

Estrategias para adaptar inmunoensayos de detección de pequeñas moléculas a formatos luminiscentes.

Tesis de grado – Licenciatura en
Bioquímica

Florencia Castagna
Tutor: Gabriel Lassabe

Área Inmunología, Facultad de Química, UdelaR

Montevideo, Uruguay.

2024

Índice

Agradecimientos	4
Resumen	5
Abreviaturas	6
Introducción	8
1. Inmunoensayos	8
1.1. Introducción.....	8
1.2. Inmunoensayos competitivos y no-competitivos.....	9
1.3. Detección de haptenos mediante inmunoensayos no-competitivos	11
2. Luminiscencia	16
2.1. Introducción	16
2.2. Aplicaciones.....	16
Objetivos	20
Materiales	21
Métodos	23
0. Métodos generales	23
Cultivo de <i>E. coli</i>	23
Técnicas de clonado de ADN	24
Análisis de ADN.....	25
Cuantificación de ADN y proteínas	25
Análisis de proteínas	25
Técnicas de cultivo celular.....	25
1. Expresión y purificación de la quimera pvtxNluc en bacterias E. coli.	26
1.1. Construcción y purificación de vectores pET28a (+) para expresión recombinante en <i>E. coli</i> de pvtxNluc	26
1.2. Expresión de pvtxNluc en <i>E. coli</i> BL21(DE3).....	28
1.3. Purificación de pvtxNluc producida en <i>E. coli</i> BL21(DE3) por cromatografía de afinidad.....	29
2. Expresión y purificación de pvtxNluc en células HEK293-T	29
2.1. Construcción y purificación de vectores pcDNA 3.1(+) para expresión recombinante en HEK293-T.....	29
2.2. Expresión en células HEK293-T	31
2.3. Purificación de pvtxNluc producida en HEK293-T por cromatografía de afinidad.....	31
3. Expresión y purificación de la quimera pvtx en bacterias E. coli.	32
3.1. Construcción y purificación de vectores pET28a (+) para expresión recombinante en <i>E. coli</i> de pvtx.	32
3.2. Expresión en <i>E. coli</i> BL21 (DE3)	32
3.3. Purificación de pvtx producida en <i>E. coli</i> BL21 (DE3) por cromatografía de afinidad.....	33
4. Expresión y purificación de la quimera StrpNluc en células HEK293-T....	33
4.1. Construcción y purificación de vectores pcDNA 3.1(+) para expresión recombinante en HEK293-T.....	33
4.2. Purificación de StrpNluc producida en células HEK293-T por cromatografía de afinidad.....	34
5. Caracterización de las construcciones pvtxNluc y StrpNluc por cromatografía de exclusión molecular.....	35

6. ELISA luminiscentes para la detección de atrazina	35
6.1. Curvas de titulación de las quimeras en ausencia y exceso de atrazina.	36
6.2. Actividad de los sobrenadantes provenientes de las pruebas de transfección en pequeña escala de pvtxNluc.....	37
7. ELISA colorimétricos para la detección de atrazina	37
7.1. Curvas de titulación de las quimeras en exceso y ausencia de atrazina.	37
8. Curvas de detección de atrazina.	38
9. Ensayos de actividad enzimática	38
9.1. Evaluación de la actividad enzimática de las diferentes quimeras de Nluc frente a diferentes concentraciones de hidrofurimazina.....	38
9.2. Valoración de las fracciones provenientes de la purificación de StrpNluc mediante ensayos luminiscentes.....	39
10. Ensayos luminiscentes para detección de MC-OVA utilizando StrpNluc o StrpHRP comercial.	40
Resultados y discusión.	41
1. Expresión recombinante de pvtxNluc.	41
1.1 Expresión recombinante de pvtxNluc en <i>E. coli</i>	41
1.2. Expresión recombinante de pvtxNluc en células HEK293-T	43
1.3. Evaluación de pvtxNluc producida en <i>E. coli</i> y en HEK293-T en ensayos de detección de atrazina luminiscentes.	45
1.4. Estudios estructurales y de actividad enzimática de pvtxNluc.....	48
1.4.1 Ensayos de actividad enzimática	48
1.4.2. Caracterización por cromatografía de exclusión molecular	49
2 Producción recombinante de pvtx.	49
2.1. Expresión recombinante de pvtx en <i>E. coli</i>	50
2.2. Evaluación del desempeño de pvtx en ensayos de detección de atrazina colorimétricos.....	51
3. Producción de la quimera StrpNluc y estudios de funcionalidad en ensayos de detección de atrazina	52
3.1. Expresión recombinante StrpNluc en células HEK293-T.....	52
3.2. Curvas de dilución de la construcción StrpNluc en presencia de un exceso de atrazina y en ausencia de esta.	54
4. Caracterización de la quimera StrpNluc	54
4.1. Aplicación de StrpNluc como reactivo en inmunoensayo de referencia.....	55
4.2. Actividad enzimática StrpNluc	55
4.3. Caracterización de StrpNluc por cromatografía de exclusión molecular y SDS-PAGE.	56
5. Ensayos con Estreptavidina-HRP comercial	57
5.1. Curvas de titulación de StrpHRP en inmunoensayo luminiscente en presencia de un exceso y ausencia de atrazina.....	58
5.2. Curvas de detección de atrazina	59
Conclusiones y perspectivas	61
Bibliografía.....	63

Agradecimientos

A Gabriel por su enorme paciencia y dedicación para enseñarme a manejarme en el lab, a pensar de forma crítica y ayudarme a mantenerme positiva frente a resultados adversos. Gracias por tu apoyo y llenate de paciencia porque nos esperan nuevos desafíos.

A todo el laboratorio de inmuno, por hacer de este lugar un espacio cómodo y alegre para trabajar. Hacen de los almuerzos de un espacio divertido y distendido para poner pausa al día (a veces muy necesaria).

Especial agradecimiento a todo el grupo de la casita del fondo, que me acogieron y me hicieron sentir super cómoda. Gracias por toda la ayuda brindada a lo largo de este periodo, aun cuando cada uno tenía sus propios experimentos por los cuales preocuparse, se hicieron un espacio para ayudarme y lo valoro mucho. Especial agradecimiento a Caro y Pau, que por estar sentadas cerca, fueron víctimas de todas las preguntas que no le hice a Gabriel. Gracias a Gualbe por estar pendiente de mi trabajo y siempre hacer sugerencias para poder “darle la vuelta”.

A mi familia, por estar siempre a mi lado y apoyarme todos estos años desde el inicio de la carrera hasta su fin. A mi mamá por bancarse todos los altibajos emocionales y siempre darme ánimos de seguir. Gracias por estar siempre.

A mi novio Valentín, por ser siempre un ser de luz, hacerme sentir querida, entenderme y apoyarme en las buenas y en las malas. Gracias por siempre estar para mí, escucharme y hacer de este camino uno más llevadero.

A mis amigas y compañeras de carrera Marce y Bru por ser apoyo y descarga constante de emociones, por entenderme y bancarme. Sin ustedes, todo este recorrido hubiese sido bastante aburrido. Gracias por las juntadas y zooms de estudio con un poco de chisme (o chisme con un poco de estudio).

Al resto de mis amigas, que también se bancaron miles de quejas de las pibas fcien, y supieron generar espacios de contención pero también de dispersión, para olvidarse de algún que otro experimento. Gracias a cada una por ser quien son, y aportarme cada una de su manera su apoyo en este recorrido.

Resumen

Los inmunoensayos son un conjunto de técnicas que se utilizan para identificar y cuantificar un determinado analito presente en una muestra. Estas técnicas se basan en la gran especificidad y afinidad de los anticuerpos por sus antígenos específicos. Según su diseño, se pueden clasificar en dos tipos: competitivos y no-competitivos. En los inmunoensayos no-competitivos, los anticuerpos se utilizan en exceso, de forma que se maximiza la sensibilidad del ensayo. Sin embargo, los analitos de bajo peso molecular no pueden ser detectados mediante estos ensayos dado que carecen de la capacidad de unir dos anticuerpos en simultáneo. Estos analitos son comúnmente detectados mediante inmunoensayos competitivos, en donde el anticuerpo específico se encuentra en cantidades limitantes, limitando consigo la sensibilidad del ensayo.

Diversas estrategias han surgido con el fin de generar inmunoensayos no-competitivos para analitos pequeños. Una de ellas surge en el laboratorio de Inmunoquímica de la Cátedra de Inmunología y se basa en la detección del inmunocomplejo (anticuerpo-analito) a través de péptidos cortos cíclicos expresados en partículas derivadas de fago o en proteínas multiméricas. Las proteínas multiméricas asociadas a los péptidos anti-inmunocomplejos se denominan nanopeptámeros y han permitido el desarrollo de inmunoensayos colorimétricos más sensibles que su contraparte competitiva, demostrando su eficacia en la detección de distintos herbicidas.

Con el fin de generar inmunoensayos no-competitivos más sensibles, en este trabajo se apuntó a generar nanopeptámeros acoplados a señal luminiscente. Así, se expresaron de forma recombinante quimeras compuestas por un péptido específico contra el analito atrazina (13A) en fase con la proteína verotoxina y con la enzima luminiscente NanoLuc. Alternativamente, también se expresó de forma recombinante la estreptavidina en fase con la NanoLuc para su posterior asociación con péptido 13A biotinilado. Ambas quimeras no fueron aptas para la detección de atrazina, siendo que la enzima NanoLuc no resultó compatible con el formato multimérico de dichas construcciones a la vez que el péptido recombinante 13A no demostró detectar de forma específica el inmunocomplejo (anticuerpo-atrazina).

En su lugar, se realizaron ensayos con Estreptavidina-Peroxidasa en conjunto con péptidos biotinilados y posterior detección luminiscente utilizando el sustrato comercial luminol. De esta forma, fue posible adaptar un ensayo basado en nanopeptámeros a un formato luminiscente, generando curvas de detección de atrazina de sensibilidad comparable a las previamente reportadas para otros nanopeptámeros y otros ensayos no-competitivos de detección de atrazina.

Abreviaturas

ADN Ácido desoxirribonucleico

adsorción)

BSA Bovine Serum Albumin (seroalbúmina bovina)

CDS Coding Sequence (secuencia codificante)

DO Densidad óptica

E. coli Escherichia coli

EDTA Ácido etilendiaminotetraacético

ELISA Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay (enzimoinmunoensayo de

HEK Human Embryonic Kidney Cells (células embrionarias de riñón

HisTag Cola de 6 histidinas

HRP Horseradish peroxidase (peroxidasa de rábano)

humano)

IMAC Ion Metal Affinity Chromatography (cromatografía de afinidad por

iones metálicos)

IPTG Isopropil- β -D-1-tiogalactopiranosido

Ni-NTA Nickel-Nitriloacetic Acid (níquel-ácido nitriloacético)

ON Overnight (equivale a 16-20 hs)

pvtx: péptido anti-inmunocomplejo-Verotoxina.

pvtxNLuc: péptido anti-inmunocomplejo-Verotoxina-NanoLuc.

RPM revoluciones por minuto

SDS Dodecilsulfato de sodio

SDS-PAGE Electroforesis en gel de poliacrilamida en presencia de SDS

SFB Suero fetal bovino

StrpHRP: Estreptavidina-Peroxidasa

StrpNLuc: Estreptavidina-Nanoluc

TMB 3,3',5,5'-tetrametilbencidina

URL Unidades relativas de luminiscencia

Introducción

1. Inmunoensayos

1.1. Introducción.

Los inmunoensayos comprenden un conjunto de técnicas de detección y cuantificación que comparten una característica fundamental en común; se valen del uso de anticuerpos y de la reacción antígeno-anticuerpo, siendo el antígeno en estos casos el analito a ser detectado. La capacidad de los anticuerpos para poder unirse a una gama extremadamente amplia de estructuras químicas dota a los inmunoensayos de versatilidad en cuanto a la diversidad de analitos potencialmente detectables mediante estas técnicas. La reacción antígeno-anticuerpo se caracteriza por ser de alta especificidad y por tanto el uso de estas herramientas permite que únicamente se detecte el analito deseado, aun cuando este se encuentra en muestras complejas con alta diversidad de compuestos. Por último, la unión entre un anticuerpo y su antígeno suele ser de alta afinidad y alcanzar equilibrios de reacción con constantes de disociación del orden subnanomolar. Esto hace que incluso en pequeñas cantidades de analito, la formación de inmunocomplejo pueda verse favorecida, lo que repercute en la generación de ensayos con alta sensibilidad de detección del analito (1).

Los inmunoensayos pueden clasificarse de acuerdo con distintos criterios. Según la necesidad de separar los reactivos o no, los inmunoensayos se dividen en heterogéneos y homogéneos, respectivamente. En los ensayos heterogéneos, se llevan a cabo múltiples etapas de incubación y lavado para separar entre el antígeno unido y el no unido. Por el contrario, en los ensayos homogéneos, no es necesario realizar esta separación. La actividad enzimática en la solución del ensayo depende interacción antígeno-anticuerpo, lo que permite medir directamente la señal sin pasos adicionales, simplificando el análisis (2).

Además del uso de anticuerpos, los inmunoensayos requieren de un método de generación de señal. Según el tipo de señal generada, pueden distinguirse diferentes clases de inmunoensayos. Existen diferentes etiquetas enzimáticas que, con el sustrato adecuado, generan productos de color en los llamados inmunoensayos colorimétricos o productos que emiten luz en inmunoensayos fluorescentes o luminiscentes. Dichas señales generadas pueden ser medidas fácilmente mediante equipos ópticos y electrónicos. El uso de enzimas para la generación de la señal es ampliamente utilizado en el área de inmunoensayos, y por tanto estos se denominan ensayos de ELISA por su acrónimo del inglés Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay (3).

Los inmunoensayos también se pueden clasificar según puedan o no ser llevados a cabo en el lugar de muestreo. Los ensayos denominados POC (“Point of Care”) pueden ser utilizados in-situ, siendo que requieren poca o ninguna infraestructura (4). Dentro de estos, se destacan los inmunoensayos de flujo lateral (LFIA por sus siglas en inglés), caracterizados por ser rápidos, fáciles de usar y económicos (**Figura 1**). En el ensayo, la muestra líquida se mueve a través de las líneas de prueba y control de tiras de papel bajo fuerza capilar y se desplaza hasta la almohadilla absorbente. Durante su transcurso, el flujo arrastra los reactivos de la almohadilla de conjugado y se da la reacción entre estos y el analito. En el punto de interrogación de la tira (línea de testeo), se encuentran anticuerpos inmovilizados que reaccionan con la muestra. Esto produce una señal óptica que puede interpretarse cualitativa, semicuantitativa o cuantitativamente, dependiendo de si se emplean equipos de medición y curvas con estándares de referencia (5).

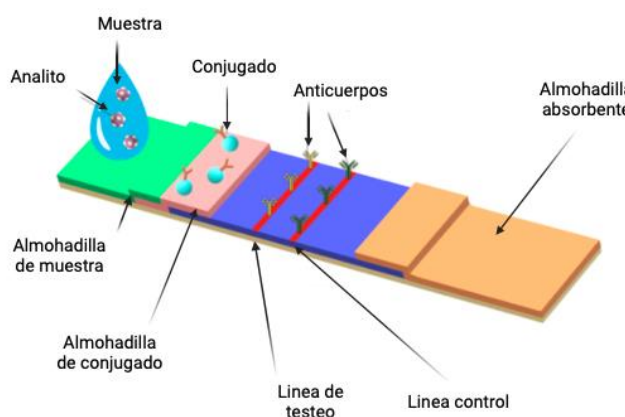


Figura 1: Esquema de un inmunoensayo de flujo lateral. Se identifican las diferentes partes constituyentes de una tira diagnóstica. La muestra con el analito se deposita en la almohadilla de muestra y recorre el resto del dispositivo por capilaridad hasta la almohadilla absorbente, arrastrando en la corrida los reactivos del ensayo. La reacción antígeno-anticuerpo se evidencia en las líneas de testeo y de control. Modificado de Omidfar et al. 2023.

1.2. Inmunoensayos competitivos y no-competitivos

Siguiendo con el punto anterior, otra forma de clasificar los inmunoensayos es según su capacidad para detectar el analito de manera competitiva o no competitiva. En los ensayos no-competitivos, también conocidos como de tipo sándwich, se utilizan dos anticuerpos anti-analito; uno es inmovilizado en el soporte sólido para ser utilizado para “capturar” el analito y el otro debe estar acoplado a una actividad enzimática para generar la señal del ensayo (**Figura 2 A**). Ambos reactivos se adicionan en exceso con el fin de favorecer las interacciones antígeno-anticuerpo y alcanzar la mayor sensibilidad posible, mientras que las cantidades residuales de los reactivos pueden ser eliminadas en las etapas de lavado. Los inmunoensayos en este formato poseen mayor sensibilidad, precisión y un mayor rango de trabajo que los competitivos gracias a la utilización de anticuerpo en exceso (6).

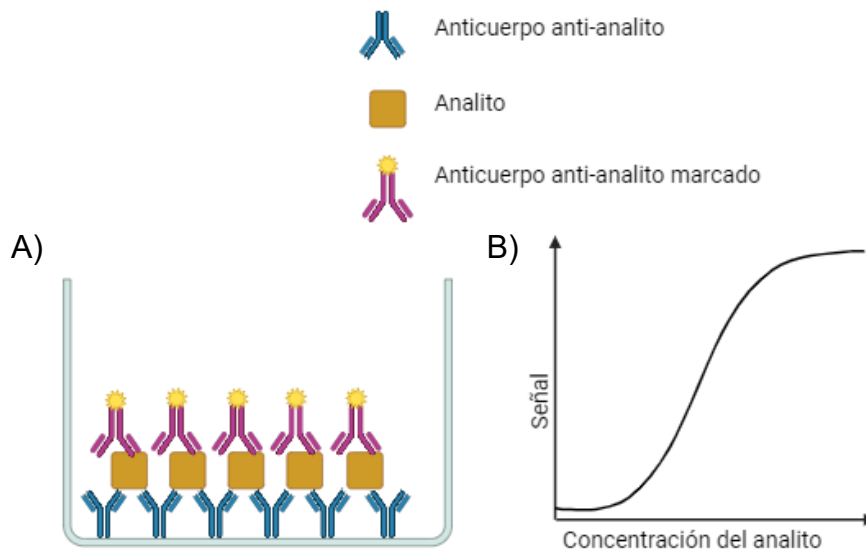


Figura 2: Esquema de un inmunoensayo no-competitivo para la detección de un analito problema. Se muestra en (A) un esquema correspondiente a un pocillo de una placa de ELISA de un ensayo no-competitivo. En (B) se enseña una curva típica de detección del analito, denominada comúnmente como curva “dosis- respuesta”.

En cuanto a la señal generada por el anticuerpo marcado, esta será proporcional a la cantidad de analito en la muestra, mostrando una curva típica de “dosis-respuesta” (**Figura 2 B**). En esta curva, en ausencia del analito existirán nulas o bajas señales, mientras que a concentraciones elevadas existirán altas señales en el ensayo (1). Los ensayos no competitivos son montables únicamente si el antígeno posee más de un epítoto, separados lo suficientemente entre sí para unir dos anticuerpos en simultaneo y por ello no es posible montarlo para analitos de bajo peso molecular.

Los analitos de bajo peso molecular, incluyen pesticidas, herbicidas, toxinas, drogas de abuso, fármacos, hormonas, entre otros. Su monitoreo es de gran relevancia tanto a nivel del ambiente como en la salud por lo que contar con técnicas analíticas de gran sensibilidad resulta de gran importancia. Las técnicas analíticas de referencia para la detección e identificación de estas moléculas suelen incluir el uso de cromatografía y espectrometría de masas. Estas técnicas tienen las principales desventajas de requerir costosos equipamientos y personal especializado para su manejo. Alternativamente, los inmunoensayos permiten montar técnicas de monitoreo de pequeños analitos, que, si bien no alcanzan la precisión de las técnicas instrumentales, son más simples en cuanto a su equipamiento y metodología a la vez que pueden ser muy sensibles y robustos (7). La inmunodetección de analitos de bajo peso molecular, denominados comúnmente como haptenos, se realiza generalmente por inmunoensayos competitivos. El formato competitivo puede realizarse de dos maneras, una implica la inmovilización en la fase sólida de una molécula análoga al analito conjugada a una proteína inerte y la otra la inmovilización del anticuerpo anti-analito sobre la fase sólida (**Figura 3**). En el primer caso, la unión del anticuerpo al analito inmovilizado genera la señal del ensayo y la misma puede verse disminuida por competencia cuando el analito problema está presente en la muestra (**Figura 3 A**). En segundo caso, un análogo del analito marcado

enzimáticamente, encargado de la señal, compite en solución con el analito por unirse al anticuerpo inmovilizado (**Figura 3 B**).

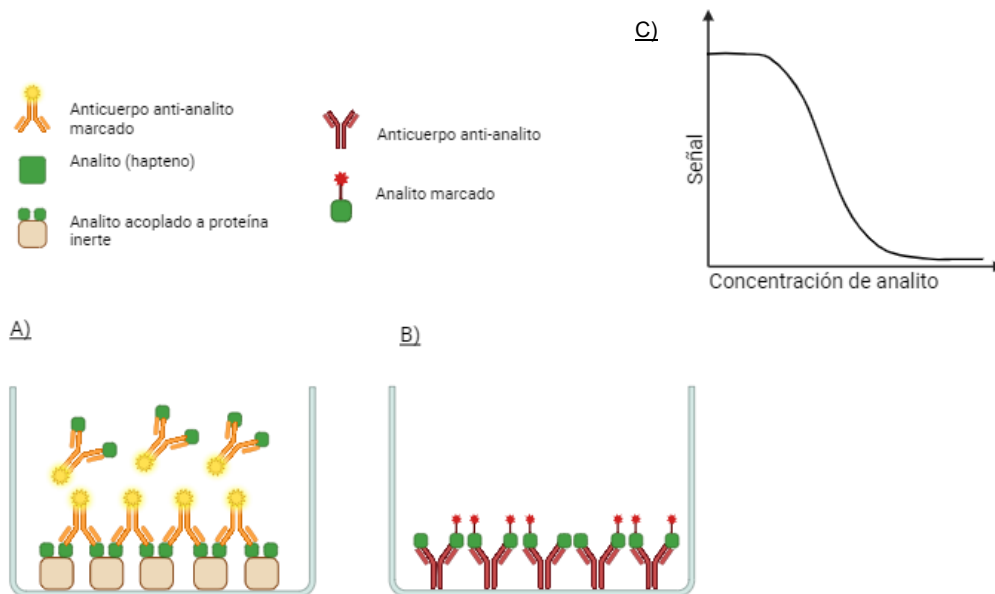


Figura 3: Esquemas de inmunoensayos competitivos para la detección de analitos de bajo peso molecular. Se esquematizan dos formatos de inmunoensayos competitivos. En un ejemplo el analito de la muestra problema compite con un análogo del analito inmovilizado en el pocillo por unirse a los sitios de unión del anticuerpo, el cual está encargado de generar la señal del ensayo (A). En el segundo ejemplo, el analito compite con el análogo del analito en solución por unirse a los sitios de unión del anticuerpo inmovilizado en el pocillo. La señal de este ensayo estará guiada por el análogo del analito (B). En las curvas de detección generadas por estos inmunoensayos, la señal generada es inversamente proporcional a la concentración del analito en la muestra (C).

En ambos la formación del inmunocomplejo entre el analito de la muestra problema y el anticuerpo se cuantifica de forma indirecta; los sitios no ocupados por analito de la muestra son ocupados por el analito marcado o por el analito inmovilizado. De esta forma, la señal en estos ensayos varía de forma inversamente proporcional a la cantidad de analito en la muestra (1).

Si bien los inmunoensayos competitivos son ampliamente utilizados, presentan sensibilidad limitada dado que la cantidad de anticuerpo en el ensayo debe ser ajustada y no puede usarse en exceso, y esto naturalmente desfavorece la reacción antígeno-anticuerpo. Por ello, se ha incursionado en diversas estrategias para obtener ensayos no competitivos para haptenos con el fin de mejorar la sensibilidad de detección de este tipo de analitos.

1.3. Detección de haptenos mediante inmunoensayos no-competitivos

Un formato no-competitivo implica el uso de anticuerpos anti-inmunocomplejos (**Figura 4**). En este tipo de ensayos se utilizan dos anticuerpos, el primero reconoce el hapteno, y el siguiente (anti-inmunocomplejos) reconoce los cambios en la región del paratópe del primer anticuerpo, lo que permite distinguir entre la estructura del anticuerpo con o sin hapteno (8,9).

La aplicación de este tipo de sistemas condujo a mejores parámetros de sensibilidad, especificidad, precisión y velocidad (8,10). Sin embargo, los anticuerpos anti-inmunocomplejos son difíciles de obtener por inmunización y suelen tener especificidad por el sitio libre del anticuerpo anti-hapteno, lo que genera alta señal ruido en los inmunoensayos (11).

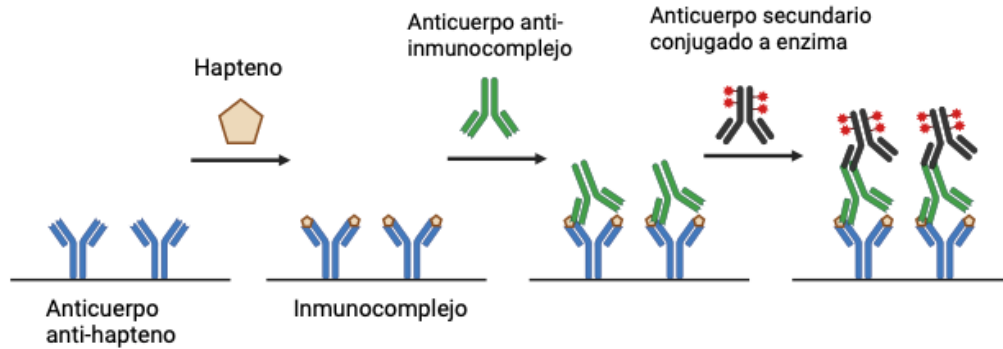


Figura 4: Inmunoensayo no-competitivo para la detección de haptenos utilizando anticuerpos anti-inmunocomplejos. Se esquematiza la reacción de los anticuerpos y el analito en un pocillo de ELISA. Las flechas indican las diferentes etapas del inmunoensayo. Adaptado de Liu et al. 2018

Otro formato no-competitivo es el denominado "Open Sandwich". Fue propuesto por primera vez por Ueda et al. 1996 (12) y se basa en que la presencia del analito favorece la asociación entre el fragmento variable de la cadena pesada (VH) y el fragmento variable de la cadena liviana (VL) (**Figura 5**). De forma general, se sensibiliza la placa con uno de los fragmentos (VH o VL), y luego se agrega la muestra con el analito en conjunto con el otro fragmento conjugado a una enzima. Luego de que se da la reacción enzimática, la medición de la señal generada será proporcional a la cantidad de analito en la muestra.

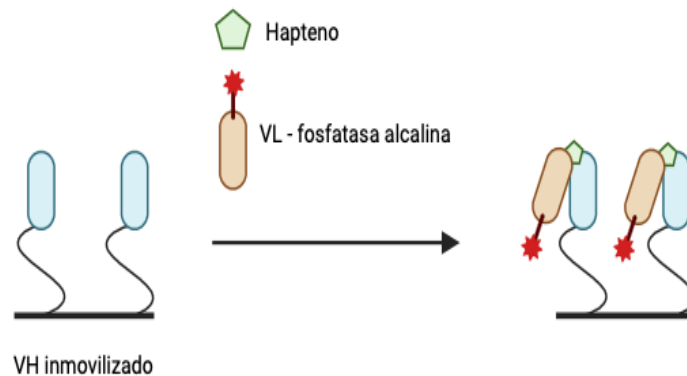


Figura 5. Inmunoensayo no-competitivo "Open Sandwich" para la detección de haptenos.

Cuando el analito está presente, se promueve la unión entre el fragmento de cadena pesada inmovilizado en el pocillo (VH inmovilizado) y el fragmento de cadena liviana en solución acoplado a la señal (VL-fosfatasa alcalina). Esta interacción permite la generación de una señal detectable en el ensayo. Adaptado de Liu et al. 2018.

Desde el desarrollo de este método, han surgido varios estudios que detectan contaminantes de bajo peso molecular en alimentos y productos agrícolas, como gonyautoxinas (13), micotoxinas (14), estradiol (15), benzaldehído (16) en los que se obtienen altos niveles de sensibilidad, incluso mejores que los reportados para su respectivo formato competitivo.

Más recientemente, Ueda y colaboradores reportaron otro tipo de inmunoensayo con un reactivo denominado Quenchbody o Q-body (17). El mecanismo de detección implica el uso de fragmentos de anticuerpo (regiones variables de cadena única o fragmentos Fab) marcados con un fluoróforo en su extremo N-terminal a través de un péptido linker de longitud variable. Las características hidrofóbicas de la marca fluorescente hacen que esta se una a la región N-terminal e interactúe con los residuos de las regiones variables del anticuerpo. En estas regiones hay residuos de triptófano conservados que debilitan la fluorescencia por quenching del fluoróforo, sin embargo, cuando el anticuerpo se une a su antígeno, el fluoróforo se libera del sitio de unión y recupera su capacidad para emitir fluorescencia (**Figura 6**) (17–19).

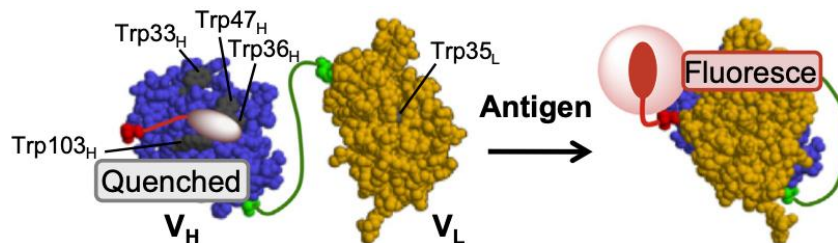


Figura 6: Inmunoensayo no-competitivo utilizando “Quenchbody” para la detección de haptenos. El Quenchbody consiste en un fragmento de anticuerpo con un fluoróforo acoplado en su extremo N-terminal. Cuando el analito no está presente en la muestra la señal del fluoróforo se apaga por quenching de triptófanos ubicados en el sitio de unión de anticuerpo. Cuando el anticuerpo se une a su analito, el fluoróforo se libera emitiendo señal de fluorescencia. Extraído de Abe et al. 2011.

Dentro del grupo de Inmunoquímica de la Cátedra de Inmunología se ha explorado una alternativa de inmunoensayos no-competitivos para haptenos basada en el uso de péptidos anti-inmunocomplejos. Estos péptidos, consisten en secuencias cortas (entre 8 y 11 aminoácidos) y cíclicas (cerrados por un puente disulfuro formado por dos cisteínas) y son seleccionados por la técnica *Phage display* desde bibliotecas de fagos por su reactividad específica contra el inmunocomplejo anticuerpo-analito (20). Los fagos, que expresan el péptido en múltiples copias son usados directamente como reactivos del ensayo no-competitivo, el cual fue denominado PHAIA (phage anti-immunocomplex assay). Brevemente, los fagos son utilizados como reactivos para reaccionar con el inmunocomplejo formado en la fase sólida de la placa de ELISA y luego los fagos unidos son detectados con un anticuerpo anti-fago conjugado a peroxidasa de rábano (HRP) (**Figura 7**).

Los ensayos en formato PHAIA han permitido obtener ensayos 10 veces más sensibles que su contraparte competitiva. Esto ha sido demostrado para la detección de pesticidas como molinato, clomazone y atrazina. En el caso de la atrazina, analito de interés en el presente trabajo, se ha montado un ensayo con un anticuerpo monoclonal K4E7 (AcMoK4E7) reportado previamente (21), y la identificación de un péptido denominado 13A que ha permitido la detección del analito con valor de sensibilidad SC50 de $0,051 \pm 0,002$ ng/mL.

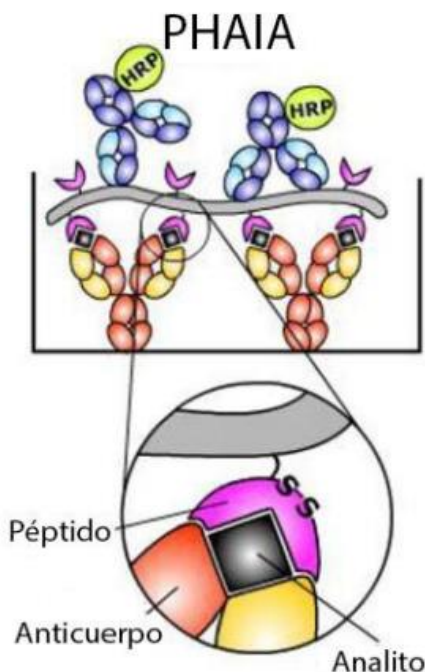


Figura 7: Inmunoensayo no-competitivo para la detección de haptenos utilizando el formato PHAIA. Se esquematiza un pocillo proveniente de una placa de ELISA, en donde el anticuerpo sensibilizado reconoce el analito en solución y a su vez, el inmunocomplejo formado es reconocido por los péptidos anti-inmunocomplejos expresados de forma multimérica en fagos. La señal en el ensayo deriva de anticuerpos anti-fago conjugados a peroxidasa (HRP). Adaptado de Gonzalez-Techera et al. 2007.

A pesar del enorme potencial de los ensayos PHAIA, el uso de fagos como reactivos resultó ser de por sí una desventaja para este formato. Por su naturaleza biológica, los fagos no son reactivos convencionales a introducir en la fabricación de kits diagnósticos en la industria por su capacidad de infectar cepas de *E. coli*. Su uso puede ser limitado por problemas de bioseguridad en algunos laboratorios, y por la dificultad de realizar su transporte entre fronteras. Alternativamente, el grupo apuntó a desarrollar ensayos independientes de fagos, generando nuevos reactivos en los que los péptidos anti-inmunocomplejos estuvieran expresados en otras construcciones. Para lograr esta independencia viral, los nuevos reactivos debían cumplir con dos condiciones: 1) Que el péptido pudiera presentarse en formato multimérico y 2) que el reactivo estuviera asociado a una actividad enzimática para generar la señal del ensayo.

Fue así como se originó el concepto de nanopeptámeros, definido por la construcción de proteínas homomultiméricas asociadas a péptidos anti-inmunocomplejos, de forma tal que estos se presentasen al medio en carácter multivalente para promover reacciones de alta avidéz con el inmunocomplejo del ensayo. En la elección de las proteínas utilizadas como *scaffold* debía considerarse su factibilidad de producción en estos cultivos por sus niveles de expresión y bajos niveles de toxicidad en las células huésped. Además, debían de ser estables y exponer al solvente alguno de sus extremos N o C-terminales para poder exponer los péptidos fusionados de forma adecuada (22). Inicialmente se desarrollaron nanopeptámeros basados en la proteína tetramérica estreptavidina y asociada a péptidos biotinilados a través de sus cuatro sitios de unión de alta afinidad a biotina (**Figura 8**) (23) La estreptavidina es una proteína termoestable, resistente al pH extremo, a los agentes desnaturizantes y a la degradación enzimática, características que son importantes para su aplicación en diferentes condiciones experimentales (24). La interacción entre la molécula biotina y estreptavidina o proteínas similares se utiliza en numerosas aplicaciones químicas y biológicas (25) incluyendo el desarrollo de inmunoensayos (26–28). El primer inmunoensayo no-competitivo basado en nanopeptámero empleó un reactivo de estreptavidina comercial conjugado a HRP, y permitió la detección del herbicida molinato con una sensibilidad similar a la obtenida en el PHAIA. (23).

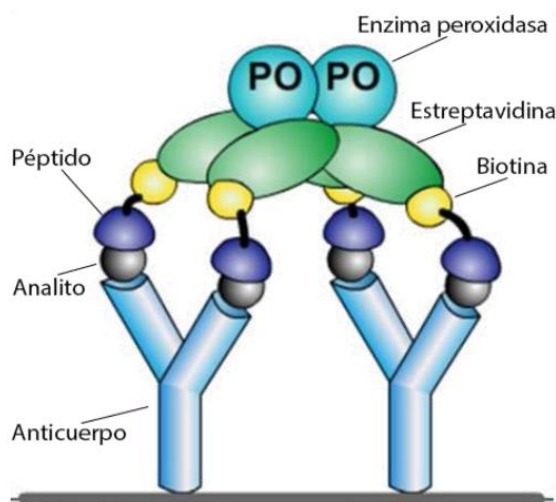


Figura 8: Esquema de ensayo no competitivo basado en nanopeptámeros de Estreptavidina para la detección de haptenos. Se esquematiza un pocillo proveniente de una placa de ELISA en donde el anticuerpo sensibilizado reconoce el analito en solución. La detección del inmunocomplejo se realiza mediante péptidos anti-inmunocomplejos biotinilados asociados a estreptavidina-peroxidasa. Adaptado de Vanrell et al. 2013.

Posteriormente, considerando que la estreptavidina cumplía con los requisitos para ser un *scaffold* recombinante, se expresó en *E. coli* con péptidos para la detección de clomazone. De la misma forma, estas construcciones permitieron desarrollar inmunoensayos con una sensibilidad comparable al PHAIA (29)

Alternativamente, se propuso la introducción de la proteína verotoxina, la cual consiste una toxina expresada naturalmente por algunas bacterias, incluyendo algunas cepas de *E. coli*. Su estructura consta de dos subunidades A y B, unidas de forma no covalente. Mientras que la subunidad A representa la fracción tóxica

de la proteína, la subunidad B media la unión de la toxina con las membranas celulares del huésped. Dicha subunidad B consiste en un pentámero en forma de anillo de 38.5 kDa, conformado por 5 monómeros idénticos de 7.7 kDa (30,31). En esta estructura, los extremos N-terminal y C-terminal se encuentran expuestos al solvente (32). La expresión de las quimeras compuestas por verotoxina-péptido resultó más sencilla que la de estreptavidina-péptido, dado que su expresión no fue tóxica para la bacteria y no se debieron realizar pasos de solubilización de cuerpos de inclusión y posterior renaturalización de la proteína. Además, los rendimientos de producción fueron más altos para estas quimeras, y luego de conjugadas a HRP, se utilizaron como reactivo en ensayos para la detección sensible de los analitos clomazone y molinato (33).

Hasta ahora los ensayos utilizando nanopeptámeros han sido realizados en formato de detección colorimétrico. Sin embargo, en este trabajo se propone explorar la adaptación de los nanopeptámeros en formatos de detección luminiscente, dado que el grupo viene trabajando en este tipo de formato como alternativa más sensible que la detección colorimétrica (34,35).

2. *Luminiscencia*

2.1. **Introducción**

Se denomina quimioluminiscencia (CL) a la producción de radiación electromagnética en forma de luz (sea ultravioleta, visible o infrarroja) emitida directa o indirectamente a partir de reacciones químicas. Si estas reacciones son desencadenadas por una actividad enzimática y/u ocurre dentro de un organismo vivo, la emisión de luz se conoce como bioluminiscencia (BL) (36).

La generación de luz se produce a partir de la oxidación de ciertos sustratos, que por su capacidad de emitir energía en forma de luz se denominan luciferinas (termino derivado de la palabra “Lucifer”, que viene del latín y significa “portador de luz”), mientras que las enzimas que catalizan la reacción se denominan luciferasas (37). Una notable diversidad de organismos es capaz de producir su propia luz, desde bacterias y protistas hasta calamares y peces, con numerosos filos intermedios. No existe un único sistema luciferina-luciferasa. Si bien las luciferinas están altamente conservadas en los filos, las luciferasas derivan de muchos linajes evolutivos, por lo que existe una mayor diversidad de estas últimas (38,39).

2.2. **Aplicaciones**

En el área de inmunoensayos, las técnicas de emisión de luminiscencia se caracterizan por poseer ciertas ventajas sobre las técnicas convencionales basadas en medición de absorbancia. Consisten en técnicas más sensibles debido a que la luz detectada proviene únicamente de las moléculas luminiscentes, a diferencia de las señales de fondo que típicamente afectan a las técnicas de absorbancia. Esta técnica no depende de la absorción de luz, por lo que evita interferencias provocadas por matrices con alta absorción de luz, mejorando la sensibilidad. Además, la sensibilidad puede ser optimizada

sencillamente al aumentar la velocidad de reacción de la enzima mediante ajustes en las concentraciones de los reactivos, incluyendo la enzima (36).

A pesar de las ventajas mencionada, hay algunas limitantes que deben ser consideradas al momento de utilizar técnicas luminiscentes. Por ejemplo, es importante realizar un estricto control de condiciones como temperatura, pH, fuerza iónica, para lograr señales reproducibles inter-ensayos, las cuales tienden a ser muy variables con pequeños cambios ocurridos en las condiciones de trabajo. El tiempo al cual se realizan las mediciones debe ser estandarizado debido a que la intensidad de luz emitida no es constante. Dicho transcurso temporal es propio para cada enzima, pero a modo general se caracteriza por un aumento de la señal después de la mezcla del reactivo, alcanza un máximo y luego disminuye a la línea de base (36). Diferentes sistemas luciferina-luciferasa han sido utilizados más comúnmente como reporteros para marcajes intracelulares y seguimiento de procesos metabólicos, vías de secreción o (40,41) interacciones entre proteínas (42).

Vista la aplicación de las luciferasas, trabajos posteriores apuntaron a identificar o mejorar nuevas variantes de Luciferasas con mayor estabilidad de luminiscencia (43–46). En este sentido estas deben ser preferentemente pequeñas, monoméricas, estructuralmente estables y emitir una alta señal luminiscente sostenida en el tiempo y de baja señal de fondo (47). Con el fin de generar un sistema luciferina-luciferasa que cumpla con dichas características, Hall y colaboradores desarrollaron un sistema nuevo, partiendo de la luciferasa del camarón de aguas profundas, *Oplophorus* (47). Esta enzima es secretada por el camarón en nubes luminosas como un mecanismo de defensa contra la depredación. Al igual que muchas luciferasas marinas, utiliza coelenteracina en una reacción independiente de ATP para producir luz azul (máximo espectral 454 nm). La enzima nativa es estructuralmente estable con una alta actividad específica y rendimiento cuántico (48). Su estructura consta de un heterotetrámero en donde dos subunidades tienen un tamaño de 35 kDa y dos subunidades de 19 kDa. Sin embargo, la actividad bioluminiscente se asocia solo con la subunidad más pequeña (Oluc-19). Desafortunadamente, la subunidad expresada de forma recombinante no conserva muchas de las características deseables evidentes en la enzima nativa, ya que es inestable y se expresa mal en ausencia de la subunidad de 35 kDa (47). Para generar una variante de Oluc-19 que sobrepase dichas limitantes, se realizó una optimización estructural por mutagénesis aleatoria y se logró generar una variante de Oluc-19 llamada NanoLuc (Nluc), también de 19 kDa y capaz de producirse de forma recombinante y con el potencial de emitir alta señal luminiscente y sostenida en el tiempo.

Esta enzima reacciona con el sustrato original coelenteracina, pero también puede reaccionar con un nuevo sustrato llamado furimazina, el cual produce una intensidad de luz superior, es más estable y posee menor autoluminiscencia de fondo (**Figura 9**).

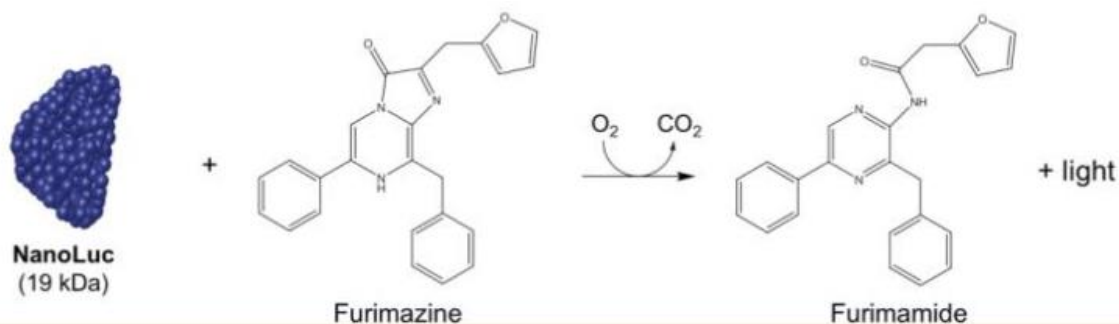


Figura 9: Esquema del sistema luciferina-luciferasa compuesto por la enzima luciferasa NanoLuc y el sustrato luciferina furimazina. Dicha reacción ocurre en presencia de O_2 y permite la emisión de luz. Extraído de England et al. 2016.

La enzima Nluc ha sido utilizada en diversas aplicaciones, incluyendo inmunoensayos convencionales (49) e inmunoensayos en los que se utiliza la enzima dividida en dos subpartes (Split-Nluc) (50). Actualmente hay varios inmunoensayos con Nluc que reportan mayores niveles de sensibilidad que la contraparte colorimétrica (51–53) e incluso mayores que ensayos luminiscentes basados en otras enzimas (54).

Recientemente en la Cátedra de inmunología del Departamento de Biociencias, el grupo de Inmunoquímica desarrolló un inmunoensayo luminiscente para la detección altamente sensible de la proteína de la nucleocápside del virus SARS-CoV-2, en donde se utiliza la enzima Nluc (34). Además, actualmente el grupo cuenta con otros trabajos en marcha en los que se utiliza Nluc; el trabajo enmarcado en el proyecto de maestría de la Lic. Paula Segovia enfocado en la detección de IgE en suero y el practicantado de finalización de la carrera en Química farmacéutica del Quim. Gonzalo Menafría enfocado en la detección de Microcistinas en aguas de embalse.

Vista su aplicación en inmunoensayos en diferentes formatos, dentro de los objetivos de este trabajo se incluyó la incorporación de esta enzima para su uso en inmunoensayos luminiscentes. En particular, es de interés generar inmunoensayos basados en nanopéptidos para la detección no-competitiva del herbicida atrazina, en donde los nanopéptidos se encuentren fusionados a la enzima Nluc.

A su vez, se apuntó a comparar el sistema novedoso de luminiscencia de Nluc con uno de uso más convencional basado en el compuesto luminol y la enzima HRP (55–58). El luminol es una diacilhidrazida cíclica y es uno de los compuestos quimioluminiscentes más utilizados debido a su disponibilidad y bajo costo (59). Tanto el luminol como compuestos derivados del mismo son co-sustratos de la HRP, mediante la cual son oxidados en presencia de un oxidante adecuado, como el peróxido de hidrógeno o el perborato de sodio. Cuando el luminol es oxidado emite luminiscencia a $425\text{ nm } \lambda_{\text{max}}$.

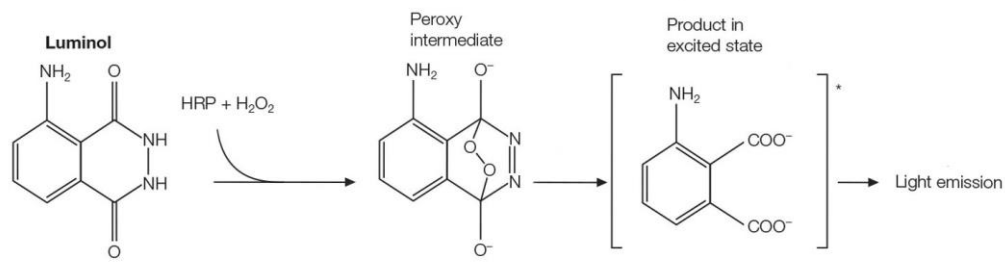


Figura 10: Reacción de oxidación del luminol catalizada por la enzima peroxidasa (HRP). En presencia de peróxido de hidrógeno, se genera un producto en estado excitado, que permite la emisión de luz al relajarse al estado fundamental. Extraído de www.bio-rad.com.

La intensidad de luz es proporcional a la actividad de la peroxidasa, y en tanto a la cantidad de esta en el ensayo (59,60). Este sistema permite la adaptación de un ensayo colorimétrico que utilice el marcaje enzimático HRP a un ensayo luminiscente, simplemente sustituyendo el sustrato colorimétrico por el sustrato luminol en el revelado del ensayo. Este tipo de transferencia a luminiscencia ya ha permitido generar ensayos más sensibles y de mayor rango lineal que los realizados con sustrato colorimétrico (61–63).

Objetivos

Objetivo general

Explorar el uso de la enzima NLuc en inmunoensayos no-competitivos para la detección del herbicida atrazina como analito modelo.

Objetivos específicos

- A. Desarrollar inmunoensayos basados en el nanopeptámero recombinante **Péptido-verotoxina-Nluc (pvtxNluc)** (Figura 12 A).
- B. Desarrollar inmunoensayos basados en la asociación de **péptidos sintéticos biotinilados** con la quimera **Estreptavidina-Nluc recombinante (StrpNluc)** (Figura 12 B).
- C. Desarrollar inmunoensayos no-competitivos utilizando **Estreptavidina-HRP (StrpHRP)** comercial y revelado convencional luminiscente (Figura 12 B).

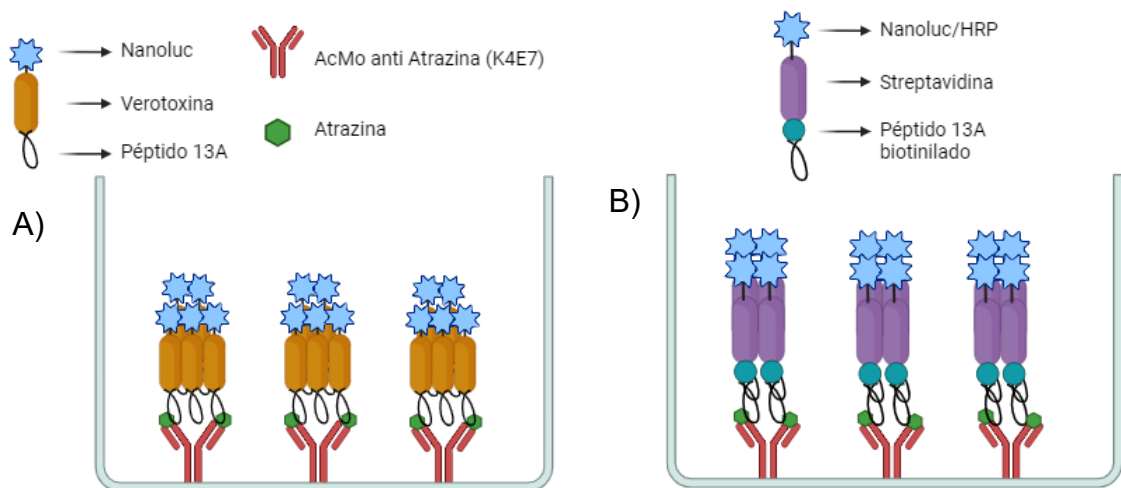


Figura 11: Esquemas de ensayos luminiscentes no-competitivos basados en nanopeptámeros para detección de atrazina. El primer inmunoensayo a desarrollar en este trabajo implicó el uso de pvtxNluc, capaz de reconocer el inmunocomplejo AcMoK4E7-atrazina (A). El segundo y tercer inmunoensayo consistió en utilizar StrpNluc o StrpHRP con péptido 13A biotinilado (B).

Materiales

Buffers y soluciones

Las soluciones fueron preparadas en agua destilada a no ser que se indique lo contrario.

Buffer fosfato salino (PBS) 1X: NaCl 137 mM, KCl 2.7 mM, KH₂PO₄ 2 mM, Na₂HPO₄ 10 mM, pH 7.4

Sustrato para peroxidasa colorimétrico: TMB 0.096 mg/mL y H₂O₂ 0.004% en buffer acetato 100 mM, pH 5.5

Sustrato para peroxidasa luminiscente (“Sustrato luminol”): SuperSignal™ ELISA Femto Substrate (Thermo Scientific #37075)

Sustrato luminiscente para NLuc: Hidrofurimazina 2,5 μM en buffer NLuc.

Atrazina: Se utiliza un stock 1mg/mL preparado en DMSO

Hidrofurimazina stock: 10 mM Hidrofurimazina (Glpbio Technology, #GC62523) en DMSO.

Buffer NLuc: PBS, tritón 1% x-100, 0,25mg/mL BSA, 8,8 mM EDTA, pH 8.

Buffer TES: 0,2 M Tris-HCl, 0,5 mM EDTA, 0,5 M Sacarosa, pH 8.

Soluciones para SDS-PAGE:

- **Buffer de carga 6X:** Tris-HCl 0.35 M, SDS 10% m/v, glicerol 30% v/v, azul de bromofenol 175 μM, DTT 0.1 M
- **Buffer de corrida 1X:** Tris 25 mM, glicina 192 mM, SDS 0.1% m/v
- **Solución colorante:** azul de Coomassie R-250 1 g/L, ácido acético 7.5% v/v, metanol 5% v/v
- **Solución decolorante:** ácido acético 7.5% v/v, metanol 5% v/v

Buffer Tris-Acetato-EDTA (TAE) 1X: Tris 40 mM, ácido acético 20 mM, EDTA 1 mM en agua mili-Q, pH 8.

Soluciones para cromatografía de afinidad por metales inmovilizados (IMAC):

- **Buffer de unión (buffer A):** NaH₂PO₄ 50 mM, NaCl 500 mM, imidazol 20 mM, pH 8.0, filtrado (tamaño de poro de 0.22 μm)
- **Buffer de elución (buffer B):** NaH₂PO₄ 50 mM, NaCl 500 mM, imidazol 300 mM, pH 8.0, filtrado 0.22 μm

Soluciones para cromatografía de afinidad por Strep-Tactin (IBA Lifesciences):

- **Buffer de unión:** Tris 100 mM, NaCl 150 mM, EDTA 10 mM, pH 8.0, filtrado (0.22 μ m)
- **Buffer de elución:** buffer BXT (IBA-Lifesciences #2-1042-025) 1/10: Tris 100 mM, NaCl 150 mM, EDTA 10 mM, biotina 50 mM, pH 8.0, filtrado (0.22 μ m)

Medios de cultivo para bacterias

Los medios fueron preparados en agua destilada a no ser que se indique lo contrario.

- **Caldo de lisogenia (LB, Sigma-Aldrich #L3522):** NaCl 10 g/L, triptona 10 g/L, extracto de levadura 5 g/L
- **LB-agar (Sigma-Aldrich #L3147):** agar 15 g/L, NaCl 10 g/L, triptona 10 g/L, extracto de levadura 5 g/L
- **Super Optimal Broth with Catabolite Repression (SOC):** triptona 20 g/L (Sigma-Aldrich), extracto de levadura 5 g/L (Sigma-Aldrich), NaCl 0.5 g/L en agua mili-Q, pH 7.0. Luego de autoclavar se agrega MgCl₂ y glucosa a concentración final 10 mM y 20 mM respectivamente, a partir de soluciones stock esterilizadas por filtración.
- **Terrific Caldo (TB Sigma-Aldrich #T0918):** Extracto de Levadura 24 g/L, Triptona 12 g/L, K₂HPO₄ 9.4 g/L, KH₂PO₄ 2.2 g/L

Cultivo de línea celular HEK293-T

- **DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium) completo:** DMEM c/ glucosa 4,5 mg/mL (Capricorn #DMEM-HA), SFB 10% v/v (esterilizado por filtración, inactivado), antibiótico-antimicótico 1X (penicilina G, estreptomycin y anfotericina B, Gibco #15240-062)
- PBS 1X estéril (Capricorn #PBS-1A)
- Tripsina 12 mg/mL en PBS 1X suplementado con EDTA 60 μ M, esterilizada por filtración

Métodos

0. Métodos generales

Cultivo de *E. coli*

Cepas

Se utilizaron dos cepas de *E. coli*. La cepa *E. coli* DH5 α se utilizó para los clonados y amplificación de ADN plasmídicos y la cepa *E. coli* BI21 (DE3) se utilizó para realizar la expresión de proteínas recombinantes.

Cultivos crecidos durante la noche (ON)

Se inoculó una colonia por matraz de vidrio previamente esterilizado conteniendo 4-6 mL de medio de cultivo. Se suplementó con el antibiótico adecuado y para los casos de expresión de proteínas recombinantes se adicionó 1/10 de Glucosa al 40%.

Las concentraciones finales de antibióticos utilizados para suplementar los medios de cultivo y placas de agar fueron 100 $\mu\text{g/mL}$ para ampicilina y 50 $\mu\text{g/mL}$ para kanamicina.

Transformación de *E. coli* mediante electroporación

Se incubaron entre 30-50 μL de células electrocompetentes con 1 μL de ADN plasmídico durante 30-60 segundos en hielo; la mezcla fue luego transferida a cubeta de electroporación estéril de 2 mm (Sigma-Aldrich) y se realizó la electroporación mediante pulso eléctrico de 2.5 kV con el equipo MicroPulserTM (BIO-RAD).

Inmediatamente después de electroporar, se recuperaron las células de la celda mediante adición de medio SOC pre-incubado a 37°C. Las células resuspendidas se transfirieron a un tubo de polipropileno (Deltalab #401402) y se incubaron a 37°C y 250 RPM por 45-60 minutos. Finalmente fueron plaqueadas en placas con LB-agar suplementado con antibiótico correspondiente e incubadas a 37°C ON.

Extracción y purificación de ADN plasmídico

La extracción de ADN plasmídico se llevó a cabo a partir de células transformadas y crecidas ON en cultivos de 5 mL, utilizando el kit comercial QIAprep Spin Miniprep (QIAGEN #27104).

Técnicas de clonado de ADN

Digestión y purificación de ADN digerido

Las digestiones de ADN plasmídico con enzimas de restricción se realizaron utilizando 5 Unidades de enzima por cada 1 µg de ADN, en el buffer comercial sugerido por el fabricante. Para el volumen final de cada reacción se consideró mantener una concentración final de glicerol (proveniente de la enzima) menor al 5% v/v. El tiempo y temperatura de digestión, así como la inactivación, se realizaron acorde a las recomendaciones del fabricantes.

Para purificar fragmentos de ADN plasmídico digerido, se realizaron electroforesis en gel de agarosa 1%, se aisló el fragmento de ADN de interés mediante corte del gel con bisturí, y luego se purificó utilizando el kit comercial GeneJET Gel Extraction Kit (Thermo Scientific #K0691).

Desfosforilación y ligación

La desfosforilación de los vectores digeridos previo a la ligación se llevó a cabo mediante incubación con rSAP (fosfatasa alcalina recombinante de camarón, NEB #M0371S). Se siguieron las instrucciones del fabricante respecto a la incubación, inactivación y cantidad de enzima, así como cantidad de vector.

Tabla 1: Condiciones de desfosforilación. Para mayor/menor cantidad de ADN se escaló la cantidad de rSAP de forma proporcional

ADN	1 picomol de extremos*
Buffer CutSmart 10X	Para concentración final 1X
rSAP	1 unidad
Incubación	30 min, 37°C
Inactivación	5 min, 65°C

**Siguiendo las recomendaciones del fabricante, 1 picomol de extremos es equivalente a 1 µg de un plásmido linealizado de 3 kb*

La ligación se realizó mediante incubación del vector digerido con el inserto y la enzima T4 ligasa (Thermo Scientific). Se siguieron las instrucciones del fabricante, con la salvedad de aumentar el tiempo de incubación para lograr mayor eficiencia de ligación.

Tabla 2: Condiciones de ligación

Vector linealizado	20-100 ng
Inserto	Relación 3:1-7:1 inserto: vector (en moles)
Buffer T4 10X	Para concentración final 1X
T4 ligasa	1 unidad
Incubación	30-60 min, 22°C
Inactivación	5 min, 65°C

Análisis de ADN

Electroforesis en gel de agarosa

Los geles se prepararon con una concentración de agarosa de 1% m/v en buffer TAE 1X. Para el pre-teñido, se utilizó agente intercalante GelRed (Millipore #SCT122), stock 10000X. A las muestras se les agregó la cantidad correspondiente de buffer de carga 6X (Thermo Scientific #R0611) antes de ser cargadas en el gel. Se utilizó el MPM GeneRuler DNA Ladder Mix (Thermo Scientific #SM1331).

Secuenciación y análisis de secuencias

Los vectores construidos fueron secuenciados por la empresa MacroGen (Korea). Se analizaron los resultados con SnapGene Viewer.

Cuantificación de ADN y proteínas

Para cuantificar ADN y proteínas se midió absorbancia a 260 y 280 nm respectivamente, utilizando el equipo NanoDrop 1000 Spectrophotometer (Thermo Scientific).

Análisis de proteínas

Electroforesis SDS-PAGE

Para evaluar las fracciones solubles e insolubles provenientes de pruebas de expresión en *E. coli* y procesos de purificación de diferentes proteínas se realizaron electroforesis en gel de poliacrilamida 12.5-15%, en condiciones reductoras y en presencia de dodecilsulfato de sodio (SDS). Previo a ser cargadas al gel, las muestras se incubaron con buffer de carga a 100°C por 5 minutos, salvo que se indique lo contrario. Se utilizaron los marcadores de peso molecular Pierce Unstained Protein MW Marker (Thermo Scientific #26610) y PAGE-MASTER Protein Standard (GenScript #M00516). Los geles se tiñeron con solución colorante conteniendo azul de Coomassie y destiñeron con solución conteniendo metanol y ácido acético.

Técnicas de cultivo celular

Cultivo y pasaje de HEK293-T

Todos los cultivos se incubaron a 37°C en estufa de CO₂ (%CO₂ = 5%). La manipulación de los cultivos y preparación de medios de cultivo y suplementos se realizó en cabina de flujo vertical previamente esterilizada por UV (15 min).

A partir de alícuotas de células a -80°C conteniendo DMSO (dimetilsulfóxido) como criopreservante se realizaron cultivos iniciales. Las alícuotas fueron descongeladas a 37°C e inmediatamente transferidas a un tubo Falcon conteniendo 10 mL de DMEM completo precalentado a 37°C. Esto se centrifugó a 300 g por 5 minutos a 20°C, se descartó el medio y las células se

resuspendieron en 5 mL de DMEM completo para ser sembradas en una botella de cultivo T25 (Greiner). A partir de estos cultivos se realizaron pasajes a botellas T75 (Greiner, volumen final 15 mL de medio de cultivo), y a partir de estas últimas a botellas T125 (Greiner, volumen final 30 mL de medio de cultivo).

Para realizar pasajes diarios se descartó el medio de cultivo de la botella y las células se lavaron con adición de 1/2 volumen (un volumen equivale a la cantidad final de medio de cultivo por botella) de PBS 1X estéril (Capricorn #PBS-1A) precalentado a 37°C. Luego, para desprender a las células del fondo de la botella, se adicionó 1/10 volumen de solución de tripsina precalentada a 37°C y se incubó la botella en estufa por 3 minutos. Se adicionó inmediatamente la cantidad de DMEM completo necesaria para llegar a volumen final de la botella para la resuspensión de las células. Se realizó un conteo de células en cámara de Neubauer y se colocó el volumen adecuado de células resuspendidas en botellas nuevas y se llevaron a volumen final con DMEM completo. Para pasajes a botellas T75 se sembraron entre 5 y 10 millones de células, mientras que para pasajes a botellas T125 se sembraron entre 15 y 20 millones de células.

Transfección de HEK293-T

Se transfectaron cultivos de HEK293-T con una confluencia de 70-90%, utilizando 36 µg de ADN por botella grande para expresión a gran escala o 2 µg por pocillo en placas de 6 pocillos (Greiner #657160) para pruebas de transfección. Se utilizó PEI MAX (Polysciences #24765-1), stock 1 mg/mL, pH 7.0, como agente transfectante en una relación 5:1 µgPEI: µgADN.

Se diluyeron el stock de PEI 1/12 y el ADN 1/55 en DMEM, por separado, en tubos de polipropileno estériles (Deltalab #401402). Se transfirió el PEI diluido a los tubos con ADN; la mezcla se homogeneizó en un agitador vórtex por 30 segundos y fue incubada a temperatura ambiente por 30 minutos para permitir la formación de complejos PEI-ADN. Luego se descartó el medio de los pocillos o botellas conteniendo las células a transfectar y, previo a la adición de PEI-ADN, se adicionó de DMEM completo en volumen adecuado para alcanzar la capacidad estándar del pocillo o botella. Se adicionó la mezcla suavemente, se homogeneizó en el medio de cultivo con las células y se incubó al menos 4 hs a 37°C antes de realizar un cambio de medio (DMEM completo). Se recolectó el medio luego de 48-72 hs. En expresiones a gran escala, se realizó un recambio de medio a las 96hs y una segunda recolección a las 48 hs.

1. *Expresión y purificación de la quimera pvtxNluc en bacterias E. coli.*

1.1. **Construcción y purificación de vectores pET28a (+) para expresión recombinante en *E. coli* de pvtxNluc**

Se utilizó el vector pET28a(+) para la expresión de proteínas en bacterias *E. coli* BL21 (DE3) (**Figura 12**). La expresión está regulada por una secuencia denominada “promotor T7lac” que se compone de un promotor constitutivo reconocido por la ARN polimerasa del fago T7 seguido del operador lac. La cepa BL21(DE3) contiene en su genoma el gen codificante de la ARN polimerasa de T7, cuya expresión también está controlada por el operador lac. En ausencia de un inductor, el represor lacI codificado tanto en el vector como en el genoma de *E. coli* se une al operador lac, lo que impide la expresión de T7 y, por consecuencia, de la proteína que se codifique a continuación del promotor T7lac. La adición de IPTG, un análogo no hidrolizable de la lactosa, permite la expresión de T7 y en consecuencia, la expresión de la proteína codificada en el vector, dado que el IPTG se une al represor lacI, disminuyendo fuertemente su afinidad por el operador lac (64).

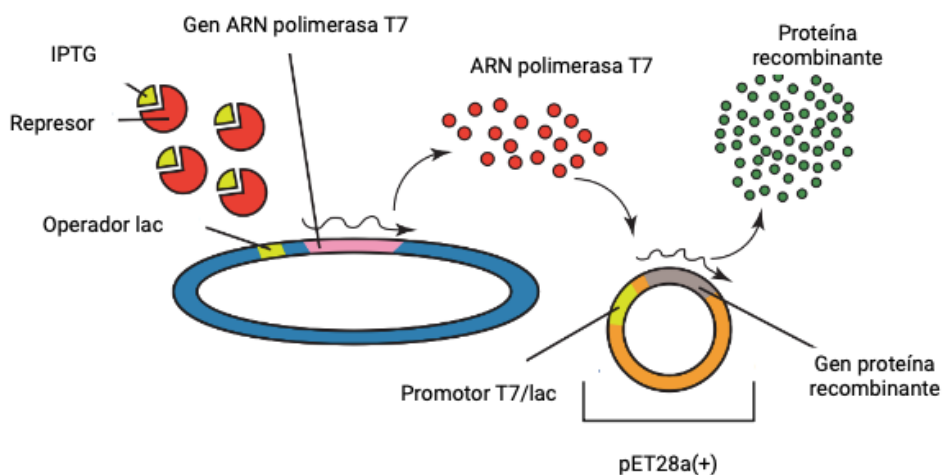


Figura 12: Representación del proceso de expresión de proteínas recombinantes en *E. coli* BL21 (DE3) utilizando el inductor IPTG. El vector pET28a(+) (naranja) transformado en cepas de *E. coli* BL21 (DE3) que expresan ARNpolT7 en su genoma (azul) permite la expresión de la proteína utilizando el promotor T7/lac. En presencia del inductor IPTG, este impide que el represor se una al operador lac y permite la expresión del gen de la ARNpol T7 codificada corriente arriba. Dicha enzima, permite transcribir los genes codificados a continuación del promotor T7lac localizado en el vector pET28a(+).

Para la construcción de un vector pET28a(+) que permita la expresión de la quimera pvtxNluc, se introdujo el gen que codifica para el péptido13A en fase con la proteína verotoxina (pvtx) en un vector de expresión pET28a(+) que contiene la secuencia codificante de la enzima Nluc. El gen pvtx se obtuvo a partir de digerir con SfiI, un plásmido sintético conteniendo dicho gen, obtenido por la empresa General Biosystem. El producto de la digestión fue purificado a través de un gel de agarosa 1% utilizando “GeneJET Gel Extraction Kit”, cortando el gel a la altura del fragmento liberado. Posteriormente se realizó la ligación del fragmento digerido, con un vector de expresión derivado del pET28a(+) que también había sido previamente digerido con la misma enzima, en una relación inserto: vector 3:1. Como resultado de la ligación, el gen “pvtx” se introdujo en

marco con la secuencia de unión a ribosoma (RBS) y con el gen codificante para la enzima Nluc (**Figura 13**).

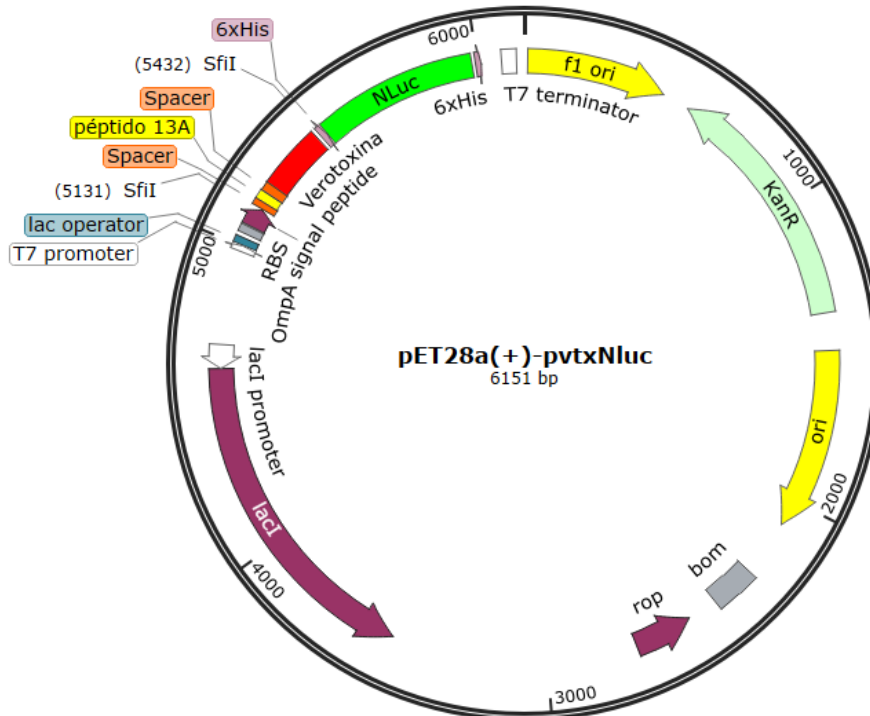


Figura 13: Plásmido generado para la expresión recombinante de pvtxNluc en bacterias *E. coli* BL21 (DE3). El plásmido contiene a continuación del promotor T7lac y la secuencia de unión al ribosoma (RBS), la secuencia del péptido señal OmpA, en fase con el péptido 13A, la verotoxina y la enzima NanoLuc. A su vez se señalan los sitios de corte de la enzima de restricción SfiI utilizada para el clonado del gen pvtx en el vector y dos tags de histidina utilizados para la purificación de la proteína.

El producto de ligación se transformó en células *E. coli* DH5 α , y las células transformadas se sembraron en placas de medio LB-agar suplementadas con kanamicina, y se las dejó creciendo a 37°C ON.

De la placa se tomaron 5 colonias aisladas, a las cuales se les confirmó la presencia del gen mediante la técnica *Colony PCR*, realizada con cebadores específicos para amplificar la secuencia de la verotoxina y de la NanoLuc previamente reportadas (33,34). A partir de dos colonias positivas se largaron cultivos ON y se purificó el ADN plasmídico por Miniprep. A su vez, el ADN plasmídico purificado fue secuenciado por la empresa Macrogen.

1.2. Expresión de pvtxNluc en *E. coli* BL21(DE3).

Para la expresión de la quimera pvtxNluc se transformaron células competentes BL21(DE3) con el vector pET28a(+)-pvtxNluc generado en el paso anterior. A partir de colonias aisladas obtenidas de placas sembradas con células transformadas, se realizaron cultivos para realizar pruebas de expresión de la proteína en medios LB o TB. Las pruebas se realizaron a partir de matraces de vidrio estériles con 7mL de medio con Kanamicina e inoculados con un volumen

1/100 de un cultivo crecido ON en el mismo medio, a 37°C en agitación. Cuando los cultivos alcanzaron una OD de 1.8 para medio TB y 0.6-0.8 para medio LB, los cultivos fueron alicuotados en tubos estériles de a 1 mL y cada uno se sometió a condiciones de inducción con IPTG que variaron entre 1 μ M, 10 μ M, 100 μ M y 1000 μ M. Paralelamente se realizó un control sin inducir ("0 μ M"). Como parte de las pruebas, los cultivos con IPTG se incubaron ON a las temperaturas de 20°C y 28°C o 4hs a 37°C. Todas las incubaciones se realizaron en agitación a 250 RPM.

Para la expresión en mayor escala se realizaron cultivos de 200 mL de medio TB en matraces de 2 L con inducción con 1000 μ M IPTG, crecidos ON a 20°C y con agitación a 250 RPM.

1.3. Purificación de pvtxNluc producida en *E. coli* BL21(DE3) por cromatografía de afinidad.

La purificación se realizó a partir de la fracción soluble del cultivo, siendo que la proteína recombinante se expresó en el periplasma de la bacteria gracias al péptido señal OmpA (65). Para llegar a dicha fracción, se centrifugaron los cultivos a 5000 g por 10 minutos para sedimentar las células, las cuales fueron resuspendidas en 30 mL de buffer Tris 50mM, NaCl 100mM, pH 8. Luego se realizó un ciclo de sonicación (15 minutos, pulso de 30 ms, 80% de potencia) utilizando el sonicador Omni-Ruptor 4000 (Omni International). Posteriormente fue centrifugado a 30000 g por 20 minutos para eliminar restos celulares y el sobrenadante (fracción soluble) fue filtrado por membranas con poros de 0.22 μ m.

La purificación de pvtxNluc se llevó a cabo utilizando una columna de Ni-NTA (HisTrap HP, GE Healthcare) en el equipo AKTA purification system (GE Healthcare) gracias a la presencia de tags de histidina (HisTag). Se le agregó a la muestra imidazol a concentración final 20 mM y NaCl a concentración final 300 mM, igualando las concentraciones de estos componentes con el Buffer A. Luego se lavó y equilibró la columna con 5 volúmenes de agua milliQ y 5 volúmenes de buffer A (ambos filtrados por 0.22 μ m). Se sembró la muestra en la columna y se realizaron varios lavados, cada uno de ellos con 5 volúmenes de columna y diferentes concentraciones de buffer B: 0%, 5%, 10%, 50% y 100% v/v. La presencia de proteína fue monitoreada por absorbancia a 280 nm durante todo el proceso de purificación. Las fracciones de interés fueron dializadas en 2 L de PBS a 4°C en agitación, con un cambio de buffer a las 24 hs. Se evaluó el eluido y otras fracciones de interés por SDS-PAGE y se cuantificó la cantidad de proteína por absorbancia a 280 nm utilizando el equipo NanoDrop 1000 Spectrophotometer (Thermo Scientific) y fue almacenada a -20°C.

2. *Expresión y purificación de pvtxNluc en células HEK293-T*

2.1. Construcción y purificación de vectores pcDNA 3.1(+) para expresión recombinante en HEK293-T

Se partió de un vector modificado de pcDNA 3.1(+) (Invitrogen #V79020) para la generación de 2 vectores para la expresión de pvtxNluc, uno de ellos con el

elemento regulador intrón A de hCMV y otro sin. El vector pcDNA 3.1(+) contiene, en orden, las CDS de un péptido señal para secreción al medio extracelular (Igk leader), la enzima Nluc, y dos péptidos utilizados para purificación llamados HisTag y Twin-Strep-Tag (**Figura 14**). Este vector está diseñado por el fabricante para la expresión transitoria de proteínas recombinantes en líneas celulares de mamíferos. Cuenta con un promotor y un potenciador ambos derivados de hCMV. El origen SV40 posibilita su replicación episomal en líneas celulares que expresen el antígeno T de SV40, como la línea HEK293-T (ATCC CRL-3216) mientras que el origen pUC (“ori”) permite obtener un alto número de copias de este plásmido en bacterias. A estas últimas le confiere resistencia a ampicilina. El vector fue digerido con la enzima SfiI, para realizar cortes en dos sitios ubicados entre Igk leader y Nluc. Entre ambos sitios se insertó el gen *pvtx* previamente digerido con SfiI, quedando en marco con las CDS mencionadas. El vector de expresión conformado se denominó pcDNA3.1 – pvtxNluc (atz).

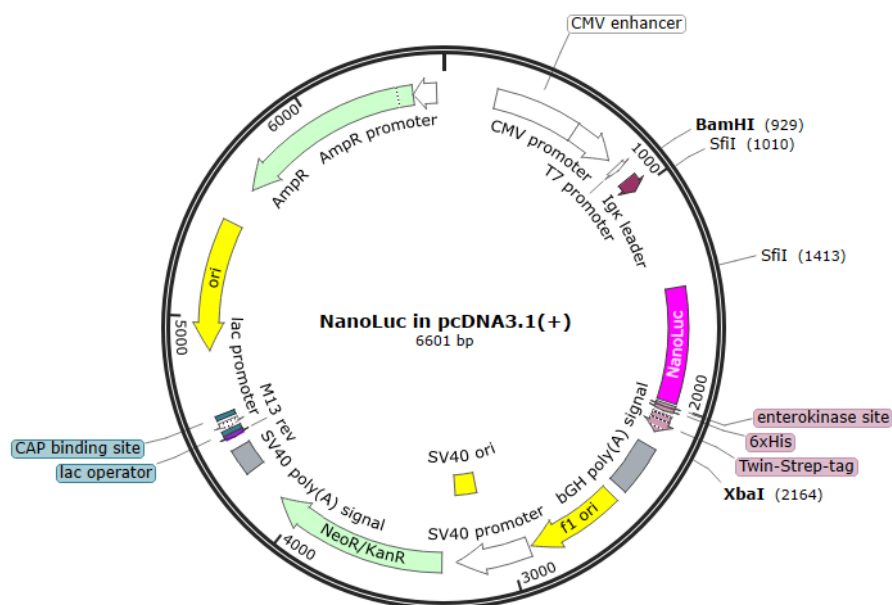


Figura 14: Representación esquemática del vector modificado pcDNA3.1(+) utilizado para generar el vector de expresión de pvtxNluc en células HEK293-T. El vector cuenta con el promotor de CMV y el péptido señal Igk leader que permite que la quimera recombinante sea enviada al medio extracelular. Se muestran además los sitios de corte de la enzima de restricción SfiI, utilizada para abrir el vector e insertar la secuencia del gen *pvtx* río arriba de la secuencia codificante para la enzima NanoLuc.

Para la introducción del intrón A de CMV en pcDNA3.1 – pvtxNluc (atz), se realizaron digestiones secuenciales con SacI y BamHI para abrir el vector río arriba de la secuencia codificante pvtxNluc. Se digirieron 5 µg de vector con la enzima SacI y el producto se purificó mediante “GeneJET PCR Purification Kit” (Thermo Scientific #K0701). El producto purificado fue luego digerido con BamHI y el vector doble digerido fue purificado mediante corrida en gel de Agarosa 1% y purificación de banda con kit comercial “GeneJET Gel Purification Kit”. Posteriormente se desfosforilaron los extremos del vector digerido con la enzima rSAP y se realizó la ligación con el intrón A de CMV previamente digerido con ambas enzimas, utilizando una relación molar inserto: vector de 7:1. Al nuevo producto de ligación se le denominó vector pcDNA 3.1- pvtxNluc (atz) –intrón. Con ambos vectores se transformaron células *E. coli* DH5α y a partir de colonias aisladas se realizaron cultivos ON para la purificación del ADN plasmídico por

Miniprep. Para corroborar la correcta introducción de pvtx y del intrón, se mandó secuenciar a la empresa Macrogen (**Figura 15**).

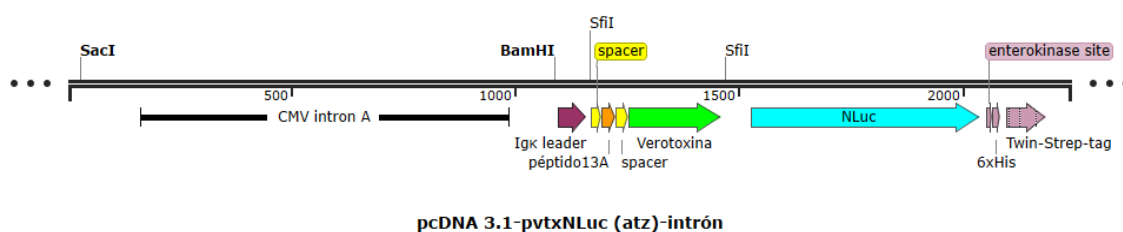


Figura 15: Fragmento del vector pcDNA3.1 utilizado para la expresión de pvtxNLuc en células HEK293-T. Se muestra el cassette génico utilizado para la expresión de pvtxNLuc compuesto por el péptido señal Igk leader, el péptido 13A, la verotoxina y la enzima NLuc. Río arriba de dicho cassette se encuentra el intrón A de CMV clonado mediante las enzimas de restricción (SacI, BamHI).

2.2. Expresión en células HEK293-T

Para las pruebas de transfección, se transfectaron cultivos con una confluencia de 70-90% de HEK293-T con los vectores pcDNA- pvtxNluc y pcDNA – pvtxNluc – intrón utilizando 2 µg de ADN por pocillo en placas de 6 pocillos (Greiner #657160). Se utilizó PEI MAX (Polysciences #24765-1), stock 1 mg/mL, pH 7.0, como agente transfectante en una relación 5:1 µgPEI: µgADN. Para la expresión a gran escala se transfectaron 3 botellas T125, utilizando 36 µg de ADN por botella.

2.3. Purificación de pvtxNluc producida en HEK293-T por cromatografía de afinidad.

La construcción pvtxNluc se purificó por cromatografía de afinidad usando una columna preempaquetada StrepTrapXT (Cytiva #29401317) en el equipo AKTA purification system (GE Healthcare). La resina de esta columna contiene un tipo de estreptavidina modificada, denominada Streptactina, con alta afinidad por el Twin-Strep-Tag, el cual está presente en el extremo C-terminal en la construcción.

La purificación se realizó a partir del medio de cultivo de las células transfectadas. El mismo se centrifugó a 300 g durante 5 minutos para sedimentar las células. Se descartó el pellet correspondiente a células y se recuperó el sobrenadante, el cual fue suplementado con 1/10 de buffer de unión de la columna y filtrado (0.22 µm). Posteriormente fue sembrado en la columna de purificación, previamente lavada y equilibrada con 5 volúmenes de agua milliQ (filtrada 0.22 µm) y 5 volúmenes de buffer de unión, respectivamente. Luego de sembrar los sobrenadantes, se lavó la columna con 5 volúmenes más de buffer de unión y se realizó la elución inyectando 6 mL de buffer de elución 1/10, conteniendo biotina 50 mM. Todo el proceso de purificación fue monitoreado absorbancia a 280 nm, el pico de absorbancia obtenido como producto de la elución fue recolectado y dializado en PBS, con un cambio de buffer a las 24 hs.

Se evaluó el eluido y otras fracciones de interés por SDS-PAGE y se cuantificó la cantidad de proteína por absorbancia a 280 nm utilizando el equipo NanoDrop 1000 Spectrophotometer (Thermo Scientific). Las alícuotas fueron almacenadas a -20°C hasta el momento de su uso.

3. Expresión y purificación de la quimera pvtx en bacterias *E. coli*.

3.1. Construcción y purificación de vectores pET28a (+) para expresión recombinante en *E. coli* de pvtx.

Se utilizó un vector derivado del pET28a (+) previamente digerido con SfiI, similar al mostrado previamente (**Figura 13**), pero sin el gen que codifica para la enzima Nluc. Este vector se ligó con el gen “pvtx” previamente digerido con SfiI. Con el resultado de la ligación se transformaron células competentes *E. coli* DH5α y a partir de colonias aisladas se realizaron cultivos ON para la purificación del ADN plasmídico por Miniprep. Para confirmar la correcta integración del gen de interés, se secuenció el ADN plasmídico purificado por la empresa Macrogen (**Figura 16**).

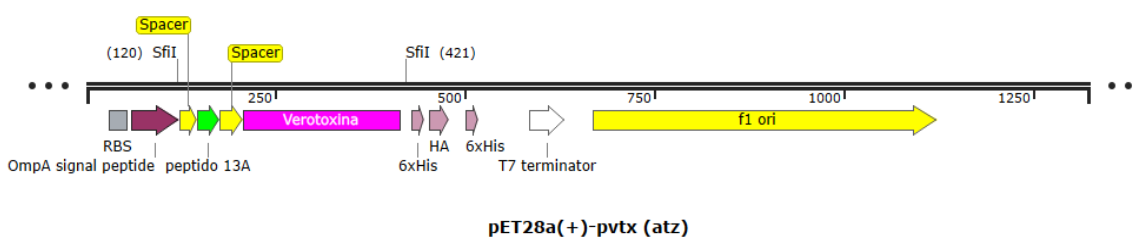


Figura 16: Fragmento del vector pET28a(+)-pvtx (atz) utilizado para la expresión de pvtx en bacterias *E. coli*. Se muestra el cassette génico compuesto por el péptido 13A y la verotoxina introducido en el vector utilizando la enzima de restricción SfiI, cuyos sitios de corte se indican en la figura. La construcción incluye además el péptido señal OmpA río arriba del cassette y las secuencias peptídicas de Histag y HA-tag en fase con la verotoxina.

3.2. Expresión en *E. coli* BL21 (DE3)

Para la expresión de la quimera pvtx se transformaron células competentes *E. coli* BL21 (DE3) con el vector pET28a(+)-pvtx (atz) generado anteriormente. A partir de colonias aisladas obtenidas de placas transformadas, se realizaron cultivos para realizar pruebas de expresión de la proteína en medio TB. Se procedió de forma análoga a las pruebas de expresión realizadas para pvtxNluc, con la salvedad de que se utilizaron cultivos en tubos estériles de 2 ml y la condición de incubación evaluada fue 4hs a 37°C.

Para la expresión en gran escala se realizaron 2 cultivos en matraces de 2 L con 200 mL de TB. Se adicionó IPTG para una concentración final de 100 μM y se los incubó por 4hs a 37°C.

3.3. Purificación de pvtx producida en *E. coli* BL21 (DE3) por cromatografía de afinidad.

Se realizó la purificación de pvtx a partir de la fracción soluble del cultivo. Para llegar a ella, se centrifugaron los cultivos a 5000 g por 10 minutos para sedimentar las células, las cuales fueron resuspendidas en 5 mL de buffer TES por cada 200 ml de cultivo en medio TB. Luego se realizó la lisis celular por shock osmótico. Para ello, se congeló el pellet a -80°C durante 30 minutos. Se descongeló a temperatura ambiente, se agregaron 10 ml de buffer TES y luego se incubó en hielo durante 30 minutos. Se indujo el shock osmótico agregando a la suspensión 30 mL de buffer TES diluido 1/5. Se homogeneizó y se incubó en hielo nuevamente durante 30 minutos. Luego, se centrifugó 30 minutos a 20000 g y se recuperó el sobrenadante. Se les agregó NaCl e Imidazol a concentraciones finales de 300 mM y 20 mM respectivamente, y la fracción soluble obtenida fue filtrada por 0.2 µm para su posterior purificación.

La purificación de pvtx se llevó a cabo utilizando una columna de Ni-NTA (HisTrap HP, GE Healthcare) en el equipo AKTA purification system (GE Healthcare) de forma análoga a la purificación de pvtxNluc producida en *E. coli* (1.3). Las fracciones de interés fueron dializadas en 4 L de buffer PBS a 4 °C en agitación. Se evaluó el eluido y otras fracciones de interés por SDS-PAGE y se cuantificó la cantidad de proteína por absorbancia a 280 nm utilizando el equipo NanoDrop 1000 Spectrophotometer (Thermo Scientific) y fue almacenada a -20°C.

4. Expresión y purificación de la quimera StrpNluc en células HEK293-T

4.1. Construcción y purificación de vectores pcDNA 3.1(+) para expresión recombinante en HEK293-T.

Se amplificó por PCR un gen de la estreptavidina disponible en laboratorio y reportado previamente (29), utilizando primers que introducen sitios de corte para la enzima de restricción Sfil. Se purificó el producto de PCR con el kit comercial "GeneJET Gel Extraction Kit". A continuación, se realizó una digestión con Sfil seguida de una purificación por "GeneJET PCR Purification Kit", dejando el gen de la estreptavidina listo para introducir en el vector de expresión. El gen de estreptavidina fue ligado con el vector derivado de pcDNA3.1 descrito anteriormente (**Figura 14**) previamente digerido con Sfil y desfosforilado con rSAP. Con el producto de la ligación (**Figura 17**), se transformaron células de *E. coli* DH5α y a partir de colonias aisladas se realizaron cultivos ON para la purificación del ADN plasmídico por Miniprep A su vez, el ADN plasmídico purificado fue secuenciado por el servicio de secuenciación del Hospital de Clínicas.

Con el vector pcDNA3.1(+) - StrpNluc se realizaron pruebas de transfección y transfección en escala de botellas tamaño T125 según se describió en Transfección de HEK293-T.

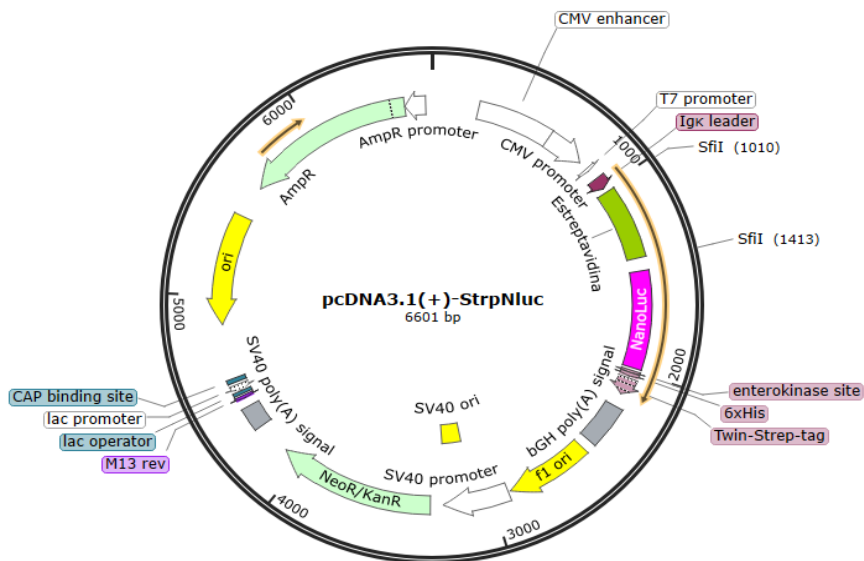


Figura 17: Vector de expresión derivado de pcDNA3.1(+) utilizado para la expresión de StrpNluc en células HEK293-T. El vector contiene la secuencia de un péptido señal (Igκ leader) que permite enviar la proteína al medio extracelular. La secuencia codificante para la Estreptavidina en fase con la enzima NanoLuc se encuentra a continuación de dicho péptido y posee, además, una cola de 6 Histidinas. A su vez se señalan los sitios de corte de la enzima SfiI, utilizada para el clonado del gen de estreptavidina.

4.2. Purificación de StrpNluc producida en células HEK293-T por cromatografía de afinidad.

La purificación de StrpNluc se llevó a cabo a partir del medio de cultivo de células transfectadas utilizando una columna de Ni-NTA EXCEL (Cytiva # 29048586) en el equipo AKTA purification system (GE Healthcare). Se centrifugó a 300 g durante 5 minutos para sedimentar las células y se recuperó el sobrenadante, el cual fue suplementado con imidazol a concentración final 20 mM y NaCl a concentración final 300 mM, igualando las concentraciones de estos componentes con el Buffer A, y filtrado por 0.22 μm . Los siguientes pasos fueron realizados de manera análoga a la purificación de pvtxNLuc producida en *E. coli* (1.3). Se evaluaron las fracciones de proteína eluída y otras de lavados por SDS-PAGE y se cuantificó la cantidad de proteína por absorbancia a 280 nm utilizando el equipo NanoDrop 1000 Spectrophotometer (Thermo Scientific) y fue almacenada a -20°C .

5. Caracterización de las construcciones pvtxNluc y StrpNluc por cromatografía de exclusión molecular.

Con el fin de valorar el estado oligomérico de las construcciones, se analizaron alícuotas de las mismas por cromatografía de exclusión molecular. Para realizar dicha valoración, es necesario construir una curva de calibración mediante el pasaje por la columna de estándares de peso molecular conocidos (**Tabla 3**).

Tabla 3: Estándares de peso molecular utilizados para construir la curva de calibración.

Estándar	Peso molecular (kDa)
Azul Dextrano	2000
Ferritina	440
Aldolasa	160
Ovoalbúmina	45
Ribonucleasa A	13.7

Para la cromatografía se utilizó la columna Superose 12 HR 10/30 (Cytiva #17-0538-01), la cual fue lavada y equilibrada con 5 volúmenes de agua milliQ y 5 volumen de PBS, respectivamente (ambos filtrados por 0.22 µm). Los estándares se diluyeron en PBS conteniendo azul dextrano, se centrifugaron 10 minutos a 17000 g, para evitar cargar precipitados en el sistema. Los estándares de peso molecular fueron corridos en dos grupos, en un volumen final de 200 µL.

- 1) Ferritina + OVA + Azul Dextrano
- 2) Ribonucleasa A + Aldolasa + Azul Dextrano

Para construir la curva de calibración, se calculó el coeficiente de distribución K_{av} para cada estándar de peso molecular, definido de la siguiente forma:

$$K_{av} = \frac{(V_e - V_0)}{(V_c - V_0)}$$

Donde V_e es el volumen de elución, V_c es el volumen total de la columna (24 mL) y V_0 es el volumen de exclusión de la columna (8.43 mL), que equivale al volumen de elución del azul dextrano debido a su gran peso molecular. El coeficiente de distribución se grafica en función del $\log(\text{PM})$ de los estándares para construir la curva de calibración. Para las muestras problema, luego de sembrarlas en la columna es posible calcular los valores de K_{av} , dado que a través de la corrida se conoce el volumen de elución. Luego, los valores de K_{av} calculados para las proteínas de interés fueron interpolados en la curva de calibración para así estimar los correspondientes pesos moleculares.

6. ELISA luminiscentes para la detección de atrazina

Todos los inmunoensayos de luminiscencia se realizaron utilizando placas de 96 pocillos (Greiner Bio-One #655074) (mencionadas de aquí en más como placas blancas).

6.1. Curvas de titulación de las quimeras en ausencia y exceso de atrazina.

De forma general, los ensayos fueron llevados a cabo como se describe a continuación, salvo que se indique lo contrario. Las quimeras evaluadas en ensayos luminiscentes correspondieron a las que contienen la enzima Nluc (pvtxNluc, StrpNluc) y StrpHRP cuando el ensayo es revelado con luminol.

- 1) Se sensibilizaron placas blancas con 5 µg/mL del anticuerpo monoclonal K4E7 (AcMoK4E7), utilizando un volumen de 100 µL/pocillo durante 1 hora a 37°C o a 4°C ON.
- 2) A) Se bloquearon los espacios no cubiertos de los pocillos con 200 µL de PBS-BSA 1% a 37°C por 30 minutos.

B) En el caso de ensayos con quimeras StrpNluc o StrpHRP, paralelo al bloqueo se realizó una pre-incubación de la quimera con péptidos biotinilados en exceso, en hielo y manteniendo el tubo protegido de la luz con papel aluminio, durante 40 minutos.
- 3) Se lavó la placa 6 veces con PBS-Tween 0.05%
- 4) Se adicionó a la placa diluciones seriadas de las quimeras en 100 µL de diluyente constituido por PBS-BSA 0.1% y en condiciones de presencia y ausencia de atrazina 1 µg/mL. Se realizaron duplicados o triplicados de dichas curvas. Se incubó durante 1h a temperatura ambiente, en agitador de placas a 450 RPM.
- 5) Se lavó la placa 6 veces con PBS-Tween 0.05%.
- 6) Se realizó el revelado del ensayo con 100 µL/pocillo de:

Sustrato NanoLuc (Furimazina 2.5 µM en buffer Nluc), en el caso de las quimeras pvtxNluc y StrpNluc.

Sustrato luminol (SuperSignal™ ELISA Femto Substrate), en el caso de StrpHRP.

- 7) Se realizó la lectura de la placa en el equipo FLUOstar OPTIMA, registrando luminiscencia dentro de los 5 minutos siguientes al agregado del sustrato.
- 8) Se analizaron los resultados. Para cada punto de concentración de la quimera en estudio, se calculó el cociente denominado $\frac{(Atz)}{(Sin Atz)}$ definido en la ecuación 1. Se registró el máximo valor obtenido para este cociente, así como también la concentración de la quimera en ese punto.

$$\frac{(Atz)}{(Sin Atz)} = \left(\frac{(Valor de luminiscencia en exceso de atrazina)}{(Valor de luminiscencia en ausencia de atrazina)} \right) \quad Ec (1)$$

Este cociente se utilizó para valorar la relación señal/ruido del ensayo. Los pasos de sensibilización, bloqueo, lavados, así como la composición del buffer diluyente fueron modificados en algunas instancias del trabajo con el fin de optimizar el ensayo.

6.2. Actividad de los sobrenadantes provenientes de las pruebas de transfección en pequeña escala de pvtxNluc.

En este ensayo se analizó la actividad luminiscente que presentaba cada sobrenadante de producción, con el fin de evaluar diferencias entre los vectores de expresión utilizados en la transfección.

- 1) Se sensibilizó una placa blanca con 100 μ L/pocillo del AcMoK4E7 a una concentración 5 μ g/mL ON a 4°C o durante 1 hora a 37°C.
- 2) Se bloqueó la placa con 200 μ L/pocillo de PBS-BSA 1% durante 30 minutos a 37°C.
- 3) Se lavó la placa 6 veces con PBS Tween 0.05%
- 4) Se incubaron diluciones seriadas de los sobrenadantes en PBS-BSA 0.1% con atrazina 1 μ g/mL, durante 1 hora a temperatura ambiente, en agitador de placas. Para realizar las diluciones, se empezó en una dilución inicial al $\frac{1}{2}$ y a partir de esta se realizaron diluciones seriadas 1/10 en la placa.
- 5) Se lavó la placa 6 veces con PBS Tween 0.05%
- 6) Se reveló con 100 μ L del sustrato Nluc concentrado (en lugar de 2.5 μ M de Hidrofurimazina se utilizaron 10 μ M) con el fin de obtener señales más altas y compensar posibles efectos, siendo que no sabíamos el efecto de la matriz (sobrenadante de producción) sobre el ensayo.
- 7) Se realizó la lectura de la placa en el equipo FLUOstar OPTIMA, registrando luminiscencia dentro de los 5 minutos siguientes al agregado del revelado.
- 8) Se analizaron los resultados utilizando el software Origin para estimar el valor EC50 para cada curva.

7. ELISA colorimétricos para la detección de atrazina

7.1. Curvas de titulación de las quimeras en exceso y ausencia de atrazina.

Las quimeras evaluadas en estos ensayos correspondieron a pvtx y StrpHRP. Se procedió de igual forma a lo detallado en los ELISA luminiscente (6.1) a excepción del uso de placas transparentes de 96 pocillos (Greiner Bio-One #655061) y del agente de revelado.

En los ensayos realizados con pvtx, luego del paso de incubación con pvtx en presencia o ausencia de atrazina, se realizó un siguiente paso de incubación con 100 μ L/pocillo de anticuerpo de revelado comercial Anti-HisTag-HPO (GenScript #A00612) 1/2000 o anti-HA-PO (Roche #12013819001) en una dilución 1/3000 durante 45 minutos a temperatura ambiente, con agitación a 450 RPM. Luego se lavó la placa 4 veces con PBS-Tween 0.05% y se procedió al revelado del ensayo utilizando 100 μ L/pocillo de sustrato colorimétrico de HRP. La lectura de placas se realizó en el equipo FLUOstar OPTIMA, registrando absorbancia a

450nm. El análisis de los resultados se realizó de forma análoga a los ensayos luminiscentes.

8. *Curvas de detección de atrazina.*

Fueron realizadas curvas de detección de atrazina utilizando pvtxNluc o utilizando StrpHRP pre-incubado con péptidos biotinilados. En el caso de esta última construcción, se realizó el ensayo con revelado luminiscente y colorimétrico.

- 1) Se sensibilizaron placas (blancas o transparentes) con 5 µg/mL de AcMoK4E7, utilizando un volumen de 100 µL/pocillo durante 1 hora a 37°C o a 4°C ON.
- 2) A) Se bloquearon los espacios no cubiertos de los pocillos con 200 µL de PBS-BSA 1% a 37°C por 30 minutos.

B) En el caso de ensayos con StrpHRP, paralelo al bloqueo se realizó una pre-incubación de la quimera con péptidos biotinilados en exceso, en hielo y manteniendo el tubo protegido de la luz con papel aluminio, durante 40 minutos.
- 3) Se realizaron 6 lavados con PBS-Tween 0.05%
- 4) Se realizaron las curvas de detección de atrazina al mezclar en la placa

50 µL de solución de atrazina en concentración que varió en el rango de 0.01-10 ng/mL con 50 µL de solución con quimera en PBS-BSA 0.1% y a concentración definida en ensayos previos de titulación.

Se incubó durante 1h a temperatura ambiente con agitación a 450 RPM.

- 5) Se realizaron 6 lavados con PBS-Tween 0.05%.
- 6) Dependiendo de la quimera del ensayo, el revelado del ensayo se realizó con 100 µl/pocillo de sustrato colorimétrico o luminiscente para HRP o sustrato luminiscente para Nluc.
- 7) Se realizó la lectura de placas en el equipo FLUOstar OPTIMA para registro de luminiscencia o absorbancia 450 nm según se describe para los inmunoensayos anteriores.
- 8) Las curvas de detección de atrazina se analizaron con el software SciDAvis. Este software permite el ajuste de las curvas obtenidas a una curva sigmoide, siendo que las curvas de detección en los ensayos no competitivos exhiben este tipo de comportamiento denominado comúnmente como curva “dosis-respuesta”. De dicho ajuste se extrajo el valor EC50 para cada curva.

9. *Ensayos de actividad enzimática*

9.1. **Evaluación de la actividad enzimática de las diferentes quimeras de Nluc frente a diferentes concentraciones de hidrofurimazina.**

Los ensayos de actividad enzimática se realizaron con la quimeras a una concentración fija de 0,29 nmoles/L y en presencia de concentraciones variables de hidrofurimazina en solución, en el rango de 0-200 μ M.

- 1) Sobre pocillos de placas blancas se incubaron 50 μ L de solución de quimera (0,58 nmol/L) en buffer PBS con 50 μ L de las diluciones del sustrato hidrofurimazina preparadas en buffer Nluc 2X.
- 2) Tras el agregado del sustrato, se agitó la placa durante 30 segundos y se procedió a medir luminiscencia inmediatamente en el equipo FLUOstar OPTIMA
- 3) Para el análisis, se realizó un ajuste de los datos obtenidos al modelo de cinética enzimática de Michaelis-Menten.

$$V_0 = \frac{V_{max} * [S]}{K_m + [S]}$$

A partir de valores de velocidad inicial se construyó el gráfico de Lineweaver-Burk ($\frac{1}{V_0}$ vs $\frac{1}{[S]}$), que permitió ajustar el modelo, representado por una hipérbola rectangular, a una recta. A través de un ajuste lineal, se extrajo el valor de V_{max} de los coeficientes del ajuste.

$$\frac{1}{V_0} = \frac{K_m}{V_{max}} \times \frac{1}{[S]} + \frac{1}{V_{max}}$$

9.2. Valoración de las fracciones provenientes de la purificación de StrpNluc mediante ensayos luminiscentes.

Para evaluar la actividad luminiscente de las distintas fracciones se procedió a realizar un ensayo en el que se incubaron diferentes diluciones de estas con el sustrato luminiscente hidrofurimazina. Las fracciones evaluadas fueron el sobrenadante de expresión previo a pasar por la columna ("Pre-column"), la fracción no unida "FlowT" y las eluciones "10%" y "50%" cuyo valor de % se debe al %v/v de buffer B utilizado en la purificación.

1. Se incubaron en placa blanca 50 μ l de cada fracción preparada 1/500, 1/5000 y 1/50000 en buffer PBS con 50 μ l de la solución de revelado Nluc (Hidrofurimazina 2.5 μ M).
2. Se agitó la placa durante 30 segundos y se midió luminiscencia inmediatamente.
3. Se realizaron las lecturas en el equipo Fluostar Optima y se analizaron los resultados compararon las señales generadas por cada fracción en sus distintas diluciones.

10. Ensayos luminiscentes para detección de MC-OVA utilizando StrpNluc o StrpHRP comercial.

En estos ensayos se valoró la capacidad de StrpNluc de reconocer un anticuerpo biotinilado (Nb-biotina) con afinidad por la microcistina en comparación con el reactivo StrpHRP comercial (Invitrogen #S911) utilizando para detección colorimétrica.

1. Se sensibilizaron placas blancas o transparentes con 2 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de microcistina conjugada a OVA (MC-OVA), utilizando 100 μL por pocillo. Se incubó ON a 4°C o 1h a 37°C.
2. Se bloqueó la placa utilizando 200 μL por pocillo de PBS-BSA 1%, durante 30 minutos a 37°C.
3. Se lavó la placa 6 veces utilizando PBS-Tween 0.05%
4. Se realizaron diluciones seriadas 1/3 del reactivo Nb-biotina en buffer PBS BSA 0.1% cubriendo el rango de 0-288 ng/mL y se incubaron 100 μL de cada dilución en los pocillos de la placa durante 1h en agitación a 450RPM a temperatura ambiente.
5. Se lavó la placa 6 veces utilizando PBS-Tween 0.05%.
6. Se incubó la placa con 100 μL de solución StrpNluc a 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ o StrpHRP a 0.1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ en PBS-BSA 0.1% durante 1h en agitación a 450 RPM, a temperatura ambiente.
7. Se lavó la placa 4 veces utilizando PBS-Tween 0.05%.
8. Se realizó el revelado con 100 $\mu\text{L}/\text{pocillo}$ de solución de revelado colorimétrica para HRP y luminiscente para Nluc.
9. Análisis de datos. Se realizaron gráficos de señal generada en función de la concentración de Nb-biotina y se determinó el valor de concentración de Nb-biotina capaz de generar el 10% de la señal máxima del ensayo (EC10).

Resultados y discusión.

1. Expresión recombinante de pvtxNluc.

La quimera pvtxNluc del presente trabajo era de por sí una proteína de fusión compleja dado que se conformaba por tres componentes; un péptido cíclico denominado 13A específico por el inmunocomplejo AcMoK4E7-atrazina, la proteína pentamérica verotoxina y la enzima NanoLuc. Dada su complejidad se evaluaron dos sistemas de expresión para aumentar las probabilidades de lograr su producción recombinante.

Por un lado, se eligió el sistema de expresión en *E. coli* dado que los protocolos de transformación son sencillos, posee bajos requerimientos en las condiciones de cultivo y bajo costo. A su vez, la expresión de péptidos anti-inmunocomplejos en fase con la verotoxina fue realizada con éxito en trabajos previos, permitiendo su producción con buenos rendimientos a partir de la fracción soluble de la bacteria.

Por otro lado, se utilizó el sistema HEK293-T, basado en una línea celular derivada de riñón embrionario humano. Si bien los cultivos en líneas celulares mamíferas suelen presentar menores rendimientos y mayores costos de producción, muchas veces permiten producir proteínas complejas que no pueden ser expresadas de forma soluble y en correcta conformación en *E. coli*.

1.1 Expresión recombinante de pvtxNluc en *E. coli*.

El primer paso para la expresión de la quimera pvtxNluc consistió en realizar pruebas a pequeña escala de cultivos de bacteria *E. coli* BI21(DE3) transformadas con el vector pET28a(+)-pvtxNluc (atz) diseñado para la expresión de la quimera (**Figura 13** y **Figura 18 A**). El foco de estas pruebas de expresión fue estudiar variables como la temperatura, el tiempo de inducción, el medio de cultivo y la concentración de agente inductor IPTG para identificar aquellas condiciones que permitan altos rendimientos en la producción de proteína soluble (66).

Las primeras pruebas de expresión fueron realizadas a partir de cultivos crecidos a 28°C o 37°C con medio LB y TB, respectivamente. Sin embargo, al analizar los extractos solubles e insolubles por SDS-PAGE de cada cultivo no fue posible evidenciar la expresión de la proteína de interés, cuyo tamaño molecular se esperaba que fuera de aproximadamente 30 kDa (**Figura 18 B y C**).

En una siguiente prueba, al reducir la temperatura de inducción a 20°C, fue posible evidenciar la expresión de la proteína cuando los cultivos eran inducidos con 10, 100 y 1000 µM (**Figura 18 D y E**).

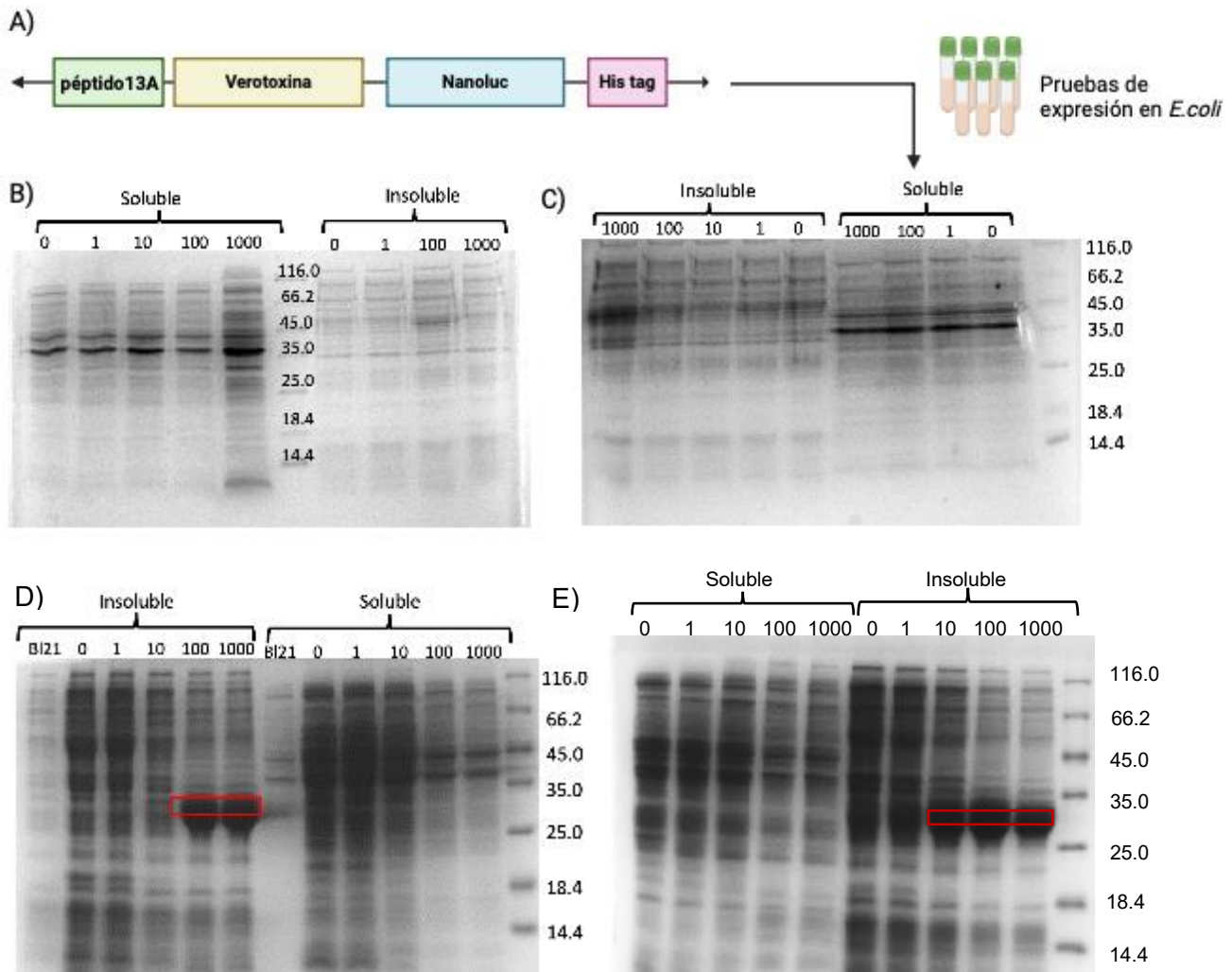


Figura 18: Pruebas de expresión recombinante de la quimera pvtxNluc en cultivos de *E. coli* utilizando el vector pET28a(+)-pvtxNluc (atz). Se utilizaron bacterias *E. coli* transformadas con el vector pET28a(+)-pvtxNluc (atz) que incluye el cassette génico mostrado en (A) y se analizó su expresión en cultivos de 1 mL. Se analizaron por SDS-PAGE las fracciones solubles e insolubles de cultivo inducidos con diferentes concentraciones de IPTG (0, 1, 10, 100, 1000 μ M) y crecidos en medio LB a 28°C ON (B), en medio LB a 37°C por 4hs (C), en medio LB a 20°C ON (D), o en medio TB a 20°C ON (E). Se muestra con recuadro rojo la banda correspondiente a la quimera expresada.

Por lo observado en los geles, esta proteína se presentaba de forma insoluble en la bacteria, lo cual resultaba ser un inconveniente dado que no estaba en su estado de plegamiento correcto y debían realizarse exploraciones de solubilización y re-naturalización para realizar su producción desde esta fracción. De todas formas, se procedió a realizar una producción a mayor escala utilizando la condición de inducción de 1000 μ M a 20°C en medio TB. Luego de separar las fracciones solubles e insolubles, se procedió primero a evaluar la fracción soluble dadas la complejidades implicadas en trabajar con la fracción insoluble.

Como parte de la evaluación, se comprobó mediante ensayos de ELISA luminiscentes la presencia de la construcción pvtxNluc en la fracción soluble, lo que resultó alentador para proceder con una purificación de la proteína a partir de dicha fracción (**Figura 19 A**). Posterior a la purificación por cromatografía de

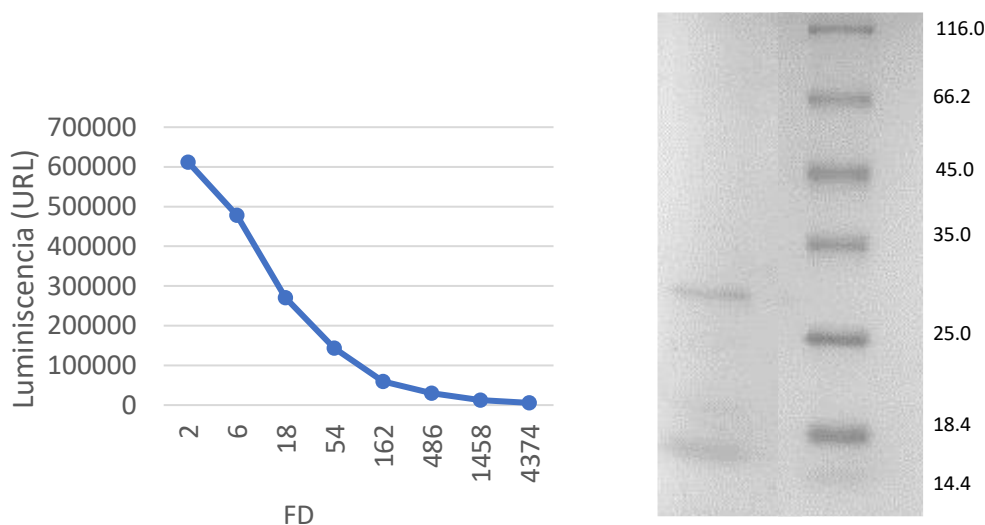


Figura 19: Evaluación de la producción recombinante a mayor escala de la quimera pvtxNluc en cultivos de *E. coli*. Se evaluó la fracción soluble del cultivo mediante curvas de titulación en ensayos de ELISA para valorar la presencia de la quimera recombinante (A). Se analizó por SDS-PAGE la quimera obtenida luego de realizar purificación por cromatografía de afinidad (B).

afinidad, se observó que la fracción purificada se encontraba enriquecida en una banda entre los 25 y 35 kDa, la cual correspondía a la quimera recombinante ya que coincidía con su tamaño esperado teórico (**Figura 19 B**).

El rendimiento de producción a partir de la fracción soluble del cultivo fue de 0.6 mg/L, un resultado que se consideraba bajo y que estaba en línea con lo observado en las pruebas de expresión en pequeña escala. A su vez resultó ser una producción significativamente inferior al de otras quimeras expresadas previamente en el laboratorio compuestas por péptido-verotoxina (33). Este bajo rendimiento puede deberse posiblemente a la introducción de la enzima Nluc a la quimera o a dificultades específicas del péptido 13A. Aun así, el rendimiento obtenido era suficiente para los objetivos de esta tesis que consistían en evaluar la capacidad de la quimera para ser usada en ensayos de detección de atrazina.

En consecuencia de lo anterior, se concluyó que no era esencial iniciar trabajos con la fracción insoluble de la bacteria para obtener mayores rendimientos de proteína.

1.2. Expresión recombinante de pvtxNluc en células HEK293-T

Para expresar pvtxNluc en HEK293-T se generó un nuevo vector de expresión basado en el plásmido pcDNA3.1. A su vez, se exploró el uso del intrón A de CMV en el vector, el cual ha sido reportado para mejorar rendimiento de producción de proteínas recombinantes (67–69) y también ha permitido rendimientos satisfactorios en nuestro laboratorio (70).

En este sentido, se generaron dos vectores de expresión con el gen de interés y con la presencia o ausencia de intrón A, y los mismos fueron utilizados para transfectar cultivos a pequeña escala de células HEK293-T. El sobrenadante de cada cultivos fue analizados mediante ensayos de ELISA luminiscentes para evaluar la expresión.

En estos ensayos se generaron curvas de titulación del sobrenadante a partir de las cuales se determinaron los valores de EC50, correspondiente al factor de dilución (FD) del sobrenadante al cual se obtiene el 50% de la señal máxima. Como resultado, la condición de expresión con el intrón A demostró expresar mayor nivel de proteína al presentarse valores de EC50 de 4.1, casi 4 veces superior al EC50 alcanzado con la curva del sobrenadante del cultivo sin intrón A.

Por lo mencionado, se procedió a realizar la producción en mayor escala transfectando botellas de 175 cm³ de cultivo con el vector de expresión de pvtxNLuc conteniendo intrón A. Luego de la purificación la proteína fue obtenida en una única fracción con alto nivel de pureza y con un patrón de migración en gel SDS-PAGE coherente con el tamaño estimado de 33 kDa para la quimera (Figura 20B). Cabe destacar, que el tamaño esperado para esta construcción fue mayor que para la producida en *E. coli*, dado que la construcción contaba con un tag de purificación adicional llamado Tween-Strept-tag y que aportaba un peso teórico de 3 kDa. El rendimiento obtenido de la producción fue de 1,7 mg/L, bastante mayor al obtenido a partir de los cultivos de *E. coli*.

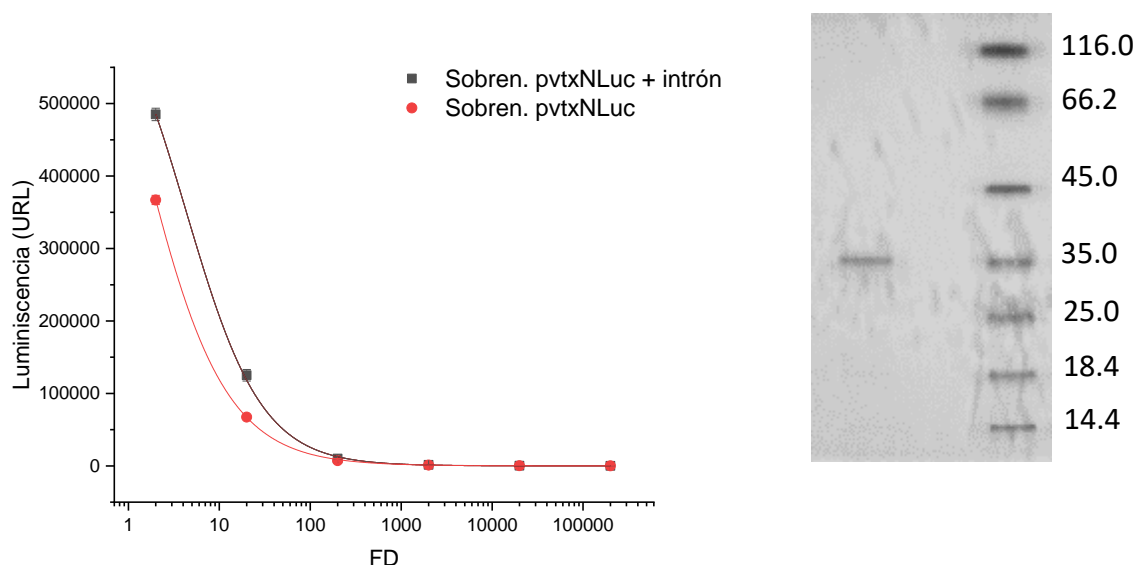


Figura 20: Evaluación de la producción recombinante y purificación de la quimera pvtxNLuc en cultivos HEK293-T. Se realizaron cultivos a pequeña escala para evaluar expresión de pvtxNLuc a partir de vectores de expresión que contenían o no el intrón A de CMV. Con el sobrenadante de cada cultivo se realizaron curvas de titulación en placas con AcMoK4E7 inmovilizado y con atrazina en exceso. Se obtuvieron valores de EC50 de 4.3 para el vector con intrón y 1.1 para el vector sin intrón (A). Se utilizó el vector con intrón A para realizar la producción en mayor escala y el producto de purificación obtenido se analizó por SDS-PAGE (B).

1.3. Evaluación de pvtxNluc producida en *E. coli* y en HEK293-T en ensayos de detección de atrazina luminiscentes.

Una vez purificadas las proteínas recombinantes desde ambos sistemas de expresión, se procedió a evaluar su desempeño como reactivos para detectar atrazina en ensayos de ELISA luminiscentes. Para esto se realizó una primera evaluación en curvas de titulación de la proteína sobre placas de ELISA sensibilizadas con AcMoK4E7. En todos los casos se realizaron curvas de titulación de la quimera en presencia de cantidades de atrazina en exceso y en ausencia de atrazina con el fin de determinar la capacidad de estas proteínas de distinguir entre ambas situaciones.

En caso de haber un reconocimiento específico por el inmunocomplejo AcMoK4E7-atrazina, esto debería reflejarse en una diferencia de señal entre la condición de presencia de atrazina (Atz) y ausencia de atrazina (Sin Atz), valorada por el cociente $\frac{(Atz)}{(Sin\ Atz)}$.

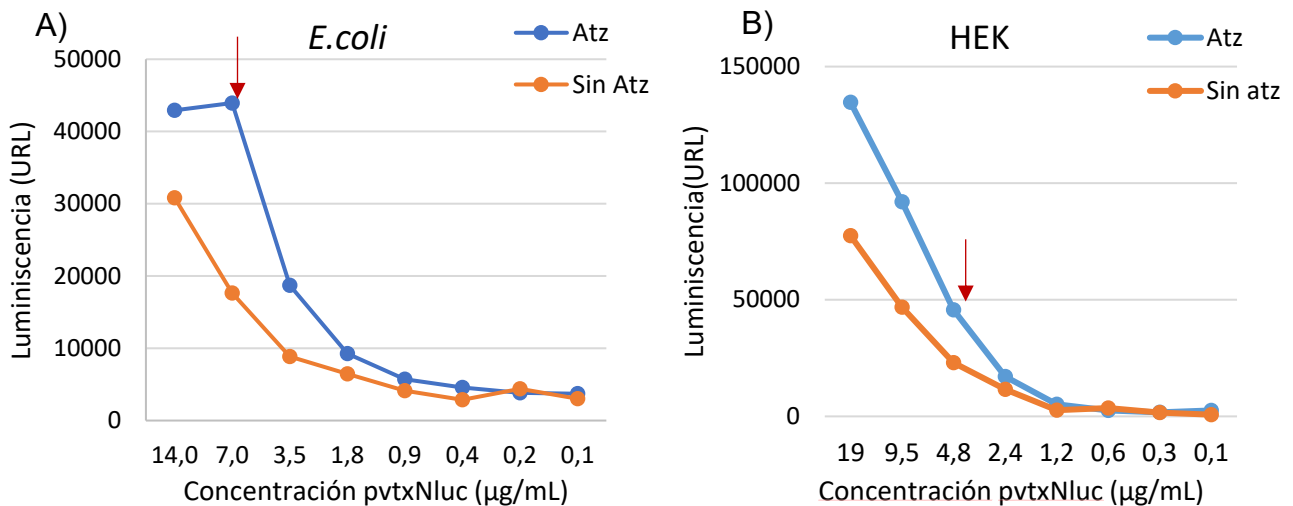


Figura 21: Curvas de titulación de pvtxNluc en presencia de exceso de atrazina y en ausencia de la misma. El ensayo se realizó en placas previamente sensibilizadas con 5 µg/mL del AcMoK4E7 utilizando pvtxNluc producido en *E. coli* (A), en donde se obtuvo una relación máxima de $\frac{(Atz)}{(Sin\ Atz)} = 2.5$ (indicado con flecha roja) o utilizando pvtxNluc producido en HEK293-T (B) en donde se obtuvo una relación máxima de $\frac{(Atz)}{(Sin\ Atz)} = 2$ (indicado con flecha roja).

Al comparar las curvas de titulación realizadas con las quimeras pvtxNluc producidas desde *E. coli* y HEK293-T se observó que en general ambas quimeras tenían un comportamiento similar (**Figura 21**). Al calcular los cocientes $\frac{(Atz)}{(Sin\ Atz)}$ obtenidos para cada punto de concentración de pvtxNluc, se dedujo que los cocientes máximos alcanzados viraban en el entorno de 2 y 3. Esto significó un resultado poco promisorio debido a que, al realizar este tipo de ensayos en formato colorimétrico, las señales máximas suelen ser al menos de 2.5 y la señal “ruido” menor a 0.2 lo que se traslada a valores de cocientes en el entorno de 20 y 30 (71,72). Dado el cociente obtenido con estas condiciones, era esperable que los ensayos de detección de atrazina a realizar con estas quimeras fueran de baja sensibilidad.

Por lo tanto, se procedió con una exploración de condiciones que pudieran mejorar el cociente $\frac{(Atz)}{(Sin\ Atz)}$. En particular, la variación de condiciones como la concentración del anticuerpo en la etapa de sensibilizado, la composición del diluyente de la muestra y la composición del buffer de lavado han tenido influencias en los límites de detección y sensibilidades alcanzadas por ensayos PHAIA previamente desarrollados (22)

En este trabajo, al aumentar y disminuir la concentración de AcMoK4E7 inmovilizado en las placas, los cocientes no variaron y por tanto no se esperaba una mejora en la sensibilidad al variar esta condición (**Tabla 4**).

Tabla 4: Variación de la concentración de AcMoK4E7 utilizada en la etapa de sensibilizado. Se presentan los valores máximos hallados del cociente $\frac{(Atz)}{(Sin\ Atz)}$ para las diferentes concentraciones de anticuerpo utilizadas. A su vez se señala la concentración del reactivo pvtxNluc a la cual se halló dicho cociente.

Sensibilización(µg/mL)	Máxima relación (Atz/Sin Atz)	Concentración pvtxNluc (µg/mL)
2,5	1,60	2,38
5,0	1,98	2,75
10	2,00	19,0

Similarmente se evaluó el cambio de diluyente y lavados, apuntando a aumentar concentraciones de detergente Tween20 y así disminuir las interacciones más débiles involucradas entre el péptido y el anticuerpo sin atrazina. Sin embargo, tampoco fue posible encontrar cocientes con valores superiores a 3 (**Tabla 5**).

Tabla 5: Variación del buffer diluyente y de lavado del ensayo. Se muestran los cocientes $\frac{(Atz)}{(Sin\ Atz)}$ máximos hallados y se indica la concentración de pvtxNluc producida en HEK293-T correspondiente a cada valor de cociente. El buffer de lavado que se evaluó correspondió a los lavados realizados luego de la incubación de la quimera con o sin atrazina. En todos los ensayos se mantuvo una concentración de anticuerpo fija de 5 µg/mL

Condición	Buffer diluyente	Buffer lavado	Máxima relación (Atz/Sin Atz)	Concentración pvtxNluc (µg/mL)
1	PBS BSA 0.1%	PBS Tween 0.05%	1.98	4.75
2	PBS Tween 0.2%	PBS Tween 0.2%	1.50	9.50
3	PBS Tween 0.05%	PBS Tween 0.2%	2.28	4.75
4	PBS Tween 0.05%	PBS Tween 0.05%	1.53	2.38

Si bien ninguna de las condiciones estudiadas promovía una buena diferencia de señal entre exceso y ausencia de analito, se procedió de todos modos a realizar el ensayo no competitivo para detección de atrazina. De las distintas curvas de detección de atrazina realizadas, se logró obtener una de mayor sensibilidad con un valor EC50 de 0.3 ± 0.1 ng/mL, la cual fue obtenida utilizando el reactivo pvtxNluc a 0.95 µg/mL de y el AcMoK4E7 a 5 µg/mL (**Figura 22**).

Como era de esperar el valor de sensibilidad alcanzado (EC50) fue notoriamente más alto a los obtenidos en trabajos previos para detección de atrazina utilizando otros nanopeptámeros o incluso fagos, cuyos reportes de EC50 eran de casi un orden más bajos (20). Sumado a lo anterior, este ensayo presentó problemas de reproducibilidad y precisión dado que la curva generada (**Figura 22**) presentó enormes variaciones entre días. Por dicha falta de reproducibilidad no pudieron ser establecidos los parámetros analíticos del ensayo como el límite de detección, límite de cuantificación y rango lineal de detección. Frente a estos resultados, se confirmó que las construcciones de pvtxNluc obtenidas de *E. coli* y HEK293-T no podían ser utilizadas en ensayos de detección de atrazina.

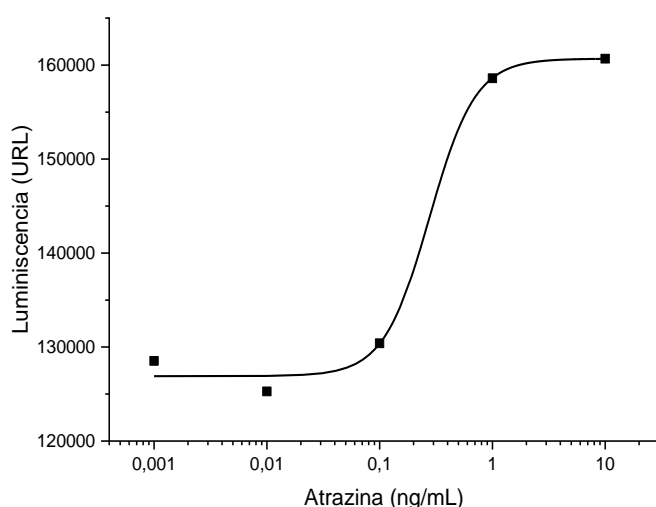


Figura 22: Curva de detección de atrazina utilizando la quimera pvtxNluc producida en HEK293-T. Las placas son previamente sensibilizadas con 5 $\mu\text{g/mL}$ de AcMoK4E7. Se utilizó una concentración de pvtxNluc de 0.95 mg/mL. El valor de detección de atrazina correspondiente al EC50 para la curva sigmoide trazada es de 0.3 ± 0.1 ng/mL.

Algunos de los factores que pueden haber contribuido al rendimiento subóptimo de pvtxNluc están relacionados con la estructura de la quimera y su actividad enzimática. Respecto a su estructura, la formación del nanopeptámero requiere que el péptido se exprese de forma multivalente, por lo que la formación del pentámero a través de la verotoxina es fundamental para la detección de atrazina. A su vez, la conformación en el espacio de los péptidos debe ser la adecuada para poder interactuar de forma específica con el inmunocomplejo AcMoK4E7-atrazina. En caso de estar alterada, el desempeño del péptido en el ensayo se vería afectado.

Por otro lado, es importante que la enzima también se encuentre con su estado de plegamiento correcto y con correcta actividad enzimática para poder generar señales en el ensayo proporcionales a la concentración de atrazina.

1.4. Estudios estructurales y de actividad enzimática de pvtxNluc.

Para comprender que aspectos de la construcción podrían estar afectando el desempeño de pvtxNluc en el inmunoensayo, se procedió a caracterizar la quimera, empezando por la evaluación de su actividad enzimática.

1.4.1 Ensayos de actividad enzimática

Se realizaron ensayos de actividad enzimática de Nluc en la quimera pvtxNluc en los que se evaluó como variaba la señal de luminiscencia conforme variaban las concentraciones de sustrato de la enzima. Las medidas de actividad fueron comparadas con las de una quimera de referencia con Nluc monovalente denominada Nb-Nluc que había demostrado ser activa y funcional en inmunoensayos de detección de otro analito. De ambos ensayos se determinó la velocidad de reacción enzimática por ajuste en modelo de Michaelis-Mentel, de donde se desprendió que para una misma cantidad de moles de enzima Nluc, la

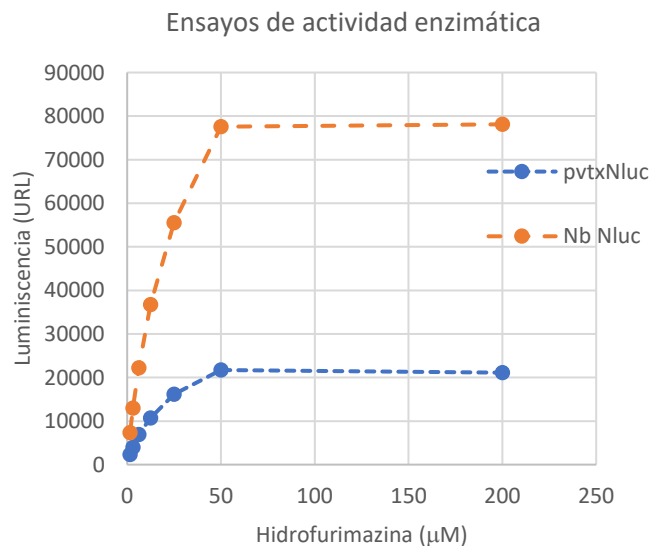


Figura 23: Ensayo de actividad enzimática de la quimera pvtxNluc. Se realizaron curvas de actividad enzimática al variar las concentraciones del sustrato hidrofurimazina con pvtxNluc y con una proteína de referencia Nb-Nluc. La enzima Nluc de la quimera pvtxNluc mostró un valor de velocidad máxima de 25000 URL mientras que la correspondiente a la de la quimera Nb-Nluc fue de 100000 URL.

quimera pvtxNluc producía menor señal y presentaba velocidad de reacción (V_{max}) mucho más baja que la quimera Nb-Nluc (**Figura 23**). De esta forma se observaba una actividad subóptima de la enzima en pvtxNluc que podría deberse a una proporción baja de enzima activa por molécula pentamérica debido a mal plegamiento o afectación del entorno generado por el nanopéptamero.

Como se mencionó anteriormente, la baja actividad enzimática detectada podía estar afectando el desempeño del inmunoensayo no competitivo. En esta situación, si la enzima no se encuentra en su totalidad en forma activa, el nanopéptamero no estaría generando una señal acorde a su capacidad de reconocimiento de atrazina y, por tanto, la distinción entre concentraciones de

atrazina se vuelve más difícil, repercutiendo en una menor sensibilidad de detección.

1.4.2. Caracterización por cromatografía de exclusión molecular

El bajo nivel de actividad enzimática de la quimera podría deberse a malos plegamientos o alteraciones en su conformación, por tanto, se procedió a caracterizar su estructura por cromatografía de exclusión molecular.

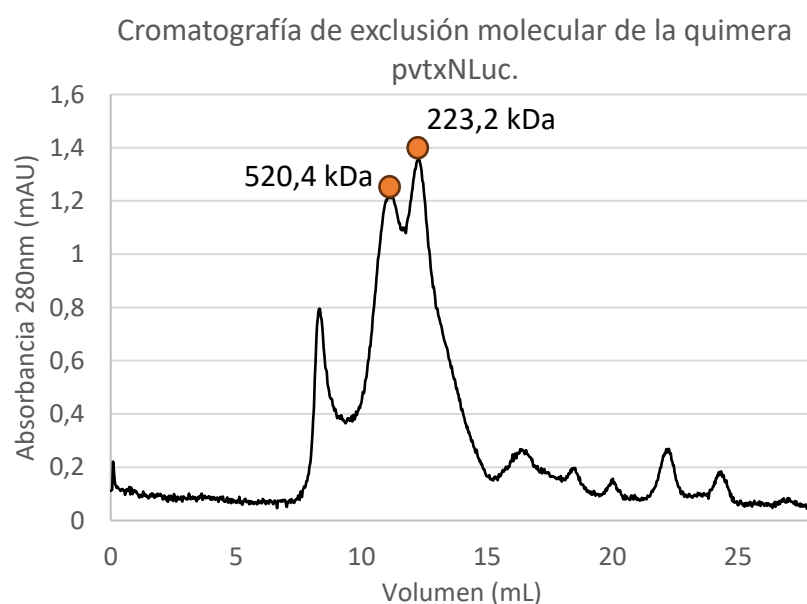


Figura 24: Cromatografía de exclusión molecular de la construcción pvtxNLuc producida en células HEK293-T. Se marca en naranja el peso molecular calculado para el volumen de elución de dos picos principales. El cálculo se realizó a través de la curva de calibración realizada con estándares de peso molecular.

Los resultados de dicho ensayo muestran dos picos principales de absorbancia que se corresponden con estructuras de peso molecular de 520.4 kDa y 223, kDa (**Figura 24**), mucho mayores al tamaño esperado de la estructura pentamérica de la quimera, cuya estimación teórica es de 165 kDa. Dado que la proteína había sido correctamente purificada y no había impurezas apreciables por SDS PAGE (**Figura 20**), los picos observados en este cromatograma podrían corresponderse con agregados de alto peso molecular de monómeros de pvtxNLuc.

En consecuencia, esto podría explicar el desempeño de la construcción en los inmunoensayos no competitivos de detección de atrazina, siendo que, en estos agregados, el plegamiento y la actividad de la enzima podrían verse comprometidos.

2 Producción recombinante de pvtx.

Otra de las variables que podrían estar afectando el desempeño de pvtxNLuc en el inmunoensayo radicaban en la estructura del péptido 13A y en su especificidad anti-atrazina. Hasta este trabajo, el péptido 13A había demostrado ser funcional en ensayo PHAIA al estar fusionado a partículas virales (20) y como péptido

sintético biotinilado y acoplado a tetrámero de estreptavidina (23), pero nunca se había generado como parte del sistema de expresión de los nanopeptámeros.

Para demostrar si el péptido era funcional en el sistema de nanopeptámeros recombinantes, se procedió a crear una nueva quimera independiente de Nluc llamada pvtx, que ya había sido generada en otros trabajos de forma soluble y sin agregados proteicos y funcional en inmunoensayos para detección de otros analitos (33)

2.1. Expresión recombinante de pvtx en *E. coli*.

Al igual que para la construcción pvtxNluc, el gen de pvtx (Figura 25 A) fue clonado en *E. coli* y su expresión fue evaluada en cultivos realizados a pequeña escala y con variaciones en las condiciones de inducción por IPTG y temperaturas de incubación.

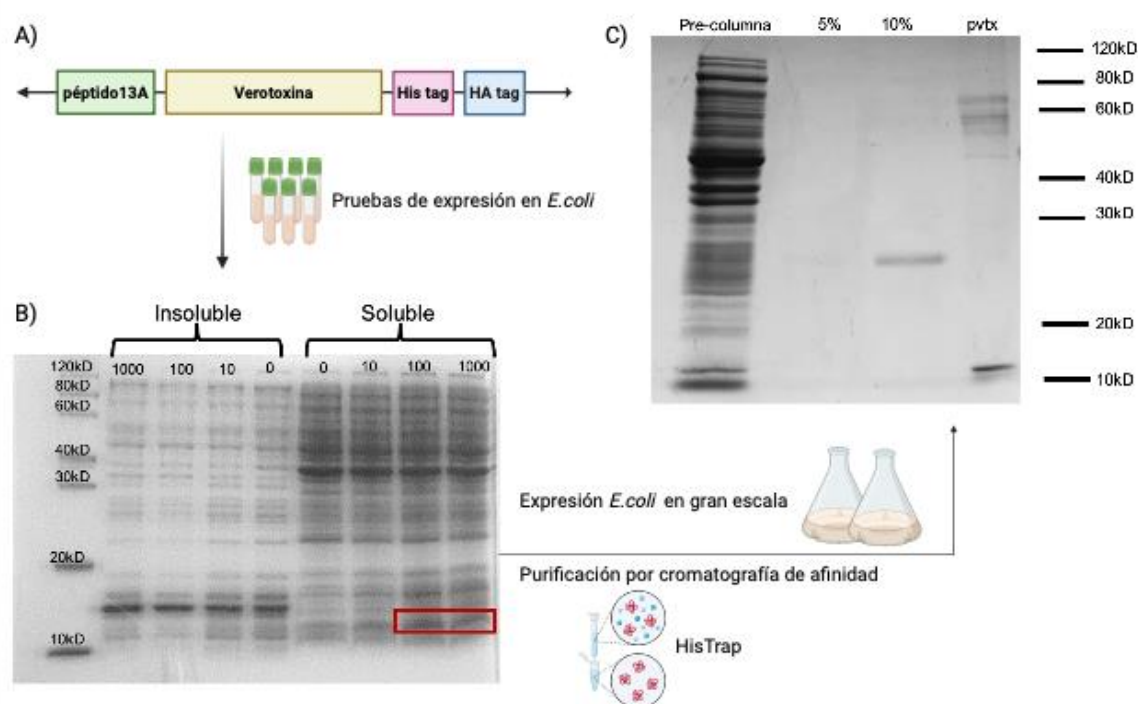


Figura 25: Expresión de la quimera pvtx en cultivos a pequeña y gran escala de bacterias *E. coli* transformadas con el vector pET28a(+)-pvtx (atz). El vector pET28a(+)-pvtx (atz) incluye el cassette génico mostrado en (A). Se analizó por SDS-PAGE las fracciones solubles e insolubles de cultivos en medio TB inducidos a distintas concentraciones de IPTG (0,10, 100, 1000 μM) e incubados a 37°C durante 4hs (B). La banda correspondiente a la quimera expresada se señala en el recuadro en rojo. Se realizó la expresión en mayor escala induciendo con 100 μM de IPTG seguido de una purificación por cromatografía de afinidad, a partir de la cual se obtuvieron distintas fracciones analizadas por SDS-PAGE (C). La fracción "Pre-columna" refiere la fracción soluble previo ser pasada por la columna, las fracciones "5%, 10%" refieren al %v/v de buffer B utilizado en la purificación y la fracción "pvtx" es la fracción enriquecida en la quimera pvtx eluída con 50% buffer B.

A partir de dichas pruebas se pudo evidenciar por SDS-PAGE una posible expresión de la proteína en la fracción soluble de las células cuando los cultivos eran inducidos con 100 y 1000 μM de IPTG y crecidos a 37°C durante 4hs (Figura 25 B). El tamaño de las bandas con probable correspondencia a la pvtx se identificó entre 10 y 20 kDa, consistente con el tamaño teórico esperado de la proteína de aproximadamente 13 kDa.

Utilizando la condición de inducción con 100 μM de IPTG se realizó una producción a mayor escala con volumen de 400 mL, desde la cual se logró obtener 0.36 mg de proteína que correspondía en al menos un 50% a pvtx. (Figura 25 C). Si bien el rendimiento alcanzado (0.9 mg/L) es menor al observado en trabajos previos y de menor pureza, este era adecuado para realizar la evaluación de su desempeño en ensayos de detección de atrazina.

2.2. Evaluación del desempeño de pvtx en ensayos de detección de atrazina colorimétricos.

Se evaluó mediante ensayos de ELISA el desempeño de la construcción pvtx para ser usados en ensayos de detección de atrazina y utilizando anticuerpos anti-His y anti-HA conjugados a peroxidasa capaces de reconocer los tags específicos de la quimera, HisTag y epítotope HA, respectivamente.

Al igual que para los ensayos de luminiscencia, lo primero que se realizó con estos ELISA fue evaluar la capacidad de reconocimiento de atrazina mediante curvas de titulación de pvtx contra el AcMo K4E7 en condiciones de exceso y ausencia de atrazina (**Figura 26**).

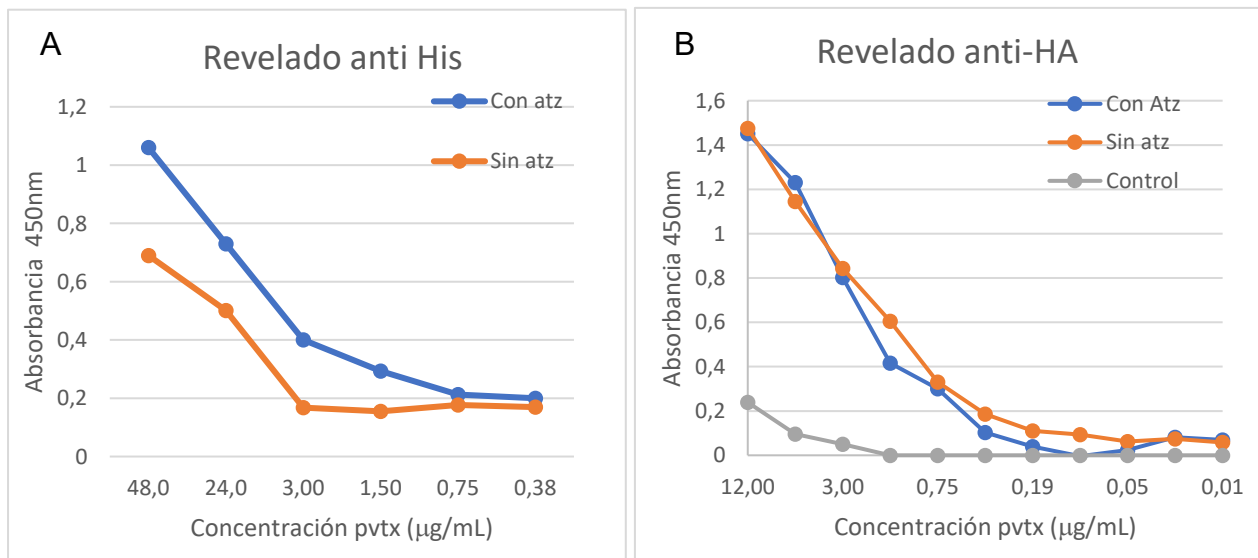


Figura 26: Curvas de titulación de pvtx en presencia de exceso de atrazina y en ausencia de la misma. Se realizaron diluciones seriadas de pvtx sobre placas previamente sensibilizadas con 5 $\mu\text{g/mL}$ del AcMoK4E7 en presencia o ausencia de atrazina. Se utilizaron los anticuerpos conjugados a peroxidasa anti-HisTag (A) y anti-epítotopeHA (B) encargados de generar la señal colorimétrica del ensayo. En el ensayo con anti-HA se realizó un control de reactividad de pvtx en ausencia de AcMoK4E7.

Nuevamente, con estos ensayos colorimétricos se observaron curvas similares a las de luminiscencia y los cocientes entre la presencia y ausencia de atrazina fueron inesperadamente bajos a lo largo de los distintos puntos de dilución de la curva (**Figura 26**). Este resultado sugiere que el péptido 13A expresado de forma recombinante fusionado a verotoxina mantiene sus propiedades de especificidad por el AcMoK4E7 pero no puede distinguir de forma específica la presencia del analito. Considerando los antecedentes previos de la funcionalidad de la verotoxina como soporte para la construcción de nanopeptámeros, es probable

que la falla del reconocimiento del péptido 13A haya sido un problema específico en este caso, posiblemente debido a su transferencia desde el sistema PHAIA a los nanopeptámeros. La fusión pvtx podría haber alterado el entorno de cargas y de exposición al solvente del péptido en comparación con su exposición en los fagos y probablemente haya repercutido en la reacción con AcMoK4E7-atrazina.

Estos cambios en el entorno molecular también pueden deberse a que la secuencia utilizada presenta variaciones en las regiones linker con respecto al utilizado en el ensayo PHAIA. La secuencia de aminoácidos que une el péptido con la verotoxina (LQGGGSGGGS) incluye dos aminoácidos (Leucina y Glutamina) que no están presentes en la secuencia que une el péptido con el fago (GGGSGGGS). Dicha variante fue introducida en el diseño del gen para introducir un sitio de corte para una enzima de restricción y puede haber generado los cambios mencionados.

3. Producción de la quimera StrpNluc y estudios de funcionalidad en ensayos de detección de atrazina

Visto que el péptido expresado de forma recombinante en fase con la verotoxina no posee la capacidad para detectar atrazina, se procedió a construir una quimera independiente de la versión recombinante del péptido. Como alternativa se propuso utilizar un péptido sintético 13A biotinilado que ya estaba disponible en el laboratorio y su funcionalidad para la detección de atrazina había sido demostrada previamente (73) al ser combinado con estreptavidina conjugada a HRP. Se procedió entonces a producir una nueva quimera recombinante compuesta por StrpNluc para luego combinarla con los péptidos biotinilados.

3.1. Expresión recombinante StrpNluc en células HEK293-T

Previamente, en nuestro grupo de investigación se había realizado expresión recombinante de quimeras de estreptavidina utilizando un sistema de expresión de *E. coli*. Dicha expresión consistió en un proceso complejo que requirió la exploración de condiciones de extracción de cuerpos de inclusión y replegamiento proteico para obtener la proteína en su conformación nativa y de forma soluble (29). Para evitar este problema, en este trabajo se procedió a realizar la expresión de StrpNluc en línea celular mamífera HEK293-T. Para ello, se modificó el vector pcDNA3.1 para insertar la inserción del gen de estreptavidina en el sitio donde estaba originalmente la secuencia péptido-verotoxina (**Figura 27 A**). Desde el sobrenadante de los cultivos de células transfectadas se realizó la purificación de la proteína de interés por cromatografía de afinidad, obteniendo como resultado dos fracciones de elución que presentaban a la proteína identificada con un tamaño de 40 kDa en gel SDS-PAGE, similar al tamaño teórico estimado para la quimera de aproximadamente

37kDa (**Figura 27 B**). A su vez, ambas fracciones demostraron poseer actividad enzimática correspondiente a Nluc activa (**Figura 27 C**). A pesar de que el proceso arrojó ciertas impurezas, la proteína StrpNluc era la mayoritaria y sumando las dos fracciones se concluyó que el rendimiento de la producción fue de 12 mg/L en donde al menos el 50% se corresponde con StrpNluc. Dicho rendimiento fue suficiente para evaluar su desempeño en ensayos de detección de atrazina.

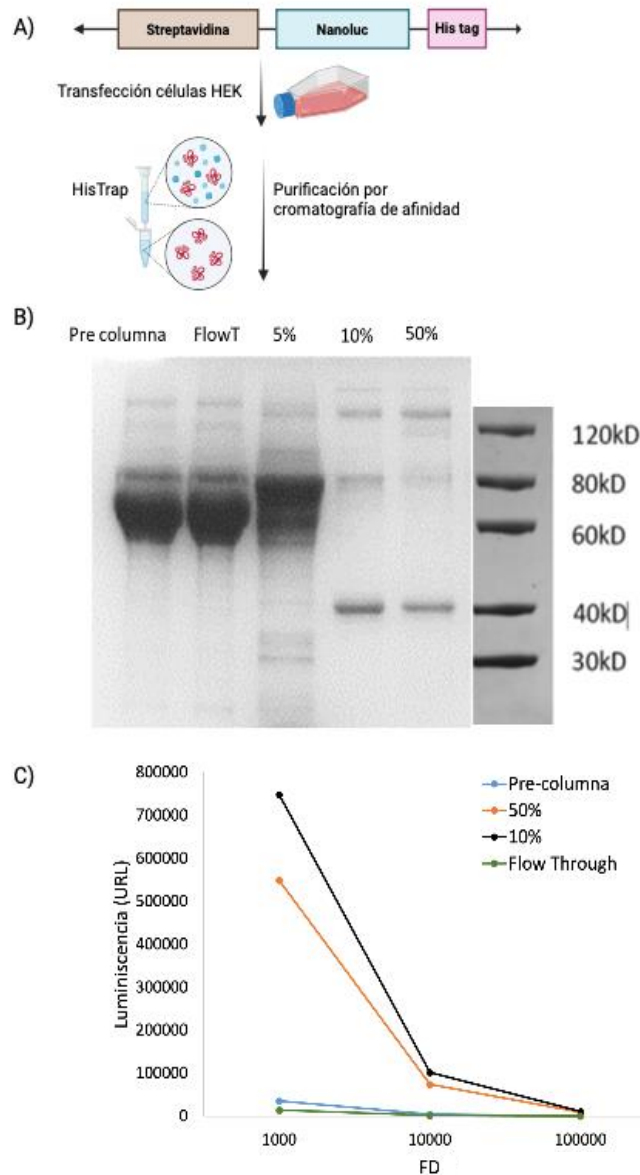


Figura 27: Proceso de expresión y purificación de StrpNluc producido en células HEK293-T transfectadas con el vector pcDNA3.1- StrpNluc. Se transfectaron células HEK293-T utilizando el vector de expresión pcDNA3.1-StrpNluc que contiene el cassette génico mostrado en (A). Luego de la purificación por cromatografía de afinidad, se analizaron las diferentes fracciones obtenidas por SDS-PAGE (B) y mediante curvas de dilución en ELISA luminiscente (C). La fracción “Pre-columna” refiere al sobrenadante de la producción previo a su purificación, “FlowT” refiere a la fracción luego de pasar por la columna mientras que “5%”, “10%” y “50%” refieren a los porcentajes de buffer B utilizados para lavar la columna y eluir la proteína.

3.2. Curvas de dilución de la construcción StrpNluc en presencia de un exceso de atrazina y en ausencia de esta.

Luego de la purificación, se procedió a evaluar la capacidad de la quimera StrpNluc en inmunoensayos luminiscentes. Esta evaluación fue similar a lo realizado con las quimeras de pvtxNluc, con la diferencia de que en este caso se requirió una preincubación entre StrpNluc y el péptido biotinilado para generar el reactivo luminiscente. Sin embargo, al realizar curvas de dilución del reactivo en el inmunoensayo, nuevamente no se observaron diferencias entre la señal generada en ausencia de atrazina y en presencia de exceso de atrazina (**Figura 28**).

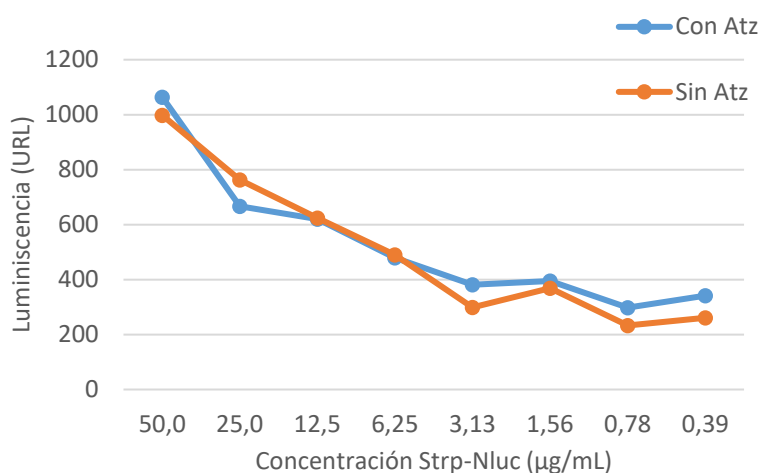


Figura 28: Curva de titulación de StrpNluc en presencia de exceso de atrazina y en ausencia de la misma. Se realizaron diluciones seriadas de StrpNluc pre-incubado con péptido 13A biotinilado sobre placas previamente sensibilizadas con 5 µg/mL del AcMoK4E7 en presencia (Con Atz) o ausencia de atrazina (Sin Atz).

A diferencia de las quimeras expresadas anteriormente, StrpNluc utiliza péptidos sintéticos biotinilados que han sido validados previamente como funcionales en estudios anteriores, en lugar de péptidos expresados de forma recombinante. Por lo tanto, el resultado observado estaría desligado del péptido y podría atribuirse a problemas asociados a la conformación tanto de la estreptavidina como de la enzima. Si la estructura de la estreptavidina presenta fallas, esto podría resultar en alteraciones en la unión a biotina, afectando así la interacción con los péptidos biotinilados. Por otro lado, si la conformación de la enzima está alterada, esto podría afectar su actividad enzimática y su desempeño como reactivo del inmunoensayo.

4. Caracterización de la quimera StrpNluc

En función de lo visto en el punto anterior se procedió a realizar una nueva evaluación de la quimera StrpNluc mediante análisis estructurales, de actividad enzimática y su desempeño en un inmunoensayo de referencia.

4.1. Aplicación de StrpNluc como reactivo en inmunoensayo de referencia

Para evaluar la capacidad de la quimera de reconocer otros analitos biotinilados, la misma fue utilizada en un ensayo optimizado de nuestro laboratorio que implica la detección de un fragmento pequeño de anticuerpo (nanobody) biotinilado específico por el analito microcistina (MC) (74). La quimera fue utilizada para detectar en inmunoensayo luminiscente la unión de nanobody a una placa de ELISA sensibilizada con MC, lo que permitió generar una curva de titulación de StrpNluc con un de EC10 (valor de concentración de reactivo que genera el 10% de la señal máxima del ensayo) estimado en 2136 pM.

Al comparar esta curva con la de un ensayo colorimétrico realizado en paralelo con el reactivo Estreptavidina-HRP (StrpHRP) con la cual se logró un EC10 de 0.46 pM, se pudo concluir que el reactivo luminiscente no estaba funcionando de forma óptima (Figura 29).

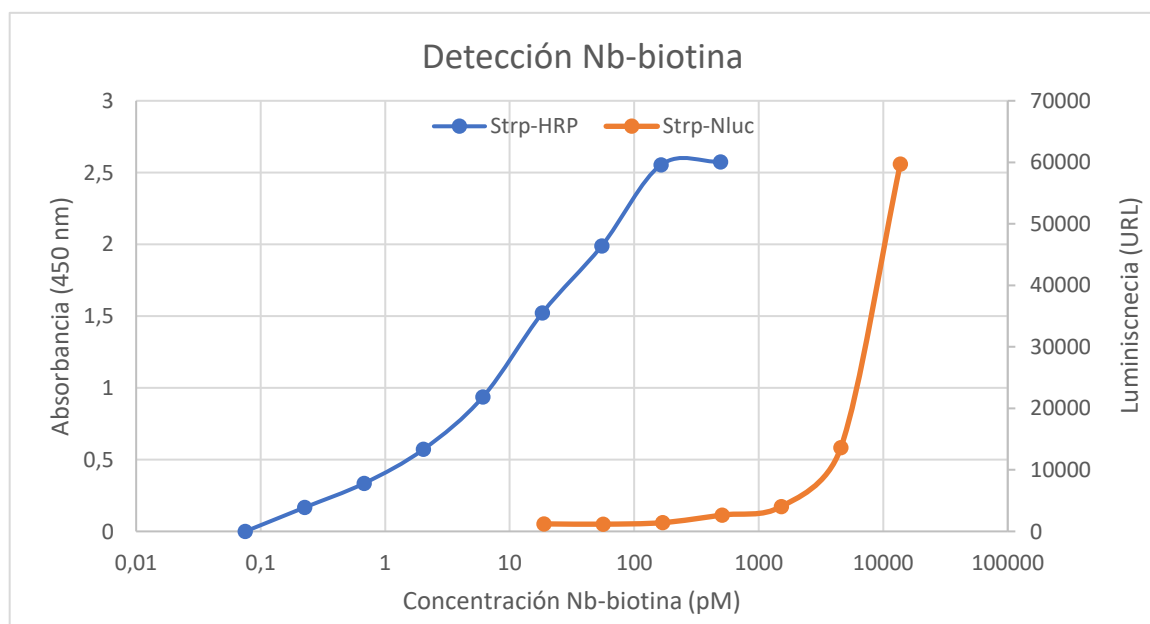


Figura 29: Curvas de detección de Nb-biotina utilizando StrpNluc y StrpHRP. Se realizaron curvas de dilución de Nb-biotinilado sobre placas transparentes y blancas sensibilizadas con 2µg/mL de Microcistina conjugado a Ovoalbumina (MC-OVA). El anticuerpo biotinilado unido fue detectado con el reactivo StrpHRP (azul) o StrpNluc (naranja) en las respectivas placas. Se calculó el 10% del valor de señal máxima (EC10) y se obtuvieron valores de 0.46 pM en el ensayo utilizando StrpHRP y 2136 pM utilizando StrpNluc.

4.2. Actividad enzimática StrpNluc

Las medidas de actividad enzimática de la construcción StrpNluc fueron realizadas de forma análoga a las de pvtxNluc, en las cuales midió la variación de señal luminiscente conforme variaban las concentraciones de incubación del sustrato de la enzima. La curva obtenida (Luminiscencia vs concentración de sustrato) demostró que la actividad enzimática de Nluc de la quimera StrpNluc era notoriamente inferior a la actividad de la enzima presente en la quimera de referencia Nb-Nluc (Figura 30).

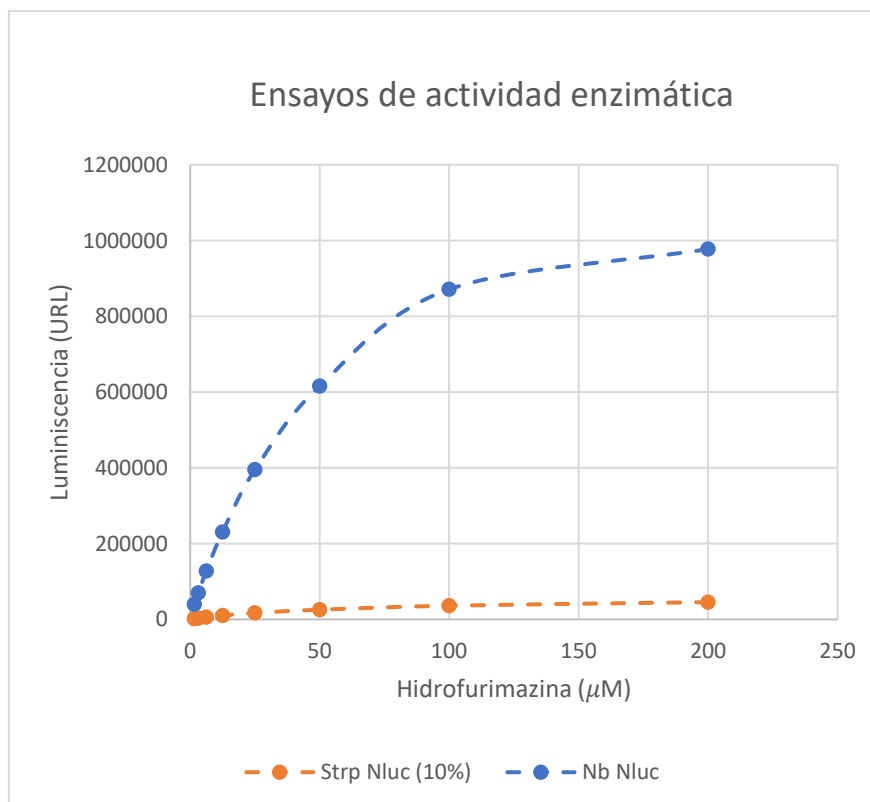


Figura 30: Ensayo de actividad enzimática de la quimera StrpNluc. Se realizaron curvas de actividad enzimática al variar las concentraciones del sustrato hidrofurimazina con StrpNluc y con una proteína de referencia Nb-Nluc. La enzima Nluc de la quimera StrpNluc mostró un valor de velocidad máxima de 33000 URL mientras que la correspondiente a la de la quimera Nb-Nluc fue de 1000000 URL.

Esto indicaba que el funcionamiento subóptimo de la actividad enzimática en StrpNluc era probablemente la causa del mal desempeño de la quimera en los inmunoensayos.

4.3. Caracterización de StrpNluc por cromatografía de exclusión molecular y SDS-PAGE.

Dado que la actividad enzimática pudo haberse visto afectada por mal plegamiento o agregación de los multímeros, se procedió a realizar una evaluación de la construcción a través de cromatografía de exclusión molecular. Como resultado de esta, se observó un pico de mayoritario correspondiente a un tamaño estimado de 321 kDa (**Figura 31 A**), mucho mayor al tamaño esperado del tetrámero (~148kDa), que indicaba una probable formación de agregados de alto peso molecular. Paralelamente, se realizó una evaluación por SDS PAGE que evidenció la presencia del monómero de estreptavidina y algunas impurezas, en condiciones normales de la técnica que involucraron un pretratamiento de la muestra 100°C; y evidenció la desaparición del monómero con consiguiente aparición de una banda por encima de los 120 kDa cuando la muestra no fue precalentada a 100°C. El tamaño observado en la muestra no calentada se correspondía probablemente al tetrámero StrpNluc (~148kDa),

indicando que al menos la proteína presentaba la multivalencia peptídica necesaria para los inmunoensayos.

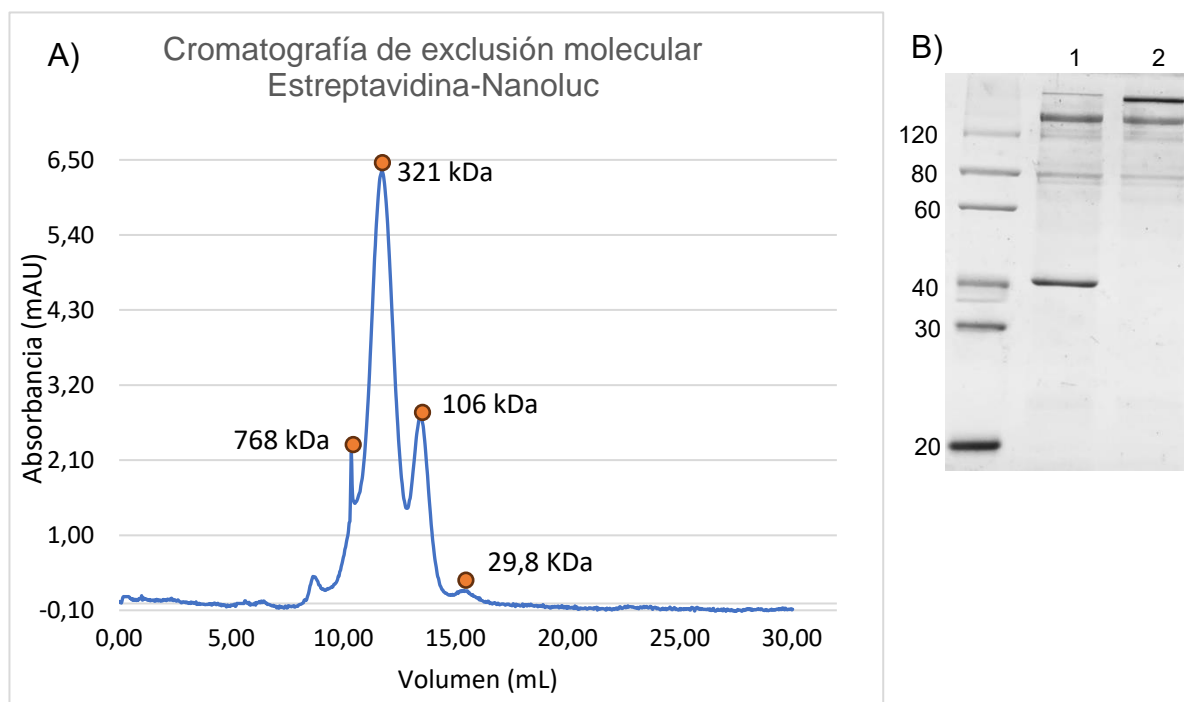


Figura 31: Caracterización estructural de la quimera StrpNluc. Se analizó la quimera por cromatografía de exclusión molecular (A). En naranja se señalan los máximos de absorbancia con su respectivo peso molecular estimado según el volumen de elución. Para la estimación del peso molecular se utilizó una curva de calibración realizada con estándares. También se realizó un análisis de la quimera por SDS-PAGE (B) en el cual se corrió la muestra pre-calentada a 100°C por 5min (1) o sin calentar (2).

Teniendo en cuenta los resultados estructurales y de actividad enzimática obtenidos para las quimera pvtxNluc y StrpNluc, es posible que la formación de agregados sea la causa de la disminución en la actividad luminiscente y por consiguiente en su bajo desempeño en los inmunoensayos. Estos resultados tienen una concordancia con lo visto recientemente en otro grupos de investigación, que han demostrado que la estabilidad de la enzima puede disminuir notoriamente cuando se encuentra formando conformaciones diméricas y triméricas lo que promovería una mayor tasa de desplegamiento proteico y por tanto menor funcionalidad (75,76). La disminución de la estabilidad observada para los dímeros y trímeros de Nluc podría ocurrir de manera análoga para tetrámeros y pentámeros, repercutiendo en la formación de agregados proteicos disfuncionales.

5. Ensayos con *Streptavidina*-HRP comercial

Las construcciones hasta este punto, que incluían Nluc, no resultaron en el desarrollo de inmunoensayos luminiscentes no competitivos para la detección de atrazina. Por lo tanto, se decidió avanzar con el objetivo de establecer un inmunoensayo luminiscente independiente de Nluc, con el fin de evaluar cómo este enfoque de detección afectaba la sensibilidad para detectar el analito. Con el fin de independizarnos de esta enzima y del péptido 13A expresado de forma recombinante, se planteó el uso de nanopéptidos compuestos por

estreptavidina-HRP combinada con péptidos biotinilados 13A anti inmunocomplejo AcMoK4E7-atrazina. El pasaje a inmunoensayos luminiscentes se realizó mediante el sistema Luminol-HRP. En este sistema, la enzima HRP cataliza la reacción de oxidación del luminol en presencia de peróxido de hidrogeno provocando la emisión de luminiscencia.

5.1. Curvas de titulación de StrpHRP en inmunoensayo luminiscente en presencia de un exceso y ausencia de atrazina.

Se realizaron curvas de titulación del reactivo StrpHRP, en ausencia de atrazina y en presencia de exceso de atrazina, de forma análoga a las realizadas con las quimeras anteriores.

Al comparar ambas curvas de titulación se observó una diferencia notable entre las señales generadas por la presencia y ausencia de atrazina. Esto se reflejó además en los valores de cociente $\frac{(Atz)}{(Sin\ Atz)}$ que oscilaron en torno a 30-40 a lo largo de los diferentes puntos de concentración de StrpHRP analizada (**Figura 32 A**). Estos valores de cociente fueron no solo diez veces superiores a los alcanzados con la enzima NIuc, sino que también se aproximaron a los valores convencionalmente obtenidos en ensayos colorimétricos. Esta mejora también se evidenció en los ensayos realizados con StrpHRP en formato colorimétrico, utilizando TMB en lugar de luminol como sustrato, donde se obtuvieron valores de cociente $\frac{(Atz)}{(Sin\ Atz)}$ en el rango esperado y similares al ensayo luminiscente (Figura 32 B).

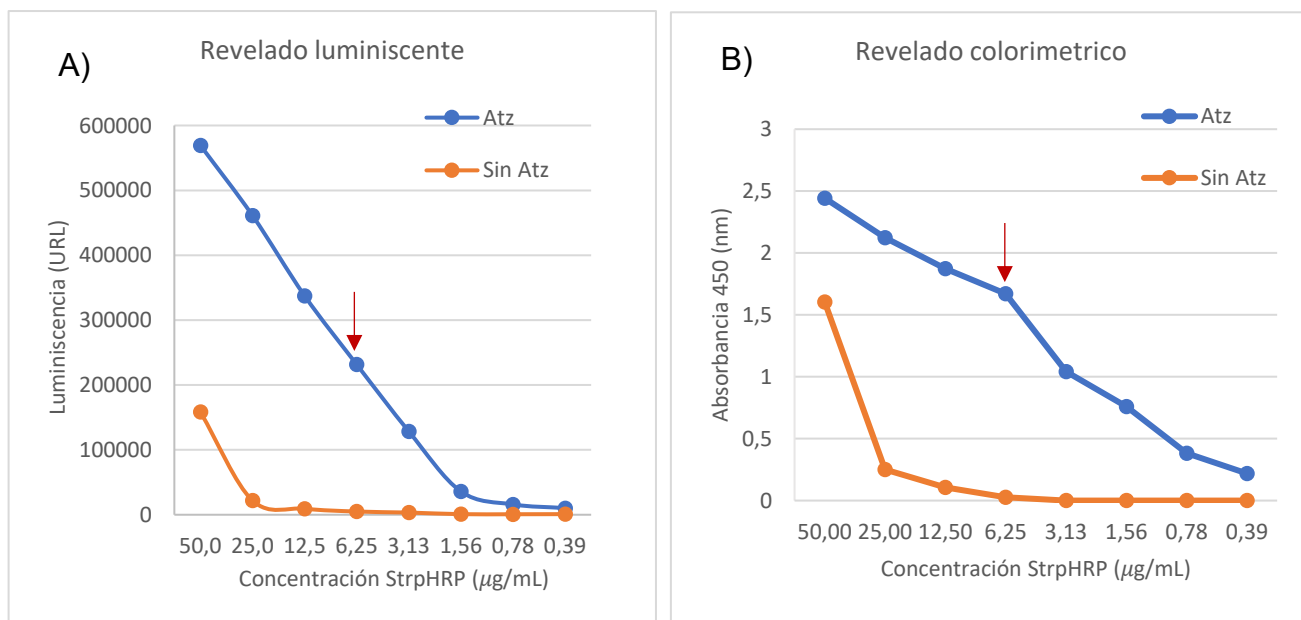


Figura 32: Curva de titulación de StrpHRP pre-incubado con el péptido 13A biotinilado, en exceso y ausencia de atrazina. Se realizaron curvas de titulación de StrpHRP con péptido 13A biotinilado en placas transparentes con AcMoK4E7 5 µg/mL en presencia o ausencia de atrazina y se reveló el ensayo con sustrato colorimétrico de HRP (A). Paralelamente se realizaron las mismas curvas en placas blancas y revelando con sustrato luminiscente (B). Se alcanzaron valores máximos de cocientes $\frac{(Atz)}{(Sin\ Atz)} = 62$ y $\frac{(Atz)}{(Sin\ Atz)}_{maximo} = 47$ (mostrados con flecha roja) para el sustrato colorimétrico y luminiscente, respectivamente. .

Estos resultados permitieron proceder con el desarrollo curvas de detección de atrazina, utilizando las concentraciones de StrpHRP que brindaban mayores cocientes $\left(\frac{(Atz)}{(Sin\ Atz)}\right)$.

5.2. Curvas de detección de atrazina

Al realizar las curvas de detección luminiscente de atrazina, se observó un comportamiento esperado de "dosis-respuesta", en el que la emisión de señal varía de forma dependiente a la concentración del analito.

Las curvas obtenidas en dos puntos de concentración de StrpHRP (6,25 y 12,5 $\mu\text{g/mL}$) exhibieron una baja dispersión entre replicas, fueron reproducibles en distintos días y mostraron valores de sensibilidad determinados por el EC50 de 0.107 ± 0.006 ng/mL y 0.121 ± 0.003 ng/mL respectivamente (**Figura 33 A y B**). Estos valores de sensibilidad fueron similares a los reportados con el péptido 13A en el ensayo PHAIA (20) y se ubicaron en el mismo rango que los EC50 obtenidos con el ensayo colorimétrico utilizando las mismas concentraciones de Strp-HRP, los cuales fueron de 0.08 ± 0.02 ng/mL y 0.13 ± 0.01 ng/mL respectivamente (**Figura 33 C y D**).

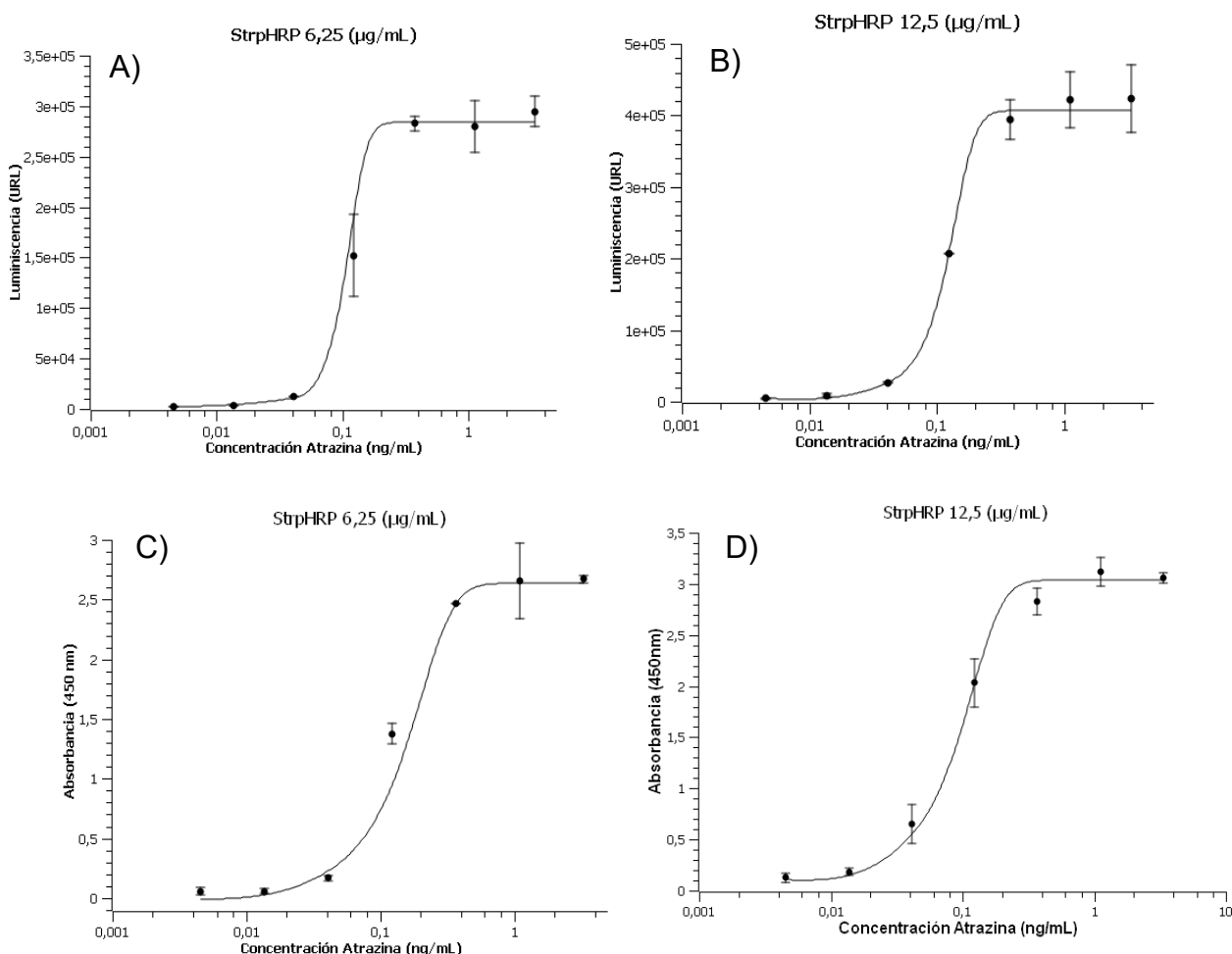


Figura 33: Curvas de detección de atrazina utilizando StrpHRP con péptidos 13A biotinilados. Las curvas de detección de atrazina luminiscentes mostraron valores de EC50 de 0.107 ± 0.006 ng/mL (A) y 0.121 ± 0.003 ng/mL (B) utilizando 6,25 o 12,5 $\mu\text{g/mL}$ de la quimera respectivamente. Por otro lado, las curvas de detección de atrazina colorimétricas generaron valores de EC50 de 0.08 ± 0.02 ng/mL (C) y 0.13 ± 0.01 ng/mL (D) utilizando las mismas concentraciones respectivamente.

Aunque según la bibliografía se esperaba alcanzar mayores sensibilidades de detección con el formato luminiscente (61–63) estos resultados demuestran que el sistema de nanopeptámeros para la detección de pequeñas moléculas como la atrazina puede ser utilizado en este formato de detección alternativo a la detección colorimétrica.

Conclusiones y perspectivas

En este trabajo se generaron diferentes nanopeptámeros con el fin de desarrollar ensayos no-competitivos para la detección de atrazina. Entre ellos, se distinguieron por la proteína scaffold utilizada, la enzima asociada a la construcción y el origen sintético o recombinante del péptido 13A.

La incorporación de la enzima NanoLuc en las construcciones pvtxNLuc y StrpNLuc no resultó favorable para el desarrollo de ensayos para la detección de atrazina. Se evidenció una disminución en la actividad enzimática de estas quimeras, lo que afectó su desempeño en las curvas de titulación correspondientes. Además, se constató la formación de agregados de alto peso molecular en ambos casos. Como se discutió previamente, estos agregados probablemente se originaron debido a una pérdida de estabilidad de la enzima cuando se encuentra en múltiples copias, lo que favorece su desplegamiento y la consiguiente agregación con pérdida de actividad enzimática. La proteína scaffold (verotoxina o estreptavidina) y el péptido también pueden sufrir desplegamiento en este contexto, afectando así el entorno del péptido y su capacidad para reconocer el inmunocomplejo. En el caso de la estreptavidina, su capacidad de unión a moléculas de biotina también podría verse comprometida como resultado de estas alteraciones.

El hecho de no haber llevado a cabo inmunoensayos luminiscentes no competitivos con esta enzima no significa que su uso para estos fines sea imposible. En nuestro grupo se ha empleado con éxito NLuc para establecer otros inmunoensayos destinados al diagnóstico y monitoreo ambiental (34,77) lo que sugiere que su aplicación al sistema de nanopeptámeros podría ser factible mediante la exploración de nuevas alternativas. En este sentido, es de interés investigar construcciones alternativas de las quimeras pvtxNLuc y StrpNLuc, que podrían implicar cambios en las secuencias espaciadoras (linkers) entre NLuc y la proteína scaffold, o invertir el orden de las proteínas para colocar a NLuc en el extremo N-terminal de la quimera. Además, se pretende explorar la generación de otras quimeras que reduzcan el número de moléculas de NLuc por quimera al emplear trímeros de una proteína Foldon utilizada en nuestro laboratorio, o al utilizar NLuc monovalente biotinilada para combinarla con quimeras de péptido-estreptavidina. Este último enfoque es especialmente interesante porque se espera que la estructura monovalente de la enzima mantenga una conformación y actividad enzimática adecuada.

La quimera pvtx sin la enzima NLuc tampoco permitió desarrollar un ensayo para la detección de atrazina, lo cual fue sorprendente en este trabajo, dado que previamente se había demostrado la viabilidad de expresar nanopeptámeros funcionales compuestos por péptidos fusionados a verotoxina utilizando el mismo método de clonado empleado aquí (33). Es probable que la disfuncionalidad de esta quimera se deba a un problema específico relacionado con el péptido 13A, que al ser transferido a este sistema pierde su especificidad por el inmunocomplejo AcMoK4E7-atrazina. La pérdida de especificidad podría estar relacionada con la presencia de dos residuos de glutamina y leucina, los cuales resultaron de la introducción de un sitio de restricción no presente en las construcciones de los fagos. Por lo tanto, futuros intentos de generar quimeras

pvtx deberán respetar el entorno aminoacídico del péptido originalmente obtenido en los fagos. Además de los residuos adicionales, la estructura y conformación cíclica del péptido también pueden verse afectadas por el entorno de cargas y la exposición al solvente ambos influenciados por la presencia de la proteína. En este sentido, sería relevante llevar a cabo estudios in silico para predecir la conformación del péptido 13A cuando está presente en el entorno de verotoxina y compararla con su conformación cuando su entorno es la proteína viral pVIII de los fagos.

Finalmente, se logró establecer un inmunoensayo luminiscente para la detección de atrazina utilizando la quimera StrpHRP con péptidos biotinilados, lo que permitió generar curvas de detección con sensibilidades acordes a los antecedentes. Estas curvas, marcan el inicio de este ensayo, el cual continuará siendo objeto de investigación para optimizar parámetros y mejorar la sensibilidad lograda. Se llevarán a cabo análisis para determinar los límites reales de detección y cuantificación, así como el rango lineal del ensayo mediante el análisis de muestras reales. También se buscará establecer los valores de precisión del ensayo tanto en condiciones inter como intradía, y se investigará la reactividad cruzada contra otros herbicidas de la familia triazinas. Además, el sistema luminiscente basado en StrpHRP podrá ser evaluado para la detección de otros herbicidas modelo del laboratorio, como molinato y clomazone, para lo cuales ya se dispone de péptidos.

Bibliografía

1. Davies C. Principles of Competitive and Immunometric Assays (Including ELISA)1. *The Immunoassay Handbook: Theory and Applications of Ligand Binding, ELISA and Related Techniques*. 2013 Jan 1;29–59.
2. Ullman EF. Homogeneous Immunoassays. In: Wild D, editor. *The Immunoassay Handbook*. Elsevier; 2013. p. 67–87.
3. Weeks I, Kricka LJ, Wild D. Signal Generation and Detection Systems (Excluding Homogeneous Assays). In: *The Immunoassay Handbook*. Elsevier; 2013. p. 267–85.
4. O'Farrell B. Lateral Flow Immunoassay Systems. In: Wild D, John R, Sheehan Chris, Binder Steve, He Jianwen, editors. *The Immunoassay Handbook*. Amsterdam: Elsevier; 2013. p. 89–107.
5. Omidfar K, Riahi F, Kashanian S. Lateral Flow Assay: A Summary of Recent Progress for Improving Assay Performance. *Biosensors (Basel)*. 2023 Aug 23;13(9):837.
6. Kobayashi N, Goto J. Noncompetitive immunoassays for small molecules with high sensitivity and specificity. In 2001. p. 139–70.
7. Liu A, Anfossi L, Shen L, Li C, Wang X. Non-competitive immunoassay for low-molecular-weight contaminant detection in food, feed and agricultural products: A mini-review. Vol. 71, *Trends in Food Science and Technology*. Elsevier Ltd; 2018. p. 181–7.
8. Self CH, Thompson S, Street T, Lamb KJ, Duffin G, Dessi JL, et al. Non-competitive Immunoassays for Small Molecules—the Anti-complex and Selective Antibody Systems. In: *The Immunoassay Handbook*. Elsevier; 2013. p. 61–5.
9. Voss EW, Mummert ME. Anti-metatype antibodies in immunoassays. *Microchimica Acta*. 1997 Sep;126(3–4):193–202.
10. Self CH, Dessi JL, Winger LA. High-performance assays of small molecules: enhanced sensitivity, rapidity, and convenience demonstrated with a noncompetitive immunometric anti-immune complex assay system for digoxin. *Clin Chem*. 1994 Nov 1;40(11):2035–41.
11. Nagata S, Tsutsumi T, Yoshida F, Ueno Y. A new type sandwich immunoassay for microcystin: production of monoclonal antibodies specific to the immune complex formed by microcystin and an anti-microcystin monoclonal antibody. *Nat Toxins*. 1999;7(2):49–55.
12. Ueda H, Tsumoto K, Kubota K, Suzuki E, Nagamune T, Nishimura H, et al. Open sandwich ELISA: A novel immunoassay based on the interchain interaction of antibody variable region. *Nat Biotechnol*. 1996 Dec;14(13):1714–8.
13. Hara Y, Dong J, Ueda H. Open-sandwich immunoassay for sensitive and broad-range detection of a shellfish toxin gonyautoxin. *Anal Chim Acta*. 2013 Sep;793:107–13.
14. Liang Y, Wang Y, Wang F, Li J, Wang C, Dong J, et al. An enhanced open sandwich immunoassay by molecular evolution for noncompetitive detection of *Alternaria* mycotoxin tenuazonic acid. *Food Chem*. 2021 Nov;361:130103.
15. Liu X, Eichenberger M, Fujioka Y, Dong J, Ueda H. Improved Detection Sensitivity and Selectivity Attained by Open-Sandwich Selection of an Anti-Estradiol Antibody. *Analytical Sciences*. 2012 Sep 10;28(9):861–7.

16. Shirasu N, Onodera T, Nagatomo K, Shimohigashi Y, Toko K, Matsumoto K. Noncompetitive Immunodetection of Benzaldehyde by Open Sandwich ELISA. *Analytical Sciences*. 2009 Sep 10;25(9):1095–100.
17. Abe R, Ohashi H, Iijima I, Ihara M, Takagi H, Hohsaka T, et al. “Quenchbodies”: Quench-Based Antibody Probes That Show Antigen-Dependent Fluorescence. *J Am Chem Soc*. 2011 Nov 2;133(43):17386–94.
18. Ueda H, Dong J. From fluorescence polarization to Quenchbody: Recent progress in fluorescent reagentless biosensors based on antibody and other binding proteins. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Proteins and Proteomics*. 2014 Nov;1844(11):1951–9.
19. Dong J, Ueda H. Recent Advances in Quenchbody, a Fluorescent Immunosensor. *Sensors*. 2021 Feb 9;21(4):1223.
20. González-Techera A, Vanrell L, Last JA, Hammock BD, González-Sapienza G. Phage anti-immune complex assay: General strategy for noncompetitive immunodetection of small molecules. *Anal Chem*. 2007 Oct 15;79(20):7799–806.
21. Giersch T. A New Monoclonal Antibody for the Sensitive Detection of Atrazine with Immunoassay in Microtiter Plate and Dipstick Format? Vol. 41, *J. Agric. FoodChem*. 1993.
22. Lassabe G. *Inmunodetección de pequeños analitos con nanopéptameros*. Montevideo; 2018.
23. Vanrell L, Gonzalez-Techera A, Hammock BD, Gonzalez-Sapienza G. Nanopeptamers for the development of small-analyte lateral flow tests with a positive readout. *Anal Chem*. 2013 Jan 15;85(2):1177–82.
24. Dundas CM, Demonte D, Park S. Streptavidin–biotin technology: improvements and innovations in chemical and biological applications. *Appl Microbiol Biotechnol*. 2013 Nov 22;97(21):9343–53.
25. Laitinen OH, Nordlund HR, Hytönen VP, Kulomaa MS. Brave new (strept)avidins in biotechnology. *Trends Biotechnol*. 2007 Jun;25(6):269–77.
26. Yang H, Zhang Q, Liu X, Yang Y, Yang Y, Liu M, et al. Antibody-biotin-streptavidin-horseradish peroxidase (HRP) sensor for rapid and ultra-sensitive detection of fumonisins. *Food Chem*. 2020 Jun 30;316:126356.
27. Wu J, Chen Y, Yang M, Wang Y, Zhang C, Yang M, et al. Streptavidin-biotin-peroxidase nanocomplex-amplified microfluidics immunoassays for simultaneous detection of inflammatory biomarkers. *Anal Chim Acta*. 2017 Aug 22;982:138–47.
28. Sun D, Liu X, Bao K, Wu L, Kuang H, Pei H, et al. Nanobody based immunoassay for alpha fetal protein detection using streptavidin-conjugated polymerized horseradish peroxidase for signal amplification. *Anal Sci*. 2023 Dec;39(12):2059–65.
29. Carlomagno M, Lassabe G, Rossotti M, González-Techera A, Vanrell L, González-Sapienza G. Recombinant streptavidin nanopeptamer anti-immunocomplex assay for noncompetitive detection of small analytes. *Anal Chem*. 2014 Oct 21;86(20):10467–73.
30. Chan YS, Ng TB. Shiga toxins: from structure and mechanism to applications. *Appl Microbiol Biotechnol*. 2016 Feb 19;100(4):1597–610.
31. Bergan J, Dyve Lingelem AB, Simm R, Skotland T, Sandvig K. Shiga toxins. Vol. 60, *Toxicon*. 2012. p. 1085–107.

32. Fraser ME, Chernaiia MM, Kozlov Y V., James MNG. Crystal structure of the holotoxino from *Shigella dysenteriae* at 2.5 Å resolution. *Nat Struct Mol Biol.* 1994 Jan;1(1):59–64.
33. Lassabe G, Rossotti M, González-Techera A, González-Sapienza G. Shiga-like toxin B subunit of *Escherichia coli* as scaffold for high-avidity display of anti-immunocomplex peptides. *Anal Chem.* 2014 Jun 3;86(11):5541–6.
34. Segovia-de los Santos P, Padula-Roca C, Simon X, Echaidés C, Lassabe G, Gonzalez-Sapienza G. A highly sensitive nanobody-based immunoassay detecting SARS-CoV-2 nucleocapsid protein using all-recombinant reagents. *Front Immunol.* 2023 Jul 11;14.
35. Quintero-Campos P, Segovia-de los Santos P, Ibáñez-Echevarria E, Hernández-Fernández de Rojas D, Casino P, Lassabe G, et al. An ultra-sensitive homologous chemiluminescence immunoassay to tackle penicillin allergy. *Anal Chim Acta.* 2022 Jun;1214:339940.
36. García-Campaña AM, Baeyens WRG. Principles and recent analytical applications of chemiluminescence. Vol. 28, *Analisis.* Wiley-VCH Verlag; 2000. p. 686–98.
37. Widder EA, Falls B. Review of bioluminescence for engineers and scientists in biophotonics. *IEEE Journal on Selected Topics in Quantum Electronics.* 2014 Mar 1;20(2).
38. Sharifian S, Homaei A, Hemmati R, Khajeh K. Light emission miracle in the sea and preminent applications of bioluminescence in recent new biotechnology. *J Photochem Photobiol B.* 2017 Jul 1;172:115–28.
39. Haddock SHD, Moline MA, Case JF. Bioluminescence in the sea. *Ann Rev Mar Sci.* 2010 Jan 15;2(1):443–93.
40. Perroy J, Pontier S, Charest PG, Aubry M, Bouvier M. Real-time monitoring of ubiquitination in living cells by BRET. *Nat Methods.* 2004 Dec 18;1(3):203–8.
41. Smirnova NA, Haskew-Layton RE, Basso M, Hushpulian DM, Payappilly JB, Speer RE, et al. Development of Neh2-Luciferase Reporter and Its Application for High Throughput Screening and Real-Time Monitoring of Nrf2 Activators. *Chem Biol.* 2011 Jun;18(6):752–65.
42. Remy I, Michnick SW. A highly sensitive protein-protein interaction assay based on Gaussia luciferase. *Nat Methods.* 2006 Dec 12;3(12):977–9.
43. Ohmuro-Matsuyama Y, Furuta T, Matsui H, Kanai M, Ueda H. Miniaturization of Bright Light-Emitting Luciferase ALuc: picALuc. *ACS Chem Biol.* 2022 Apr 15;17(4):864–72.
44. Kim DS, Choi JR, Ko JA, Kim K. Re-engineering of Bacterial Luciferase; For New Aspects of Bioluminescence. *Curr Protein Pept Sci.* 2017 Nov 21;19(1).
45. Kim SB, Torimura M, Tao H. Creation of Artificial Luciferases for Bioassays. *Bioconjug Chem.* 2013 Dec 18;24(12):2067–75.
46. Mezzanotte L, Blankevoort V, Löwik CWGM, Kaijzel EL. A novel luciferase fusion protein for highly sensitive optical imaging: from single-cell analysis to in vivo whole-body bioluminescence imaging. *Anal Bioanal Chem.* 2014 Sep 24;406(23):5727–34.
47. Hall MP, Unch J, Binkowski BF, Valley MP, Butler BL, Wood MG, et al. Engineered luciferase reporter from a deep sea shrimp utilizing a novel

- imidazopyrazinone substrate. *ACS Chem Biol.* 2012 Nov 16;7(11):1848–57.
48. Shimomura O, Masugi T, Johnson FH, Haneda Y. Properties and reaction mechanism of the bioluminescence system of the deep-sea shrimp *Oplophorus gracilorostri*. *Biochemistry.* 1978 Mar 1;17(6):994–8.
 49. He Q, Yang L, Lin M, Yang H, Cui X, McCoy MR, et al. Generation of bioluminescent enzyme immunoassay for ferritin by single-chain variable fragment and its NanoLuc luciferase fusion. *Anal Bioanal Chem.* 2022 Sep 10;414(23):6939–46.
 50. Alsulami T, Nath N, Flemming R, Wang H, Zhou W, Yu JH. Development of a novel homogeneous immunoassay using the engineered luminescent enzyme NanoLuc for the quantification of the mycotoxin fumonisin B1. *Biosens Bioelectron.* 2021 Apr 1;177.
 51. Wang F, Li ZF, Yang YY, Wan DB, Vasylieva N, Zhang YQ, et al. Chemiluminescent Enzyme Immunoassay and Bioluminescent Enzyme Immunoassay for Tenuazonic Acid Mycotoxin by Exploitation of Nanobody and Nanobody–Nanoluciferase Fusion. *Anal Chem.* 2020 Sep 1;92(17):11935–42.
 52. Bao K, Liu X, Liao Y, Liu Z, Cao H, Wu L, et al. Nanobody-Nanoluciferase Fusion Protein-Enabled Immunoassay for Ochratoxin A in Coffee with Enhanced Specificity and Sensitivity. *Toxins (Basel).* 2022 Oct 19;14(10):713.
 53. Ren W, Li Z, Xu Y, Wan D, Barnych B, Li Y, et al. One-Step Ultrasensitive Bioluminescent Enzyme Immunoassay Based on Nanobody/Nanoluciferase Fusion for Detection of Aflatoxin B₁ in Cereal. *J Agric Food Chem.* 2019 May 8;67(18):5221–9.
 54. Oyama H, Kiguchi Y, Morita I, Miyashita T, Ichimura A, Miyaoka H, et al. NanoLuc luciferase as a suitable fusion partner of recombinant antibody fragments for developing sensitive luminescent immunoassays. *Anal Chim Acta.* 2021 May;1161:238180.
 55. Liu J, Zhang L, Fu C, Wang Y, Sun S. Employment of 4-(1,2,4-triazol-1-yl)phenol as a signal enhancer of the chemiluminescent luminol–H₂O₂–horseradish peroxidase reaction for detection of hepatitis C virus in real samples. *Luminescence.* 2015 Dec 25;30(8):1297–302.
 56. Vdovenko MM, Lu CC, Yu FY, Sakharov IYu. Development of ultrasensitive direct chemiluminescent enzyme immunoassay for determination of aflatoxin M1 in milk. *Food Chem.* 2014 Sep;158:310–4.
 57. Vdovenko MM, Hung CT, Sakharov IYu, Yu FY. Determination of okadaic acid in shellfish by using a novel chemiluminescent enzyme-linked immunosorbent assay method. *Talanta.* 2013 Nov;116:343–6.
 58. Díaz AN, Bracho V, Algarra M, García Sánchez F. Chemiluminometric Determination of the Pesticide Pirimicarb by a Flow Injection Analysis Assembly. *Anal Lett.* 2008 Dec 8;41(17):3210–20.
 59. Khan P, Idrees D, Moxley MA, Corbett JA, Ahmad F, von Figura G, et al. Luminol-Based Chemiluminescent Signals: Clinical and Non-clinical Application and Future Uses. *Appl Biochem Biotechnol.* 2014 May 22;173(2):333–55.
 60. Zhang Z, Lai J, Wu K, Huang X, Guo S, Zhang L, et al. Peroxidase-catalyzed chemiluminescence system and its application in immunoassay. *Talanta.* 2018 Apr;180:260–70.

61. Roda A, Manetta AC, Portanti O, Mirasoli M, Guardigli M, Pasini P, et al. A rapid and sensitive 384-well microtitre format chemiluminescent enzyme immunoassay for 19-nortestosterone. *Luminescence*. 2003 Mar 6;18(2):72–8.
62. Deepak TS, Rashmi S, Manonmani HK. Comparison of colorimetric and chemiluminescent enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of endosulfan in food samples. *Luminescence*. 2015 Dec 24;30(8):1274–9.
63. Zhai R, Chen G, Liu G, Huang X, Xu X, Li L, et al. Comparison of Chemiluminescence Enzyme Immunoassay (Cl-ELISA) with Colorimetric Enzyme Immunoassay (Co-ELISA) for Imidacloprid Detection in Vegetables. *Foods*. 2023 Jan 1;12(1):196.
64. Browning DF, Godfrey RE, Richards KL, Robinson C, Busby SJW. Exploitation of the *Escherichia coli lac* operon promoter for controlled recombinant protein production. *Biochem Soc Trans*. 2019 Apr 30;47(2):755–63.
65. Sockolosky JT, Szoka FC. Periplasmic production via the pET expression system of soluble, bioactive human growth hormone. *Protein Expr Purif*. 2013 Feb;87(2):129–35.
66. Ferrer-Miralles N, Saccardo P, Corchero JL, Xu Z, García-Fruitós E. General Introduction: Recombinant Protein Production and Purification of Insoluble Proteins. In: García-Fruitós E, editor. *Insoluble Proteins*. 1st ed. Humana New York, NY; 2015. p. 1–24.
67. Mariati, Ho SCL, Yap MGS, Yang Y. Evaluating post-transcriptional regulatory elements for enhancing transient gene expression levels in CHO K1 and HEK293 cells. *Protein Expr Purif*. 2010 Jan;69(1):9–15.
68. Jäger V, Büssow K, Schirrmann T. Transient Recombinant Protein Expression in Mammalian Cells. In: Al-Rubeai M, editor. *Animal Cell Culture*. 1st ed. Springer Cham; 2015. p. 27–64.
69. Quilici LS, Silva-Pereira I, Andrade AC, Albuquerque FC, Brigido MM, Maranhão AQ. A minimal cytomegalovirus intron A variant can improve transgene expression in different mammalian cell lines. *Biotechnol Lett*. 2013 Jan 7;35(1):21–7.
70. Márquez De Los Santos MB. Producción de calibradores recombinantes quiméricos para ensayos serológicos COVID - 19 [Tesis de grado]. [Montevideo]: Universidad de la República, Facultad de Ciencias; 2023.
71. Starcevic Manning M, Hassanein M, Partridge MA, Jawa V, Mora J, Ryman J, et al. Comparison of Titer and Signal to Noise (S/N) for Determination of Anti-drug Antibody Magnitude Using Clinical Data from an Industry Consortium. *AAPS J*. 2022 Jul 12;24(4):81.
72. Bayarri-Olmos R, Idorn M, Rosbjerg A, Pérez-Alós L, Hansen CB, Johnsen LB, et al. SARS-CoV-2 Neutralizing Antibody Responses towards Full-Length Spike Protein and the Receptor-Binding Domain. *The Journal of Immunology*. 2021 Aug 1;207(3):878–87.
73. Lassabe G, Kramer K, Hammock BD, González-Sapienza G, González-Techera A. Noncompetitive Homogeneous Detection of Small Molecules Using Synthetic Nanopeptamer-Based Luminescent Oxygen Channeling. *Anal Chem*. 2018 May 15;90(10):6187–92.
74. Pírez-Schirmer M, Rossotti M, Badagian N, Leizagoyen C, Brena BM, González-Sapienza G. Comparison of Three Antihapten VHH Selection

- Strategies for the Development of Highly Sensitive Immunoassays for Microcystins. *Anal Chem.* 2017 Jun 20;89(12):6800–6.
75. Apostolidou D, Marszalek PE. Engineering robust chaperone substrates for refolding studies using the highly bioluminescent protein NanoLuc. *Biophys J.* 2022 Feb;121(3):326a.
 76. Apostolidou D, Zhang P, Yang W, Marszalek PE. NanoLuc tandem repeats show misfolding during thermal denaturation which is reversible by *E. coli* chaperones (DnaK/DnaJ/GrpE). *Biophys J.* 2023 Feb;122(3):477a.
 77. Gonzalo Menafrá. Desarrollo y optimización de los componentes necesarios para generar un kit para la detección de microcistinas en aguas utilizando la quimera recombinante Nanobody-NanoLuc. . [Montevideo]: Universidad de la República; 2024.