

OBTENCIÓN DE VESÍCULAS EXTRACELULARES A PARTIR DE CULTIVOS DE *E. coli* RECOMBINANTE BAJO RESONANCIA ACÚSTICA

Mayra Herrera de los Santos¹, Ricardo M. Castro-Acosta², Mauricio A. Trujillo Roldán¹, Norma Adriana Valdez Cruz¹.
1 Departamento de Biología Molecular y Biotecnología, Instituto de Investigaciones Biomédicas, Universidad Nacional Autónoma de México, CDMX C.P. 04510; 2 Departamento de Medicina Molecular y Bioprocesos, Instituto de Biotecnología, Universidad Nacional Autónoma de México, Cuernavaca, Mor., México. adrivaldez1@gmail.com

Palabras clave: Vesículas extracelulares, Agitación por Resonancia Acústica, Biomateriales

Introducción. Las vesículas extracelulares (VE's) son un conjunto heterogéneo de estructuras membranosas secretadas por bacterias tanto Gram (+) como Gram (-); y aunque su biogénesis hasta el momento es una interrogante, se sabe que su liberación puede ser constitutiva o consecuente a la estimulación celular por estrés físico o químico (1,2). Una gran variedad de VE's son producidas por bacterias patógenas y no patógenas (3); en estas últimas, su composición, función y especificidad han sido pobremente caracterizadas (2,4). Sin embargo, su estudio ha llamado la atención ya que pueden ser utilizadas como sistemas de entrega de moléculas a células blanco. En nuestro grupo de trabajo, mediante microscopía de transmisión electrónica (TEM), se observó que la agitación de resonancia acústica (RAM) promueve la liberación de VE's en *Escherichia coli* (Origami) productora de una fosfolipasa A2. Sin embargo, su producción no había sido caracterizada (4). Por lo anterior, el objetivo de nuestro proyecto es obtener, cuantificar y caracterizar a las VE's de *E. coli* (Origami) en condiciones de agitación por resonancia acústica, para proponer sus futuras aplicaciones en el área de los biomateriales.

Metodología. Se realizaron cinéticas de crecimiento de *E. coli* (Origami) rPLA2 en matraces de 250 mL con medio mineral modificado del reportado (5). Los matraces se incubaron a 37 °C bajo dos condiciones de agitación orbital (AO) 200 rpm y RAM 18 g, tomando muestras de 10 mL de medio durante los tiempos 5, 10 y 15 para monitorear la obtención de VE's. Las muestras recolectadas fueron centrifugadas para separar la mayor parte del contenido celular y recuperar el sobrenadante del cultivo, al cual se añadió 1 µL de PMSF 0.1 mM. Por último, se procedió a concentrar las VE's mediante ultracentrifugación a 35,000 g en gradientes de sacarosa. El pellet obtenido se resuspendió en PBS 1X. De la suspensión de VE's, se colocaron 200 µL en una celda de cuarzo para analizar el tamaño de partícula por Dispersión Dinámica de Luz (DLS). Todos los experimentos se realizaron por triplicado.

Resultados.

A) El cultivo de *E. coli* (Origami) rPLA2 en medio mineral, bajo RAM alcanza 6.34 g/L de biomasa.

Tabla 1. Comparación de parámetros cinéticos del crecimiento de *E. coli* (Origami) rPLA2 en medio mineral en OM 200 rpm y RAM18 g.

| Agitación | Orbital (200 rpm) | RAM (18 g) |
|----------------------|--------------------|---------------------|
| K_{La} inicial | 80 h ⁻¹ | 295 h ⁻¹ |
| D.O máx (U.A) | 4.94 ± 0.02 | 13.31 ± 0.58 |
| X máx (g/L) | 2.35 ± 0.01 | 6.34 ± 0.28 |
| µ (h ⁻¹) | 0.442 ± 0.006 | 0.274 ± 0.002 |

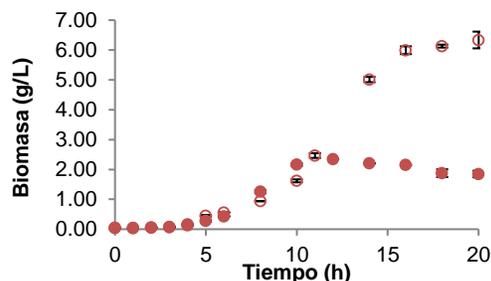


Fig. 1. Cinética de crecimiento de *E. coli* (Origami) rPLA2 en medio mineral bajo RAM 18 g (círculos vacíos). Los círculos llenos muestran cultivos bajo AO a 200 rpm.

B) Se observaron VE'S producidas en *E. coli* (Origami) rPLA2 bajo AO y RAM, después de 10 h de cultivo, obteniéndose estructuras de entre 105 hasta 147 nm.

Tabla 2. Diámetro promedio (nm) de las VE'S obtenidas en AO (200 rpm) y RAM (18 g), determinado por DLS.

| Agitación | Orbital 200 rpm | RAMbio 18 g |
|------------|--------------------|--------------------|
| Tiempo (h) | Diámetro ± DS (nm) | Diámetro ± DS (nm) |
| 5* | no detectadas | no detectadas |
| 10 | 113.00 ± 8.14 | 128.5 ± 9.94 |
| 15 | 117.3 ± 2.54 | 131.8 ± 16.59 |

Conclusiones. La agitación por resonancia acústica tiene un efecto favorable sobre el crecimiento de *E. coli* (Origami) rPLA2, obteniéndose 2.7 veces más biomasa que en un sistema de agitación orbital. Aunque, la velocidad de crecimiento es menor (40%). Es importante notar que los K_{La} iniciales son distintos de ahí la mejora en la acumulación de biomasa. En ambas condiciones de agitación se obtuvieron VE's, las cuales presentaron una densidad aproximada de 1.12 g/mL obtenido del gradiente de sacarosa. Observándose que la acumulación de VE's ocurre en ambos sistemas de agitación después de 5 h de cultivo, y cuyas estructuras presentaron, entre 105 hasta 147 nm.

Agradecimientos. Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica (PAPIIT IT-200719, IN-208414) y Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología, (CONACYT 247473, 220795).

Bibliografía.

- Kim J et al. (2015) *Sem Cell Dev Biol.* 40:97–104.
- Price N et al. (2016) *Sci Rep.* 6(1):1–9.
- Kuehn MJ & Kesty NC (2005) *Genes Dev.* 19(22):2645-55
- Valdez-Cruz NA et al. (2017) *Microb Cell Fact.* 16(129):3–12.
- Caspeta et al. (2013). *J Biotechnol.* 167:47-55

