



XIV Congreso Nacional de Biotecnología y Bioingeniería



DISEÑO DEL PROCESO DE PRODUCCIÓN DE UNA VACUNA VETERINARIA CONTRA ROTAVIRUS BOVINO PRODUCIDA EN *Saccharomyces cerevisiae*.

William A. Rodríguez-Limas, Octavio T. Ramírez, Laura A. Palomares

Departamento de Medicina Molecular y Bioprocesos. Instituto de Biotecnología. Universidad Nacional Autónoma de México. Apdo. Postal. 510-3. Cuernavaca, Morelos, CP. 62250, México. Teléfono: (52) 777 329-1863 y (52) 77 329-1617. Fax: (52) 777 313-8811. e-mail: william@ibt.unam.mx, laura@ibt.unam.mx

Palabras clave: Vacuna, Rotavirus, *Saccharomyces*

Introducción. Rotavirus es el principal agente causante de gastroenteritis en niños y animales jóvenes (1). Para el caso de bovinos, se ha mostrado que las vacunas disponibles en el mercado generan una protección heterotípica limitada (2). Dichas vacunas son producidas por métodos tradicionales mediante propagación y posterior inactivación de cepas de virus que no necesariamente contienen todos los genotipos circulantes en el país (3). En el presente trabajo se aborda la producción de una vacuna veterinaria basada en partículas pseudovirales (PPV) producidas en *Saccharomyces cerevisiae*, utilizando los genes de proteínas estructurales de cepas de rotavirus bovino aisladas de ranchos mexicanos. El proyecto ha requerido la evaluación de diferentes condiciones de expresión heteróloga y mejoras en el bioproceso para que los procesos productivos planteados sean rentables y técnicamente factibles de ser implementados por la industria veterinaria nacional.

Metodología. Las cepas de *S. cerevisiae* utilizadas para este estudio fueron la W3031a, PJ69-4a, CEN.PK.113-5D y PD 83B.1d. Se utilizaron diferentes promotores constitutivos e inducibles para la expresión heteróloga de las proteínas VP2, VP6 y VP7 de rotavirus en plásmidos centroméricos y episomales. El medio sintético completo CSM-Ura (glucosa 2%, YNB 0.67%) fue optimizado mediante dos diseños experimentales a dos niveles, suplementándolo con leucina, glutamato y succinato. Las condiciones de cultivo fueron controladas a 30°C, TOD superior al 30% y pH 5.0. Se realizaron cultivos en lote alimentado con perfil exponencial, manteniendo una velocidad específica de crecimiento de 0.19 h⁻¹. La producción de proteínas heterólogas fue monitoreada por ELISA y Western blot. Las PPV de rotavirus fueron purificadas por gradientes de CsCl y visualizadas mediante tinción negativa en un microscopio electrónico de transmisión.

Resultados. Los genes de las proteínas heterólogas VP2, VP6 y VP7 de rotavirus bovino fueron clonados en 4 cepas de *S. cerevisiae* usando diferentes combinaciones de promotores para expresar las tres proteínas en una misma célula. Las cepas con mejor desempeño fueron

evaluadas en fermentaciones por lote y lote alimentado usando el medio CSM-Ura suplementado con leucina (1.8 mM), glutamato (20mM) y succinato (50mM). El tipo de cepa utilizada tuvo un efecto importante sobre la producción de proteína heteróloga mientras que el tipo de plásmido no afectó los rendimientos de proteína. Los cultivos en lote alimentado de la cepa PD.U-267 alcanzaron las concentraciones más altas de proteína heteróloga. Las productividades volumétricas y específicas se incrementaron 34 y 11 veces con respecto a los cultivos por lote. Mediante microscopía electrónica, pudo evidenciarse la presencia de PPV de rotavirus (Fig. 1).

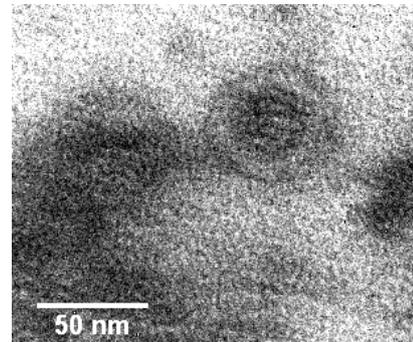


Figura 1. Microscopía electrónica de PPV de rotavirus bovino producidas en cultivos por lote alimentado de *S. cerevisiae*. Magnificación 250,000X

Conclusiones.

Mediante selección de cepas, optimización de medios de cultivo y estrategias de alimentación de nutrientes, se pudo mejorar la producción de proteínas heterólogas de rotavirus bovino, para su uso como principio activo en la formulación de una vacuna de tipo veterinario.

Agradecimiento. Apoyo económico DGAPA IN-224409, CONACyT-Salud 2007-c01-69911 y SEP-CONACyT 2008-c01-101847. Asistencia técnica de V. Hernández y R. Pastor. Rodríguez-Limas agradece el apoyo mediante beca CONACyT No. 210328.

Bibliografía.

- Holland, RE. (1990). *Clin. Microb. Rev.* 3: 345-375.
- <http://www.usda.gov>
- Rodríguez-Limas WA, Flores-Samaniego B, de la Mora G, Ramírez OT, Palomares LA. (2009). *Vaccine* 27(46):6411-6414.