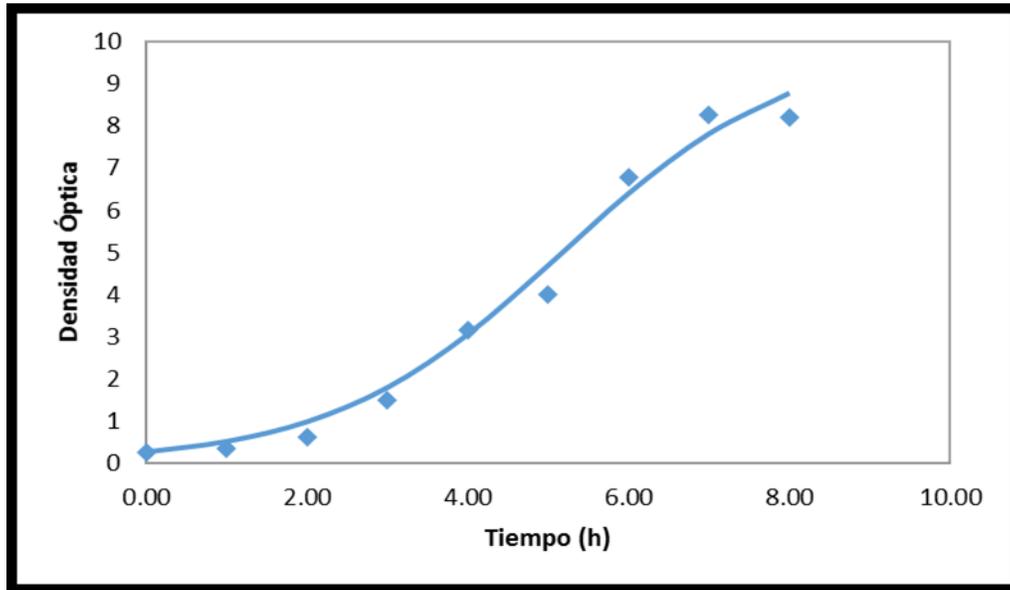


Figura B1. Curva de crecimiento bacteriano y modelo logístico. Se tiene $\mu=0.50$ h^{-1} para los valores experimentales y $k=0.7$ h^{-1} y $X_{\infty}=10$ para el modelo logístico

$$X = \frac{x_0 e^{kt}}{1 - \frac{x_0}{X_{\infty}}(1 - e^{kt})}$$

APÉNDICE
C
Curva de Calibración

La curva de calibración del plásmido pVAX1-NH36 se obtiene utilizando el kit comercial de purificación y lisados donde se encuentra presente el mismo, con el fin de obtenerlo totalmente puro, con el cual se medirá su absorbancia y, con ella, se determinará la concentración de plásmido puro. La relación es de 1 unidad de absorbancia y corresponde a 50 µg/mL. Se repite este procedimiento hasta obtener varias concentraciones diferentes. Al tener varias concentraciones se utiliza la técnica de HPLC-HIC para determinar el área presente en cada concentración.

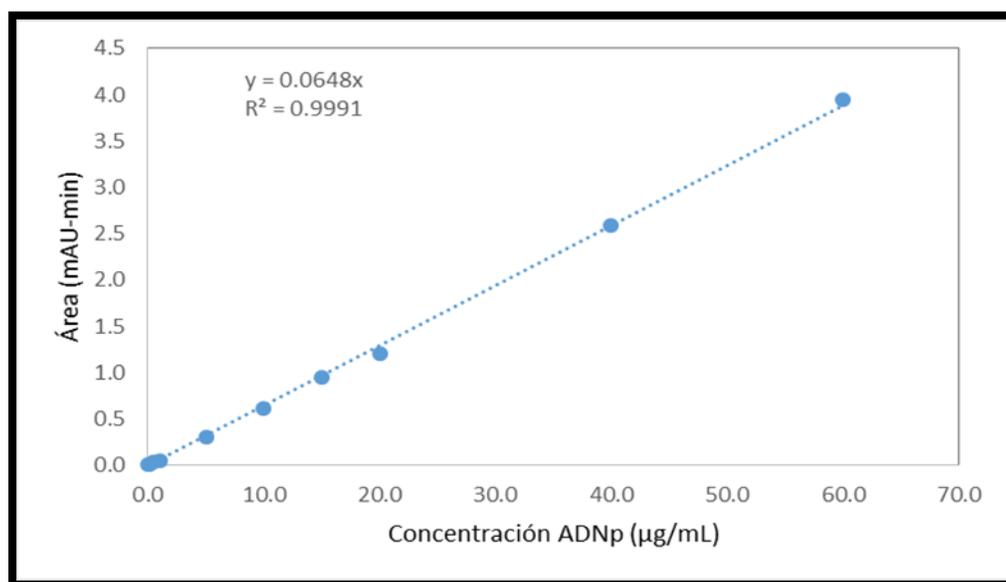


Figura C1. Curva de calibración

BIBLIOGRAFÍA

- Aguilar-Be I.; Da Silva Z.R.; Paraguai S.E.; Borja-Cabrera G.P.; Rosado-Vallado M.; Mut-Martin M.; García-Miss M.R.; Palatnik S.C.B. and Dumonteil E. Cross-Protective Efficacy of a Prophylactic *Leishmania donovani* DNA Vaccine against Visceral and Cutaneous Murine Leishmaniasis. *Infection and Immunity*, **2005**, 812-819.
- Bakir U. and Hamamci H. Short Communication: The effect of freeze-thawing on the release of intracellular proteins from *Escherichia coli* by means of a bead mill. *World Journal of Microbiology & Biotechnology*, **1997**, 13, 475-477.
- Birnboim, H.C. and Doly, J. A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Res.*, **1979**, 7, 1513 – 1523.
- Carlson A.; Signs M.; Liermann L.; Boor R. and Jem K.J. Mechanical Disruption of *Escherichia coli* for Plasmid Recovery. *Biotechnology and bioengineering*, **1995**, 4, 303-305.
- Carnes A.E. and Williams J.A. Plasmid DNA Manufacturing Technology. *Recent Patents on Biotechnology*, **2007**, 1, 1-16.
- Danko, I.W. Direct gene transfer into muscle. *Vaccine*, **1994**, 1499-1502.
- Diogo M.M.; Queiroz J.A. and Prazeres D.M.F. Chromatography of plasmid DNA. *J. Chromatogr.A*, **2015**, 1069, 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.
- Geciova J.; Bury D. and Jelen P. Methods for disruption of microbial cells for potential use in the dairy, industry-a review. *International Dairy Journal*, **2001**, 12, 541-553.
- Ghanem A.; Healy R. and Adly F.G. Current trends in separation of plasmid DNA vaccines: A review. *Analytica Chimica Acta*, **2013**, 760, 1-15.
- Kennedy R.D.O'; Ward J.M. and Keshavarz-Moore E. Effects of fermentation strategy on the characteristics of plasmid DNA production. *Biotechnology and Applied Biochemistry*, **2003**, 37, 83-90.
- Levy M.S.; Kong S. and Titchener-Hooker N. Plasmid DNA processing for gene therapy and vaccination: Studies on the membrane sterilization filtration step. *Journal of Membrane Science*, **2006**, 280, 824-831.

Melendres A.V.; Honda H.; Shiragami N. and Unno H. Enzyme release kinetics in a cell disruption chamber of a bead mill. *Journal of Chemical Engineering of Japan*, **1993**, 2, 148-152.

Prazeres D.M.F.; Montiero G.A.; Ferreira G.N.M.; Diogo M.M.; Ribeiro S.C. and Cabral J.M.S. Purification of plasmids for gene therapy and DNA. *Biotechnology Annual Review*, **2001**, 7, 1-30.

Prazeres, D.M.F., Ferreira, G.N.M. Design of flowsheets for the recovery and purification of plasmids for gene therapy and DNA vaccination. *Chem. Eng. Process*, **2004**, 43, 609-624.

pVAX1 Catalog no. V260-20 Version C. Invitrogen, Life Technology Corporation Web Site. http://tools.lifetechnologies.com/content/sfs/manuals/pvax1_man.pdf. Published 11 Nov 2010. Revision date 2 March 2012

Silva F.; Lourenco O.; Maia C.M.; Queiroz J.A. and Domingues F.C. Impact of plasmid induction strategy on overall plasmid DNA yield and *E. coli* physiology using flow cytometry and real-time PCR. *Process Biochemistry*, **2011**, 46, 174-181.

Tejeda A.M.; Montesinos R.M. and Guzmán R. *Bioseparaciones*, Segunda edición. Ed. Pearson Educación, México, **2011**.

Voß C.; Schmidt T.; Schleef M.; Friehs K. and Flaschel E. Production of supercoiled multimeric plasmid DNA for biopharmaceutical application. *Journal of Biotechnology*, **2003**, 105, 205-213.

Walker J.M. and Rapley R. *Molecular Biology and Biotechnology*, Gran Bretaña, **2000**.