

INFLUENCIA DEL TAMAÑO DEL PLÁSMIDO Y DEL MEDIO DE CULTIVO EN LA PRODUCCIÓN DE UNA VACUNA DE DNA CONTRA LEISHMANIASIS

Myriam Sánchez Casco¹, Eric Dumonteil², Jaime Ortega López¹

¹Biotecnología y Bioingeniería, CINVESTAV-IPN, Av. IPN #2508 San. Pedro Zacatenco, México D. F.

mysanchez@cinvestav.mx

Palabras clave: leishmaniasis, VR1012-NH36, pVAX-NH36

Introducción. La leishmaniasis es una infección causada por parásitos del género *leishmania* que puede ser incapacitante o mortal y en nuestro país es un problema de salud pública. Su tratamiento actual es ineficiente, largo y costoso, por lo que una alternativa son las vacunas de DNA. Estas vacunas inducen una respuesta inmune a nivel celular y humoral, no contienen patógenos y no requieren de la “cadena fría” para su transporte y almacenamiento (1). En estudios recientes se demostró que la vacuna VR1012-NH36 contra leishmaniasis basada en el antígeno NH36 es inmunoterapéutica e inmunoprotectora contra *L. donovani*, *L. chagasi* y *L. mexicana* en ratones (2). Sin embargo, para avanzar a la siguiente fase de experimentación y su posible aplicación se requiere DNA plasmídico superenrollado (sc-pDNA) en cantidades que no es viable obtenerlas por métodos convencionales utilizados en el laboratorio (2 mg/L de cultivo). Para mejorar la producción de esta vacuna de DNA contra leishmaniasis, en el presente trabajo se determinó la influencia del tamaño de plásmido y el medio de cultivo en la producción de sc-pDNA.

Metodología. Se clonó el fragmento correspondiente a NH36 en el vector pVAX1 (pVAX-NH36) con un tamaño menor a 1 Kb de la vacuna VR1012-NH36 se comparó la producción en el medio ZMY505. Para determinar la influencia del medio de cultivo en la producción de pVAX-NH36 se diseñó una matriz de Plackett-Burman. Cultivos de *E. coli* DH5 α se crecieron a 37 °C y 100rpm, se determinó el crecimiento celular y el DNA plasmídico se analizó por electroforesis en geles de agarosa al 0.8%.

Resultados y discusión. Al comparar la producción de VR1012-NH36 y pVAX-NH36 se observa un aumento del 30% (16.2 mg/L pVAX-NH36 y 12.2 mg/L VR1012-NH36) en la producción de DNA plasmídico al disminuir el tamaño del plásmido en 1 Kb (Fig 1 A). Adicionalmente, el análisis electroforético (Fig1 B) muestra que aproximadamente 80% del pVAX-NH36 esta superenrollado contra solo el 50% en el caso del VR1012-NH36. A partir de estos resultados se seleccionó pVAX-NH36 para determinar el efecto de los componentes del medio de cultivo en la producción de pVAX-NH36. En la Figura 1 C se muestran los resultados de rendimiento volumétrico (mg/L) de DNA plasmídico para el medio de control (ZYM505 (C1)) y los 12 experimentos de la matriz Plackett-Burman. En tres de los doce medios probados se obtuvieron rendimientos (22.3, 16.6 y 18.8 mg/L) mayores al control de (15 mg/L).

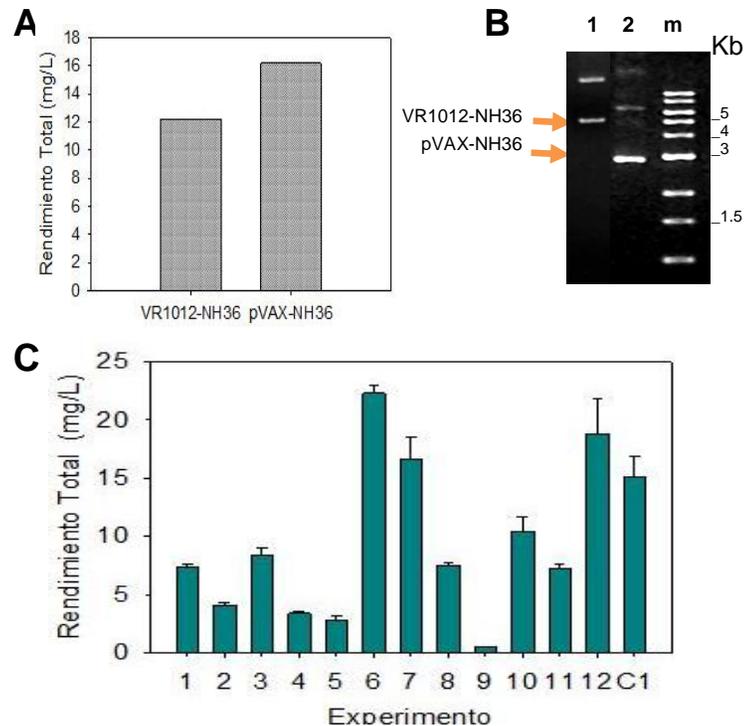


Figura 1. Producción de una vacuna de DNA contra leishmaniasis basada en el antígeno NH36. Influencia del tamaño del plásmido, A) medio de cultivo ZMY505 B) VR1012-NH36(carril 1) y pVAX-NH36 (carril 2) y marcadores (m). C) Producción de pVAX-NH36, los números corresponden a los 12 experimentos del diseño experimental Plackett-Burman.

Conclusiones. Se mejoró la producción de la vacuna contra leishmaniasis basada en el antígeno NH36, disminuyendo el tamaño del plásmido y modificando el medio de cultivo.

Agradecimiento. Agradecemos al CINVESTAV, al Instituto Hideyo Noguchi de la UADY, al CONACYT (beca 167077 MSC) y al ICyTDF (proyecto PIFUTP08-108 JOL).

Bibliografía.

1. Prather K.J., Sagar S., Murphy J. y Chartrain M. (2003). Industrial scale production of plasmid DNA for vaccine and gene therapy: plasmid design, production, and purification *Enz. Microb. Technol.*, 33, 865 – 883
2. Aguilar-Be, Da Silva Zardo, Souza, Borja-Cabrera (2005), Cross-protective efficacy of a prophylactic *Leishmania donovani* DNA vaccine against visceral and cutaneous murine leishmaniasis, *Inf. Imm.*, 73 (2), 812 -819