Universidad ORT Uruguay
Facultad de Ingeniería

NANOBIOSENSOR COLORIMÉTRICO PARA LA DETECCIÓN DE TOXINA ÉPSILON DE *Clostridium perfringens* TIPO D

Entregado como requisito para la obtención del título Ingeniero en Biotecnología

Florencia Pirotti (167064)
Joaquín Rodríguez (177712)

Tutor: Lorena Betancor

2017

Declaración de Autoría

Nosotros, Florencia Pirotti y Joaquín Rodríguez, declaramos que el trabajo que se presenta en esa obra es de nuestra propia mano.

Podemos asegurar que:

- La obra fue producida en su totalidad mientras realizábamos el Trabajo final de carrera;

- Cuando hemos consultado el trabajo publicado por otros, lo hemos atribuido con claridad;

- Cuando hemos citado obras de otros, hemos indicado las fuentes. Con excepción de estas citas, la obra es enteramente nuestra;

- En la obra, hemos acusado recibo de las ayudas recibidas;

- Cuando la obra se basa en trabajo realizado conjuntamente con otros, hemos explicado claramente qué fue contribuido por otros, y qué fue contribuido por nosotros;

- Ninguna parte de este trabajo ha sido publicada previamente a su entrega, excepto donde se han realizado las aclaraciones correspondientes.





Florencia Pirotti **Joaquín Rodríguez**

15 de marzo del 2017

Agradecimientos

En una primera instancia, quisiéramos agradecerle a nuestra tutora Lorena Betancor por toda su ayuda, apoyo y motivación a lo largo de la realización de esta tesis.

También queremos agradecer especialmente a Jesús Martínez de la Fuente y Valeria Grazú por su gran ayuda y contribución con el proyecto.

Queremos agradecer también a Álvaro Artiga Folch por las imágenes de microscopía de transmisión electrónica tomadas en el Instituto de Nanociencia de Aragón (Zaragoza, España).

Por otro lado, queremos agradecer a todo equipo de laboratorio, especialmente a Carlos Sanguinetti y Erienne Jackson por apoyarnos y contribuir en el desarrollo del proyecto.

Agradecemos también a ANII y al CII (Centro de Innovación en Ingenierías) por el financiamiento otorgado en este proyecto.

Por último nos gustaría agradecer a nuestras familias por el incondicional apoyo brindado a lo largo de esta etapa.

Resumen

La toxina épsilon de *Clostridium perfringens* tipo D (etx) es uno de los principales antígenos implicados en la enterotoxemia de animales domésticos y una de las infecciones que más afecta al ganado provocando importantes pérdidas económicas a nivel mundial. Actualmente, el principal método de profilaxis es la utilización de vacunas veterinarias. Para la elaboración de vacunas frente a este antígeno se realizan fermentaciones industriales de la bacteria *C. perfringens*.

La mejora de las metodologías del procesamiento downstream tanto en la preparación de vacunas clostridiales como en la estandarización de puntos críticos, podrían mejorar la calidad y aumentar los rendimientos de tales procesos. Una metodología rápida que permitiera analizar y cuantificar la etx durante su producción permitiría reducir los tiempos del proceso y disminuir el capital invertido en testeo y pruebas que hoy se realizan *in vivo*.

Un nanobiosensor permite la detección y/o cuantificación de un analito de interés de manera inmediata utilizando interacciones biológicas que luego son transducidas mediante un transductor para que puedan ser leídas por el usuario.

En este trabajo, se busca el desarrollo de un nanobiosensor basado en nanopartículas de oro, capaz de generar un cambio colorimétrico según la concentración de toxina épsilon a la que se lo enfrente.

De esta manera, se lograría implementar un punto de control en la fermentación de *C. perfringens* para la producción de vacunas veterinarias mediante el seguimiento a pie de reactor de la concentración producida de etx, optimizando así los tiempos de fermentación y estandarizando la concentración final de cada batch.

Para la realización de este proyecto, fue necesario obtener un estándar de etx puro, el cual fue llevado a cabo mediante el estudio y optimización de diversas metodologías. Mediante la optimización de estrategias de purificación bioquímica que combinaron precipitación salina y una cromatografía de intercambio iónico, se logró obtener un estándar proteico con una homogeneidad de 90%.

Por otra parte, se llevó a cabo la síntesis y caracterización de nanopartículas de oro de 16 nm, así como su posterior estabilización, funcionalización con anticuerpos anti-etx y bloqueo.

Con el protocolo óptimo de preparación y tras desafiar el nanobiosensor con muestras puras de etx, se logró obtener una respuesta específica, que implicó un cambio colorimétrico de la suspensión de nanopartículas proporcional a la concentración de etx en relaciones molares de nanopartículas:etx de 1:100.

Palabras clave

Clostridium perfringens tipo D; toxina épsilon; nanotecnología; nanobiosensor; nanopartículas de oro; purificación de proteínas; inmovilización de anticuerpos.

Abreviaciones

Etx: Toxina épsilon
IgG: Inmunoglobulina G
Ac: Anticuerpo
BSA: Albumina de suero bovino
BCIP/NBT: 5-Bromo- 4-cloro- 3-indolil fosfato/Nitroazul de tetrazolio
PBS: Buffer fosfato salino
PEG: Polietilenglicol
CH_3-PEG- NH_2: Polietilenglicol aminado
SH-PEG-COOH: Polietilenglicol carboxilado
SH-PEG- CH_3: Polietilenglicol metoxilado
EDA: etilendiamina
EDC: N-(3-Dimetilaminopropil)-N′- etil-carbodiimida hidrocloridrica
Sulfo-NHS: N-Hidroxisuccinimida
MES: 2- (N- morfolino) ácido etanosulfónico
g: Gramos
KDa: Kilodalton
L: Litro
M: Molar
mM: Milimolar
mg: Miligramos
µL: Microlitros
mL: Mililitros
nm: Nanómetros
nmol: Nanomoles
Np: Nanopartícula
AuNP: Nanopartícula de oro
NpMg: Nanopartícula magnética
RPM: Revoluciones por minuto
SDS: Dodecilsulfato sódico
SDS-PAGE: Electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecilsulfato sódico
SEM: Microscopía electrónica de barrido
TEM: Microscopía electrónica de transmisión
DLS: Dispersión de luz dinámica
EDTA: Ácido etilendiaminotetraacético
TAE: Tris-acetato- EDTA
Temed: Tetrametiletilendiamina
Tris: Tris (hidroximetil) aminometano
APS: Persulfato de amonio
V: Voltio
UV: Ultra violeta
Vis: Visible
SA: Sulfato de amonio
Au@Citrato: nanopartículas estabilizadas con citrato

Índice

1. Introducción 9
1.1 Nanotecnología y nanomateriales 9
1.2 Nanopartículas de oro 10
1.2.1 Propiedades de las nanopartículas de oro 10
1.2.2 Síntesis y funcionalización de nanopartículas de oro 11
1.3 Aplicaciones de AuNPs en biosensores 12
1.4 Nanobiosensor colorimétrico basado en agregación 14
1.5 El problema de la cuantificación de la toxina épsilon (etx) de *C. perfringens* 15
2. Objetivos 19
3. Metodología 20
3.1 Materiales 20
3.2 Métodos 21
3.2.1 Confirmación de direccionalidad del inserto mediante PCR 21
3.2.2 Confirmación de direccionalidad del inserto mediante enzimas de restricción 21
3.2.3 Electroforesis en gel de agarosa: Visualización de productos de PCR y plásmido incubado con Hind III 22
3.2.4 Western Blot 22
3.2.5 Precipitación salina 22
3.2.6 Cromatografía en columnas comerciales 23
3.2.7 Cromatografía de intercambio iónico en matrices DEAE y Lewatit Monoplus MP 68 23
3.2.8 Cromatografía de intercambio hidrofóbico en matriz Lewatit VP OC 1600 23
3.2.9 Cromatografía de exclusión molecular 24
3.2.10 Síntesis de nanopartículas de sílica 24
3.2.11 Cromatografía en matrices nanoestructuradas 24
3.2.12 Electroforesis SDS-PAGE 25
3.2.13 Tinción de colas de histidina 25
3.2.14 Cuantificación de proteínas mediante método de Bradford 25
3.2.15 Síntesis de nanopartículas de oro de 16 nm 25
3.2.16 Estabilización de nanopartículas de oro 26
3.2.17 Funcionalización de nanopartícula de oro 26
3.2.18 Bloqueo de nanopartículas de oro 26
3.2.19 Cálculo de la concentración de nanopartículas de oro 27
3.2.20 Electroforesis en gel de agarosa de nanopartículas de oro 27
3.2.21 Medidas de potencial Z y DLS 27

3.2.22 Ensayos de agregación del nanobiosensor 28
4. Resultados y Discusión 29
4.1 Purificación de la toxina épsilon de *Clostridium perfringens* tipo D 29
4.1.1 Abordaje molecular: Expresión recombinante de etx 29
4.1.2 Abordaje bioquímico clásico: Técnicas cromatográficas 35
4.1.2.1 Cromatografía de exclusión molecular gel filtración 36
4.1.2.2 Cromatografía de intercambio iónico en DEAE 38
4.1.2.3 Cromatografía de intercambio iónico en Lewatit Monoplus MP 68 40
4.1.2.4 Cromatografía en columnas comerciales POROS HQ 50 y D 50 40
4.1.2.5 Cromatografía de intercambio hidrofóbico en Lewatit VP OC 1600 41
4.1.2.6 Cromatografía de intercambio iónico en NPs magnéticas 42
4.1.2.7 Confirmación de identidad de toxina épsilon 43
4.1.2.8 Selección de método cromatográfico 44
4.2 Síntesis, estabilización y funcionalización de nanopartículas de oro esféricas de 16 nm 45
4.2.1 Síntesis de nanopartículas de oro 45
4.2.2 Estabilización de nanopartículas de oro 47
4.2.3 Funcionalización de nanopartículas de oro con anticuerpos anti etx 50
4.2.4 Bloqueo de nanopartículas de oro 53
4.3 Nanobiosensor 55
4.4 Perspectivas a futuro 60
5. Análisis económico 62
6. Conclusiones 64
7. Referencias bibliográficas 65
Anexo 1 68
Anexo 2 70

1. Introducción

1.1 Nanotecnología y nanomateriales

El prefijo “nano” asociado a una longitud hace referencia a la millonésima parte de un metro, lo que significa un factor de 10^{-9} m.

Si bien existen diversas definiciones para lo que es un nanomaterial, se define como un material que mida al menos en una dimensión, entre 1 y 100 nm de longitud. Los nanomateriales que presentan este rango de tamaño en sus tres dimensiones se denominan nanopartículas (1).

Mientras que la nanociencia trata el estudio de los principios fundamentales de las moléculas y materiales nanométricos, la nanotecnología se basa en la aplicación práctica de estas nanoestructuras, incluyendo el diseño, caracterización, producción hasta la aplicación de estructuras y dispositivos de escala nanométrica (2).

Las características de los materiales nanométricos son diferentes de las de los materiales macrométricos de la misma composición, presentando nuevas propiedades físicas y químicas. La escala nanométrica permite obtener materiales con propiedades únicas, ya que es a este nivel donde las propiedades ópticas y fisicoquímicas de los materiales pueden comportarse de manera novedosa. Las propiedades fundamentales de la materia a nivel nanométrico dependen del tamaño de una manera en que no lo hacen en ninguna otra escala (3).

Las razones de estos cambios, están relacionados a la naturaleza de las interacciones entre los átomos que componen el material, las cuales no existen en escalas macrométricas (3).

Los materiales nanométricos también presentan una característica que las diferencia de cualquier otro material, esta se trata de la gran relación superficie/volumen que presentan, la cual se representa en la Figura 1 (2).



	Un cubo de 4 centímetros de lado	Ocho cubos de 2 centímetros de lado	Sesenta y cuatro cubos de 1 centímetro de lado
Superficie (cm^2)	96	192	384
Volumen (cm^3)	64	64	64
Relación S/V	1.5 : 1	3 : 1	6 : 1

Figura 1. Representación del aumento de volumen a medida que el tamaño decrece (2).

El aumento de la relación superficie volumen, genera un aumento drástico del área superficial expuesta por los compuestos nanométricos, lo que genera también un aumento de la velocidad de las reacciones químicas que suceden en su superficie. De la misma manera, sobre la superficie de materiales nanoestructurados se logran inmovilizar mayor cantidad de compuestos por unidad de volumen que en otro tipo de materiales (2).

Por otra parte, cabe destacar que es en la escala nanométrica donde se encuentran la mayoría de los componentes celulares, como lo son las proteínas y ácidos nucleicos, por lo que es posible utilizar estructuras y procesos biológicos en desarrollos nanobiotecnológicos (Figura 2) (1).

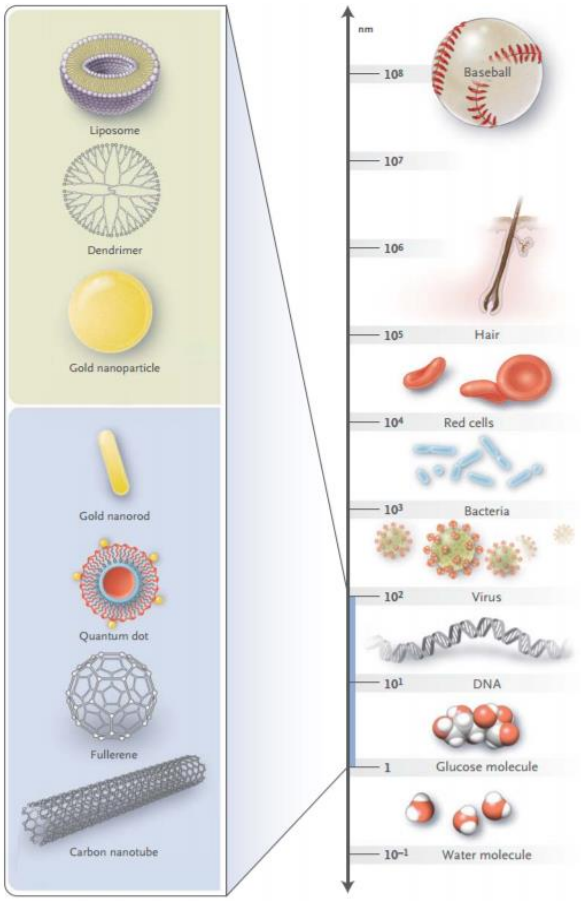


Figura 2. Escala comparativa de algunas nanopartículas respecto elementos de la vida cotidiana y biomoléculas (Imagen tomada de (4)).

Hoy en día, existe una variedad de nanomateriales que se clasifican según su naturaleza orgánica o inorgánica y por su morfología, presentando propiedades características (5).

Las aplicaciones concretas de los nanomateriales son extensas y variadas y van desde el marcaje fluorescente de moléculas, la detección de microorganismos y proteínas específicas, la purificación de componentes biológicos, el delivery de fármacos, tratamientos antitumorales térmicos o químicos, como agentes de contraste en imagenología molecular, entre otros (1).

1.2 Nanopartículas de oro

1.2.1 Propiedades de las nanopartículas de oro

Las nanopartículas de oro (AuNPs) son de gran interés en el mundo de la nanotecnología debido a sus propiedades físicas, químicas y biológicas (6). Entre ellas se destacan que presentan un core químicamente inerte mientras que su superficie es fácilmente modificable. Al mismo tiempo, su gran densidad electrónica y alta absorción óptica generan que las AuNPs sean candidatas en las bioaplicaciones (7).

La alta absorción óptica de las AuNPs hace que su propiedad más destacada sea la presencia de un plasmón de resonancia superficial (SPR de sus siglas en inglés: Surface Plasmon Resonance), el cual surge de la oscilación de los electrones con el campo magnético de la luz incidente (8).

Cuando una partícula metálica se expone a un rayo de luz, el campo magnético oscilatorio de esta, induce una oscilación coherente colectiva de los electrones libres del metal (Figura 3). La oscilación

de estos electrones sobre la superficie de la nanopartícula genera una separación de cargas formando de esta manera, un dipolo que oscila según el campo eléctrico de la luz incidente (9).

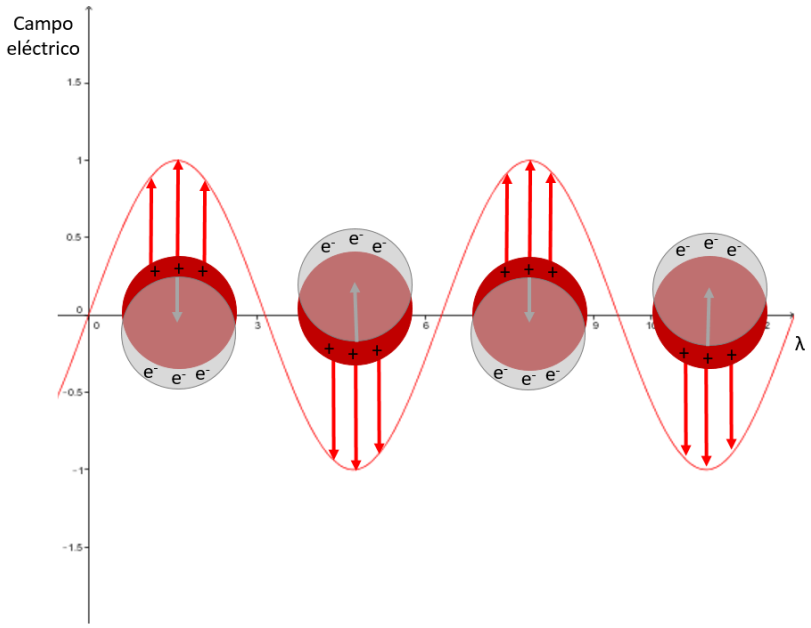


Figura 3. Esquema ilustrativo de la generación del plasmón de resonancia superficial en nanopartículas metálicas.

La amplitud de la oscilación alcanza un máximo a determinada frecuencia, y es a esta banda a la que se le denomina plasmón de resonancia superficial. El plasmón de resonancia induce la absorción de la luz incidente de determinada frecuencia por la nanopartícula que puede ser detectada en el rango de espectro UV-Visible utilizando un espectrofotómetro (8). La absorbancia, la forma y la longitud de onda del SPR dependen tanto de la naturaleza de la nanopartícula (dado por el tipo de metal del cual están hechas), como del tamaño, la forma y la distancia entre nanopartículas así como también el medio en el cual se encuentran (Figura 4) (9, 10).

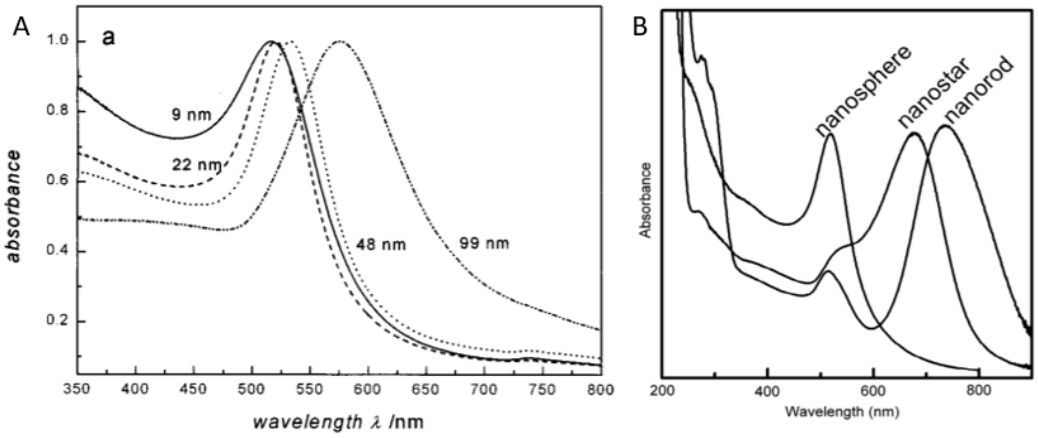


Figura 4. Espectro de absorción de nanopartículas de oro de distintos tamaños (A) y de distintas formas (B) (Imágenes tomadas de (11) y (12) respectivamente).

1.2.2 Síntesis y funcionalización de nanopartículas de oro

Hoy en día existen una gran diversidad de métodos de síntesis de AuNPs descritos en bibliografía. Se describen tanto abordajes del tipo “bottom-up” como “top-down” para obtener nanopartículas de diferentes tamaños y formas.

Un enfoque “top-down” implica el fraccionamiento de un material a granel hasta la obtención de nanopartículas, mientras que un enfoque del tipo “bottom-up” implica el uso de compuestos más pequeños como una sal, en donde los átomos se nuclean para formar nanopartículas (13).

Las técnicas más comunes y reproducibles para la síntesis de AuNPs son las del tipo “bottom-up” ya que presentan un mejor rendimiento. Este tipo de síntesis se basa en una reducción química de una sal de oro a su forma metálica. Para controlar el crecimiento inicial de las “semillas” formadas y para prevenir la agregación de las AuNPs, se utilizan agentes estabilizadores, los cuales pueden ser desde polímeros hasta surfactantes que una vez unidos a las nanopartículas brindan estabilidad coloidal tanto por repulsión electrostática como por estabilización estérica (7).

Una de las técnicas más utilizadas para la síntesis de AuNPs es el método de síntesis de Turkevich (14), en donde se reduce y estabiliza una sal cloro áurica en medio acuoso con citrato de sodio. Esta técnica permite obtener nanopartículas esféricas con un rango de tamaño acotado y con gran reproducibilidad. El tamaño de las nanopartículas obtenidas está determinado por la concentración de citrato de sodio utilizado. Mientras que altas concentraciones de citrato estabilizan nanopartículas de menor tamaño, una baja concentración de citrato no logra estabilizar tantas nanopartículas, provocando así un crecimiento de las mismas (15).

La caracterización de las nanopartículas es un punto clave para lograr entender y controlar la síntesis de las mismas. La caracterización se lleva a cabo mediante el uso de diferentes técnicas como lo son la microscopía de transmisión (TEM), microscopía electrónica de barrido (SEM), dispersión dinámica de la luz (DLS), espectroscopia UV–Vis, difracción de rayos X, potencial Z, entre otras. Estas técnicas son utilizadas para la determinación de diferentes parámetros como lo son el tamaño, la forma, área superficial, cristalinidad, orientación, dispersión, etc (16).

Uno de los principales problemas de las nanopartículas de oro es su estabilidad. Aunque pueden permanecer estables en el medio de síntesis, cualquier cambio de concentración o fuerza iónica del medio puede provocar la agregación de las mismas. Sin embargo, una de las grandes ventajas de estas nanopartículas, es la posibilidad de ser funcionalizadas por diversas moléculas en su superficie ya sea para mejorar su estabilidad como para cumplir roles biológicos (17).

Dentro de la variedad de opciones que brindan las nanopartículas, la conjugación con moléculas biológicas es de las más destacables. La elevada relación superficie-volumen que ofrecen las nanopartículas las convierte en un soporte ideal para funcionalizarlas con biomoléculas como proteínas, péptidos, ácidos nucleicos, entre otros.

Una de las biomoléculas más utilizadas para conjugar a las nanopartículas son los anticuerpos. Estos sistemas son utilizados tanto para el biosensado de muestras como para su uso en biomedicina.

1.3 Aplicaciones de AuNPs en biosensores

Hoy en día se buscan sistemas de análisis que permitan una detección específica de sustancias químicas y biológicas con gran precisión y sensibilidad en un corto tiempo. Las técnicas de análisis y sensado clásicas suelen requerir largos tiempos, son laboriosas y necesitan personal capacitado.

Las herramientas proporcionadas por la nanotecnología posibilitan el desarrollo de nanobiosensores. Se define biosensor al dispositivo de detección cuantitativo o semicuantitativo que contiene una molécula capaz de convertir una señal biológica en una electroquímica, óptica, térmica o piezoelétrica. Los biosensores proporcionan varias ventajas frente a técnicas clásicas de sensado, entre ellas se destacan que proporcionan procedimientos analíticos más cortos, admiten volúmenes

de muestra más pequeños y presentan menor costo que los métodos de sensado tradicionales, haciéndolos atractivo para las empresas (7).

Un biosensor consiste en un componente biológico (bio-receptor) encargado del reconocimiento específico asociado a un dispositivo transductor físico químico (Figura 5) (18).

El principio de detección de un biosensor se basa en el reconocimiento específico entre el bio-receptor y el analito de interés. Como resultado de esta interacción, se produce un cambio o una variación en las propiedades fisico-químicas que es detectada por el transductor y transformada en una señal que pueda ser leída por el detector (18).

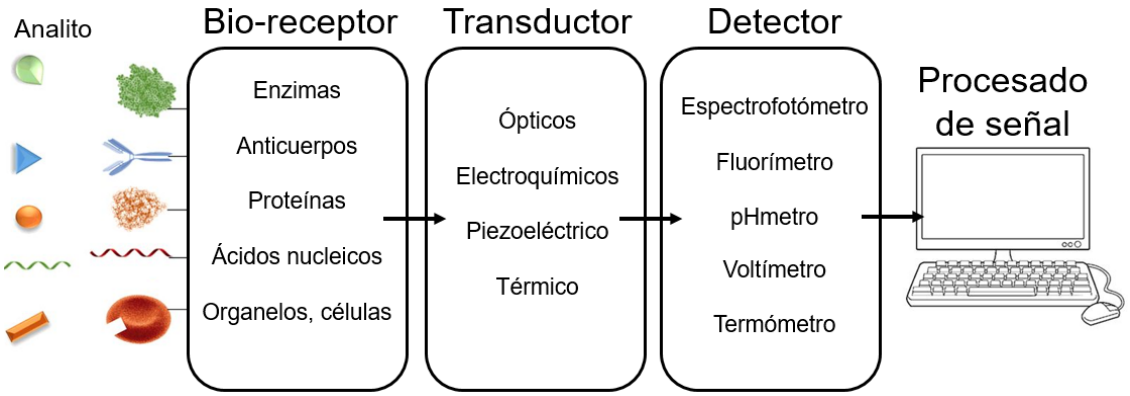


Figura 5. Esquema de los componentes de un biosensor.

Los biosensores pueden ser clasificados en tres tipos según la transducción de señal que posean: electroquímicos, ópticos y sensible a la masa.

Los sensores electroquímicos, son aquellos que cuando el analito se encuentra presente en la muestra, se produce un cambio eléctrico dado por un electrodo biofuncionalizado. Por otra parte, los sensores ópticos se basan en cambios ópticos tales como aparición o desaparición de color o cambios en la resonancia de plasmón de superficie. Por último, los sensores sensibles a la masa se basan en las variaciones de frecuencia de resonancia cuando el antígeno es reconocido, generando un incremento en la masa (7).

A pesar de que los biosensores pueden presentar ciertas limitaciones, como la posible inestabilidad del componente biológico (puede perder su actividad según las condiciones de almacenaje), las ventajas de éstos sobrepasan sus limitaciones.

Los biosensores presentan una gran variedad de ventajas frente a los sistemas clásicos de sensado, entre ellas se destacan que (i) presentan una rápida respuesta, (ii) son fácilmente utilizables, (iii) en general son pequeños dispositivos con bajo costo de producción, (iv) el analito a detectar puede ser sensado desde concentraciones micro a nanomolar (bajos límites de detección), (v) presentan alta sensibilidad y (vi) pueden ser utilizados *in-situ* en aplicaciones de campo (18).

Los biosensores basados en detección óptica son la clase de biosensores más diversos debido a que admiten una gran variedad de técnicas de espectroscopía para ser utilizados (por ejemplo, absorbancia, fluorescencia, fosforescencia, entre otras). Sin embargo, la medida de absorbancia es la más común ya que permite fácilmente correlacionar la concentración del analito de interés sensada (19).

Para el diseño de nanobiosensores colorimétricos las nanopartículas seleccionadas necesariamente deben presentar un marcado cambio de color, consecuencia de que el pico del SPR se encuentre en

el rango visible. Las nanopartículas de oro son utilizadas para este tipo de aplicación debido a sus características. Estas son fácilmente biofuncionalizables, presentan gran bioestabilidad y propiedades espectrales deseables, ya que el pico máximo en el SPR puede encontrarse en el rango visible dependiendo del tamaño y forma de la partícula. Por otra parte las propiedades ópticas de las AuNPs son dependientes de la distancia a la que se encuentran las nanopartículas. Una disminución de la distancia provoca una alteración en la absorbancia y la dispersión, lo que provocan un cambio de color y una variación del espectro de absorbancia. La gran capacidad de absorción de la luz que presentan las AuNPs es la principal propiedad en la cual se basa el diseño de biosensores basados en la agregación de las nanopartículas de oro utilizados para identificar moléculas objetivo (20).

1.4 Nanobiosensor colorimétrico basado en agregación

De la gran variedad de biosensores colorimétricos, este trabajo se enfoca en el desarrollo de un nanobiosensor colorimétrico basado en la agregación de nanopartículas de oro.

Este tipo de biosensores colorimétricos se basan en un cambio de color de la suspensión coloidal cuando el analito de interés es reconocido por los anticuerpos funcionalizados a la superficie de las nanopartículas. Estos tipos de sensores son muy utilizados entre los distintos métodos de detección de biomoléculas ya que su utilización es sencilla y provee una rápida respuesta (21). Por otra parte, permiten que la transducción de las interacciones moleculares sean detectables por un cambio de color que puede ser detectado a simple vista sin la necesidad de equipamiento de laboratorio (17).

Las nanopartículas de oro son ampliamente utilizadas para estos nanobiosensores, ya que pueden ser fácilmente sintetizadas por varios métodos obteniendo una amplia variedad de formas y tamaños, poseen una superficie altamente compatible con biomoléculas para ser funcionalizadas y presentan propiedades ópticas y electrónicas dependientes de la forma y tamaño que permiten su monitoreo (22).

En la Figura 6 se esquematiza el funcionamiento de un nanbiosensor en el cual se utilizan nanopartículas de oro como plataforma para la funcionalización con anticuerpos sobre la superficie de las mismas. La suspensión coloidal de nanopartículas presenta un color rojo cuando no hay presencia de analito de interés. Nanopartículas de un tamaño de aproximadamente 16 nm presentan un pico máximo en su SPR a longitudes de onda del entorno de los 520 nm, que corresponde a un espectro de emisión en el color rojo. Sin embargo, cuando estas son enfrentadas a la molécula de interés, los anticuerpos se encargan del reconocimiento, provocando un acercamiento de las nanopartículas y generando un cambio de color en la suspensión. Este cambio de color se debe a que la suspensión de nanopartículas unidas al analito y más próximas entre sí presenta un máximo de absorción de su SPR a longitudes de onda mayores, emitiendo en el color azul. Este cambio de color indica la presencia del analito y puede ser visualizado de manera macroscópica o mediante un seguimiento espectrofotométrico en base al plasmón de resonancia superficial de las nanopartículas, el cual se desplaza a longitudes de onda mayores cuando las nanopartículas aumentan su estado de agregación.

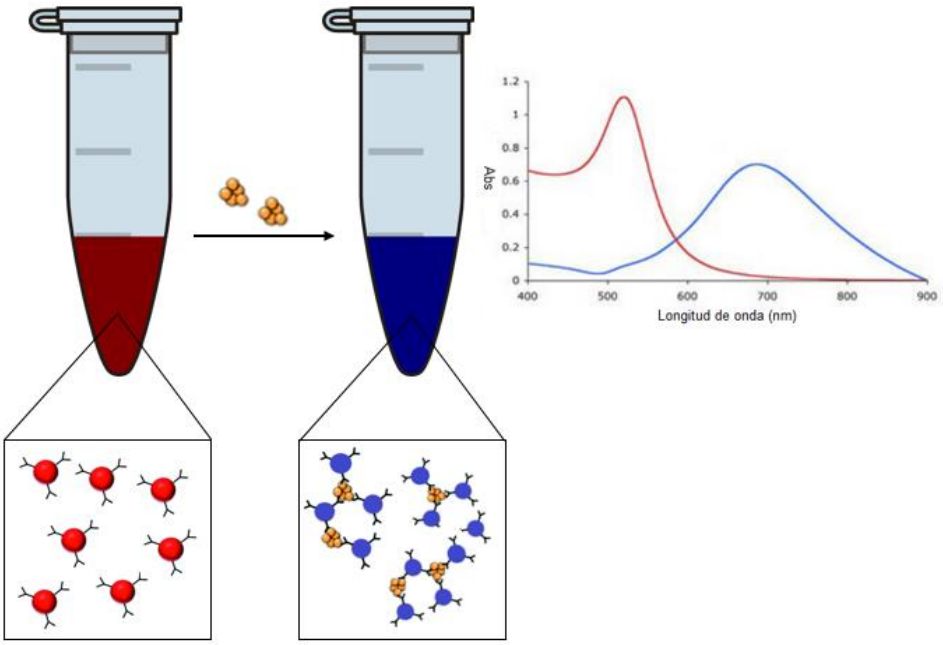


Figura 6. Esquema de funcionamiento de un nanobiosensor colorimétrico basado en agregación.

El desarrollo de un nanobiosensor colorimétrico como el descrito anteriormente, requiere de varios pasos. En primera instancia se deben sintetizar las AuNPs del tamaño y forma deseada y deben ser caracterizadas mediante diversas técnicas. Posteriormente, se procede a estabilizar las nanopartículas con moléculas poliméricas capaces de aumentar la estabilidad de las mismas así como ofrecer grupos funcionales para la posterior conjugación de biomoléculas. Para este diseño de nanobiosensor, se utilizan anticuerpos como biomoléculas para funcionalizar a la superficie de las nanopartículas. Finalmente se bloquea la superficie de las AuNPs que no está en contacto con el anticuerpo de manera de evitar cualquier tipo de interacción inespecífica con la muestra.

Una vez sintetizado el nanobiosensor, se debe proceder a la optimización del funcionamiento del mismo. Para ello, se requiere de un estándar de analito de interés para enfrentarlo al nanobiosensor. Es de crucial importancia tener disponible un estándar del analito, de manera de conocer el comportamiento que presenta el sensor frente a la molécula objetivo, asegurando así que los fenómenos observados son provocados por la presencia del analito y no por componentes de la matriz de la muestra.

Una vez que se obtiene el nanobiosensor funcional, se procede a desafiarlo contra la muestra real a analizar. El hecho de utilizar nanobiosensores en muestras biológicas, hace que sea de vital importancia lograr obtener la superficie de la nanopartícula lo más inerte posible frente a otros componentes.

Las muestras biológicas, generalmente contienen gran cantidad de moléculas coexistentes con el analito. La presencia de un anticuerpo de alta especificidad es de gran importancia para no obtener resultados falsos positivos, o sobreestimar la concentración del analito. Por otra parte, las interacciones a nivel molecular existentes entre el anticuerpo y el analito pueden ser interferidas por las distintas moléculas presentes en la muestra, evitando los fenómenos de agregación y cambios de color en la suspensión coloidal de las nanopartículas funcionalizadas.

1.5 El problema de la cuantificación de la toxina épsilon (etx) de *C. perfringens*

La enterotoxemia es una de las principales causas de muertes en rumiantes y de las mayores pérdidas económicas.

Clostridium perfringens es una bacteria anaerobia, Gram-positiva, formadora de poros que se encuentra en el agua, suelo y el tracto gastrointestinal de varios mamíferos. Existen cinco tipos de dicha bacteria (A, B, C, D y E), cada una de ellas produce un tipo o una combinación de toxinas (23). *C. perfringens* produce cuatro tipos de toxinas, alfa, beta, épsilon e iota; tres de ellas (alfa, beta y épsilon) afectan directamente a las membranas celulares mediante el incremento de la permeabilidad, causando un desbalance iónico, mientras que la toxina iota destruye directamente la actina del citoesqueleto. La intoxicación con cualquiera de estas toxinas clostridiales, pueden llevar a las disfunción celular causando la muerte (24).

La toxina épsilon (etx) es producida por *C. perfringens* tipo B y D, y es la tercer toxina clostridial más potente después de las toxinas botulínica y tetánica. La toxina épsilon, es producida como una protoxina en un estado relativamente inactivado, con un peso molecular de aproximadamente 33 KDa. Mediante una maduración proteolítica causada por proteasas del tracto gastro digestivo como la tripsina y quimotripsina, y por otras como la λ-proteasa producidas por el propio *C. perfringens* se produce la escisión de los residuos 13 y 29 de los extremos N y C terminal respectivamente. Una vez activada, la toxina tiene un peso molecular de 32 KDa y una potencia LD50 de 70 ng/kg, aproximadamente 1000 veces más que la protoxina (24, 25).

La toxina épsilon es responsable de una rápida y fatal enterotoxemia de ovejas, cabras y otros animales de campo. La enterotoxemia es una enfermedad entérica fatal que se asocia con algunas alteraciones clínicas, bioquímicas, bacteriológicas e histopatológicas características. Dentro de los diversos efectos que provoca, están reportados el incremento de la permeabilidad intestinal, daño en el riñón y aumento de la presión sanguínea. (26).

Como se muestra en la Figura 7, etx posee tres dominios compuestos principalmente por hojas beta, los cuales comparte con otras toxinas bacterianas formadoras de poros (27). Sumado a otras características, etx puede ser clasificada dentro de la familia de toxinas β formadoras de poros (PFTs).

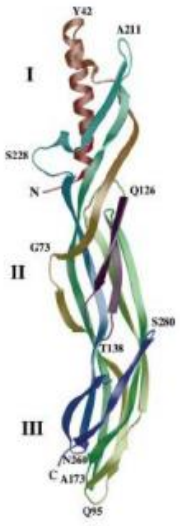


Figura 7. Representación gráfica tridimensional de la estructura proteica de la toxinas épsilon (Imagen tomada de (27)).

Las PFTs-beta comparten un mecanismo de actividad (Figura 8). Estas toxinas son secretadas como monómeros solubles por la bacteria los cuales reconocen receptores específicos en la superficie de la célula blanco. Previo a esto, los monómeros experimentan un cambio conformacional y forman un heptámero que se inserta en la membrana celular para formar un poro (26).

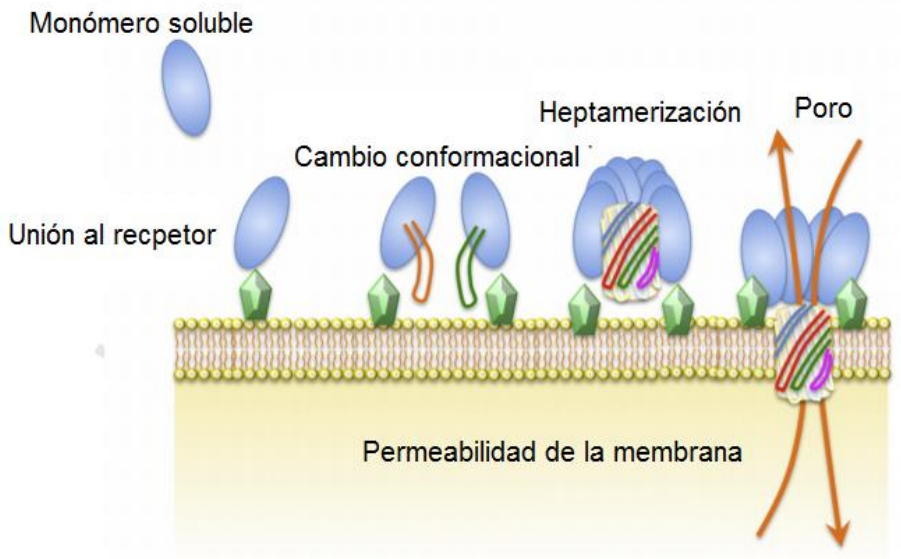


Figura 8. Modelo general del mecanismo de acción de las toxinas β formadoras de poros (Imagen tomada de (26)).

Etx es un componente esencial en la producción de vacunas clostridiales para la profilaxis de dicha enfermedad, y es por lo tanto un eslabón muy importante en la medicina veterinaria.

Ovejas y cabras son los huéspedes naturales y en donde más frecuencia ocurre intoxicaciones por etx. Si bien tanto la cepa de *C. perfringens* B y D son productoras de etx, es el tipo D el predominante en los casos de enterotoxemia. La enfermedad no es de carácter infeccioso, pero aparecen brotes esporádicos cuando se altera el equilibrio microbiano del intestino por distintos factores, como el consumo de alimentos ricos en carbohidratos, un estado de nutrición pobre, infecciones parasitarias, etc. (28).

Puntualmente en Uruguay, el último valor reportado a la fecha fue en el año 2011 donde se estimó una pérdida de US$ 100 millones anuales en el sector ganadero debido a la no prevención mediante vacunación contra la clostridiosis, provocando importantes pérdidas para la ganadería. Se estima que de un total del 3% de muertes a nivel nacional, la tercera parte son debidas a las clostridiosis (29).

En Uruguay, están disponibles en el mercado más de 20 vacunas contra clostridiosis, muchas de las cuales presentan a la etx como antígeno. Las vacunas están basadas en filtrados celulares o cultivos de células enteras tratados con formaldehído las cuales confieren un alto grado de protección a animales.

En lo que respecta a la producción de vacunas, las medidas de la actividad de la toxina se realizan a producto terminado, la cual consiste en ensayos de letalidad en ratón (28).

Por otra parte, se han desarrollado ensayos alternativos para medir la toxicidad de la etx mediante el uso de líneas celulares susceptibles a filtrados de cultivo de *C. perfringens* tipo D (28).

La producción de vacunas contra toxina épsilon de *C. perfringens* tipo D a través de una fermentación implica un número de variables desconocidas o no estandarizadas debido a la naturaleza biológica de los microorganismos. Sin embargo, esfuerzos enfocados en análisis y estandarización de puntos críticos durante el procesamiento downstream, pueden mejorar la calidad de los procesos. De esta manera, no solo se reducen los tiempos del proceso sino también se disminuye el capital invertido en testeo y pruebas en cada fermentación.

Actualmente no existe en el mercado un sistema de cuantificación específico por etx capaz de realizar un seguimiento *in-situ* de la concentración de la proteína durante el proceso fermentativo.

Los tiempos de fermentación de *C. perfringens* tipo D para la producción de etx a nivel industrial están estipulados por la experiencia, sin embargo la concentración obtenida en cada producción es variable.

La utilización de un nanobiosensores capaz de cuantificar *in-situ* la concentración de toxina épsilon producida en el fermentador, sería de gran importancia para optimizar los tiempos de fermentación, permitiendo así una vez alcanzada la concentración de etx deseada finalizar el proceso fermentativo, no solo disminuyendo tiempos de procesado, sino estandarizando la concentración final de cada batch.

2. Objetivos

Este trabajo tiene como objetivo general el desarrollo de una nanobiosensor colorimétrico basado en nanopartículas de oro para la detección y cuantificación de toxina épsilon del sobrenadante de fermentación de *Clostridium perfringens* tipo D.

Para llevar a cabo este proyecto se proponen los siguientes objetivos específicos:

- Obtener un estándar puro de toxina épsilon mediante métodos cromatográficos clásicos y mediante la síntesis recombinante de la etx.
- Sintetizar y caracterizar nanopartículas de oro de 16 nm.
- Estabilizar nanopartículas de oro con distintas moléculas de polietilenglicol carboxilados.
- Funcionalizar nanopartículas con anticuerpos anti-toxina épsilon.'
- Bloquear nanopartículas funcionalizadas con distintos agentes bloqueantes.
- Desafiar las nanopartículas funcionalizadas con muestras de toxina épsilon.

3. Metodología

3.1 Materiales

El ADN genómico y el sobrenadante de fermentación de *Clostridium perfringens* tipo D fueron cedidos por la empresa Virbac Uruguay. Los primers necesarios para amplificar el gen etx fueron diseñados y enviados a sintetizar a la empresa Macrogen (Seúl, Corea del Sur). El kit Champion pET SUMO Expression System utilizado para expresar etx recombinante, la enzima de restricción Hind III utilizada para corroborar la direccionalidad del inserto y la kanamicina se obtuvieron de Thermo Fisher Scientific (Massachusetts, Estados Unidos).

Tanto el anticuerpo policlonal IgG primario anti-toxina épsilon como el anticuerpo monoclonal anti-toxina épsilon fueron donados por Virbac Australia mientras que el anticuerpo policlonal fragmento Fab anti-toxina épsilon fue adquirido de NIBSC (Herts, Reino Unido). Por otra parte, los anticuerpos secundarios IgG anti-mouse conjugado a fosfatasa alcalina, IgG anti-horse conjugado a fosfatasa alcalina como la solución de revelado BCIP/NBT solution premixed fueron adquiridos de Sigma-Aldrich (Misuri, Estados Unidos), mientras que el anticuerpo secundario IgG anti-rabbit conjugado a fosfatasa alcalina fue adquirido de Thermo Fisher Scientific (Massachusetts, Estados Unidos).

Los marcadores de peso molecular preteñidos (PageRuler Prestained Protein Ladder 26616, 26618 y 26619), el kit iBlot Gel Transfer Stacks Nitrocellulose Regular y el kit InVision His-Tag In-Gel Stain fueron adquiridos de Thermo Fisher Scientific (Massachusetts, Estados Unidos).

Las nanopartículas magnéticas fluidMAG-PEA fueron adquiridas en Chemicell (Berlín, Alemania), las matrices Lewatit MP Monoplus 68 y Lewatit VP OC 1600 fueron adquiridas en Lenntech (Rotterdamseweg, Holanda) mientras que la matriz Dietilaminoetil Sephadex (DEAE-Sephadex) fue adquirida de Sigma-Aldrich (Misuri, Estados Unidos). El tetraetilortosilicato (TMOS) fue de MERCK (New Jersey, Estados Unidos) y la polietilenimina (PEI) de Sigma-Aldrich (Misuri, Estados Unidos). Tanto las columnas de gel filtración Superdex 75 10/300 y Superdex 200 10/300 como el filtro concentrador de proteínas GE 10,000MWCO 2 mL fueron de GE Healthcare (Little Chalfont, Reino Unido). Las columnas POROS HQ 50 y D 50 fueron de Thermo Fisher Scientific (Massachusetts, Estados Unidos).

La ácido cloroáurico utilizado fue adquirido de Strem Chemicals (Massachusetts, Estados Unidos). La etilcarbodiimida (EDC) y el N-hidroxisuccinimida (Sulfo-NHS) fueron adquiridos de Sigma-Aldrich (Misuri, Estados Unidos). Los polietilenglicoles (PEGs) SH-PEG-COOH 3219 Da y SH-PEG-COOH 458 Da se obtuvieron de Iris-BIOTECH GMBH (Marktredwitz, Alemania) mientras que el SH-PEG-COOH 2100 Da y la etilendiamina (EDA) fueron adquiridos de Sigma-Aldrich (Misuri, Estados Unidos). Por otro lado el H_2N-PEG-OCH_3 750 Da se obtuvo de Rapp Polymere (Tübingen, Alemania), la sero albúmina bovina (BSA) fue de Gibco by Thermo Fisher Scientific (Massachusetts, Estados Unidos) y el Tris de J. T. Baker (Pensilvania, Estados Unidos).

El resto de los materiales utilizados fueron de grado analítico.

La composición de las soluciones utilizadas se encuentran detalladas en el Anexo 1.

3.2 Métodos

3.2.1 Confirmación de direccionalidad del inserto mediante PCR

Se seleccionaron colonias One Shot Mach-T1R al azar resistentes a kanamicina, y se realizó una extracción de ADN plasmídico de cada una de ellas con el kit ZR Plasmid Miniprep (Zymo Research, California, Estados Unidos).

Previo a los análisis, se llevó a cabo una electroforesis en gel de agarosa 1 % a partir de la extracción plasmídica de cada colonia a modo de confirmar la presencia del plásmido de interés.

El análisis por PCR consistió en la amplificación del ADN plasmídico extraído con 4 juegos de primers, un par de primers (forward y reverse) que amplifican el gen etx y un par de primers (forward y reverse) que amplifican el plásmido pET SUMO flanqueando la zona de inserción del gen etx.

Se realizaron 4 reacciones de PCR combinando los primers de la siguiente manera:

1) Forward etx y Reverse etx.
2) Forward Sumo y Reverse Sumo.
3) Forward etx y Reverse Sumo.
4) Forward Sumo y Reverse etx.

Primer		Largo
Forward etx	5'ATGTCAAAAAAAAATCTTGTAAAAAGTTTAGC3'	32
Reverse etx	5'TTATTTTATTCCTGGTGCCTTAATAGAAAG 3'	30
Forward Sumo	5´-AGATTCTTGTACGACGGTATTAG-3´	23
Reverse Sumo	5´-TAGTTATTGCTCAGCGGTGG-3´	20

El programa de PCR utilizado fue el siguiente:

Programa		
94ºC	1 minuto	
58ºC	1 minuto	35 ciclos
72ºC	1 minuto	
72ºC	10 minutos	

3.2.2 Confirmación de direccionalidad del inserto mediante enzimas de restricción

Para el análisis de direccionalidad utilizando enzimas de restricción, se realizó un análisis bioinformático con el programa NEB cutter V2.0 (New England BioLabs, Massachusetts, Estados Unidos), de forma de encontrar una enzima capaz de cortar en 2 sitios distintos y de generar patrones de bandas reconocibles. De esta manera se seleccionó la enzima de restricción Hind III.

El ensayo constó de la incubación de los ADN plasmídicos de las colonias seleccionadas con la enzima Hind III durante 3 horas y media a 37ºC.

Reacción de restricción con Hind III	
ADN plasmídico	2 µL
H2O up	16 µL
10X Buffer de enzima	2 µL
Enzima Hind III (5000U)	2 µL

3.2.3 Electroforesis en gel de agarosa: Visualización de productos de PCR y plásmido incubado con Hind III

A modo de visualizar los productos de PCR obtenidos y los fragmentos generados por los cortes de la enzima de restricción en el plásmido, se realizaron electroforesis en gel de agarosa 1 %. La agarosa se disolvió en buffer TAE 0,5X y posteriormente se adicionó 1µL de GoodView (SBS Genetech, Beijing, China) como agente intercalador. Las muestras se diluyeron en buffer de carga (Thermo Fisher Scientific, Massachusetts, Estados Unidos) hasta obtener una dilución 1X del mismo. Se sembraron 5 µL de cada muestra junto con 3 µL de marcador de peso molecular Gene Ruler DNA Ladder Mix (Thermo Fisher Scientific, Massachusetts, Estados Unidos) y el gel se corrió en buffer TAE 0,5X a 100 V por minutos.

Posteriormente, se visualizó la corrida a través del sistema de visualización de imágenes E-Gel Imager (Thermo Fisher Scientific, Massachusetts, Estados Unidos).

3.2.4 Western Blot

Para el análisis de Western Blot se realizó previamente una electroforesis SDS-PAGE 12%. Luego se transfirieron las proteínas del gel de poliacrilamida a una membrana de nitrocelulosa con el kit del sistema iBlot siguiendo las indicaciones del fabricante. Posteriormente la membrana se incubó 16 horas a 4 °C con solución de bloqueo conteniendo PBS 1X, Tween 0,5 % y BSA 0,5 %. Se lavó la membrana tres veces con solución de lavado: PBS 1X, Tween 0,05 % durante 10 minutos a 70 rpm y se incubó durante 1 hora a 25 °C a 70 rpm con el anticuerpo primario correspondiente (dilución 1/1000 anticuerpo policlonal fragmento Fab anti-toxina épsilon, 1/100 anticuerpo policlonal IgG anti-toxina épsilon, 1/3000 anticuerpo monoclonal anti-toxina épsilon) en una solución de PBS 1X, 0,05 % Tween. Nuevamente se lavó la membrana tres veces con PBS 1X, Tween 0,05 % durante 10 minutos a 70 rpm. Una vez finalizados los lavados, se incubó 1 hora a 25 °C a 70 rpm con el anticuerpo secundario correspondiente (1/8000 anticuerpo IgG anti-horse conjugado a fosfatasa alcalina, 1/500 anticuerpo IgG anti-rabbit conjugado a fosfatasa alcalina, 1/1500 anticuerpo IgG anti-mouse conjugado a fosfatasa alcalina, respectivamente) y se repitieron los lavados. Se reveló el Western blot con BCIP/NBT solution, premixed, se detuvo la reacción con agua destilada.

3.2.5 Precipitación salina

Se realizó una precipitación salina con sulfato de amonio al 75 % del sobrenadante de fermentación de *C. perfringens* tipo D. Para ello, se disolvió sulfato de amonio en una relación de 516 g para 1 L de sobrenadante de fermentación y se incubó a 25 °C durante 45 minutos en agitación. Posteriormente se centrifugó la solución durante 15 minutos a 5000 rpm a 4 °C. Se descartó el sobrenadante y el pellet se resuspendió en buffer fosfato de sodio 25 mM pH 7 en el mismo volumen retirado.

3.2.6 Cromatografía en columnas comerciales

Para ambas columnas POROS (HQ 50 y D 50) se llevó a cabo el mismo protocolo y todas la cromatografías fueron llevadas a cabo en el equipo de FPLC AKTA avant 25 (GE Healthcare, Little Chalfont, Reino Unido).

Se lavó la columna con 10 volúmenes de columna con agua milli Q. Posteriormente, se equilibró con 2 volúmenes de columna con buffer fosfato de sodio 25 mM pH 7. Luego, se aplicó 1 mL de muestra (sobrenadante de fermentación de *C. perfringens* tipo D o sobrenadante de fermentación precipitado), se realizó un lavado con 2 volúmenes de columna con buffer fosfato de sodio 25 mM pH 7 y se realizó una elución en gradiente de 10 volúmenes de columna de 0 a 100 % de NaCl 1 M junto con una elución de 2 volúmenes de columna con 100 % de NaCl 1 M. Luego se realizó un lavado con 10 volúmenes de columna con buffer fosfato de sodio 25 mM pH 7 y uno de 20 volúmenes de columna con agua milli Q. El flujo fue 0,3 mL/ minuto continuo durante toda la cromatografía. La columna se almacenó en etanol al 20 %. La detección se realizó a 25 °C con medidas de absorbancia a 280 nm y 214 nm.

Todas las fracciones se recogieron y fueron analizadas mediante electroforesis SDS-PAGE 12 %.

3.2.7 Cromatografía de intercambio iónico en matrices DEAE y Lewatit Monoplus MP 68

La hidratación del soporte comercial DEAE se realizó siguiendo las especificaciones del fabricante, para ello, se pesaron 5 g del soporte comercial deshidratado, se disolvieron en 25 mL de buffer fosfato de sodio 25 mM pH 7 y se incubó por 16 horas a 25 °C. Posteriormente se almacenó a 4 ºC hasta su utilización.

Ambas cromatografías se realizaron en batch en columnas PD-10 (GE Healthcare, Buckinghamshire, Reino Unido), utilizando una relación 1: 3 matriz-aplicado siguiendo el mismo protocolo. Se pesó 1 g de matriz y se lavó 3 veces con 3 mL de buffer fosfato de sodio 25 mM pH 7, posteriormente se aplicaron 3 mL de sobrenadante de fermentación o sobrenadante de fermentación precipitado y se incubó por 2 horas a 25 °C en agitación. Luego, se realiza un lavado con 3 mL de buffer fosfato de sodio 25 mM pH 7 por 10 minutos a 25 °C en agitación. Posteriormente se realizaron eluidos con concentraciones crecientes de cloruro de sodio (desde 200 mM hasta 1 M) incubados durante 30 minutos en agitación a 25 °C.

Todas las fracciones se recogieron por gravedad, fueron analizadas mediante electroforesis SDS-PAGE 12% y se realizó cuantificación de proteínas de cada una de ellas mediante el método de Bradford.

3.2.8 Cromatografía de intercambio hidrofóbico en matriz Lewatit VP OC 1600

Las cromatografías se llevaron a cabo en batch en columnas PD-10 con una relación 1: 1 matriz-aplicado. Se pesa 1 g de matriz y se la lava 3 veces con 3 mL de buffer fosfato de sodio 25mM pH 7.

Utilizando sobrenadante de fermentación de *C. perfringens* como aplicado, se incubó 1 mL de dicha muestra durante 1 hora en agitación a 25 °C. Se lavó con 1 mL de buffer fosfato de sodio 25 mM pH 7 por 10 minutos en agitación a 25 °C. Posteriormente se realizaron eluidos de 30 minutos en agitación a 25 °C con 1 mL de SDS al 0,3 %, 0,7 %, 1 % y 2 %.

Por otra parte, utilizando sobrenadante de fermentación de *C. perfringens* precipitado como aplicado, se incubó 1 mL de dicha muestra y se incubó durante 1 hora en agitación a 25 °C. Se lavó con 1 mL

de buffer fosfato de sodio 25 mM pH 7 por 10 minutos en agitación a 25 °C. Posteriormente se realizaron eluidos de 30 minutos en agitación a 25 °C con 1 mL de SDS al 0,1 %, 0,5 % y 1 %.

Todas las fracciones se recogieron por gravedad y fueron analizadas mediante electroforesis SDS-PAGE 12% y fueron cuantificadas mediante el método de Bradford.

3.2.9 Cromatografía de exclusión molecular

El sobrenadante de fermentación se concentró utilizando columnas concentradoras de proteínas (GE Healthcare Life Sciences, Chicago, Estados Unidos) con membrana de corte de 10 KDa, hasta obtener una muestra de una concentración de 20 mg/mL.

Las cromatografías fueron llevadas a cabo en un equipo de FPLC (GE Healthcare, Little Chalfont, Reino Unido). Ambas columnas superdex, se equilibraron con buffer fosfato de sodio 25 mM pH 7 con un flujo de 1 mL/minuto con 5 volúmenes de columna. Posteriormente, se inyectaron 500 µL de muestra conteniendo 10 mg de proteínas con un flujo de 1 mL/minuto en buffer fosfato de sodio 25 mM pH 7 a 25 °C. La detección se realizó a 280 nm por 38 minutos. Se recogieron fracciones cada 2 minutos.

3.2.10 Síntesis de nanopartículas de sílica

Para la síntesis de nanopartículas de sílica se hidrolizaron 200 µL de TMOS en 800 µL de HCl 1 mM. En paralelo, se realizó una solución de PEI 10 % en buffer fosfato de sodio 100 mM pH 8. A continuación se le adicionaron 250 µL de TMOS previamente hidrolizado a 50 µL de PEI 10%. Se homogenizó la solución por inversión repetidas veces.

Una vez sintetizadas las nanopartículas, se procedió a colectarlas mediante centrifugación durante 5 minutos a 4000 rpm. Posteriormente, se llevaron a cabo tres lavados de las nanopartículas, en primera instancia se lavaron con agua destilada y luego con buffer fosfato de sodio 25 mM pH 7. Luego de cada lavado las nanopartículas se recolectaron por centrifugación.

Para la síntesis de nanopartículas de sílica-BSA, se hidrolizaron 200 µL de TMOS en 800 µL de HCl 1mM. Por otro lado, se tomaron 500 µL de BSA (20 mg/mL en buffer fosfato de sodio 25 mM pH 7) y se le adicionaron 50 µL de PEI 10%. A continuación se le adicionaron 250 µL de TMOS previamente hidrolizado. Se homogeneizó la solución por inversión repetidas veces y se realizaron 3 lavados, en primera instancia las nanopartículas se lavaron con agua destilada mientras que los siguientes lavados se realizaron con buffer fosfato de sodio 25 mM pH 7. Luego de cada lavado, las nanopartículas se recolectaron por centrifugación durante 5 minutos a 4000 rpm.

3.2.11 Cromatografía en matrices nanoestructuradas

Para la cromatografía en nanopartículas magnéticas, se tomaron 40 µL de nanopartículas magnéticas fluidMAG-PEA 25 mg/mL, se lavaron con 75 µL de buffer fosfato de sodio 25 mM pH 7.
Posteriormente se agregaron 75 µL de muestra (sobrenadante de fermentación o precipitado del sobrenadante de fermentación) y se incubó durante 1 hora a 25 °C en agitación.
Se lavó con 75 µL de buffer fosfato de sodio 25 mM pH 7 y se realizaron eluidos con cloruro de sodio 0,6 M, 1 M y 3 M.

En todos los pasos las nanopartículas magnéticas se recolectaron utilizando un imán de neodimio y las fracciones fueron recogidas para su posterior análisis mediante electroforesis SDS-PAGE 12 % y cuantificación de proteínas por el método de Bradford.

Para la cromatografía con nanopartículas de sílica-BSA se tomó 1 g de nanopartículas y se aplicaron 3 mL de sobrenadante de fermentación de *C. perfringens* tipo D o sobrenadante de fermentación precipitado. La suspensión se incubó durante 2 horas a 25 °C en agitación. Posteriormente, se realizó un lavado con 3 mL de buffer fosfato de sodio 25 mM pH 7 durante 10 minutos a 25 °C. Luego se realizaron tres eluidos con 100 mM, 300 mM y 600 mM de NaCl durante 30 minutos cada uno a 25 °C y en agitación.

En todos los pasos las nanopartículas de sílica-BSA se recolectaron por centrifugación a 4000 rpm por 2 minutos y los sobrenadantes se recogieron para su posterior análisis mediante electroforesis SDS-PAGE 12 % y cuantificación de proteínas por el método de Bradford.

3.2.12 Electroforesis SDS-PAGE

Las proteínas se analizaron mediante electroforesis SDS-PAGE en gel de poliacrilamida 12% o 15%. Las muestras se prepararon con buffer de carga desnaturalizante y se incubaron por 10 minutos a 100 ºC. Los geles se corrieron en buffer de corrida Tris-glicina a 120 V durante 90 minutos. Estos se tiñeron con Coomassie Blue por 16 horas a 25 °C y se decoloraron con solución decolorante en las mismas condiciones. Posteriormente, las electroforesis obtenidas se visualizaron y documentaron utilizando el sistema de visualización de imágenes E-Gel Imager (Thermo Fisher Scientific, Massachusetts, Estados Unidos).

3.2.13 Tinción de colas de histidina

Para la realización de la tinción de colas de histidina, se realizó previamente una electroforesis SDS-PAGE 12 % de las muestras proteicas a analizar. Posteriormente, se incubó el gel de poliacrilamida en 100 mL de solución de fijado durante 1 hora. Luego, se realizaron dos lavados de 10 minutos con 100 mL de agua milli Q. Se incubó el gel en 25 mL del reactivo InVision His-tag In-gel Stain por 16 horas.

El gel se lavó dos veces en buffer fosfato de sodio 20 mM pH 7.8 y luego se visualizó mediante el sistema de visualización de imágenes E-Gel Imager (Thermo Fisher Scientific, Massachusetts, Estados Unidos).

3.2.14 Cuantificación de proteínas mediante método de Bradford

Todas las cuantificaciones de proteínas se realizaron mediante el método de Bradford en placa de 96 pocillos. Para ello, se tomaron 5 µL de muestra y se le adicionaron 250 µL de reactivo de Bradford comercial (Sigma-Aldrich, Misuri, Estados Unidos), luego de 16 minutos de incubación a 25 °C tapado de la luz se midió la absorbancia a 595 nm en lector de placas Infinite 200 PRO (Tecan, Mannedorf, Suiza).

Los resultados obtenidos fueron interpolados en una curva de calibración (0 - 0,8 mg/mL) realizada bajo las mismas condiciones con sero albúmina bovina (BSA).

3.2.15 Síntesis de nanopartículas de oro de 16 nm

La síntesis de nanopartículas de oro se llevó a cabo según el método descrito por Turkevich (14). Para ello, se lavó un matraz erlenmeyer de 500 mL con agua regia y se enjuagó tres veces con agua milli Q, luego se secó en estufa y se envolvió con papel aluminio. Se pesaron 10 mg de ácido cloroáurico y se disolvieron en 100 mL agua milli Q en el matraz limpio y seco, la disolución se calentó y una vez alcanzada la ebullición se esperaron 5 minutos y se añadieron 25 mg de citrato de sodio tribásico dihidratado disueltos en 2,5 mL de agua milli Q y se calentó durante 30 minutos más. Pasados los 30 minutos de ebullición se dejó enfriar a temperatura ambiente.

De manera de caracterizar y determinar la concentración de las nanopartículas de oro sintetizadas, se midió el plasmón de resonancia superficial en placa de 96 pocillos en un volumen final de 100 µL y se realizó el espectro UV-visible (entre 450 y 650 nm) en lector de placas Infinite 200 PRO (Tecan, Mannedorf, Suiza).

3.2.16 Estabilización de nanopartículas de oro

En un tubo Falcon de 15 mL estéril y tapado de la luz se mezclaron los siguientes reactivos en el orden especificado:

- 0,0352 nmol de Au@Citrato
- 25 µL de SDS 10%
- 40,2 nmol SH-PEG-COOH (458, 2100 o 3219 Da)
- Agua milli Q hasta completar 10 mL (menos 125 µL)
- 125 µL de NaOH 2 M.

Se incubó la mezcla por 16 horas a 25 °C en agitación. Luego de la incubación se realizaron 3 lavados por centrifugación a 13.400 rpm por 30 minutos a 4 ºC resuspendiendo el pellet obtenido en el mismo volumen de buffer MES 10 mM pH 5. Al finalizar el último paso de centrifugación el pellet fue resuspendido en 1 mL de buffer MES 10 mM pH 5. Posteriormente las nanopartículas estabilizadas con PEG-COOH fueron caracterizadas y se determinó su concentración mediante medida de espectro UV-visible (entre 450 y 650 nm) en lector de placas Infinite 200 PRO (Tecan, Mannedorf, Suiza) en un volumen final de 100 µL realizando una dilución (1/40) en buffer MES 10 mM pH 5.

3.2.17 Funcionalización de nanopartícula de oro

Para la funcionalización de nanopartículas de oro con anticuerpo, se tomaron las nanopartículas estabilizadas con SH-PEG-COOH 2100 Da (Au@S-PEG-COOH 2100 Da) y se activaron mediante la química de la carbodiimida.

Para la activación de los grupos carboxilo de las nanopartículas de oro estabilizadas con SH-PEG-COOH (Au@S-PEG-COOH), se preparó, para 1 mg de nanopartículas, una solución conteniendo 146 µmol EDC (Sigma-Aldrich, Misuri, Estados Unidos) y 451 µmol Sulfo-NHS (Sigma-Aldrich, Misuri, Estados Unidos) disueltos en buffer MES 10 mM pH 5, se incubó por 5 minutos a temperatura ambiente. Luego, la solución activadora fue incubada con 1 mg/mL de Au@S-PEG-COOH 2100 Da durante 30 minutos a 37 ºC en 150 rpm.

Para eliminar el exceso de solución activadora y lavar las nanopartículas, la solución conteniendo las nanopartículas se centrifugó 2 veces a 13.400 rpm durante 30 minutos a 4 ºC y el pellet fue resuspendido en buffer MES 10 mM pH 5 en el mismo volumen. Sobre este volumen se agregaron 0,5 nmol de anticuerpo fragmento Fab anti-toxina épsilon, que corresponden a una relación molar de 1:4 nanopartícula-anticuerpo. Para ello, se tomaron 7,5 µL de una dilución 1/100 (0,33 mg/mL) del anticuerpo y se incubó durante 1 hora a 37 ºC en 150 rpm. Luego de centrifugar a 13.400 rpm durante 30 minutos a 4 ºC para eliminar el exceso de solución conteniendo anticuerpo, las nanopartículas funcionalizadas fueron resuspendidas en buffer MES 10 mM pH 5 en el mismo volumen.

3.2.18 Bloqueo de nanopartículas de oro

Sobre la suspensión de nanopartículas funcionalizadas, se agregaron 200 µL de buffer bloqueante (Bicarbonato de sodio 60 mM pH 8 + 200 mM de metoxi polietilenglicol aminado (H_2N-PEG-OCH_3), 200 mM EDA o 2 % BSA o 2 % Tris) y se incubó durante 16 horas a 4 ºC en 150 rpm.

Por último, se realizó un paso de centrifugación a 13.400 rpm durante 30 minutos a 4 ºC para eliminar el exceso de agente bloqueante y las nanopartículas funcionalizadas y bloqueadas fueron resuspendidas en 500 µL de buffer MES 10 mM pH 5.

Las nanopartículas funcionalizadas y bloqueadas se almacenaron a 4 ºC hasta su utilización.

3.2.19 Cálculo de la concentración de nanopartículas de oro

A lo largo del proceso de síntesis, estabilización, funcionalización y bloqueo de las nanopartículas de oro se realizó el mismo procedimiento para el cálculo de la concentración de las mismas. Para ello se realizó el espectro UV-Vis de cada una de ellas y se toma la absorbancia registrada en el pico máximo de absorbancia, luego se aplica la Ley de Lambert - Beer:

$$Concentración\left(\frac{mol}{L}\right) = \frac{Abs\ pico\ máx}{l\ x\ \text{Ɛ}}\ x\ factor\ de\ dilución$$

Siendo Abs la absorbancia de las nanopartículas en su pico máximo de absorción, l la longitud de la cubeta en centímetros y Ɛ (2,7 x 10^8 $M^{-1}cm^{-1}$) el coeficiente de absorción molar de las nanopartículas de oro.

Luego de calcular la concentración en mol/L, se multiplicó este valor por el peso (24926230 g/mol) de una nanopartícula de oro (Ver Anexo 2) y de esta manera se obtuvo la concentración de las nanopartículas en mg/mL.

3.2.20 Electroforesis en gel de agarosa de nanopartículas de oro

Con el objetivo de verificar la correcta funcionalización y/o bloqueo de las nanopartículas de oro con el anticuerpo y/o los distintos agentes bloqueantes, se realizó una electroforesis en gel de Agarosa 1 % en buffer TBE 1X.

Las muestras de nanopartículas se diluyeron en buffer TBE conteniendo glicerol al 25 % y se cargaron 10 µL de muestra por pocillo. Se corrió la electroforesis en buffer TBE 0,5X con un voltaje de 100 V durante 1 hora.

No es necesario teñir la muestra, ya que el propio color rojo de las nanopartículas permite su visualización.

3.2.21 Medidas de potencial Z y DLS

El análisis de las nanopartículas de oro mediante potencial Z, se llevó a cabo con el equipo NanoBrook ZetaPALS Potential Analyzer y las medidas fueron analizadas con el software Zeta Potential Analyzer (Brookhaven Instruments Corporation, Nueva York, Estados Unidos). Para cada muestra se realizaron 5 corridas de 30 ciclos cada una y se determinó un error absoluto de 2 x 10^{-2}. Cada medida se realizó colocando 1,8 mL de una solución de KCl 1mM y 10 µL de muestra de nanopartículas.

Por otra parte, las medidas de DLS se realizaron en el mismo equipo pero fueron analizadas mediante el software zetaPALS Particle Sizing (Brookhaven Instruments Corporation, Nueva York, Estados Unidos). Para cada muestra se realizaron 5 corridas de 30 ciclos cada una. Cada medida se realizó colocando 1,9 mL de agua milli Q y 15 µL de muestra de nanopartículas.

3.2.22 Ensayos de agregación del nanobiosensor

En tubos de 0,5 mL, se llevaron a cabo los ensayos de agregación frente a etx. Como estándar de toxina épsilon puro se utilizó el percolado de la cromatografía de intercambio iónico con matriz DEAE aplicando precipitado de sobrenadante de fermentación. En un volumen final de 100 µL, se agregaron distintas concentraciones de etx que fueron desde 0,01 a 0,4 mg/mL, para ello se partió de una solución de 0,5 mg/mL de estándar de etx, el cual se diluyó en buffer MES 10 mM pH 5 hasta obtener la dilución deseada. Posteriormente se agregó el volumen requerido de nanopartículas funcionalizadas y bloqueadas para obtener una concentración final de 0,06 mg/mL. Se realizaron medidas espectrofotométricas de las absorbancias en el UV-Vis desde 450-650 nm en cuba de cuarzo de 10 mm de paso óptico (Hellma Analytics, Müllheim, Alemania) en espectrofotómetro BioSpec-Mini (Shimadzu Biotech, Tokio, Japón) en tiempo cero y luego de dos horas. Los ensayos se realizaron a 25 °C.

Los datos fueron normalizados a partir de 450 nm.

4. Resultados y Discusión

4.1 Purificación de la toxina épsilon de *Clostridium perfringens* tipo D

El desarrollo de un biosensor requiere de un estándar del analito a detectar para determinar parámetros tales como: sensibilidad, límite de detección o rango dinámico del mismo. Para calibrar y optimizar dichos parámetros antes de enfrentar el nanobiosensor a una muestra heterogénea y compleja, es necesario la obtención de un estándar puro del analito problema.

En este trabajo, hemos abordado la obtención de un estándar de etx mediante dos estrategias. Por un lado, dada la alta eficiencia y los niveles de homogeneidad obtenidos en la producción de proteínas recombinantes (30), nos propusimos abordar una estrategia molecular que incluyó el clonado del gen de etx en *E. coli*, su sobreexpresión y purificación.

Por otro lado, se abordó la purificación de etx a partir del sobrenadante de fermentación de *C. perfringens* tipo D a través de técnicas bioquímicas clásicas.

La toxina épsilon obtenida por fermentación anaeróbica de *C. perfringens*, se encuentra en un medio complejo, conteniendo péptidos, restos celulares, antiespumantes y todo tipo de elementos requeridos para una fermentación microbiana. La purificación de etx involucró el testeo de varias estrategias cromatográficas y de precipitación salina.

4.1.1 Abordaje molecular: Expresión recombinante de etx

La expresión recombinante de la toxina épsilon, fue llevada a cabo utilizando el kit Champion pET SUMO. Este sistema de expresión fue seleccionado ya que el mismo permite obtener altos niveles de expresión al mismo tiempo que favorece la solubilidad de proteínas recombinantes en *E.coli*. pET SUMO utiliza un pequeño modificador de fusión (SUMO) perteneciente a la gran familia de proteínas relacionadas con ubiquitina. Es esta proteína de fusión la que permite mejorar la solubilidad de las proteínas expresadas. Luego de la expresión, SUMO puede ser clivado en el carboxilo terminal mediante el uso de la proteasa SUMO obteniéndose una proteína nativa sin cicatrices como producto. A partir de una secuencia de dos pasos cromatográficos según protocolo del proveedor, se logra obtener un producto de muy alta homogeneidad (Figura 9).

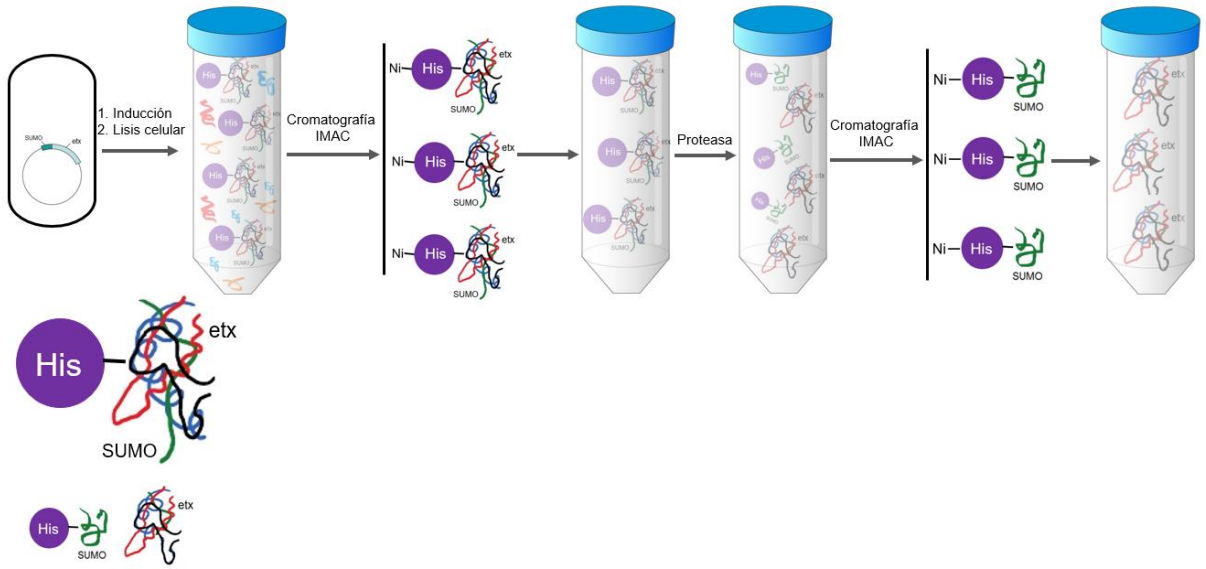


Figura 9. Resumen esquemático de proceso de expresión y purificación de toxina épsilon.

El diseño de primers, amplificación y clonado, hasta la obtención del plásmido pET SUMO con el inserto del gen de la toxina épsilon (pET SUMO-etx), fueron llevadas a cabo en un trabajo previo en el laboratorio "Expresión recombinante de toxina épsilon de *C. perfringens* tipo D en *E.coli*", F. Pirotti, J. Rodríguez.

A partir de la cepa One Shot Mach1-T1R de *E. coli* transformadas con el plásmido pET-SUMO-etx, se aisló el plásmido para llevar a cabo dos pruebas confirmatorias. Una mediante enzimas de restricción y otra mediante técnicas de PCR a modo de corroborar la presencia y direccionalidad del gen.

El sistema de clonación utilizado, es un sistema libre de enzimas de restricción, y se basa en la ligación de extremos A overhanging del gen de interés, con extremos T del plásmido. Si bien el sistema de clonación es sencillo, no asegura la direccionalidad del inserto por lo que es necesario confirmar el sentido 5´- 3´.

Para confirmar la presencia y el sentido 5´- 3´ del inserto en el plásmido se trató un extracto plasmídico con la enzima de restricción Hind III, capaz de generar dos cortes en la secuencia y se analizó el perfil de bandas obtenido.

Según el análisis bioinformático previamente realizado (Figura 10), si el gen etx se inserta en la dirección deseada (sentido 5´- 3´), la enzima de restricción genera dos bandas, una de aproximadamente 852 pb y otra de 5777 pb. Sin embargo, si el inserto se encuentra en sentido contrario, el perfil consta de una banda de 145 pb y otra de 6484 pb. Por otra parte, si el plásmido se circulariza sin inserto, se espera un único corte con la enzima de restricción, y por ende una única banda.

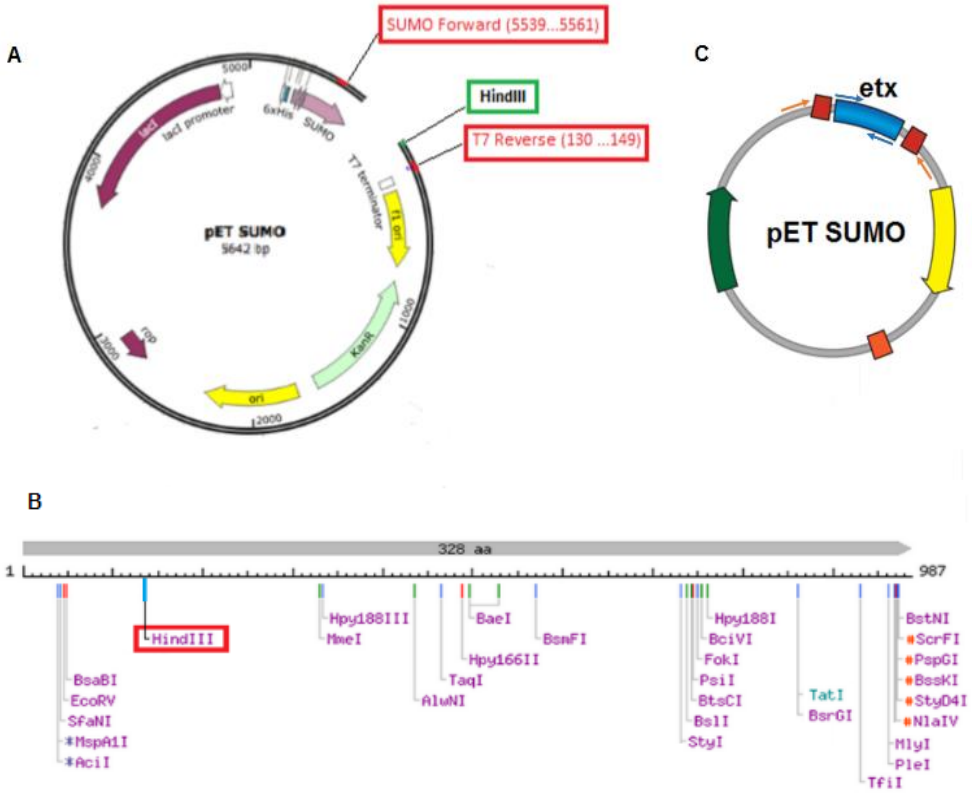


Figura 10. A. Esquema de restricción del plásmido pET SUMO, en verde corte con la enzima de restricción Hind III y en rojo los sitios de complementariedad para primers del plásmido. B. Esquema de restricción del gen etx de *C. perfringens* tipo D, en rojo sitio de restricción con la enzima Hind III. C. Esquema de sitios de unión de primers para pET SUMO y para ETX, en naranja: Primers Forward y Reverse para el plásmido pET SUMO, en celeste: Primers Forward y Reverse para el gen etx.

Como se observa en la Figura 11, los extractos plasmídicos de los carriles 2 y 6 presentan un perfil de bandas acorde con lo esperado para colonias con plásmido con inserto en sentido 5´- 3´, ya que se observa una banda a 852 pb y otra de 5777 pb.

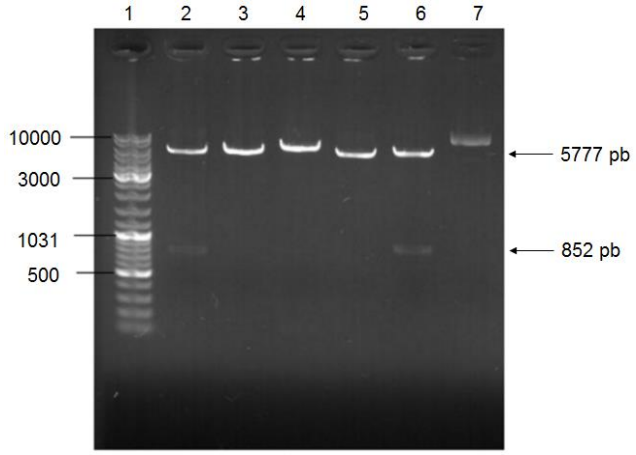


Figura 11. Electroforesis en gel de agarosa 1%. Análisis mediante restricción con Hind III de extractos plasmídicos pET-SUMO-etx de transformantes de *E.coli* One Shot Mach 1. Carril 1: MPM; Carril 2: Colonia 1; Carril 3: Colonia 2; Carril 4: Colonia 3; Carril 5: Colonia 4; Carril 6: Colonia 5; Carril 7: Colonia 6.

De manera de confirmar los resultados anteriores, se verificó presencia y direccionalidad del gen etx en el plásmido mediante PCR de los extractos plasmídicos.

Para este análisis se utilizaron dos juegos de primers, un juego (forward y reverse) capaz de amplificar el gen etx, y otros (forward y reverse) capaz de amplificar el plásmido pET SUMO (Figura 10 C).

Aquellas colonias que presentan el plásmido con el inserto en sentido 5´- 3´, amplifican el gen por PCR para las cuatro combinaciones de primers.

Si el inserto no se encuentra en la dirección correcta, sólo amplifican las reacciones que utilicen los primers del plásmido y del gen pero no la combinación entre ellos. Por último si el plásmido está circularizado, es decir, sin inserto, solo amplificará el juego de primers del plásmido.

Como se muestra en la Figura 12 A, el extracto plasmídico analizado confirma la presencia del gen de interés en sentido deseado, ya que amplifica para las 4 reacciones de PCR un único fragmento de aproximadamente 987 pb.

Respecto a los controles negativos, en todos los casos se observan fragmentos pequeños que pueden deberse a dímeros de primers. Sin embargo, en la Figura 12 B se puede observar cómo el control negativo para la mix de los primers 2 (forward y reverse para plásmido pET SUMO) (carril 2), presenta algunas bandas no deseadas, por lo que se debería repetir esta condición para confirmar el resultado.

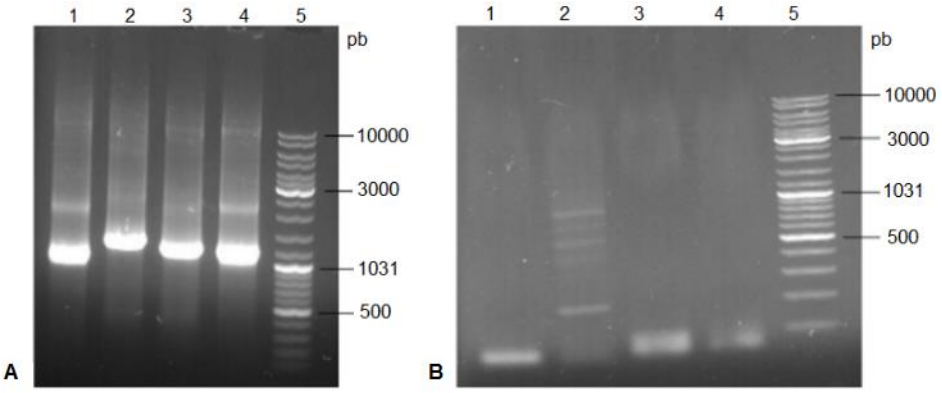


Figura 12. Análisis de direccionalidad del inserto en colonias E.coli One Shot® Mach 1™-T1R transformadas con plásmido pET SUMO-etx mediante PCR.
Combinaciones de primers: 1) Primers Forward y Reverse para el gen etx. 2) Primers Forward y Reverse para el plásmido pET SUMO. 3) Primer Forward para el gen etx y Reverse para el plásmido pET SUMO. 4) Primer Forward para el plásmido pET SUMO y Reverse para el gen etx.
A: Colonia 5. B: Controles negativos. Carriles 1: Combinación de primers 1; Carriles 2: Combinación de primers 2; Carriles 3: Combinación de primers 3; Carriles 4: Combinación de primers 4; Carriles 5: MPM.

Con el ADN plasmídico extraído de las colonias positivas, se prosiguió transformando bacterias *E.coli* BL 21(DE3) quimiocompetentes. Una vez obtenidas las bacterias transformadas, se estudió la expresión recombinante de la proteína etx.

Como se muestra en la Figura 13 A, la expresión de la toxina etx fue exitosa.

El control positivo funcionó correctamente, ya que en la fracción soluble se visualiza la presencia de una banda de gran intensidad de un tamaño aproximado de 39 KDa correspondiente a la proteína cloranfenicol acetil transferasa (CAT), utilizada como control positivo de expresión.

Por otra parte, al comparar las fracciones solubles de las colonias sin inducir y las inducidas a diferentes concentraciones de IPTG, se logra visualizar como al aumentar la concentración de IPTG, aumenta la intensidad de una banda de 35 KDa correspondiente probablemente a nuestra proteína de interés, cuyo peso molecular es de 32,7 KDa, pero que aumenta su peso molecular por el agregado de colas de histidina. Esta banda no es observada en la fracción insoluble.

Claramente se visualiza expresión basal de la proteína en el control sin IPTG, resultado esperado, ya que se encuentra reportado como un efecto de la T7 RNA polimerasa.

De manera de confirmar que la proteína que se expresa es la toxina épsilon, se llevó a cabo un ensayo de Western Blot con anticuerpos anti toxina épsilon.

En la Figura 13 B, se confirma la identidad de la proteína expresada, ya que se da un reconocimiento específico del anticuerpo por la proteína sobreexpresada.

Como control negativo, se utiliza la proteína CAT sobreexpresada, la cual no es reconocida por el anticuerpo.

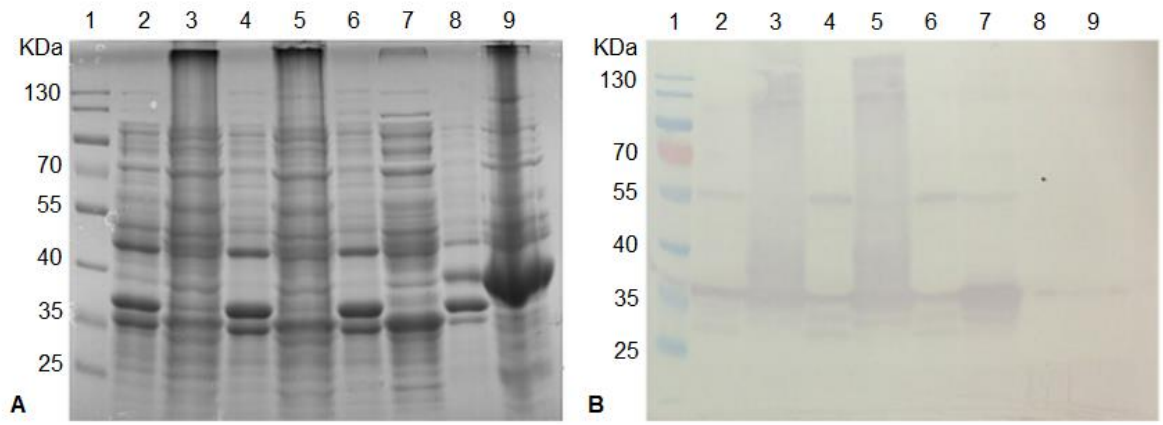


Figura 13. Análisis de la expresión de etx recombinante en BL21 (DE3). A: Electroforesis desnaturalizante SDS-PAGE 12%. B: Western Blot de la expresión de etx en BL21 (DE3). Carril 1: MPM (PageRuler Prestained Protein Ladder 26616); Carril 2: Fracción insoluble de pET SUMO-etx sin inducir; Carril 3: Fracción soluble de pET SUMO-etx sin inducir; Carril 4: Fracción insoluble de pET SUMO-etx inducido (0,5 mM IPTG); Carril 5: Fracción soluble de pET SUMO-etx inducido (0,5 mM IPTG); Carril 6: Fracción insoluble de pET SUMO-etx inducido (1mM IPTG); Carril 7: Fracción soluble de pET SUMO-etx inducido (1 mM IPTG); Carril 8: Fracción insoluble de pET SUMO/CAT inducido (1 mM IPTG); Carril 9: Fracción soluble de pET SUMO/CAT inducido (1 mM IPTG).

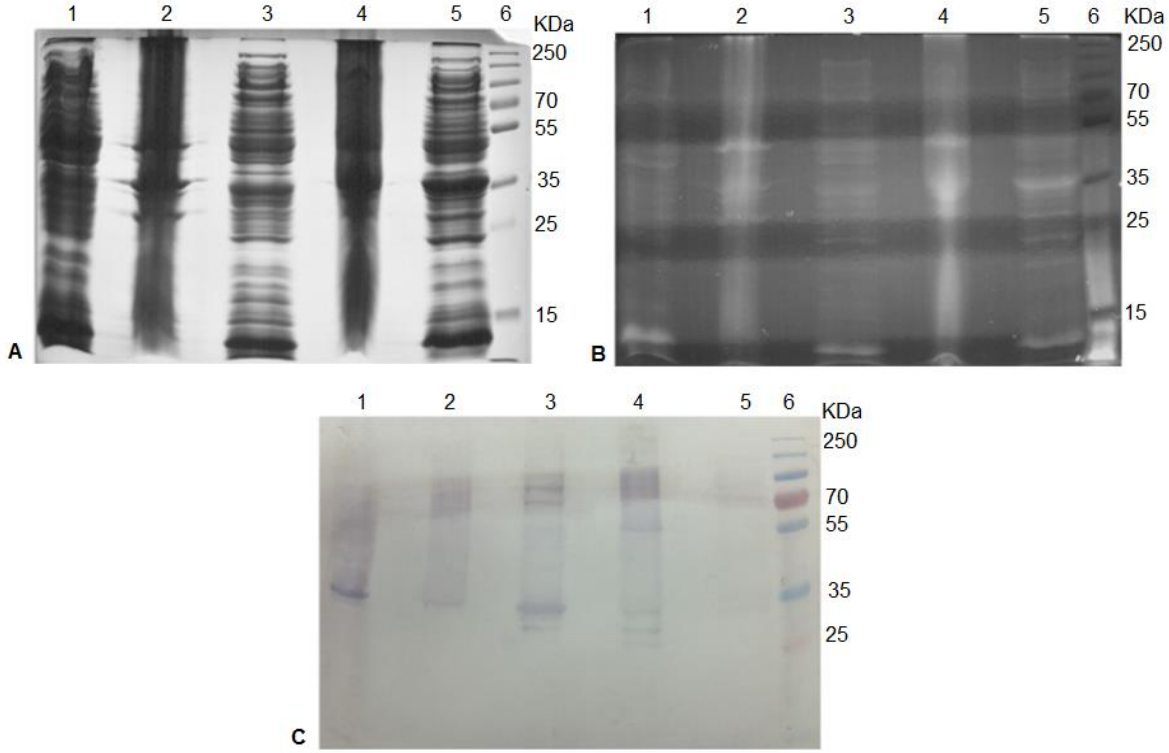


Figura 14. A. Electroforesis SDS-PAGE 12% de la expresión de etx, tinción con Coomassie Blue. B. Electroforesis SDS-PAGE 12% de la expresión de etx, tinción con InVision His Tag. C. Western Blot de la expresión de etx. Carril 1: Fracción soluble Control; Carril 2: Fracción insoluble Control; Carril 3: Fracción soluble inducido con IPTG 1 mM; Carril 4: Fracción insoluble inducido con IPTG 1 mM; Carril 5: Control Positivo (BtrH + His tag); Carril 6: MPM (PageRuler Prestained Protein Ladder 26619).

A modo de corroborar la presencia de las colas de histidina unidas a la toxina épsilon se corrieron 2 electroforesis SDS-PAGE con las fracciones solubles e insolubles de la expresión y se analizaron con tinciones diferentes.

Por un lado, un gel fue teñido con el kit InVision His-tag In-gel Stain, siguiendo los pasos descritos en el protocolo, de manera de visualizar las colas de histidina bajo luz UV. Este mismo gel fue luego teñido con Coomassie Blue. Por otro lado, con el otro gel se realizó un Western Blot utilizando anticuerpos policlonales anti-toxina épsilon.

En la Figura 14 A y C se comprueba que en las fracciones solubles se encuentra la toxina recombinante expresada. Si bien en la imagen A, no se logra distinguir con claridad la banda correspondiente a la toxina, en el Western Blot se confirma su presencia e identidad (Figura 14 C).

Como es esperable, la toxina debe expresarse fusionada a colas de histidina, las cuales pueden ser teñidas diferencialmente con la coloración InVision His Tag. De manera opuesta a lo esperado, las bandas que se visualizan teñidas (Figura 14 B) no corresponden al peso molecular de la toxina, sino que tienen un peso aproximado de 10 KDa.

Como control positivo de la tinción, se utilizó una proteína modelo de 35 KDa (Butirosina acil transferasa fusionada a colas de histidina), la cual se observa en el carril 5 tanto en la imagen A como en la B.

Los resultados demuestran que si bien la toxina se logra expresar correctamente, esta no está fusionada a la proteína SUMO que contiene las colas de poli histidina, las cuales permitirían posteriormente su fácil purificación mediante una cromatografía de afinidad IMAC.

Una posible explicación a este hecho puede estar relacionado a que la proteína que está clonada, es el precursor de la toxina épsilon activa.

En sistemas biológicos, para generarse la toxina activa, la protoxina expresada por *Clostridium perfringens* es clivada tanto por proteasas intestinales de los animales, como por proteasas propias de la bacteria, como por ejemplo la toxina lambda (23), capaz de clivar 14 aminoácidos en el extremo N terminal y 23 en el C terminal de la secuencia, aumentando así la toxicidad de la toxina épsilon.

Una proteína homóloga a la toxina Lambda de *Clostridium* en *Escherichia coli BL21-DE3* (cepa utilizada para la expresión del gen de la toxina épsilon) es la peptidasa de señal 1 capaz de generar una proteólisis entre un aminoácido hidrofóbico y otro aminoácido (31).

La secuencia aminoacídica de la toxina épsilon, ubica una isoleucina en la posición 14, lo que podría provocar una proteólisis de la toxina en esta posición, eliminando así los últimos 14 aminoácidos junto a la proteína SUMO y las poli histidinas, lo que explicaría porque no se logran visualizar las colas en la toxina expresada, y por qué aparece una banda de aproximadamente 10 KDa que si se tiñe con la tinción de histidinas.

Con los resultados presentados, no es posible proseguir con el diseño experimental propuesto. Debido a que la proteólisis de la toxina sucede tanto en el extremo N terminal como en el C terminal, no es viable expresar la proteína sumo fusionada en ninguno de los extremos de la secuencia. Un cambio en la cepa no sería una solución, ya que las proteasas están ampliamente distribuidas en todas las cepas bacterianas. Según reportes bibliográficos (32) una metodología capaz de eliminar los problema de la proteólisis, es mediante la fusión de un tag de histidinas a la secuencia aminoacídica de etx activada y no de la protoxina como se realizó en este trabajo. De esta manera, se evita expresar etx en su forma no activa, por lo que la proteína no sufrirá proteólisis.

Por otra parte, cabe destacar que la etx no resultó tóxica para la cepa utilizada de *E.coli*.

Debido a las restricciones en tiempo para avanzar en la tesis, nos abocamos a la obtención de un estándar de toxina por métodos bioquímicos.

4.1.2 Abordaje bioquímico clásico: Técnicas cromatográficas

Para la purificación de la toxina épsilon a partir del sobrenadante de fermentación de *C. perfringens* tipo D se abordaron distintos enfoques cromatográficos variando el tipo de interacción proteína-matriz, la configuración (Batch o columna) y el tamaño de partícula de los soportes.

Como se describió previamente en la sección 1, la toxina épsilon de la bacteria *Clostridium perfringens* tipo D, es utilizada para formular vacunas veterinarias. Para ello, *C. perfringens* se crece en cultivo anaeróbico en donde expresa sus proteínas. Posteriormente, dicho cultivo es filtrado utilizando filtros de 0,2 micrómetros de manera de remover los restos celulares, y así obtener el sobrenadante de fermentación de *C. perfringens* conteniendo la toxina épsilon expresada.

El sobrenadante de fermentación de *C. perfringens* es una muestra compleja que contiene diversas proteínas, péptidos y otras moléculas que forman parte de la composición del medio de cultivo, desde azúcares y sales para el crecimiento bacteriano, hasta antiespumantes para controlar las condiciones en la fermentación. La concentración inicial de la muestra es de 0,9 mg/mL y se encuentra a un pH de 7.8.

En primera instancia, se utilizaron matrices de intercambio iónico para llevar a cabo la purificación de la toxina épsilon. Para ello se ensayaron intercambiadores débiles y fuertes de origen aniónico, como lo son las columnas comerciales POROS HQ 50 y D 50, la matriz DEAE y Lewatit Monoplus MP 68. Por otra parte también se realizaron ensayos con la matriz Lewatit VP OC 1600, un soporte hidrofóbico. Así mismo, se llevaron a cabo cromatografías de exclusión molecular utilizando dos tipos de columnas, superdex 75 10/300 y superdex 200 10/300. A su vez, se realizaron ensayos utilizando matrices nanoestructuradas como nanopartículas magnéticas fluidMAG-PEA, nanopartículas de sílica y nanopartículas de sílica-BSA.

Además de utilizar el sobrenadante de fermentación de *C. perfringens* como aplicado en las distintas cromatografías, se evaluó el comportamiento de las matrices al ser enfrentadas a una muestra de partida distinta. Uno de los problemas que se observaron en los ensayos anteriores, fue la saturación de las matrices con contaminantes de la muestra (peptonas, sales, etc.) observado por la disminución de la capacidad de carga de los soportes (Datos no mostrados), por lo que a modo de disminuir los efectos del medio, se probó gel filtrar el sobrenadante de fermentación en columna PD10 o precipitarlo con sulfato de amonio.

Según reportes bibliográficos (23) una metodología de salting-out del cultivo filtrado previa a una cromatografía de intercambio iónico, permite obtener fracciones de alta pureza.

Mientras que mediante el gel filtrado previo de la muestra antes de ser aplicada a las matrices no se obtuvieron resultados diferentes, a través de una precipitación salina con sulfato de amonio al 75% con una posterior re solubilización en buffer fosfato de sodio 25 mM pH 7 se logró mejorar el grado de pureza para varias de las matrices ensayadas. Por esta razón continuamos con experimentos realizando siempre una precipitación con sulfato de amonio 75% previa al paso cromatográfico.

		Aplicado: Sobrenadante de fermentación		Aplicado: Precipitado SA 75%	
Matriz	**Tipo de cromatografía**	**Mejora de la pureza**	**Grado de pureza***	**Mejora de la pureza**	**Grado de pureza***
Superdex 75 10/300	Exclusión molecular	Sí	91%	-	-
Superdex 200 10/300	Exclusión molecular	Sí	96%	-	-
Lewatit VP OC 1600	Intercambio hidrofóbico	Sí	98%	Sí	95%
POROS HQ 50	Intercambio aniónico fuerte	Sí	78%	Sí	81%
POROS D 50	Intercambio aniónico débil	Sí	69%	Sí	72%
DEAE	Intercambio aniónico	Sí	63%	Sí	90%
Lewatit Monoplus MP 68	Intercambio aniónico	-	-	Sí	83%
NpMg fluiMAG-PEA	Intercambio aniónico	No	-	Sí	98%
Np sílica	Intercambio aniónico	No	-	No	-
Np sílica-BSA	Intercambio aniónico	No	-	No	-

* Valores de pureza calculados con el software GelQuant Express en base a geles de electroforesis SDS-PAGE.

Tabla 1. Matrices estudiadas con sus respectivos desempeños.

En la tabla 1, se resumen todas las pruebas llevadas a cabo, especificando el porcentaje de pureza alcanzado en cada tipo de cromatografía. Como se puede observar, no con todas las matrices estudiadas se logró obtener una fracción con un grado de pureza mayor al de la muestra de partida. Aquellas matrices con las que se logró obtener una fracción pura, se alcanzaron porcentajes de purificación que van desde el 60% hasta valores cercanos al 100%. También se puede observar una diferencia en el comportamiento de las matrices según se las enfrente al sobrenadante de fermentación o al precipitado de la misma.

A continuación se muestran los resultados obtenidos para la purificación de etx con las distintas matrices cromatográficas para las que se obtuvieron una mejora en el grado de pureza de la muestra proteica problema.

4.1.2.1 Cromatografía de exclusión molecular gel filtración

Se analizaron dos columnas comerciales, superdex 75 10/300 y superdex 200 10/300 en un equipo FPLC.

En primera instancia, se realizó una gel filtración en la columna superdex 75 10/300, esta columna es capaz de separar proteínas con alta resolución con tamaños de entre 3000 y 70000 Da.

En la Figura 15 se muestra el cromatograma obtenido de la gel filtración en la columna superdex 75 10/300 al aplicar sobrenadante de fermentación de *C. perfringens*, como era esperado, las proteínas de mayor tamaño eluyen primero mientras que las proteínas de pequeño peso molecular, como son los péptidos encontrados en el medio de cultivo eluyen a mayores tiempos.

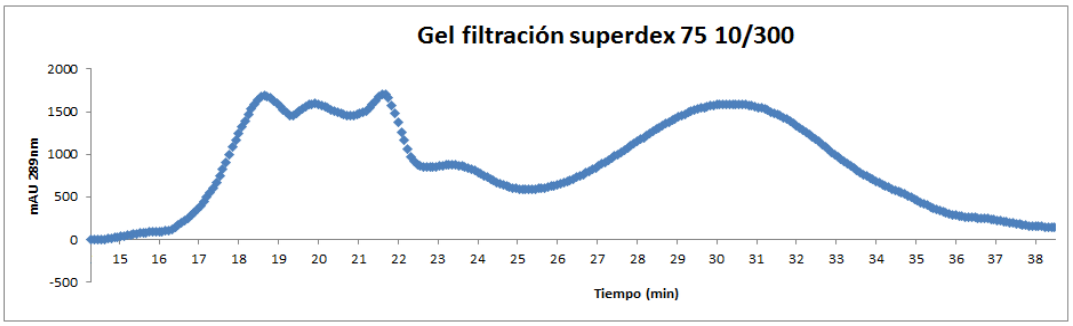


Figura 15. Cromatograma de la gel filtración en columna superdex 75 10/300 aplicando sobrenadante de fermentación de *C. perfringens* tipo D.

Se analizaron por electroforesis SDS-PAGE (Figura 16) los eluidos correspondientes a tiempos entre 16 y 38 minutos. Los picos correspondientes a los tiempos entre 16 a 24 minutos contenían la proteína de interés. Si bien en los carriles 4, 5 y 6 se puede observar la presencia de etx, a medida que transcurre el tiempo, se puede observar como aumenta y mejora la pureza de la muestra.

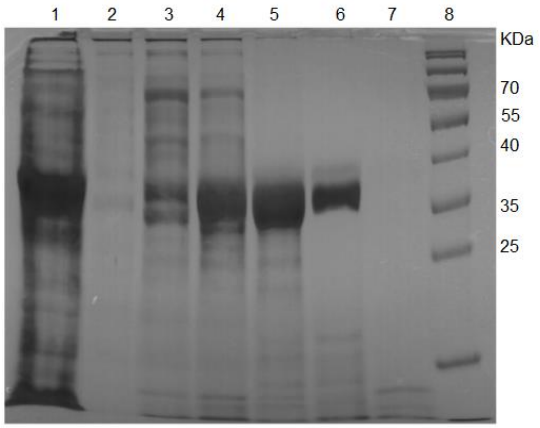


Figura 16. Electroforesis SDS-PAGE 12% de eluidos cromatográficos de columna superdex 75 10/300. Carril 1: Sobrenadante de Fermentación, Carril 2: Eluido 16´; Carril 3: Eluido 18´; Carril 4: Eluido 20´; Carril 5: Eluido 22´; Carril 6: Eluido 24´; Carril 7: Eluido 26´; Carril 8: MPM (PageRuler Prestained Protein Ladder 26616).

Estas fracciones también fueron analizadas mediante Western Blot de manera de confirmar la identidad de las bandas. Como se muestra en la Figura 17, etx está presente en los carriles 3, 4, 5, 6 y 7, sin embargo, se observa que la pureza aumenta y mejora a lo largo de los eluidos.

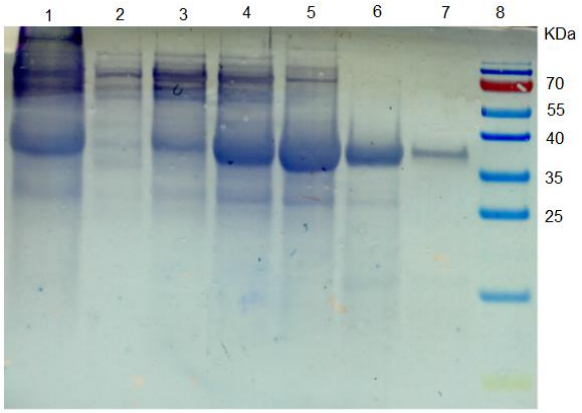


Figura 17. Western Blot de eluidos cromatográficos de columna superdex 75 10/300. Carril 1: Sobrenadante de Fermentación, Carril 2: Eluido 16´, Carril 3: Eluido 18´, Carril 4: Eluido 20´, Carril 5: Eluido 22´, Carril 6: Eluido 24´, Carril 7: Eluido 26´, Carril 8: MPM (PageRuler Prestained Protein Ladder 26616).

En segunda instancia, se realizó una gel filtración utilizando la columna superdex 200 10/300 la cual es capaz de separar proteínas de un peso molecular de entre 10000 y 60000 Da, utilizando un empaquetamiento de partículas más pequeñas que otras columnas e incrementa así su resolución.

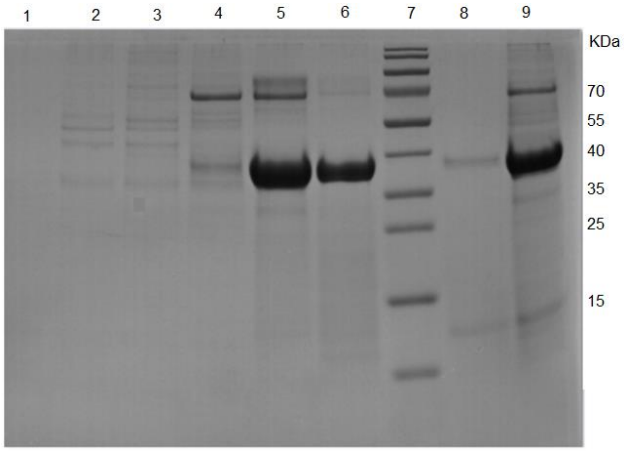


Figura 18. Electroforesis SDS-PAGE 12% de eluidos cromatográficos de columna superdex 200 10/300.
Carril 1: Eluido 14´. Carril 2: Eluido 16´; Carril 3: Eluido 18´; Carril 4: Eluido 20´; Carril 5: Eluido 22´; Carril 6: Eluido 24´; Carril 7: MPM (PageRuler Prestained Protein Ladder 26616); Carril 8: Eluido 26´; Carril 9: Sobrenadante de Fermentación concentrado en centricón de 10 KDa.

Como se puede ver en la Figura 18, se obtuvo una fracción de alta homogeneidad en el eluido correspondiente a 24 minutos (Carril 6).

En ambas gel filtraciones se obtuvieron fracciones puras y homogéneas de etx libre de sales y contaminantes del medio. Debido a nuestros propósitos, fue necesario continuar con la búsqueda de otros métodos de purificación, ya que este tipo de técnica suponía extensos tiempos operacionales y pequeños volúmenes de muestra procesados. Utilizando estas técnicas se obtuvo 0,4 mg/mL de etx pura a partir de 1 mL de muestra.

4.1.2.2 Cromatografía de intercambio iónico en DEAE

La matriz DEAE presenta varias ventajas frente a las columnas de gel filtración, la misma es fácilmente escalable al mismo tiempo que puede ser utilizada empaquetada o en batch. Es un producto comercial de fácil acceso, más económico que las columnas de gel filtración y su utilización es sencilla.

Como se observa en la Figura 19, al realizar una cromatografía de intercambio iónico enfrentando el sobrenadante de fermentación de *C. perfringens* a la matriz DEAE, no se obtienen buenos resultados ya que, a pesar de que se logra establecer una interacción entre la toxina y la matriz, no se logra separar la proteína de interés del resto de los contaminantes ni en el percolado, ni en el eluido.

De la Figura anterior, también se puede observar como la capacidad de carga de la matriz se ve completamente saturada, ya que en el percolado (Carril 2) se observa una intensidad de bandas comparable con el aplicado.

En el caso del carril 4, se logra eluir las proteínas unidas a la matriz, pero en baja concentración y sin aumentar la pureza de la muestra.

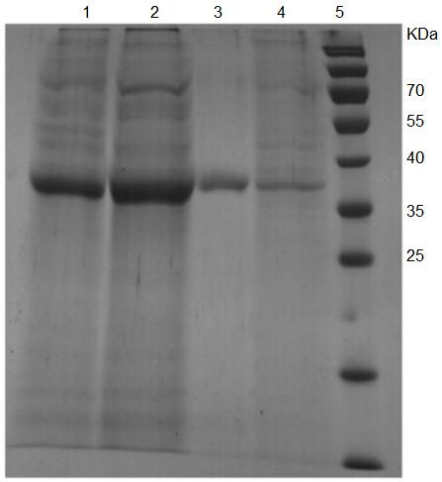


Figura 19. Electroforesis SDS-PAGE 12% de cromatografía de intercambio aniónico en matriz DEAE con sobrenadante de fermentación de *C. perfringens* como aplicado. Carril 1: Sobrenadante de fermentación; Carril 2: Percolado; Carril 3: Lavado; Carril 4: Eluido NaCl 600 mM; Carril 5: MPM (PageRuler Prestained Protein Ladder 26616).

Por las razones anteriormente señaladas, se ensaya utilizar la matriz DEAE frente al precipitado de sobrenadante de fermentación de *C. perfringens* tipo D resuspendido en buffer fosfato de sodio 25 mM pH 7 (Figura 20). Los resultados obtenidos fueron prometedores ya que en el percolado (Carril 2) se logra separar la toxina épsilon con un alto grado de homogeneidad. Si bien en el lavado y el primer eluido (Carriles 3 y 5 respectivamente) continúa eluyendo la proteína de interés, no lo es en cantidades significativas. Por otra parte, en las siguientes fracciones (Carriles 6 y 7) se logra eluir el resto de los contaminantes.

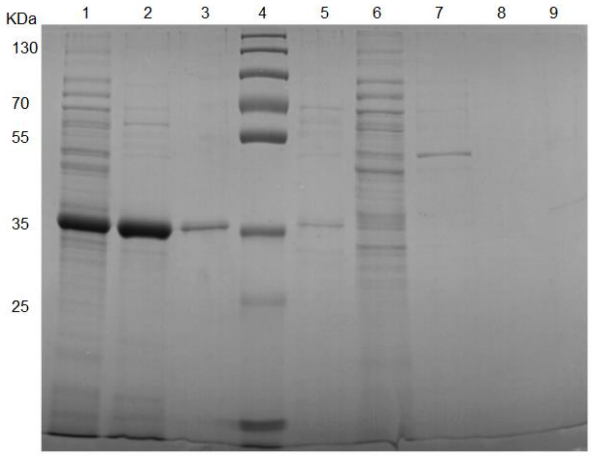


Figura 20. Electroforesis SDS-PAGE 12% de cromatografía de intercambio aniónico en matriz DEAE con precipitado al 75% sulfato de amonio de sobrenadante de fermentación de *C. perfringens* tipo D resuspendido en buffer fosfato de sodio como aplicado. Carril 1: Precipitado resuspendido en buffer fosfato de sodio 25 mM pH 7; Carril 2: Percolado; Carril 3: Lavado; Carril 4: MPM (PageRuler Prestained Protein Ladder 26619); Carril 5: Eluido NaCl 200 mM; Carril 6: Eluido NaCl 600 mM; Carril 7: Eluido 1 M; Carril 8: Vacío; Carril 9: Matriz.

Mediante este proceso, se logra obtener la proteína de interés en un grado de mayor homogeneidad en una fracción mayoritaria a través de una cromatografía negativa. Esto se debe a que etx es una proteína hidrofóbica que no se absorbe a matrices de intercambio iónico (28). A través de este tipo de cromatografía de intercambio aniónico aplicando sobrenadante de fermentación de *C. perfringens* tipo D precipitado con sulfato de amonio 75% se logró obtener una muestra de etx con alto grado de pureza y homogeneidad con una concentración de 0,4 mg/mL aplicando 3 mL de muestra precipitada.

4.1.2.3 Cromatografía de intercambio iónico en Lewatit Monoplus MP 68

El comportamiento del sobrenadante de fermentación precipitado con sulfato de amonio frente a la matriz Lewatit Monoplus MP 68 de intercambio aniónico fue similar a la anteriormente observada con la matriz DEAE.

Si bien etx no generó interacciones con la matriz, si lo hicieron el resto de las proteínas contaminantes de la muestra.

Como se observa en la Figura 21, en el percolado se obtiene una fracción de etx con una pureza mayor al aplicado. Los contaminantes que sí interaccionan con la matriz son eluidos con 1 M de NaCl.

Cabe destacar que utilizando esta matriz no se logró aumentar la pureza de la misma manera que con la matriz DEAE, obteniéndose una fracción de un 83% de pureza.

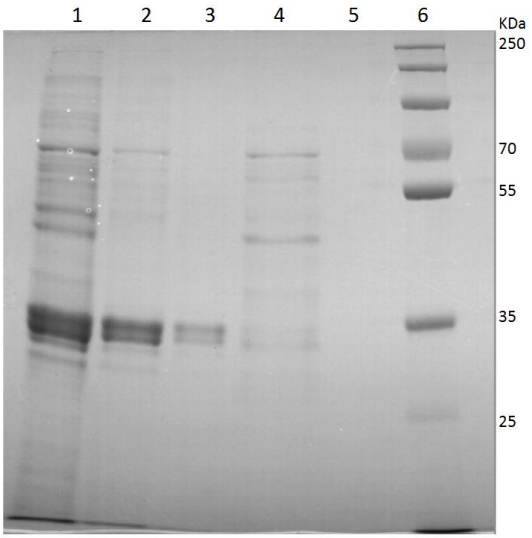


Figura 21. Electroforesis SDS-PAGE 12% de cromatografía de intercambio iónico en matriz Lewatit Monoplus MP 68 con precipitado al 75% sulfato de amonio de sobrenadante de fermentación de *C. perfringens* tipo D resuspendido en buffer fosfato de sodio como aplicado. Carril 1: Precipitado resuspendido en buffer fosfato de sodio 25 mM pH 7; Carril 2: Percolado; Carril 3: Lavado; Carril 4: Eluido 1M NaCl; Carril 5: MPM (PageRuler Prestained Protein Ladder 26616).

4.1.2.4 Cromatografía en columnas comerciales POROS HQ 50 y D 50

Las cromatografías en columnas comerciales POROS presentaron el mismo comportamiento que los otros intercambiadores aniónicos utilizados. Etx no interacciona de forma específica con la matriz pero si alguno de los contaminantes, los cuales eluyen al aplicar NaCl. De esta manera, la toxina de interés se obtiene con una mayor homogeneidad en el percolado.

Por otra parte, en la columna de intercambio aniónico fuerte (HQ 50) se obtuvo un mayor grado de pureza en comparación con la columna de intercambio aniónico débil (D 50). A su vez, para ambas columnas al aplicar sobrenadante de fermentación de *C. perfringens* precipitado se obtuvieron mayores grados de pureza de etx.

Si bien se logró aumentar la homogeneidad de etx, no se logró alcanzar resultados tan buenos como en las otras técnicas utilizadas.

4.1.2.5 Cromatografía de intercambio hidrofóbico en Lewatit VP OC 1600

Luego de analizar el comportamiento de etx frente a cromatografías de intercambio iónico, se decidió estudiar otro tipo de intercambios. Como se observa en la Figura 22, al enfrentar el sobrenadante de fermentación de *C. perfringens* a una matriz hidrofóbica como lo es el Lewatit VP OC 1600, se logró mejorar la pureza proteica. A diferencia de la matriz DEAE, etx sí establece interacciones con dicha matriz.

Si bien en el percolado (Figura 22, Carril 2) se observa un alto contenido proteico, debido probablemente a una saturación de la matriz, en el lavado se eluyen los contaminantes (sin la presencia de etx), y en los eluidos con 0,7, 1 y 2 % de SDS se logra eluir la proteína de interés con una alta homogeneidad.

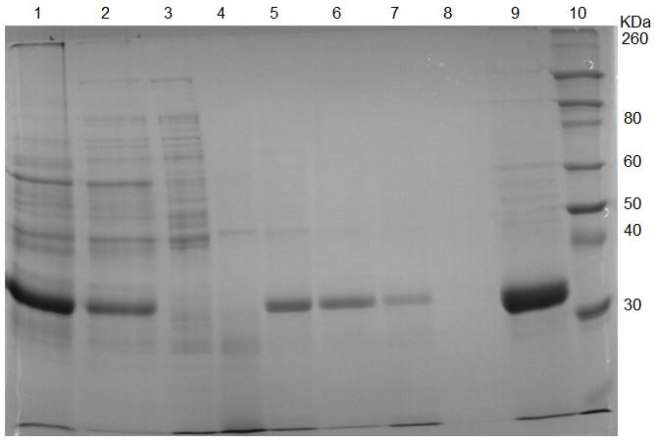


Figura 22. Electroforesis SDS-PAGE 12% de cromatografía de intercambio hidrofóbico en matriz Lewatit VP OC 1600 con sobrenadante de fermentación de *C. perfringens* como aplicado. Carril 1: Sobrenadante de fermentación; Carril 2: Percolado; Carril 3: Lavado; Carril 4: Eluido 0,3 % SDS; Carril 5: Eluido 0,7 % SDS; Carril 6: Eluido 1 % SDS; Carril 7: Eluido 2 % SDS; Carril 8: Matriz; Carril 9: Percolado de DEAE aplicando sobrenadante de fermentación precipitado resuspendido en buffer fosfato de sodio 25 mM pH 7; Carril 10: MPM (PageRuler Prestained Protein Ladder 26618).

Por otra parte, al analizar la matriz (Carril 8) no se observa ninguna banda, por lo que se puede afirmar que con 2 % de SDS toda la toxina unida a la matriz es eluida.

En la Figura 22 se incluye la fracción pura obtenida con la matriz DEAE (Carril 9). Si bien la concentración de las fracciones puras no es comparable, si se puede analizar el grado de pureza que se obtiene entre ambas técnicas. En donde se observa que los eluidos obtenidos utilizando la matriz Lewatit VP OC 1600 presentan menos contaminantes que el percolado obtenido de la matriz DEAE.

Por otra parte, también se estudió el comportamiento de la matriz Lewatit VP OC 1600 frente al sobrenadante de fermentación precipitado como aplicado. En este caso, como se muestra en la Figura 24, los contaminantes se eluyen en el percolado (Carril 3) y a bajas concentraciones de SDS (Carriles 4 al 6), mientras que la toxina épsilon, recién logra ser eluida homogéneamente con 1 % de SDS (Carril 7).

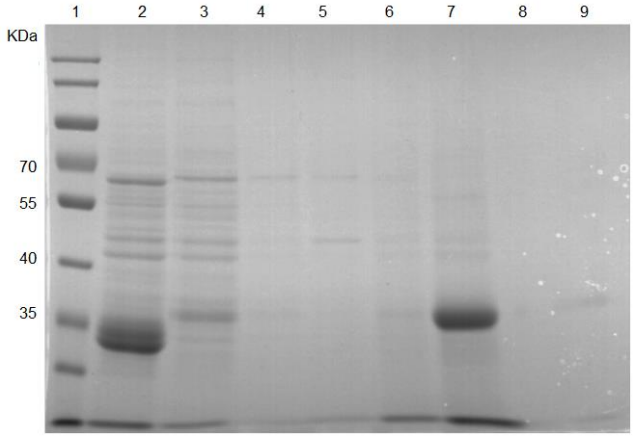


Figura 23. Electroforesis SDS-PAGE 12% de cromatografía de intercambio hidrofóbico en matriz Lewatit VP OC 1600 con precipitado al 75% sulfato de amonio de sobrenadante de fermentación de *C. perfringens* tipo D resuspendido en buffer fosfato de sodio como aplicado. Carril 1: MPM (PageRuler Prestained Protein Ladder 26616); Carril 2: Sobrenadante de fermentación precipitado resuspendido en buffer fosfato de sodio 25 mM pH 7; Carril 3: Percolado; Carril 4: Lavado; Carril 5: Eluido 0,1 % SDS; Carril 6: Eluido 0,5 % SDS; Carril 7: Eluido 1 % SDS; Carril 8: Vacío; Carril 9: Matriz.

Una posible respuesta a este cambio de comportamiento, puede estar relacionado con la eliminación de componentes del medio de cultivo cuando la muestra es sometida una precipitación salina, de manera que la toxina épsilon tiene menos competencia a la hora de establecer interacciones hidrofóbicas con la matriz, permitiendo que se establezcan uniones más fuertes.

4.1.2.6 Cromatografía de intercambio iónico en NPs magnéticas

Aprovechando la alta relación superficie volumen que ofrecen los soportes nanoestructurados, se utilizaron nanopartículas magnéticas como intercambiadores aniónicos debido a las características de su superficie.

Al igual que con las otras matrices, se analizó el comportamiento de las nanopartículas magnéticas al ser enfrentadas tanto al sobrenadante de fermentación de *C. perfringens* tipo D como al sobrenadante de fermentación precipitado con sulfato de amonio.

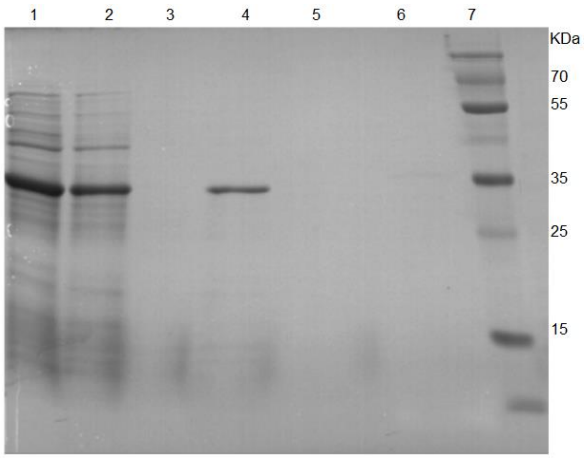


Figura 24. Electroforesis SDS-PAGE 12% de cromatografía de intercambio aniónico con nanopartículas magnéticas con sobrenadante de fermentación precipitado resuspendido en buffer fosfato de sodio 15 mM pH 7 como aplicado. Carril 1: Precipitado resuspendido en buffer fosfato de sodio 25 mM pH 7; Carril 2: Percolado; Carril 3: Lavado; Carril 4: Eluido 1 M NaCl; Carril 5: Eluido 3 M NaCl; Carril 6: Matriz; Carril 7: MPM (PageRuler Prestained Protein Ladder 26619).

Dado que no se logró mejorar la pureza utilizando el sobrenadante de fermentación como aplicado, solo se muestran los resultados obtenidos cuando se aplicó el precipitado del sobrenadante de fermentación.

Como se muestra en la Figura 24, las nanopartículas al ser enfrentadas al precipitado del sobrenadante de fermentación establecieron interacciones con la toxina. Etx fue eluida en su totalidad y en un alto grado de pureza al aplicar 1 M de cloruro de sodio (Carril 4).

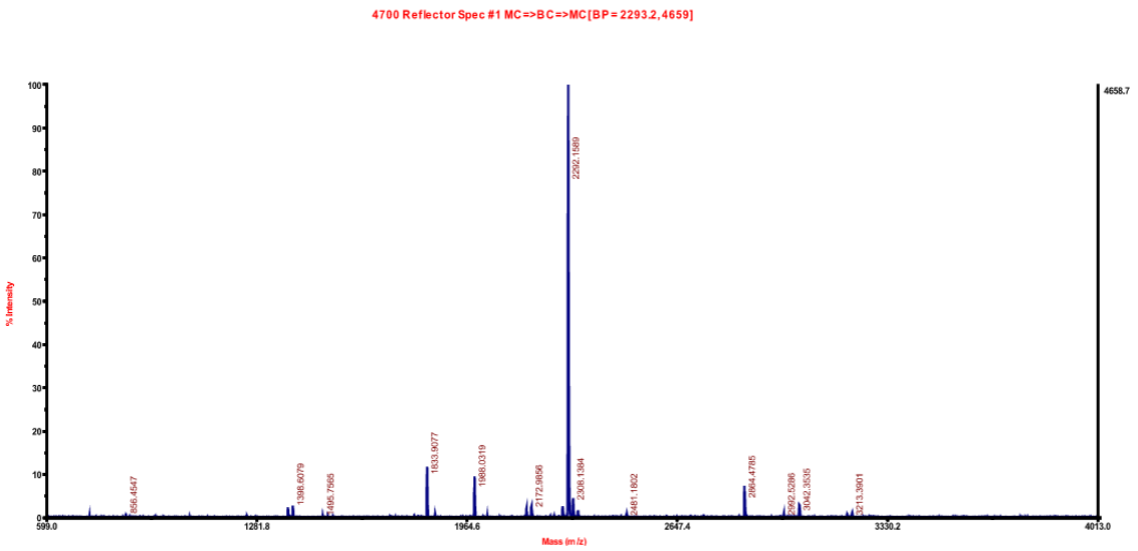
Si bien la capacidad de carga de las nanopartículas se vio saturada, la intensidad de la banda correspondiente a etx disminuye en el percolado, indicando la adsorción de la proteína de interés a la matriz.

4.1.2.7 Confirmación de identidad de toxina épsilon

Para confirmar la identidad de la proteína purificada, se realizó una identificación por mapeo peptídico con tripsina y medida por MALDI-TOF incluyendo MS/MS. Para ello, se analizó la banda del gel de poliacrilamida correspondiente a la cromatografía en matriz DEAE de aproximadamente 32 KDa (Figura 20, carril 2), la cual se esperaba que se tratase de la toxina épsilon según su peso molecular. Como se observa en la Figura 26, los resultados confirman la identidad de la misma.

Como ya fue descrito previamente, etx forma agregados de forma natural. A modo de descartar la posibilidad de que la banda de aproximadamente 70 KDa que co-purifica con la etx se tratase de un dímero, también se la analizó de la misma manera.

Como resultado se identificó dicha proteína como un péptido de transporte de *C. perfringens*. Los transportadores ABC del inglés ATP-binding cassette transporters, utilizan la energía del ATP para transportar varios sustratos a través de las membranas celulares. Esta proteína asociada a membranas celulares tiene una naturaleza hidrofóbica (33). Teniendo en cuenta las fuertes interacciones que presentó la etx por soportes hidrofóbicos, es esperable que dicho péptido co-purifique con etx.



Masa molar en el gel (KDa)	Proteína identificada por EM	Masa molar teórica (KDa)
32	"Épsilon toxin" de *Clostridium perfringens* D	31,2
> 70	"Peptide ABC transporter" de *Clostridium perfringens*	64,6

Figura 25. Mapeo peptídico con tripsina y medida por MALDI-TOF incluyendo MS/MS de muestra de toxina épsilon pura.

4.1.2.8 Selección de método cromatográfico

De los métodos cromatográficos ensayados, sólo algunos dieron lugar a resultados positivos obteniéndose fracciones puras de alta homogeneidad de etx. Los distintos métodos traen consigo ciertas ventajas y desventajas que deben ser analizadas al momento de seleccionar uno de ellos como método de trabajo para obtener la toxina épsilon pura para utilizarla como estándar del nanobiosensor.

Si bien las técnicas de exclusión molecular y las columnas comerciales devolvieron buenos resultados con eluidos de alta pureza, la técnica presenta dos puntos críticos. Por un lado el extenso tiempo que se requiere para obtener la muestra pura (concentrado de la muestra, lavado de la columna, equilibrado de la columna, procesado de la muestra), y por otro lado, los costos asociados al equipo de FPLC y las columnas correspondientes, lo que hacen que esta técnica no sea viable a nivel industrial y rutinario. Por estas razones, se descartó una exclusión molecular o una cromatografía en columnas comerciales como método de purificación en el contexto de nuestro trabajo.

Sin embargo no debería descartarse como estrategia de aislamiento en laboratorios bioquímicos. Al mejor de nuestro conocimiento, éstas técnicas no han sido aplicadas a la purificación de etx previamente.

Matriz	Aplicado	Fracción en la cual se obtiene toxina épsilon pura	Concentración (mg/mL)	Grado de pureza * (%)	Relación mg toxina épsilon puro – g matriz
Lewatit VP OC 1600	Sobrenadante de fermentación	Eluido 1% SDS	0,56 ± 0,06	98	6,0
Lewatit VP OC 1600	Precipitado	Eluido 1% SDS	0,68 ± 0,04	95	7,0
DEAE	Precipitado	Percolado	0,36 ± 0,10	90	1,2
NpMg fluidMAG-PEA	Precipitado	Eluido 1 M NaCl	0,16 ± 0,05	98	7,5

* Valores de pureza calculados con el software GelQuant Express en base a geles de electroforesis SDS-PAGE.

Tabla 2. Resumen de resultados obtenidos con las matrices que presentan resultados prometedores.

En la Tabla 2, se resumen los resultados obtenidos con las matrices cromatográficas que presentaron una mejora en la pureza.

Como puede observarse, realizando cromatografías de intercambio hidrofóbico con matriz Lewatit VP OC 1600 se obtuvieron fracciones de etx con alto grado de pureza tanto al aplicar el sobrenadante de fermentación como el precipitado de la misma. En ambos casos se obtuvieron fracciones con una pureza superior al 95%, con una concentración mayor a las otras técnicas y una alta relación entre los miligramos de toxina pura obtenida por gramo de matriz.

Si bien dicha matriz es adquirida comercialmente y su aplicación es sencilla, la principal desventaja que presenta esta metodología, es la necesidad de eluir la etx con SDS en proporciones que llegan hasta el 1%. Cabe destacar que luego de la elución, la eliminación del SDS de la muestra no es sencilla y provoca inconvenientes frente a las nanopartículas de oro para su utilización en el estandarizado del biosensor. Tanto la cromatografía con matriz DEAE como con nanopartículas magnéticas parecen ser las más adecuadas para nuestro objetivo.

En la Tabla 3 se muestran en detalle el proceso y las concentraciones obtenidas en cada paso para ambas cromatografías.

En lo que refiere a las nanopartículas magnéticas, éstas presentaron un gran desempeño como intercambiadores iónicos frente al precipitado del sobrenadante de cultivo. La fracción pura obtenida

presenta una alta homogeneidad y grado de pureza, así como la mejor relación de toxina obtenida por miligramo de matriz utilizada. Las posibles desventajas del método, están asociadas al costo de las nanopartículas, así como de las bajas cantidades volumétricas de toxina obtenida en comparación con otros métodos.

Mediante la cromatografía de intercambio iónico con la matriz DEAE aplicando precipitado de sobrenadante de cultivo, se obtuvieron fracciones de un grado de pureza del 90%.

La matriz es obtenida comercialmente a un costo accesible, y su metodología de utilización es sencilla. A pesar de que con dicha técnica se obtuvo un menor grado de pureza y menor cantidad de miligramos puros de toxina en relación a los gramos de matriz aplicada, una gran ventaja de esta metodología, es que la fracción pura es obtenida en el mismo medio en que fue aplicada (buffer fosfato de sodio) ya que es eluida directamente en el percolado sin la necesidad de eluir con ningún agente competidor, lo que permite su utilización directa frente al nanobiosensor.

Por otra parte, esta técnica fue utilizada a una escala de laboratorio mayor donde se obtuvieron resultados comparables, comportándose de la misma manera que a pequeña escala.

	Muestra	Concentración (mg/mL)	Volumen (mL)	mg totales
Cromatografía de intercambio iónico en matriz nanopartículas magnéticas (fluidMAG-PEA)	Sobrenadante de fermentación precipitado al 75 % SA	0,91 ± 0,01	0,075	0,07 ± 0,01
	Percolado	0,65 ± 0,11	0,075	0,05 ± 0,11
	Lavado	0,11 ± 0,02	0,075	0,01 ± 0,02
	Eluido 1 M NaCl	0,16 ± 0,05	0,075	0,01 ± 0,05
	Eluido 3 M NaCl	> 0,1	0,075	> 0,01
Cromatografía de intercambio iónico en matriz DEAE	Sobrenadante de fermentación precipitado al 75 % SA	0,91 ± 0,01	3	2,72 ± 0,01
	Percolado	0,36 ± 0,10	3	1,09 ± 0,10
	Lavado	0,12 ± 0,05	3	0,35 ± 0,01
	Eluido 200 mM NaCl	> 0,1	3	> 0,3
	Eluido 600 mM NaCl	0,37 ± 0,09	3	1,11 ± 0,09
	Eluido 1 M NaCl	> 0,1	3	> 0,3

Tabla 3. Tabla de purificación para las cromatografías de intercambio iónico.

Por todas las razones anteriormente presentadas, se decidió continuar con la cromatografía de intercambio aniónico en matriz DEAE como técnica rutinaria para purificar la toxina épsilon de *C. perfringens* a partir del precipitado con sulfato de amonio del sobrenadante de fermentación.

4.2 Síntesis, estabilización y funcionalización de nanopartículas de oro esféricas de 16 nm

4.2.1 Síntesis de nanopartículas de oro

Las nanopartículas de oro fueron sintetizadas siguiendo el método de Turkevich (14), mediante la reducción de ácido cloroáurico con citrato de sodio en proporciones adecuadas para obtener nanopartículas esféricas monodispersas de 16 nm.

De manera de verificar la correcta síntesis de las nanopartículas, se llevaron a cabo diversas técnicas para su caracterización.

El tamaño de las nanopartículas esféricas de oro se correlaciona con el pico máximo de su espectro de absorbancia UV-Vis entre 400 y 700 nm, por lo tanto, en primera instancia se analizó el plasmón

de resonancia de superficie de las mismas. Las AuNPs mostraron un pico máximo a 519 nm que de acuerdo con bibliografía corresponde a nanopartículas de 16 nm de diámetro (34).

Además del plasmón de resonancia, se tomaron imágenes de microscopía de transmisión electrónica (TEM) de las nanopartículas para determinar morfología y tamaño. En la Figura 26 se observan dos microscopias de Au@Citrato, donde se puede observar que la mayoría son esféricas y se comprueba que la solución coloidal es monodispersa y homogénea. Estos resultados no son menores ya que uno de los problemas más recurrentes en la síntesis de nanopartículas es la agregación de las mismas.

El diámetro promedio de las nanopartículas resultado del análisis de las imágenes de TEM mediante el software libre ImageJ del NIH (National Institutes of Health), fue de 16 ± 3 nm.

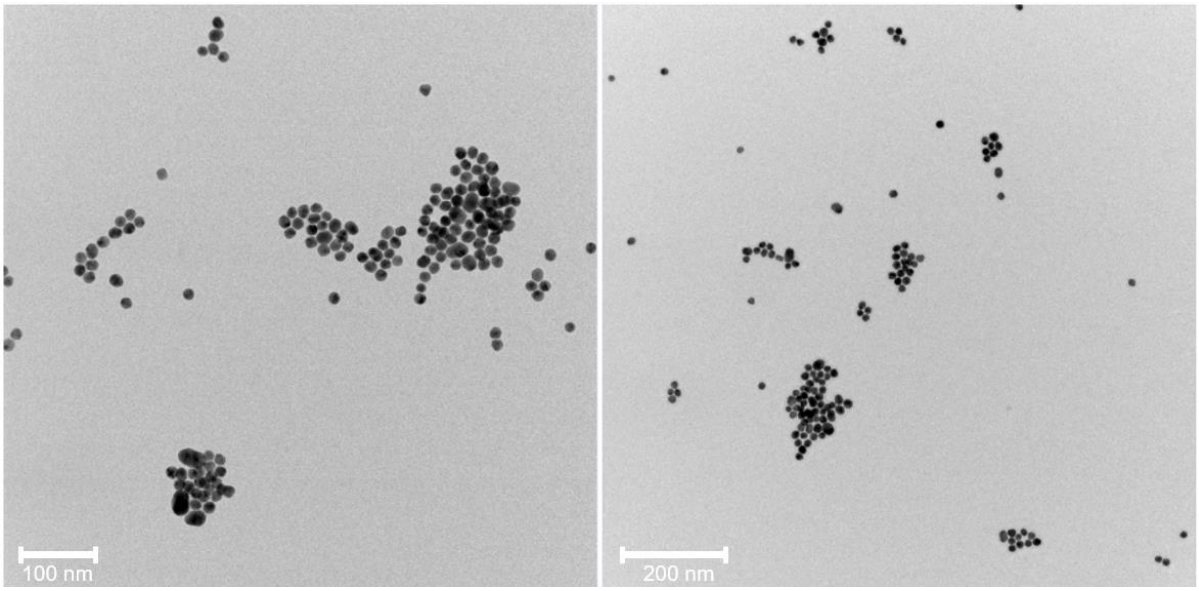


Figura 26. Microscopía de transmisión electrónica (TEM) de nanopartículas de oro sintetizadas y estabilizadas con citrato de sodio (Au@Citrato) en dos escalas diferentes.

En la Figura 27 se presenta el histograma del diámetro de las nanopartículas obtenido del análisis de las imágenes de TEM. Se puede observar que la mayor parte de las nanopartículas presentan un tamaño de entre 15 y 16 nm de diámetro.

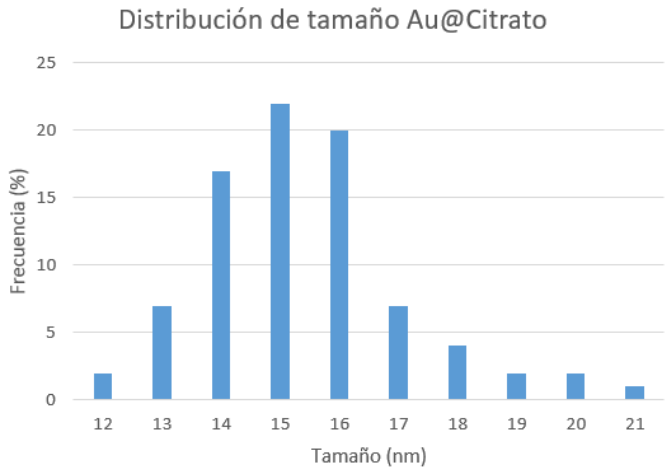


Figura 27. Histograma del diámetro de nanopartículas de oro obtenido a partir del análisis de imagen mediante el software ImageJ.

Por otra parte, se analizó la distribución de tamaño de las Au@Citrato mediante DLS (Dynamic Light Scattering) donde el diámetro efectivo de las nanopartículas fue de 17,8 ± 0,1 nm.

La polidispersidad obtenida en la medida fue de 0,06 ± 0,01 lo que indica que la muestra es monodispersa.

Tanto los estudio por TEM como por DLS brindan resultados consistentes en cuanto a tamaño y polidispersidad. Como puede observarse en dicha tabla, las nanopartículas analizadas mediante este método presentan un diámetro mayor que aquellas analizadas mediante TEM. Esto se debe a que el análisis de tamaño de las nanopartículas mediante DLS brinda información del diámetro hidrodinámico de las mismas.

4.2.2 Estabilización de nanopartículas de oro

Un problema recurrente en las suspensiones de AuNPs es su tendencia a la agregación. El recubrimiento de las nanopartículas con citrato de sodio resulta lábil, lo que se traduce en una baja estabilidad coloidal. La aplicación de nanopartículas en sistemas biológicos, hace necesario el uso de estabilizadores más fuertes que el citrato ya que éste interacciona débilmente con las nanopartículas a través de interacciones electroestáticas (17). Para evitar la agregación de las NPs se recurre a su recubrimiento con moléculas de gran tamaño, que puedan establecer enlaces covalentes con la superficie, o que contemplen ambas modalidades.

La estabilización no solo permite mejorar la estabilidad de las nanopartículas, sino también la conjugación con otras moléculas, como pueden ser ligandos funcionales. Los agentes estabilizadores utilizados en la síntesis de nanopartículas (citrato de sodio), pueden ser intercambiados por otros agentes o ligandos de mayor afinidad a la superficie. Los ligandos tiolados (-SH) son ampliamente utilizados, ya que los grupos tiol son capaces de reemplazar los agentes estabilizadores debido a la alta afinidad que posee el oro por el azufre (8).

Si bien existe una gran variedad de agentes tiolados, son moléculas tiol terminal de polietilenglicol (PEG) las más destacadas por su capacidad estabilizadora (8).

En este trabajo se utilizó polietilenglicol con un grupo tiol en un extremo y un grupo carboxilo en el otro (SH-PEG-COOH) como agente estabilizador. Esta molécula se une por el extremo tiol de un modo pseudo covalente a los átomos de oro de la nanopartícula, mientras que en el otro extremo presenta grupos carboxilo terminales expuestos para ser modificados posteriormente. La presencia del polietilenglicol en las nanopartículas aumenta la estabilidad de las mismas evitando así la agregación entre ellas. Esto se debe a la naturaleza polimérica del PEG que proporciona impedimento estérico, produciendo repulsión entre nanopartículas que a su vez se ve incrementada por las cargas negativas que aportan los grupos carboxilo (35).

Dado que existe una gran variedad de SH-PEG-COOH, se seleccionaron tres tipos de pesos moleculares de 458, 2100 y 3219 Da (Figura 28 A, B y C respectivamente).

Las nanopartículas estabilizadas con los tres tipos de PEGs carboxilados fueron caracterizadas por espectrometría UV-Vis siendo el pico máximo de absorbancia de 520 nm para los tres casos.

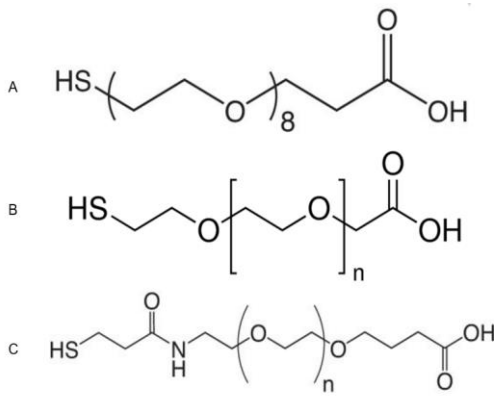


Figura 28. Estructura de polietilenglicoles utilizados para la estabilización de nanopartículas de oro. A. Alpha-Thio-omega-(propionic acid) octa (ethylene glycol) 458 Da (Iris BIOTECH GMBH) B. Poly(ethylene glycol) 2-mercaptoethyl ether acetic acid 2100 Da (Sigma-Aldrich) C. alpha-Thio-omega-carboxy poly(ethylene glycol) 3219 Da (Iris BIOTECH GMBH).

Con el fin de de caracterizar y conocer la carga superficial de las nanopartículas estabilizadas, se realizó un gel de agarosa de las nanopartículas para analizar su movilidad.

Dado a que la movilidad de las nanopartículas está determinada por el tamaño y la carga, si se conoce el tamaño de las mismas se puede comparar la carga según su movilidad en el gel de agarosa al ser sometidas a una carga eléctrica. En la Figura 29, se muestra el gel de agarosa de las nanopartículas de oro estabilizadas con SH-PEG-COOH 458, 2100 y 3219 Da.

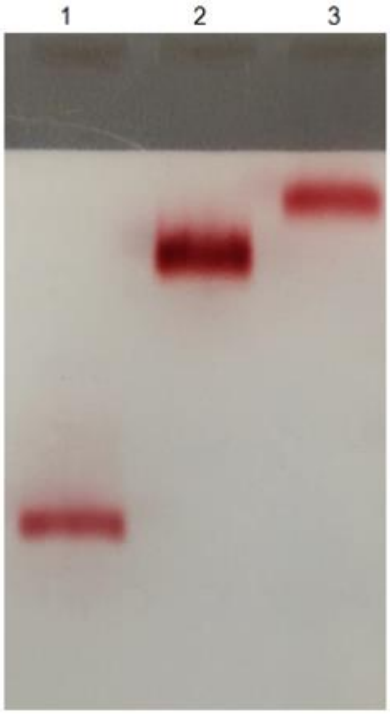


Figura 29. Electroforesis en gel de agarosa 1% en TBE 1X. Nanopartículas de oro estabilizadas con distintos tipos de SH-PEG-COOH Carril 1: Au@S-PEG-COOH 458 Da; Carril 2: Au@S-PEG-COOH 2100 Da; Carril 3: Au@S-PEG-COOH 3219 Da.

Si bien el tamaño de la molécula de polietilenglicol tiene una implicancia directa en la movilidad de las nanopartículas, si analizamos las distancias recorridas en cada caso, vemos como esta no fue proporcional al tamaño del polietilenglicol.

La movilidad puede ser expresada en valores numéricos calculando el factor de retardo (Rf). En la Tabla 4, se muestra el valor de Rf para cada tipo de nanopartícula, así como la relación entre estas según su tamaño y movilidad.

SH-PEG-COOH (Da)	Rf	Relación Da		Relación Rf	
3219	0,20	3219/2100	1,5	3219/2100	1,4
2100	0,28	3219/458	7	3219/458	3,4
458	0,68				

Tabla 4. Valores de factor de retardo (Rf) para las nanopartículas estabilizadas con polietilenglicoles de diferentes tamaños, y su relación en peso y movilidad.

Como se puede observar, la relación entre los tamaños de los polietilenglicoles de 3219 Da y 458 Da, es de un valor de 7, mientras que si comparamos la movilidad que resultó de cada uno, esta relación es de 3,4.

Si ambas nanopartículas tuvieran la misma carga superficial, ambas relaciones deberían ser iguales. Esto significa que las nanopartículas con polietilenglicol de 3219 Da migran más en proporción a las de 458 Da debido a su carga superficial. De la misma manera, se puede realizar este razonamiento para las nanopartículas estabilizadas con SH-PEG-COOH 2100 Da. La relación en tamaño entre estas y las de 3219 Da es de 1,5 y la relación del Rf es de 1,4, por lo que podemos concluir que la carga en ambas es muy similar, ya que se mantiene casi idéntica la relación de ambos factores.

Estos resultados fueron confirmados mediante medidas de potencial Z para las nanopartículas Au@S-PEG-COOH de 458 Da y 3219 Da.

El potencial Z brinda información sobre la repulsión o atracción que existe entre las nanopartículas, ya que el potencial eléctrico es el resultado de las fuerzas de repulsión existentes entre las nanopartículas, de manera que si estas fuerzas son suficientemente elevadas, las nanopartículas se mantienen dispersas entre sí (16).

Mientras que las Au@S-PEG-COOH 458 Da presentaron un valor de potencial Z de -7,29 ± 2,03 mV, las Au@S-PEG-COOH 3219 Da presentaron un valor de -13,35 ± 0,52 mV.

Estos datos, confirman los resultados obtenidos mediante el análisis de movilidad de las nanopartículas en geles de agarosa.

Respecto a la carga de las nanopartículas, cabe destacar que las estabilizadas con SH-PEG-COOH 458 Da son las que presentaron menor carga superficial, lo que las hace menos estables por disminuir la repulsión entre ellas.

Las nanopartículas estabilizadas con SH-PEG-COOH 458 Da no pudieron ser funcionalizadas con anticuerpo ya que estas se agregaban al ser activadas por la acción del EDC y Sulfo-NHS. Por otra parte, las AuNPs estabilizadas con SH-PEG-COOH de 2100 y 3219 Da fueron funcionalizadas con anticuerpos anti-toxina épsilon y enfrentadas al estándar puro de etx. Solamente las nanopartículas estabilizadas con SH-PEG-COOH 2100 Da presentaron cambios en su estado de agregación frente a etx. Tanto para SH-PEG-COOH 458 Da como para SH-PEG-COOH 3219 Da no se pudo encontrar una condición óptima para generar agregación específica frente a etx. Debido a estos resultados, posteriormente solo se muestran los resultados utilizando nanopartículas estabilizadas con SH-PEG-COOH 2100 Da.

4.2.3 Funcionalización de nanopartículas de oro con anticuerpos anti etx

En este trabajo, anticuerpos policlonales capaces de reconocer a la toxina épsilon, fueron inmovilizados sobre la superficie de las nanopartículas de oro mediante una pre adsorción iónica y una unión covalente utilizando las aminas primarias expuestas en la estructura aminoacídica de los anticuerpos y los grupos carboxilo terminal de las moléculas de SH-PEG-COOH unidas a la superficie de las nanopartículas.

La química del EDC (Etilcarbodiimida) es la más utilizada para generar reactividad entre ácidos carboxílicos (presentes en moléculas de PEG) y aminas primarias (presentes en proteínas, como por ejemplo en anticuerpos). La carbodiimida es capaz de reaccionar con ácidos carboxílicos formando un intermediario más reactivo contra grupos aminos, induciendo la formación covalente de una amida (36).

Debido a la inestabilidad del intermediario, el agregado de Sulfo-NHS (N-hidroxisuccinimida) estabiliza y aumenta la reactividad de éste por los grupos aminos, incrementando así el rendimiento de la reacción (37).

Los métodos de conjugación orientada de anticuerpos a la superficie de las nanopartículas incluyen el uso de interacciones tanto físicas como químicas. Las interacciones físicas dependen de las atracciones iónicas entre las cargas de las nanopartículas y los anticuerpos, de las interacciones hidrofóbicas y de las interacciones entre los aminoácidos con azufre del anticuerpo con la superficie de oro de la nanopartícula (37).

En el proceso de inmovilización del anticuerpo en la superficie de la nanopartícula, es de gran importancia lograr una rápida absorción iónica que permita la orientación de los anticuerpos, de modo que la región Fab se mantenga disponible luego de una lenta unión covalente.

Debido a que los grupos aminos más reactivos del anticuerpo están en la región Fab, si no se realiza una adsorción iónica que promueva la funcionalización orientada, la unión covalente tendría lugar principalmente por este sitio, impidiendo un posterior reconocimiento molecular del antígeno por el anticuerpo (37).

Para favorecer la adsorción iónica los anticuerpos deben presentar una carga neta positiva. Por esta razón, se decidió llevar a cabo la funcionalización en un buffer pH 5, ya que permite mantener la estabilidad de los anticuerpos mientras que otorga una carga neta positiva a la mayoría de las isoformas, teniendo en cuenta que la mayoría de estos presentan puntos isoeléctricos superiores a 5 (6).

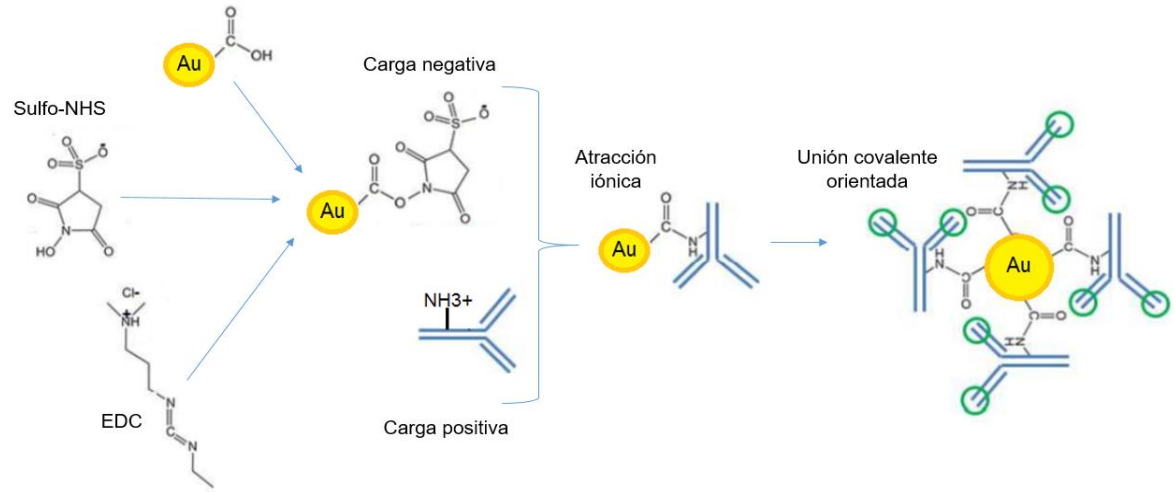


Figura 30. Esquema de la funcionalización orientada de anticuerpos a nanopartículas de oro estabilizadas (Imagen tomada de (37)).

En la Figura 30, se esquematiza una estrategia de conjugación orientada de anticuerpos. En primera instancia se genera una rápida adsorción iónica entre los grupos carboxilo del polietilenglicol y los grupos amino primarios de los anticuerpos para dar orientación. Posteriormente se forman enlaces covalentes entre los grupos aminos que por su orientación quedaron espacialmente cercanos a los grupos carboxilo terminal

Los anticuerpos fueron analizados mediante una electroforesis desnaturalizante SDS-PAGE para determinar su peso molecular y Western Blot para verificar su reconocimiento por etx (Figura 31 y 32 respetivamente).

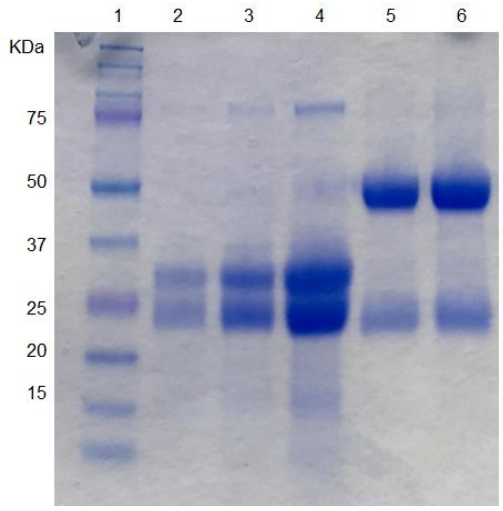


Figura 31. Electroforesis SDS-PAGE 12% de los anticuerpos teñido con Coomassie Blue. Carril 1: MPM (Dual color bio rad protein standard 161-0374); Carril 2: Anticuerpo policlonal fragmento Fab anti toxina épsilon *Clostridium perfringens* NIBSC 0.3 mg/mL; Carril 3: Anticuerpo policlonal fragmento Fab anti toxina épsilon *Clostridium perfringens* NIBSC 1,5 mg/mL; Carril 4: Anticuerpo policlonal fragmento Fab anti toxina épsilon *Clostridium perfringens* NIBSC 3 mg/mL; Carril 5: Anticuerpo policlonal IgG anti antígenos de *C. perfringens* tipo D Virbac AUS 1 mg/mL; Carril 6: Anticuerpo policlonal IgG anti antígenos de *C. perfringens* tipo D Virbac AUS 1,5 mg/mL.

Como se puede observar en la Figura 31, los carriles 2, 3 y 4 corresponden al anticuerpo policlonal comercial fragmento Fab de la empresa NIBSC en distintas diluciones. El perfil cromatográfico corresponde con el esperado para una región Fab.

Los carriles 5 y 6 corresponden al anticuerpo policlonal completo (IgG) producido por Virbac Australia, en los cuales se observan dos bandas correspondientes a la cadena pesada y la cadena liviana del IgG. A su vez, a partir de la imagen se puede afirmar que los anticuerpos se encuentran en un alto grado de pureza.

Por otra parte, se realizaron tres Western Blot (Figura 31 B, C y D) para confirmar el reconocimiento de los anticuerpos hacia etx utilizando los anticuerpos anteriormente descritos y comparándolos con un anticuerpo monoclonal anti-toxina épsilon donado por la empresa Virbac.

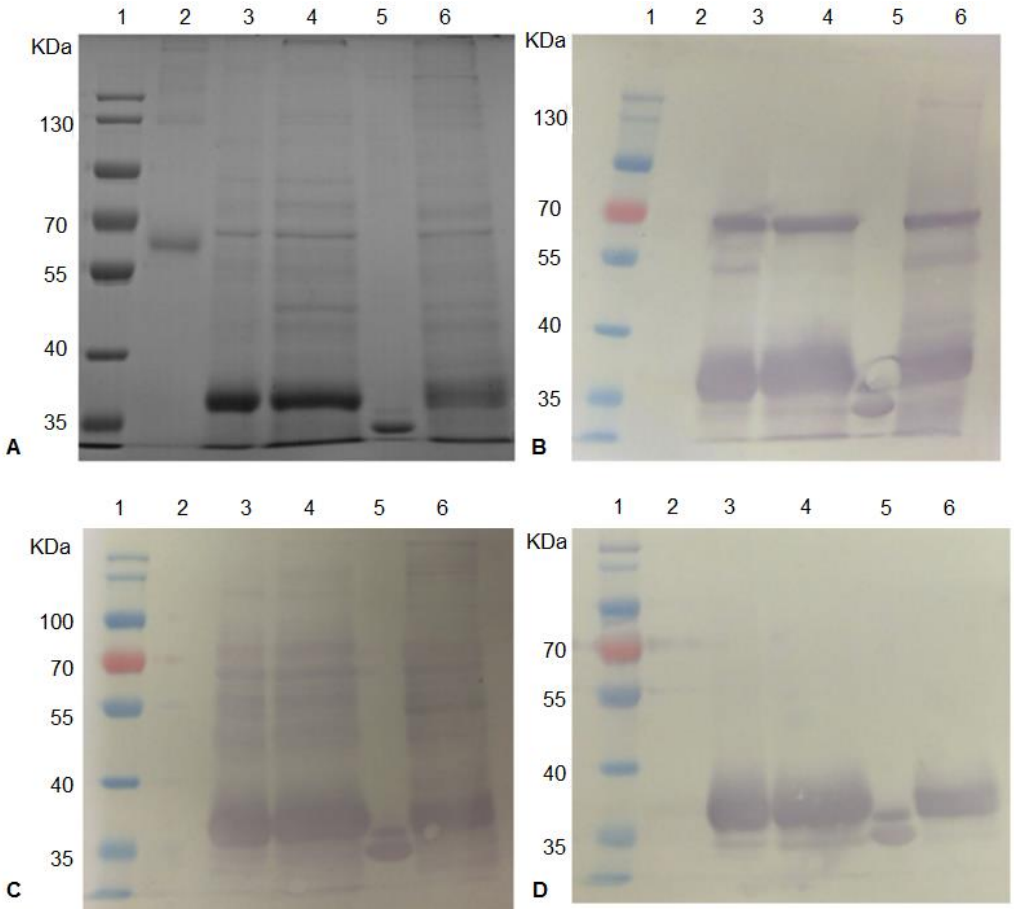


Figura 32. Electroforesis SDS-PAGE y Western Blot de anticuerpos anti toxina épsilon de *C. perfringens* Carril 1: MPM (Page Ruler Protein Ladder Thermo 26616); Carril 2: Sero albúmina bovina (BSA) 0,2 mg/mL; Carril 3: Toxina pura purificada en Uruguay; Carril 4; Sobrenadante de fermentación de *C. perfringens* Uruguay; Carril 5: Toxina épsilon formulada en Australia; Carril 6: Sobrenadante de fermentación de *C. perfringens* Australia.
A. Electroforesis SDS-PAGE 12% teñido con Coomassie Blue. B. Western Blot con anticuerpo IgG anti toxina épsilon producido por Virbac Australia. C. Western Blot con anticuerpo Fab anti toxina épsilon producido por NIBSC. D. Western Blot con anticuerpo monoclonal anti toxina épsilon.

En la Figura 32 A, se observa una electroforesis SDS-PAGE de las muestras teñidas con Coomassie Blue. La muestra de toxina épsilon (Carril 5) fue purificada en Uruguay a partir del sobrenadante de fermentación de *C. perfringens* tipo D y posteriormente enviada a Australia, donde fue acondicionada para realizar pruebas de potencia. La diferencia que se observa de peso molecular entre la toxina épsilon formulada en Australia y la purificada en Uruguay, se debe al paso de activación de la proteína (mediante proteólisis) realizada previamente a las pruebas de potencia.

En lo que refiere a los Western Blots (Figura 32 B, C y D) se puede observar como en todos los casos existió reconocimiento por etx por parte de todos los anticuerpos, mientras que ninguno presentó un reconocimiento inespecífico por la BSA.

Si bien la especificidad del anticuerpo monoclonal por etx es superior a los otros dos (Figura 32 D), existe una diferencia sensible entre la especificidad del anticuerpo comercial (Figura 32 C) y el producido por Virbac Australia (Figura 32 B). Mientras que el fragmento Fab reconoce una gran cantidad de proteínas presentes en la muestra, el anticuerpo IgG reconoce a la toxina épsilon y unas pocas proteínas más.

Para la funcionalización de ambos anticuerpos a la superficie de las nanopartículas se realizaron cálculos teóricos de manera de inmovilizar una cantidad conocida de anticuerpos capaz de generar agregación. Por un lado, se probó agregar dos anticuerpos IgG por nanopartícula y por otro lado, cuatros anticuerpos fragmento Fab por nanopartícula.

La unión de los anticuerpos a las nanopartículas es evidenciada por un corrimiento de 1 nm del pico máximo del plasmón de resonancia, y por un mayor retardo en geles de agarosa (Figura 34 carriles 1, 4 y 5).

4.2.4 Bloqueo de nanopartículas de oro

Uno de los puntos claves de un biosensor, es el bloqueo de las nanopartículas. Un agente bloqueante se encarga de enmascarar los grupos carboxilo activados de la superficie de la nanopartícula que no se enlazaron con los anticuerpos, neutralizando de esta manera la superficie de la misma impidiendo que existan interacciones inespecíficas entre la superficie de la nanopartícula y moléculas presentes en el medio.

De esta manera, solo el anticuerpo será capaz de generar interacciones específicas con su antígeno, siendo el único responsable de los distintos estados de agregación que se generan entre las nanopartículas.

Para seleccionar un agente bloqueante se debe tener en cuenta distintas características de los mismos: si posee grupos adecuados para formar enlaces con los grupos carboxilo activados restantes, el tamaño y las ramificaciones que posea. Son importantes estos dos últimos aspectos ya que la molécula puede ocultar los sitios de reconocimiento de los anticuerpos.

Diversas moléculas fueron utilizadas para bloquear las nanopartículas, polietilenglicol aminado (H_2N-PEG-OCH_3 750 Da), moléculas pequeñas como el Tris, etilendiamina (EDA) y proteínas complejas como la BSA.

Las nanopartículas de oro se sintetizaron, se estabilizaron con SH-PEG-COOH 2100 Da, se activaron mediante la reacción de acoplamiento con carbodiimida y se bloquearon con los distintos agentes. Luego de obtenidas las nanopartículas bloqueadas sin anticuerpo, las mismas fueron enfrentadas a distintas concentraciones de toxina, realizándose un seguimiento del plasmón de resonancia superficial. Este experimento permitió determinar el mejor agente bloqueante al mismo tiempo que funciona como control de los ensayos posteriores en donde se enfrentan nanopartículas funcionalizadas con anticuerpo a etx.

Como se muestra en la Figura 33, existen diferentes comportamientos de las nanopartículas sin anticuerpo y bloqueadas al ser enfrentadas a concentraciones crecientes de etx, es decir que, no todos los agentes logran bloquear la superficie de las AuNPs del mismo modo. Por otra parte, en todos los casos se observa cómo en mayor o menor medida, al aumentar la concentración de toxina se favorecen las interacciones inespecíficas con la superficie de las nanopartículas, las cuales generan una bajada de absorbancia del plasmón.

El Tris fue el agente que logró bloquear la superficie de las nanopartículas de mejor manera, impidiendo interacciones inespecíficas casi en su totalidad, hasta incluso en altas concentraciones de

etx (Figura 33 A). Por otra parte, al bloquear las AuNPs con NH_2-PEG-CH_3O y BSA se observa una leve caída en la absorbancia al aumentar la concentración de proteína, lo que indica que no logran bloquear totalmente la superficie (Figura 33 A y C). Por último, la etilendiamina (Figura 33 D) presenta el peor comportamiento ya que se observa una caída pronunciada en la absorbancia a medida que se aumenta la concentración de toxina. Este resultado puede explicarse por el aporte de cargas positivas a la superficie de la nanopartícula que la EDA aporta. Como se vió previamente, etx establece interacciones con matrices de intercambio aniónico, por lo que la EDA favorece las interacciones inespecíficas entre la nanopartícula y etx.

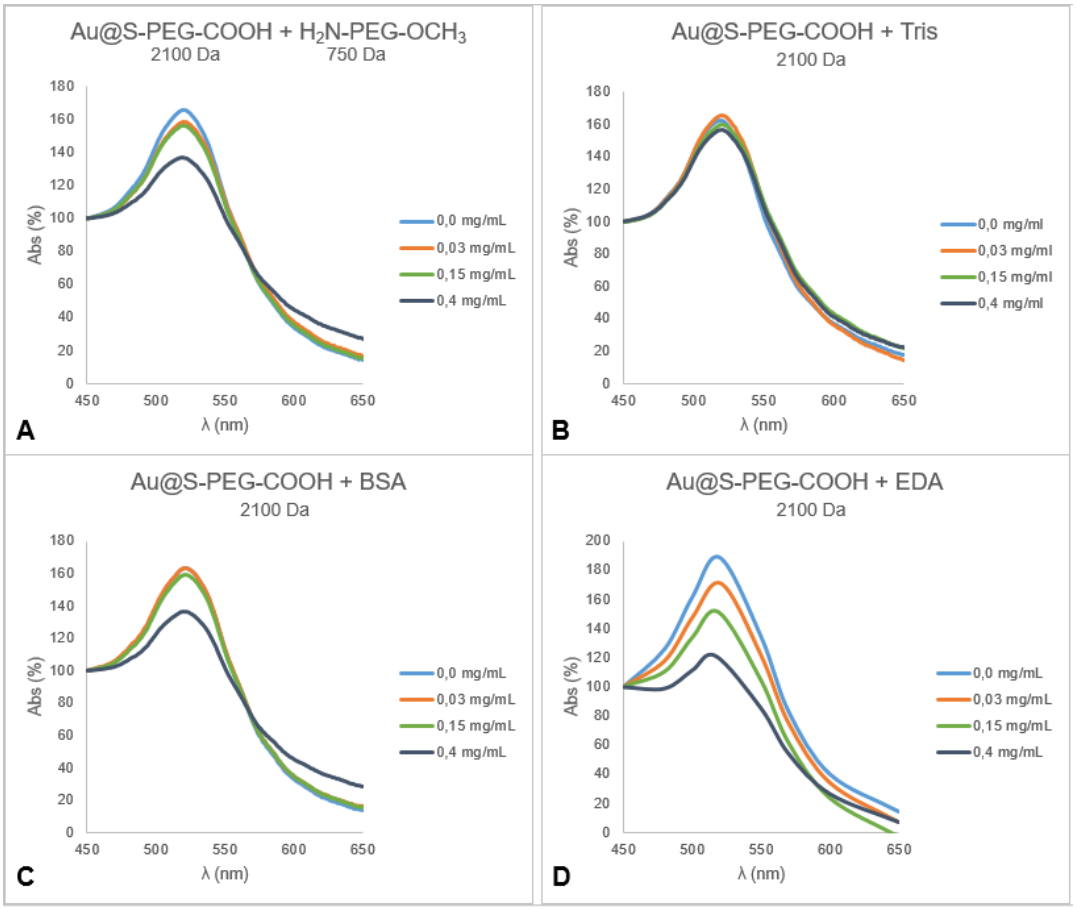


Figura 33. Espectro de plasmón de resonancia de nanopartículas de oro bloqueadas con distintos agentes enfrentadas a toxina pura en un amplio rango de concentraciones.

Además del seguimiento espectrofotométrico, se estudió la carga superficial de las nanopartículas bloqueadas mediante un gel de agarosa y medidas de potencial Z (Tabla 5).

Potencial Z	**Movilidad**	**Potencial Z (mV)**	**Rel. Residual**
Au@H_2N-PEG-OCH_3 750 Da	-0,600 ± 0,100	-7,65 ± 1,24	0,091 ± 0,0003
Au@BSA	-0,316 ± 0,063	-4,04 ± 0,85	0,0193 ± 0,0002

Tabla 5. Potencial Z de nanopartículas de oro bloqueadas con distintos agentes.

Los agentes bloqueantes presentes en la Tabla 5, logran disminuir la carga superficial de las nanopartículas respecto a los valores obtenidos para las nanopartículas estabilizadas con SH-PEG-

COOH 2100 Da. La BSA logra disminuir en mayor medida la carga superficial que el PEG aminado. Esto se debe a que al igual que la EDA, la BSA por ser una proteína compleja, también aporta cargas positivas a la superficie de la nanopartícula.

De manera de corroborar la funcionalización y el bloqueo de las nanopartículas, se realizó una electroforesis en gel de agarosa de las nanopartículas en las distintas etapas del proceso.

Como se observa en la Figura 34, el aumento del retardo de los carriles 1 y 5 correspondientes a las nanopartículas funcionalizadas con anticuerpo respecto a las nanopartículas estabilizadas con SH-PEG-COOH 2100 Da (Carril 4), es evidencia de una funcionalización exitosa con los anticuerpos.

Entre estas nanopartículas no existen diferencias en agentes bloqueantes que aporten carga, por lo que la diferencia en la movilidad sólo está determinada por el tamaño. Al funcionalizar el anticuerpo, la nanopartícula aumenta su tamaño provocando un aumento del retardo.

Por otra parte, se puede analizar el efecto de los agentes bloqueantes. Tanto el Tris como el H_2N-PEG-OCH_3 750 Da provocaron un aumento del retardo de las nanopartículas, evidencia de que efectivamente existieron modificaciones sobre las nanopartículas.

El aumento del retardo de las nanopartículas bloqueadas con H_2N-PEG-OCH_3 750 Da respecto al Tris se debe tanto al tamaño del agente, a la carga y a la cantidad de moléculas unidas. El tris al ser una molécula pequeña, tiene mejor acceso a la superficie de las nanopartículas maximizándose la densidad.

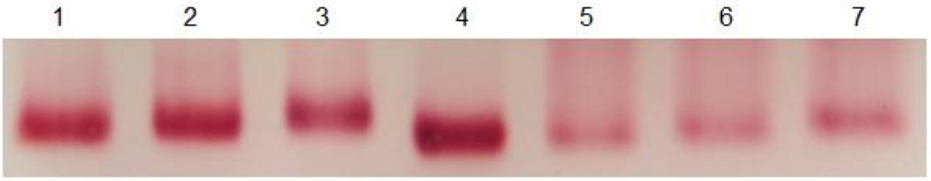


Figura 34. Gel agarosa 1X en TBE 1X. Carril 1: Au@fab 1:4 sin bloqueo; Carril 2: Au@fab 1:4 bloqueo Tris; Carri 3: Au@fab 1:4 bloqueo H_2N-PEG-OCH_3 750 Da; Carril 4: Au@SH-PEG-COOH 2100 Da; Carril 5: Au@IgG 1:2 sin bloqueo; Carril 6: Au@IgG 1:2 bloqueo Tris; Carril 7: Au@IgG 1:2 bloqueo NH_2-PEG-CH_3O 750 Da.

4.3 Nanobiosensor

Las nanopartículas de oro funcionalizadas con los anticuerpos policlonales tanto fragmento Fab como IgG anti-toxina épsilon junto con el estándar puro permitieron ensayar el comportamiento del nanobiosensor, en donde se busca la agregación de las nanopartículas al ser enfrentadas a etx. Dicha agregación se debe al reconocimiento específico de los anticuerpos funcionalizados por los distintos epítopes de la toxina, de manera que varias nanopartículas se unan a una misma molécula de etx, disminuyendo la distancia entre sí y modificando su plasmón de resonancia superficial.

Dado que se busca que distintos anticuerpos reconozcan una misma molécula, es importante tener en cuenta las relaciones molares entre los anticuerpos funcionalizados y la toxina épsilon en los ensayos.

Para provocar un desplazamiento del plasmón de resonancia hacia longitudes de onda mayores, se deben enfrentar relaciones de nanopartículas:etx capaces de que varias nanopartículas reconozcan a una misma molécula de toxina. Si se coloca toxina en exceso, cada nanopartícula reconocerá una molécula de etx, pero no necesariamente a la misma, por lo que no se encontrarán lo suficientemente juntas como para modificar su plasmón de resonancia.

Por otra parte, si se excede la concentración de nanopartículas en relación a la de toxina, se ocuparan todos los epítopes, pero aún muchas nanopartículas se encontrarán separadas entre sí y no se podrá observar un cambio significativo del plasmón de resonancia.

Dicha agregación puede ser identificada de manera macroscópica por un cambio de color de la suspensión coloidal de nanopartículas y/o mediante el seguimiento del espectro UV-Vis de las mismas.

El espectro de absorción es una herramienta útil, ya que las interacciones entre las AuNPs inducen cambios en la forma de los picos, los valores máximos de absorbancia y el desplazamiento a longitudes de onda mayores cuando existe agregación.

Mientras que fenómenos de agregación inespecíficos provocan una bajada de la absorbancia del plasmón de resonancia, la agregación específica por un ligando provoca un desplazamiento del pico máximo hacia longitudes de onda mayores.

En este trabajo, se utiliza el seguimiento del espectro UV-Vis para identificar fenómenos de agregación específicos o inespecíficos.

Se enfrentaron nanopartículas funcionalizadas y bloqueadas con distintos agentes a un amplio rango de concentraciones de toxina pura, a modo de estudiar los fenómenos de agregación provocados (Figura 35), estos ensayos fueron comparados con los controles presentados anteriormente (Figura 33).

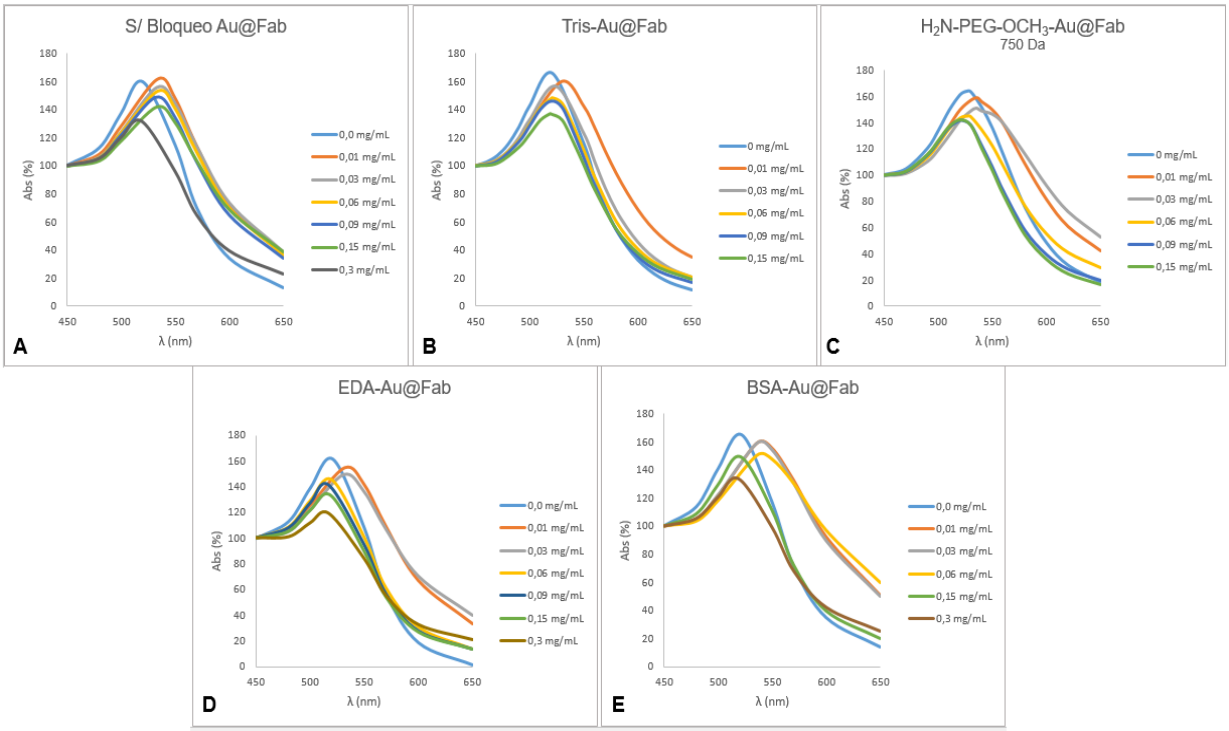


Figura 35. Espectro de plasmón de resonancia superficial de nanopartículas de oro funcionalizadas con anticuerpo policlonal anti-toxina épsilon fragmento Fab bloqueadas con distintos agentes enfrentadas a toxina épsilon pura en un amplio rango de concentraciones en tiempos iniciales.

El enfrentamiento de nanopartículas funcionalizadas con anticuerpo Fab y sin bloqueo (Figura 35 A), provocó un desplazamiento del plasmón de resonancia hacia longitudes de onda mayores en concentraciones que fueron desde 0,01 mg/ml a 0,15 mg/ml, lo que corresponde a relaciones molares

nanopartícula:etx de 1:100 a 1:10000. Por otra parte, a mayores concentraciones de toxina sólo se observa una bajada del valor máximo del pico de absorbancia.

Las nanopartículas bloqueadas con los distintos agentes, tuvieron un comportamiento similar, presentando un corrimiento del pico máximo de absorbancia a bajas concentraciones de etx. Sin embargo, los rangos de concentraciones de toxina en los que se observa el corrimiento del plasmón de resonancia varía según los agentes utilizados.

Mientras que las nanopartículas sin bloqueo presentan un desplazamiento frente a un mayor rango de concentraciones (0,01 a 0,15 mg/mL), las nanopartículas bloqueadas con BSA (Figura 35 E) presentan desplazamiento con concentraciones que van desde 0,01 a 0,06 mg/mL. Por otra parte las nanopartículas bloqueadas con EDA y H_2N-PEG-OCH_3 (Figura 35 C y D) presentan un desplazamiento del plasmón de resonancia en un rango más acotado, de entre 0,01 a 0,03 mg/mL de etx.

En el caso del bloqueo con Tris (Figura 35 B), las nanopartículas sólo son capaces de generar agregación a una concentración puntual de 0,01 mg/mL de etx. Teniendo en cuenta la cantidad de nanopartículas utilizadas en el ensayo, se trata de una relación molar de 1:100.

Respecto al corrimiento del pico máximo, en todos los casos el desplazamiento observado fue de 13 nm, llegando a longitudes de onda de 534 nm.

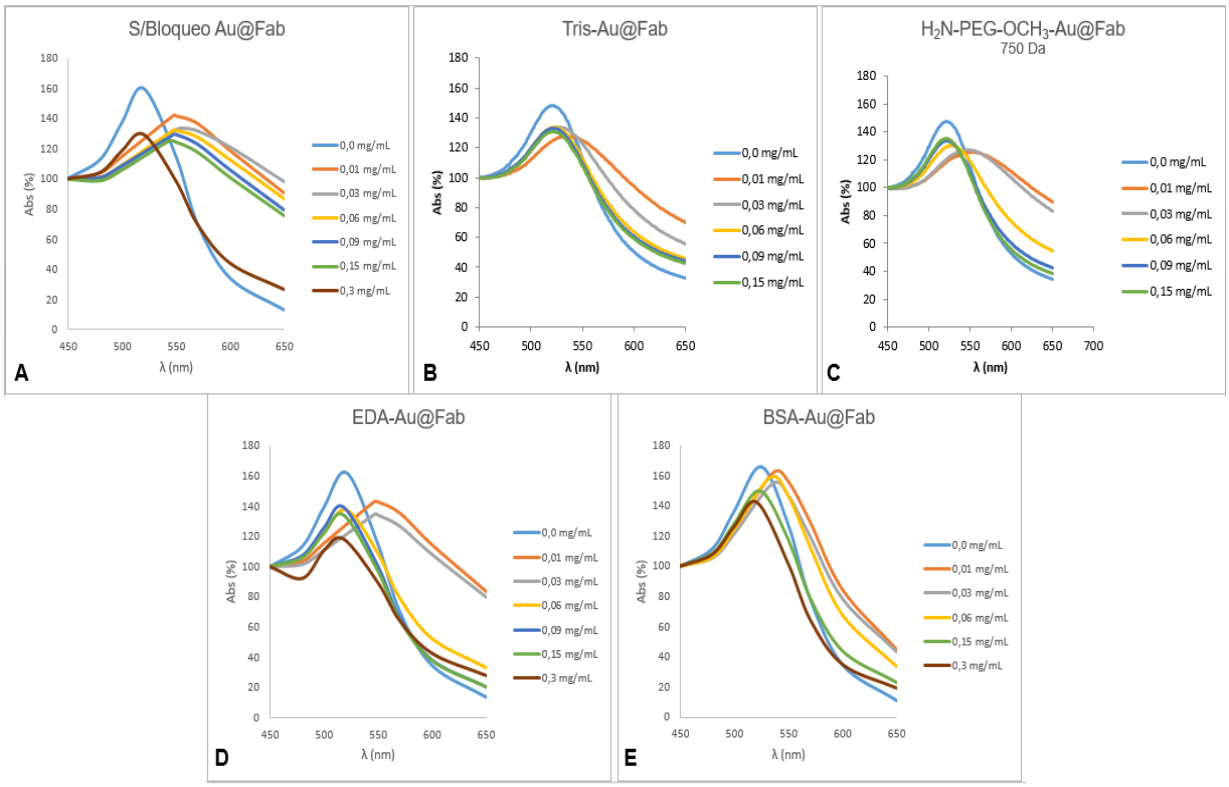


Figura 36. Espectro de plasmón de resonancia superficial de nanopartículas de oro funcionalizadas con anticuerpo policlonal anti-toxina épsilon fragmento Fab bloqueadas con distintos agentes enfrentadas a toxina épsilon pura en un amplio rango de concentraciones luego de 2 horas.

Cabe destacar que luego de 2 horas de reacción (Figura 36), se observa el mismo comportamiento. Mientras que el control (0,0 mg/mL de etx) se mantuvo invariado, las mismas concentraciones de etx que provocaban un desplazamiento del pico máximo de absorbancia a tiempos iniciales, provocan un desplazamiento acentuado de las longitudes de onda. Por otra parte, a las dos horas se observa una caída de los valores de absorbancia en todas las condiciones.

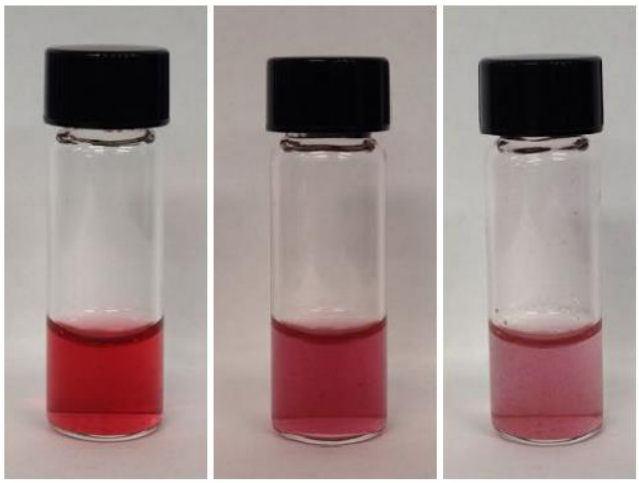


Figura 37. Seguimiento colorimétrico en el tiempo de la agregación de las nanopartículas funcionalizadas con anticuerpo Fab anti-toxina épsilon bloqueadas con Tris al ser enfrentadas a 0,01 mg/mL de estándar puro de etx. A: Tris-Au@Fab en tiempo 0; B: Tris-Au@Fab frente a etx luego de 15 minutos; C: Tris-Au@Fab frente a etx luego de 1 hora.

Como se muestra en la Figura 37, el fenómeno de agregación también pudo ser detectado de manera macroscópica como un cambio visible en el color de la suspensión coloidal de nanopartículas. En este caso se enfrentaron nanopartículas funcionalizadas con anticuerpo fab y bloqueadas con tris con etx pura en una relación molar de 1 a 100. Como se puede observar, a los 15 minutos el cambio de color ya es visible. Por otra parte a la hora de realizado el ensayo, las nanopartículas comienzan a formar agregados.

En cuanto a los ensayos con nanopartículas funcionalizadas con anticuerpo IgG (Figura 38), se enfrentó etx a nanopartículas con IgG inmovilizado y bloqueadas con Tris y se obtuvo un desplazamiento del plamsón de resonancia superficial hacia longitudes de onda mayores en todas las concentraciones de etx ensayadas. A menores concentraciones de etx el corrimiento del SPR fue mayor, alcanzando un desplazamiento de 10 nm respecto al control (0,0 mg/mL de etx).

Como se puede observar en la Figura 38 B, a las dos horas de realizado el ensayo, el desplazamiento del pico máximo se vio acentuado, llegando a longitudes de onda de 533 nm.

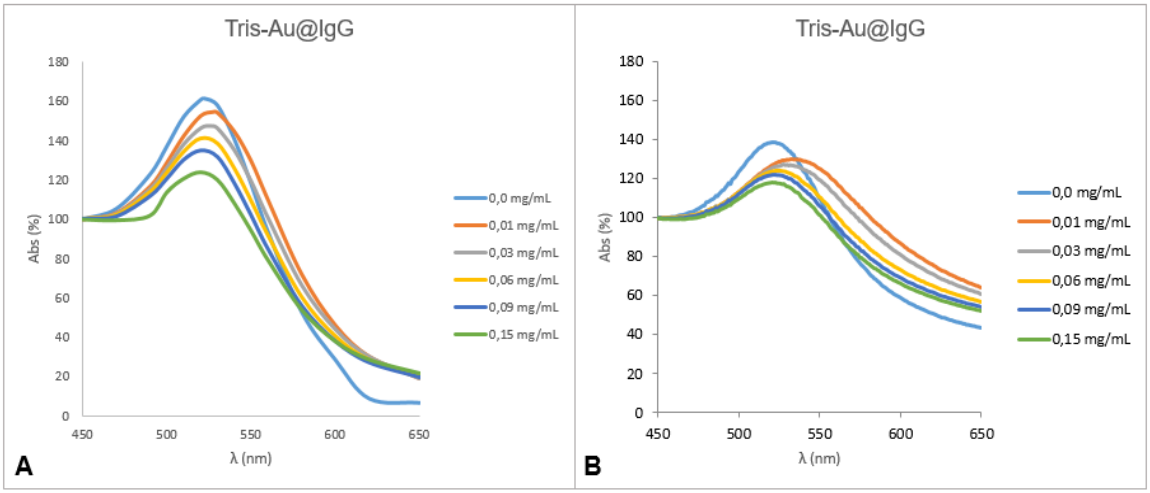


Figura 38. Espectro de plasmón de resonancia superficial de nanopartículas de oro funcionalizadas con anticuerpo policlonal anti-toxina épsilon IgG bloqueadas con Tris enfrentadas a toxina épsilon pura en un amplio rango de concentraciones. A. Ensayo a tiempo inicial; B: Ensayo luego de 2 horas.

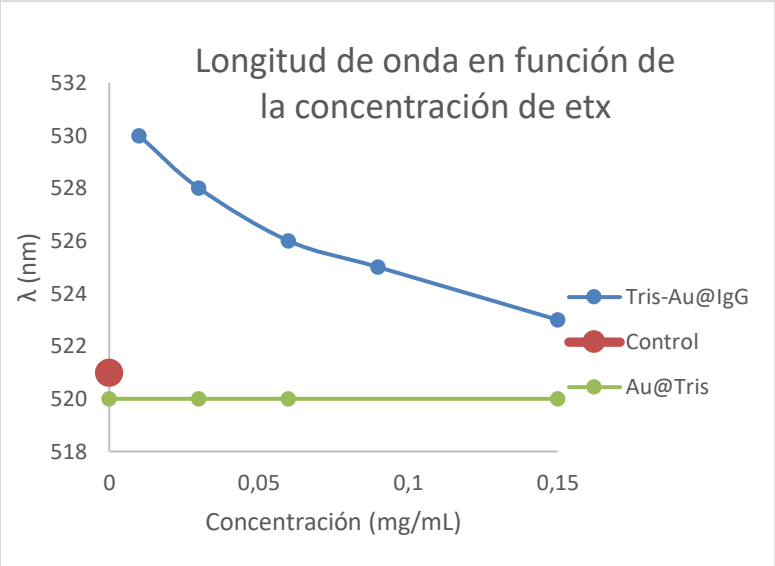


Figura 39. Longitud de onda del pico máximo del plasmón de resonancia superficial en función de la concentración de toxina épsilon aplicada luego de 2 hrs de incubación.

A modo de analizar la proporcionalidad del desplazamiento del plasmón de resonancia superficial hacia longitudes de onda mayores, se graficó la longitud de onda del pico máximo del SPR para cada concentración de etx ensayada (Figura 39). Como se observa en la figura, en azul se muestra el comportamiento de las nanopartículas funcionalizadas con anticuerpo IgG y bloqueadas con Tris frente a un rango de concentraciones de etx. El punto rojo corresponde a nanopartículas funcionalizadas con anticuerpo IgG y bloqueadas con Tris frente a una concentración de etx de 0,0 mg/mL (control). Por otra parte, en verde se muestran los resultados obtenidos para las nanopartículas sin anticuerpo y bloqueadas con Tris frente a un rango de concentraciones de etx.

A través de este gráfico se logró confirmar que existe un comportamiento del desplazamiento del SPR que es inversamente proporcional a la concentración de etx. Es decir que, a bajas concentraciones de etx se logró obtener un desplazamiento máximo del SPR, mientras que a medida que se aumenta la concentración de etx el desplazamiento disminuye. Por otra parte, las nanopartículas sin anticuerpo no presentaron movimiento del pico máximo de absorbancia para ninguna concentración ensayada.

A pesar de que se obtuvo un desplazamiento diferencial del SPR con una tendencia lineal entre las concentraciones ensayadas, la diferencia de las longitudes de onda del pico máximo del SPR no son lo suficientemente significativa como para observar un cambio colorimétrico entre los ensayos.
Es decir que, para conocer la concentración de una muestra problema mediante el uso de estas nanopartículas (Tris-Au@IgG) es necesario la utilización de un espectrofotómetro para conocer el estado de agregación de las nanopartículas.

Por otra parte, al enfrentar las nanopartículas al sobrenadante de fermentación de *Clostridium perfringens* (Figura 40), no se lograron repetir los resultados obtenidos al enfrentar las nanopartículas a toxina pura.

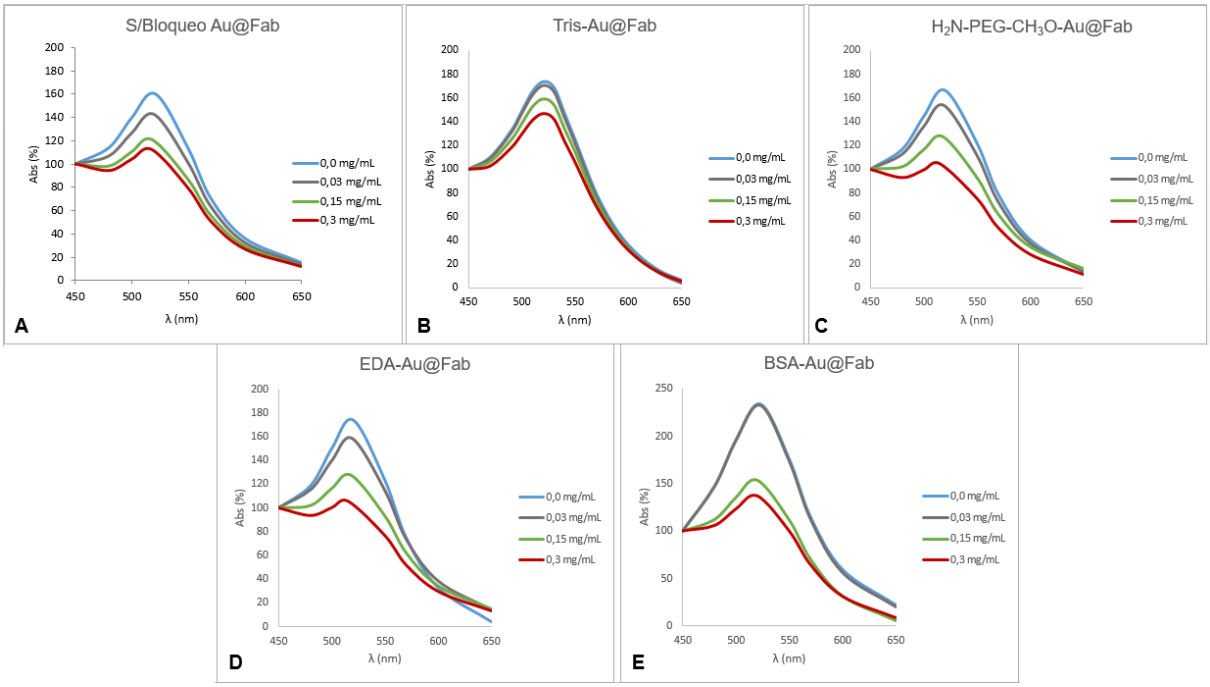


Figura 40. Espectro de plasmón de resonancia superficial de nanopartículas de oro funcionalizadas con anticuerpo policlonal anti-toxina épsilon fragmento Fab bloqueadas con distintos agentes enfrentadas a sobrenadante de fermentación de *C. perfringens* tipo D en un amplio rango de concentraciones en tiempos iniciales.

Para ninguna de las nanopartículas ensayadas, se observó un cambio en el pico máximo de absorbancia. Aquellas nanopartículas que enfrentadas a etx pura generaban un cambio colorimétrico, al ser enfrentadas con el sobrenadante de fermentación solo muestran una caída del pico máximo de absorbancia.

Si bien no se logra generar un corrimiento del pico máximo de absorbancia, nuevamente el bloqueante Tris fue el que logró disminuir los fenómenos de agregación inespecífica.

En esta muestra compleja, existen compuestos capaces de interferir con el reconocimiento específico de los anticuerpos por etx.

Cabe destacar que con los resultados anteriormente presentados, se demuestra la necesidad de pretratar la muestra previo a la cuantificación con el biosensor.

4.4 Perspectivas a futuro

El nanobiosensor propuesto en este trabajo presentó resultados prometedores en los ensayos frente a toxina épsilon. Sin embargo, es necesario continuar con la optimización del mismo, para lograr obtener un desplazamiento del plasmón de resonancia superficial de las nanopartículas de oro junto a un cambio de color de la suspensión coloidal al ser enfrentas al sobrenadante de fermentación de *C. perfringens* tipo D.

A sí mismo, resta diseñar una metodología para el uso de este nanosensor en una futura aplicación industrial, optimizando los volúmenes y cantidad de nanopartículas utilizados en cada ensayo, para obtener los mejores resultados.
También se requiere optimizar la cantidad de anticuerpos funcionalizados por nanopartícula.

Por otra parte, se debería estudiar el comportamiento del biosensor frente a distintos batches de fermentación de *C. perfringens*.

Por otra parte, aún resta la optimización y estudio de varios parámetros asociados a biosensores, como lo son la robustez, el límite de sensibilidad, precisión, repetitividad, entre otros.

Por último, sería de gran importancia extender la tecnología al toxoide (toxina atenuada).

5. Análisis económico

En este trabajo se lograron avances importantes en el desarrollo de un nanobiosensor colorimétrico para la cuantificación de etx. Si bien es necesario continuar con el desarrollo así como con ensayos de validación, se realizó un cálculo estimado del costo de cada ensayo según los precios de los reactivos utilizados.

En primera instancia se realizó un listado del precio y cantidad por envase de los reactivos necesarios para llevar a cabo el ensayo (Tabla 6).

Nanosensor			
Reactivos	**Proveedor**	**Cantidad (g)**	**Precio (US$)**
Sal de oro	Strem Chemicals	5	380,00
Citrato de sodio	Merck	1000	65,00
MES	Merck	25	84,15
EDC	Sigma-Aldrich	1	134,30
Sulfo-NHS	Sigma-Aldrich	25	84,15
SDS	J. T. Baker	500	132,00
Hidroxido de sodio	Dorwil Química Analítica	1000	26,97
Bicarbonato de sodio	Macllinckrodt Chemicals	1000	21,96
Tris	J. T. Baker	1000	133,88
SH-PEG-COOH 2100 Da	Sigma-Aldrich	0,5	1040,00
Anticuerpo policlonal fragmento Fab anti-toxina épsilon	NIBSC	1 mL	118,80

Acondicionamiento de la muestra			
Reactivos	**Proveedor**	**Cantidad (g)**	**Precio (US$)**
DEAE	Sigma-Aldrich	50	656,60
Sulfato de amonio	Sigma-Aldrich	1000	302,70
Fosfato de sodio	Carlo Ebra Reagents	1000	78,00

Tabla 6. Reactivos utilizados para el desarrollo del nanosensor y acondicionamiento de la muestra.

Luego, se calculó la cantidad de reactivo utilizado por reacción y con los datos recopilados en la Tabla 6, fue posible calcular el precio de cada reactivo por reacción (Tabla 7).

Síntesis		
Reactivo	**Cantidad (mg)**	**Precio (US$)**
Sal de oro	10	0,7600
Citrato de sodio	25	0,0016
	Total	0,7616
	%10	0,0762

Estabilización		
Reactivo	**Cantidad (mg)**	**Precio (US$)**
SDS	10	0,0026
SH-PEG-COOH 2100 Da	0,1	0,2080
Hidróxido de sodio	10	0,0003
MES	59	0,1986
	Total	0,4095

Funcionalización y Bloqueo		
Reactivo	**Cantidad (mg)**	**Precio (US$)**
EDC	2,8	0,3760
Sulfo-NHS	5,19	0,0175
Ac Fab anti- etx	0,075 µL	0,0089
Tris	20	0,0027
Bicarbonato de sodio	0,84	0,0000
	Total	0,4051

Acondicionamiento de la muestra		
Reactivo	**Cantidad (g)**	**Precio (US$)**
DEAE	0,04	0,5253
Sulfato de amonio	1,5	0,4541
Fosfato de sodio	0,0123	0,0010
	Total	0,9803
	Total	1,8711

Tabla 7. Cantidad y precio de los reactivos utilizados en cada etapa para el desarrollo de nanosensor y acondicionamiento de la muestra.

Como se puede observar, el cálculo se separó en secciones que comprenden la síntesis de nanopartículas de oro, estabilización de nanopartículas de oro con PEG tiolado carboxilado, funcionalización con anticuerpo Fab policlonal anti-toxina épsilon, bloqueo con Tris y por último el acondicionamiento de la muestra para poder ser enfrentada al nanosensor.

El total de la síntesis se dividió entre 10, ya que el volumen obtenido por cada síntesis rinde para 10 rondas de estabilización, funcionalización y bloqueo de nanopartículas.

Según los datos calculados, una reacción tiene el costo de US$ 1,87. Cada reacción consta de la posibilidad de realizar 10 diluciones de la muestra a cuantificar para obtener una concentración en la cual se observe un cambio de color en un volumen final de 1 mL de nanopartículas.

Cabe destacar que el precio anteriormente calculado no incluye costos fijos ni mano de obra.

6. Conclusiones

En este trabajo, se logró purificar toxina épsilon de *C. perfringens* tipo D con un alto grado de pureza a partir de una muestra compleja mediante distintos métodos cromatográficos. Los mejores resultados fueron obtenidos con soportes aniónicos basados en agarosa (DEAE-Sephadex) y nanopartículas magnéticas.

Por otra parte, se logró la síntesis y caracterización física de nanopartículas de oro. Las nanopartículas demostraron ser monodispersas con un tamaño aproximado de 16 nm determinado por TEM y DLS.

Se logró estabilizar las nanopartículas de oro mediante modificación con polietilenglicol carboxilo de distintos peso molecular y se seleccionó el SH-PEG-COOH de 2100 Da por presentar mejores resultados.

Se logró la inmovilización de dos tipos anticuerpos policlonales anti-toxina épsilon sobre la superficie de las nanopartículas. Dicha inmovilización se demostró mediante desplazamiento en el plasmón de resonancia superficial y análisis por geles de agarosa.

Se optimizó el bloqueo de las nanopartículas para minimizar las interacciones inespecíficas en los ensayos de desafío con las muestras de toxina.

Se testearon las nanopartículas frente a distintas concentraciones de toxina pura encontrándose respuesta específica. Para las nanopartículas funcionalizadas con anticuerpo región fab y bloqueadas con Tris, se lograron detectar concentraciones de etx de 0,01 mg/ml a 0,03 mg/ml, mediante medidas espectrofotométricas y un cambio colorimétrico de la suspensión coloidal de nanopartículas. Es decir que se logró obtener un nanobiosensor colorimétrico semicuantitativo para la detección de toxina épsilon de *C. perfringens* tipo D.

Para las nanopartículas funcionalizadas con anticuerpo entero IgG, se obtuvo un desplazamiento del plasmón de resonancia superficial con un comportamiento lineal en función de la concentración de toxina épsilon, el cual puede ser monitoreado mediante medidas espectrofotométricas. Es decir que se logró obtener un nanobiosensor cuantitativo para la detección de toxina épsilon de *C. perfringens* tipo D.

Se determinó la necesidad de pre tratar el sobrenadante de cultivo de *C. perfringens* tipo D para la utilización de los nanobiosensores propuestos.

7. Referencias bibliográficas

1. Clark DP, Pazdernik NJ. Nanobiotechnology. En: Elsevier. Biotechnology. 2da ed. Boston: Elsevier; 2015. p. 219-248.

2. Sanjay SS, Pandey AC. A Brief Manifestation of Nanotechnology. En: Shukla AK. EMR/ESR/EPR Spectroscopy for Characterization of Nanomaterials. 1a ed. Nueva Deli: Springer; 2017. p. 47-63.

3. Ratner M, Ratner D. Chapter 1. Introducing Nano. En: Prentice Hall. Nanotechnology: A Gentle Introduction to the Next Big Idea. 1a ed. Nueva Jersey: Prentice Hall; 2002. p. 6-13.

4. Kim BY, Rutka JT, Chan WC. Current Concepts Nanomedicine. The New England Journal of Medicine. 2010; 363(25): 2434-43.

5. lmartin N, O'Kennedy R. Nanobiotechnologies for the detection and reduction of pathogens. Enzyme and Microbial Technology. 2012; 50(2): 87-95.

6. Jazayeri MH, Amani H, Pourfatollah AA, Pazoki-Toroudi H, Sedighimoghaddam B.Various methods of gold nanoparticles (GNPs) conjugation to antibodies. 2016; 9(2): 17-22.

7. De la Fuente JM, Grazu V. Nanobiotechnology: Inorganic Nanoparticles vs Organic Nanoparticles. Zaragoza: Elsevier; 2012.

8. Couto C, Vitorino R, Daniel-da-Silva AL. Gold nanoparticles and bioconjugation: a pathway for proteomic applications. Critical Reviews in Biotechnology. 2016; 37(2): 238-250.

9. Huang X, El-Sayed MA. Gold nanoparticles: Optical properties and implementations in cancer diagnosis and photothermal therapy. Journal of Advanced Research. 2010; 1(1): 13-28.

10. Haiss W, Thanh NTK, Aveyard J, Fernig DG. Determination of size and concentration of gold nanoparticles from UV-vis spectra. Journal of Analytical Chemistry. 2007; 79(11): 4215–22.

11. Link S, El-Sayed MA. Size and Temperature Dependence of the Plasmon Absorption of Colloidal Gold Nanoparticles. The Journal of Physical Chemistry B. 1999; 103(21): 4212-17.

12. Li M, Cushing SK, Zhang J, Lankford J, Aguilar ZP, Ma D, Wu N. Shape-dependent surface-enhanced Raman scattering in gold–Raman-probe–silica sandwiched nanoparticles for biocompatible applications. Nanotechnology. 2012; 23(11): 1-10.

13. Mafune F, Kohno J, Takeda Y, Kondow T. Formation of Gold Nanoparticles by Laser Ablation in Aqueous Solution of Surfactant. The Journal of Physical Chemistry B. 2001; 105(22): 5114-20.

14. Turkevich J, Stevenson PC, Hillier J. A study of the nucleation and growth processes in the synthesis of colloidal gold. Discussions of the Faraday Society. 1951; (11): 55-75.

15. Frens G. Controlled Nucleation for the Regulation of the Particle Size in Monodisperse Gold Suspensions. Nature Physical Science. 1973; 241(105): 20-22.

16. Kholoud MM, El-Nour A, Eftaiha A, Al-Warthan A, Ammar RA. Synthesis and applications of silver nanoparticles. Arabian Journal of Chemistry. 2010; 3(3): 135-140.

17. Liu X, Wang Y, Chen P, Wang Y, Zhang J, Aili D, Liedberg B.Biofunctionalized Gold Nanoparticles for Colorimetric Sensing of Botulinum Neurotoxin A Light Chain. Analytical Chemistry. 2014; 86(5): 2345-2352.

18. Evtugyn G. Chapter 2 Biochemical Components Used In Biosensor Assemblies. En: Springer. Biosensors: Essentials. 1a ed. Kazan: Springer; 2014. p. 21-91.

19. Touhami A. Biosensors and nanobiosensors: design and applications. En: Seifalian A, de Mel A, Kalaskar DM, editores. Nanomedicine. 1a ed. Londres: One Central Press; 2014. p. 374-403.

20. Nekouian R, Khalife NJ, Saleh Z. Development of Gold Nanoparticle Based Colorimetric Biosensor for Detection of Fibronectin in Lung Cancer Cell Line. Advanced Techniques in Biology and Medicine. 2014; 2 (1): 1-5.

21. Xiao L, Zhu A, Xu Q, Chen Y, Xu J, Weng J. Colorimetric Biosensor for Detection of Cancer Biomarker by Au Nanoparticles-Decorated Bi2Se3 Nanosheets. Applied Materials and Interfaces. 2017; 9(8): 6931-40.

22. Versiani AF, Andrade LM, Martins EM, Scalzo S, Geraldo JM, Chaves CR, Ferreira DC, Ladeira M, Guatimosim S,Ladeira LO, da Fonseca FG. Gold nanoparticles and their applications in biomedicine. Future Virology. 2016; 11(4): 293-309.

23. Cavalcanti MT, Porto T, Figueiredo AL, Viana I, de Lima JL, Pessoa A.Large scale purification of Clostridium perfringens toxins: a review. Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences. 2004; 40(2): 151-164.

24. Stiles BG, Barth G, Barth H, Popoff MR. Clostridium perfringens Epsilon Toxin: A Malevolent Molecule for Animals and Man?. Toxins. 2013; 5(11): 2138-60.

25. Alves G, de Avila R, Chavez-Olortegui CD, Lobato FC. Clostridium perfringens epsilon toxin: The third most potent bacterial toxin known. Anaerobe. 2014; 30(1): 102-107.

26. Popoff MR. Clostridial pore-forming toxins: Powerful virulence factors. Anaerobe. 2014; 30(2): 220-238.

27. Cole A, Gibert M, Popoff M, Moss D, Titball R, Basak A. Clostridium perfringens ε-toxin shows structural similarity to the pore-forming toxin aerolysin. Nature Structural and Molecular Biology. 2004; 11(8): 797-799.

28. Titball R, Williamson E, Havard H, Oyston P, Payne D; The Secretary of State for Defense DSTL Porton Down, asignado. Vacuna contra Clostridium perfringens. España, 0888453; 2004 Nov 01.

29. Ocampo H. La ganadería pierde US$ 100 millones por no prevenir la clostridiosis. El Observador. 2011 dic 01; Agro Sanidad Animal.

30. Rosano GL, Ceccarelli EA.Recombinant protein expression in Escherichia coli: advances and challenges. Frontiers in Microbiology. 2014; 5(341): 172-173.

31. Lucas S, Copeland A, Lapidus A, Glavina del Rio T, Dalin E, Tice H, Bruce D, Goodwin L, Pitluck S, LaButti KM, Clum A, Larimer F, Land M, Hauser L, Kyrpides N, Anderson I, Sorek

R, Rubin E. Complete sequence of Escherichia coli BL21(DE3) [Internet]. UniProtKB/TrEMBL; 2009 [citado 2017 Mar 15]. Disponible desde: http://www.uniprot.org/uniprot/A0A140N8W1.

32. Zhao Y, Kang L, Gao S, Zhou Y, Su L, Xin W, Su Y, Wang J. Expression and purification of functional Clostridium perfringens alpha and epsilon toxins in Escherichia coli.Protein Expression and Purification. 2011; 77(2): 207-213.

33. Rose-Sperling D, Hellmich UA, Neumann J. Diverse relations between ABC transporters and lipids: An overview. Biochimica et Biophysica Acta - Biomembranes. 2017; 1859(4): 605-618.

34. Haiss W, Thanh TK, Aveyard J, Fernig DG .Determination of Size and Concentration of Gold Nanoparticles from UV-Vis Spectra. Journal of Analytical Chemistry. 2007; 79(11): 4215-21.

35. Lazarus G, Revaprasadu G, López-Viota N, Singh M. The electrokinetic characterization of gold nanoparticles, functionalized with cationic functional groups, and its' interaction with DNA. Colloids and Surfaces., B Biointerfaces. 2014; 121(1): 425–431.

36. Nakajima N, Ikada Y.Mechanism of Amide Formation by Carbodiimide for Bioconjugation in Aqueous Media. Bioconjugate Chemistry. 1995; 6(1): 123-130.

37. Parolo C, De la Escosura-Muñiz A, Polo E, Grazu V, De la Fuente JM, Merkoçi A. Design, preparation and evaluation of a fixed-orientation antibody/gold nanoparticle conjugate as immunosensing label. Applied Materials and Interfaces. 2013; 5(21): 10753-59.

Anexo 1

Preparación de soluciones.

Buffer TAE
Para la preparación de 1 L 50X:
· 242 g de Tris base
· 18,6 g de EDTA
Agregar 500 mL de agua destilada y 57,1 mL de ácido acético glacial.
Llevar a 1 L de volumen total con agua destilada.

Buffer TBE
Para la preparación de 1 L 5X:
-54g de Tris base
-27,5 g de Ácido bórico
-20 mL de EDTA 0,5 M
-pH 8
Llevar a 1 L de volumen total con agua destilada.

Buffer MES
· 10 mM
· pH 5,0

Buffer PBS
Para la preparación de 1L 10X:
· 80 g de NaCl
· 2 g de KCl
· 14,4 g de Na_2HPO_4
· 2,4 g de KH_2PO_4
· pH 7,4
Suspender en 1 L de água destilada.

Gel de poliacrilamida
Para la preparación de una solución de acrilamida al 30% se pesan 29 g de acrilamida y 1 g de bisacrilamida, y se disuelven en 100 mL de agua destilada. Para la preparación de una solución de APS y SDS al 10% se pesan 1 mg y se disuelven en 1 mL de agua destilada.

Para la preparación de un gel de poliacrilamida al 12% se deben seguir los siguientes pasos:

Gel concentrador (5 mL):
· 3,4 mL de agua destilada
· 0,83 mL de acrilamida al 30%
· 0,63 mL de buffer Tris 1,5 M pH 8,8
· 0,05 mL de SDS al 10%
· 0,05 mL de persulfato de amonio al 10%
· 0,005 mL de TEMED

Gel separador (15 mL):
· 4,9 mL de agua destilada
· 6,0 mL de acrilamida al 30%
· 3,8 mL de buffer Tris 1M pH 6,8

· 0,15 mL de SDS al 10%
· 0,15 mL de persulfato de amonio al 10%
· 0,006 mL de TEMED

Buffer de carga SDS-PAGE
· 50 mM Tris-HCl
· 100 mM DTT
· 2% SDS
· 0.1% azul de bromofenol
· 10% glicerol
pH 6.8

Buffer de corrida SDS-PAGE
· 25 mM Tris
· 250 mM glicina
· 0.1% SDS
pH 8,3

Solución colorante (Coomassie Blue)
· 2,5 g Coomassie Brilliant Blue
· 222 mL de Alcohol metílico
· 222 mL de Ácido acético
· 556 mL de Agua

Solución decolorante
· 200 mL de Alcohol metílico
· 100 mL de Alcohol etílico
· 50 mL de Ácido acético
· 650 mL de Agua

Solución de fijado InVision His-tag In-gel Stain
· 100 mL de Alcohol etílico
· 20 mL de Ácido acético
· 200 mL de Agua milli Q

Agua regia
Para la preparación del agua regia se utiliza ácido nítrico y ácido clorhídrico en una proporción (3:1)

Gel de agarosa
Para la preparación de un gel de agarosa al 1%:
· 0,3 g de Agarosa
· 30 mL de buffer TAE
El buffer de carga utilizado para los geles de agarosa fue EZ- Vision de Amresco.

Anexo 2

Calculo del peso molecular de una nanopartícula de oro de 16 nm.

Volumen de una esfera: $V = \frac{4}{3}\pi r^3$

Donde el radio de una partícula de 16 nm es: $r = 8\ x\ 10^{-7}$ cm

Por lo tanto: $V = \frac{4}{3}\ \pi.(8\ x\ 10^{-7}\ cm)^3 \rightarrow V = 2{,}14\ x\ 10^{-18}\ cm^3$

Densidad de un cuerpo: $\rho = \frac{m}{V}$

La densidad (ρ) del oro (Au) es de: 19,3 g/cm^3

Entonces: $m = \rho\ .V \rightarrow m = 19{,}3\ \frac{g}{cm^3}\ .2{,}14\ x\ 10^{-18}\ cm^3 \rightarrow m = 4{,}13\ x\ 10^{-17}\ g/NP$

La masa de una NP multiplicada por el número de Avogadro nos dará el peso molecular de la NP:

$$(4{,}13\ x\ 10^{-17}\ g)\ x\ \left(6{,}022\ x\ 10^{23}\ \frac{g}{mol}\right) = 24926230\ g/mol$$

El peso molecular obtenido para una partícula de 16 nm de diámetro es aproximación ya que no se tiene en cuenta el peso de las moléculas de citrato que hay por cada partícula.