

Universidad ORT Uruguay

Facultad de Ingeniería

Nanoanticuerpos como biopesticidas con actividad antifúngica para su aplicación en agricultura

Entregado como requisito para la obtención del título de Ingeniero en Biotecnología

Camila Chiesa – 185704

Agustina Olivera – 186924

Tutor: Lucía Vanrell

2021

Declaración de autoría

Nosotras, Camila Chiesa y Agustina Olivera, 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 proyecto final de la carrera Ingeniería en Biotecnología;
- 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.



Camila Chiesa



Agustina Olivera

10 de agosto de 2021

Agradecimientos

Queremos agradecer a todas las personas que contribuyeron en nuestra formación universitaria, y a la ANII por la confianza en nuestro trabajo y por el financiamiento brindado a través del CII.

Especialmente agradecemos a nuestra tutora, Lucía Vanrell, por permitirnos llevarlo a cabo, brindándonos los conocimientos necesarios y apoyándonos en cada paso de este camino. Sin su experiencia, su paciencia y sus consejos esto no habría sido posible.

A Seba, Felipe, Erienne y todas las personas que forman parte del Laboratorio de Biotecnología de la Universidad ORT por su buena disposición, ayuda y enseñanzas. Así como a nuestros compañeros tesisistas, por volver amenas las largas jornadas en el laboratorio, por festejar los buenos momentos con nosotras y por su apoyo para superar obstáculos durante este tiempo.

A Titi por su ayuda desinteresada, brindando consejos y recursos a nuestra tesis, sin sus aportes este trabajo no habría llegado tan lejos.

A Franco, por transmitirnos los conocimientos adquiridos en su tesis para que pudiéramos desenvolvemos en el laboratorio, y por responder a todas nuestras preguntas con paciencia y empeño.

A nuestras familias y amigos por su apoyo incondicional durante esta etapa de nuestras vidas, por creer siempre en nosotras y por el apoyo y comprensión en situaciones de cansancio y estrés. También por demostrar interés, aún cuando hablábamos en un idioma completamente diferente para ellos.

Y finalmente, a nuestros compañeros y amigos de trabajo, que en los momentos de mayor estrés se limitaban a preguntar "*¿aún no se habla del tema?*", para mostrar su apoyo sin llevar al derramamiento de lágrimas; así como por crear siempre un ambiente alegre que nos permitió distendernos en su presencia.

Resumen

Los nanoanticuerpos o V_HHs son proteínas monodominio, con un tamaño aproximado de 15 kDa, presentes en los camélidos y cuyas numerosas ventajas les permiten tener diversas aplicaciones biotecnológicas. Entre ellas se destaca la posibilidad de utilizarlos como agentes fitosanitarios con actividad antifúngica y con una alta afinidad por compuestos conservados de la pared celular de todos los hongos, como lo son las glucosilceramidas (GlcCer).

En este trabajo se evaluó la actividad antifúngica de dos nanoanticuerpos monoespecíficos previamente descritos por *De Coninck et al.* con el fin de utilizarlos en la protección de plantas de tomate del hongo *Botrytis cinerea*, causante de las enfermedades fúngicas más comunes y más ampliamente distribuidas en hortalizas, plantas ornamentales y frutales. Además, su desarrollo es favorecido por las condiciones climáticas de Uruguay, donde predominan temperaturas templadas y alta humedad ambiente. En la actualidad, en nuestro país, el control de las enfermedades causadas por *B. cinerea*, se basa en una combinación de medidas culturales y la aplicación de productos químicos con riesgo de aparición de cepas resistentes. Frente a esto, los V_HH permitirían la producción al tiempo que se reduciría el impacto negativo en el medio ambiente y en la salud causado por los fungicidas tradicionales.

Con ese objetivo, se produjeron los V_HH 41D01 y 56F11 a escala mediana y se purificaron por *FPLC-IMAC*, obteniendo el primero en concentraciones de 1249.7 y 932.5 µg/mL, y el segundo en 2489.8 µg/mL. A partir de ello, se evaluó la capacidad de los mismos de interaccionar con distintas glucosilceramidas *in vitro*, observándose que ambos nanoanticuerpos reconocen con mayor afinidad la GlcCer proveniente de hongos que las de otras especies. A su vez, al utilizar 10 µg de V_HH, el 41D01 mostró una capacidad de reconocimiento mayor que el 56F11. Por otra parte, se determinó la actividad antifúngica *in vitro* en *Botrytis cinerea*. Se observó que ambos V_HHs inhiben el crecimiento del hongo, siendo más pronunciada dicha inhibición en el 41D01 que en el 56F11. Esto concuerda con lo reportado por *De Coninck et al.*

En este trabajo se logró producir ambos V_HHs en cantidades suficientes, pudiendo así evaluar su interacción con GlcCer y su actividad antifúngica *in vitro*. Con los

resultados obtenidos, se evidenció que la concentración a la que los V_HHs logran inhibir considerablemente el crecimiento de hongos es muy alta. Y dados los rendimientos de su producción, se concluyó que su aplicación en grandes superficies no es viable económicamente en su estado actual.

Palabras clave

Nanoanticuerpos o V_HHs, GlcCer, actividad antifúngica, *Botrytis cinerea*.

Abreviaciones

μM - micromolar

μg - microgramo

μL - microlitro

μm - micrómetro

$^{\circ}\text{C}$ - grados Celsius

BCA - Ácido bicinconínico (del inglés *bicinchoninic acid*)

BCR - Receptor de células B (del inglés *B cell receptor*)

bp - par de bases (del inglés *base pair*)

BSA - Seroalbúmina bovina (del inglés *bovine serum albumin*)

CDR - Regiones determinantes de complementariedad (del inglés *complementarity determining region*)

CH1 - Primer dominio canónico constante de cadena pesada (del inglés: *first constant domain in the heavy chain*)

c.s.p - cantidad suficiente para

CV - volumen de columna (del inglés *column volume*)

Da - Dalton

DMSO - Dimetilsulfóxido

DNA - Ácido desoxirribonucleico (del inglés *deoxyribonucleic acid*)

DNAse - Desoxirribonucleasa (del inglés *deoxyribonuclease*)

EDTA - Ácido etilendiaminotetraacético (del inglés *etildiaminotetraacetic acid*)

ELISA - ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas (del inglés *enzyme-linked immunosorbent assay*)

FPLC - Cromatografía líquida de proteínas a alta velocidad (del inglés *fast protein liquid chromatography*)

fGlcCer - Glucosilceramida de hongo

Fw - primer forward

g - gramos

GlcCer - Glucosilceramida

GRAS - Generalmente reconocido como seguro (del inglés: *generally recognized as safe*)

HA - Hemaglutinina

HCAb - Anticuerpos de cadena pesada (del inglés *heavy-chain antibodies*)

HRP - Peroxidasa de rábano (del inglés *horseradish peroxidase*)

IgG - Inmunoglobulina G

IDA - Ácido iminodiacético (del inglés *Iminodiacetic acid*)

IMAC - Cromatografía de afinidad por iones metálicos inmovilizados (del inglés *Immobilized metal affinity chromatography*)

IPTG - Isopropil- β -D-1-tiogalactopiranosido

kDa - kiloDalton

kb- kilobase

L - litro

LB - Luria Bertani

M - Molar

mL - mililitro

mg - miligramo

mM - milimolar

mm - milímetro

mUA - miliunidades de absorbancia

mQ- Milli-Q®: agua ultra pura de laboratorio

mRNA - RNA mensajero

N - Normal

ng - nanogramo

nm- nanómetro

OD - Densidad óptica

ON - Overnight

PBS - Buffer fosfato salino (del inglés *phosphate-buffered saline*)

PCR - Reacción en cadena de la polimerasa (del inglés *polymerase chain reaction*)

PDA - Agar de dextrosa y papa (del inglés *Potato dextrose agar*)

PDB - Medio de dextrosa y papa (del inglés *Potato dextrose broth*)

pH: logaritmo negativo de la concentración de hidrogeniones de una solución

PMSF - fluoruro de fenilmetilsulfonilo (del inglés *Phenylmethylsulfonyl fluoride*)

R² - Coeficiente de correlación de Pearson

RNA - Ácido ribonucleico (del inglés *Ribonucleic acid*)

rpm- revoluciones por minuto

Rv - primer reverse

SDS - Dodecil sulfato de sodio (del inglés *sodium dodecyl sulfate*)

SDS-PAGE - Electroforesis en gel de poliacrilamida con *SDS* (del inglés *SDS polyacrylamide gel electrophoresis*)

SOC - *SOB* con represión de catabolitos (del inglés *SOB with Catabolites repression*)

SOB - Medio super óptimo (del inglés *Super optimal broth*)

TAE - Tris-acetato-*EDTA*

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

U - Unidad de actividad enzimática

UV - Ultravioleta

V - Voltio

xg - aceleración gravitatoria

YES - Extracto de levadura con suplementos (del inglés *Yeast extract with supplements*)

Índice

Introducción	17
I. Biopesticidas y enfermedades fúngicas	17
A. Defensinas vegetales	18
II. Anticuerpos convencionales	21
A. Funciones generales	21
B. Estructura.....	21
C. Aplicaciones	23
III. Anticuerpos monodominio de llama.....	24
A. Anticuerpos de cadena pesada.....	24
B. Nanoanticuerpos o V _H Hs.....	25
1. Ventajas de los nanoanticuerpos.....	27
2. Aplicaciones de los nanoanticuerpos.....	28
C. Producción de proteínas recombinantes	29
Objetivos.....	33
Objetivo general.....	33
Objetivos específicos.....	33
Metodología	34
I. Puesta a punto de la producción del V_HH B₃₄.....	34
A. Producción de B ₃₄ en <i>E. coli</i> BL21(DE3) a escala de laboratorio.....	34
B. Clonado de B ₃₄ en el vector de expresión pET28a (+)	35
C. Producción y purificación de B ₃₄ en <i>E. coli</i> BL21(DE3) Rosetta	37
II. Selección y clonado de VHH monoespecíficos y biespecíficos.....	38
A. Selección de diferentes clones positivos para su expresión a dos escalas.....	38
B. Clonado de los VHHs en un vector de expresión.....	39

III. Producción de nanoanticuerpos monoespecíficos anti-fGlcCer a escala piloto y de laboratorio	40
A. Electroporación de Rosetta con las construcciones generadas y selección de clones positivos para el inserto	40
B. Producción de 41D01 y 56F11 a escala pequeña	41
C. Producción de los nanoanticuerpos biespecíficos	42
D. Evaluación de la expresión del V _H H 56F11 utilizando gradiente de <i>IPTG</i>	43
E. Producción de los V _H H a escala matraz	43
F. Producción a escala mediana.....	44
G. Purificación del V _H H 56F11 mediante <i>FPLC-IMAC</i> por método en gradiente	44
H. Purificación de los V _H Hs 56F11 y 41D01 mediante <i>FPLC-IMAC</i> por método isocrático.....	45
I. Cuantificación de proteínas por el método de <i>BCA</i>	46
IV. Evaluación de la capacidad de los V_HH producidos de interaccionar con GlcCer y de inhibir el crecimiento de <i>Botrytis cinerea in vitro</i>	47
A. Evaluación de la interacción de los V _H H con diferentes GlcCer <i>in vitro</i>	47
B. Evaluación de la actividad antifúngica de los V _H Hs producidos	49
V. Procedimientos generales	51
A. <i>PCR</i> en tiempo final	51
B. Producción de células electrocompetentes	52
C. Transformación por electroporación	52
D. Electroforesis de proteínas <i>SDS-PAGE</i>	53
E. Electroforesis de <i>DNA</i>	54
F. Cuantificación de <i>DNA</i>	54
G. Diálisis de fracciones proteicas	54
VI. Soluciones, <i>buffers</i> y medios de cultivo	54
A. Soluciones	54
1. Soluciones estériles.....	55

2. Soluciones no estériles.....	55
B. <i>Buffers</i>	56
C. Medios de cultivo	56
Resultados y Discusión	57
I. Puesta a punto de la producción del V_HH B₃₄.....	57
A. Producción de B ₃₄ en <i>E. coli</i> BL21(DE3) a escala de laboratorio.....	57
B. Clonado de B ₃₄ en el vector de expresión pET28a	60
C. Producción y purificación de B ₃₄ en <i>E. coli</i> BL21(DE3) Rosetta	61
II. Selección y clonado de V_HH monoespecíficos y biespecíficos.....	66
III. Producción de nanoanticuerpos monoespecíficos anti-fGlcCer a escala piloto y de laboratorio	68
A. Electroporación de Rosetta con las construcciones generadas y selección de clones positivos para el inserto	68
B. Producción de 41D01 y 56F11 a escala pequeña	69
C. Producción de los nanoanticuerpos biespecíficos	72
D. Evaluación de la expresión del V _H H 56F11 utilizando gradiente de <i>IPTG</i> y producción de este a escala matraz.....	75
E. Producción a escala mediana.....	76
F. Purificación del V _H H 56F11 mediante <i>FPLC-IMAC</i> por método en gradiente	77
G. Purificación de los nanoanticuerpos 56F11 y 41D01 mediante <i>FPLC-IMAC</i> por método isocrático.....	79
H. Cuantificación de proteínas por el método de <i>BCA</i>	83
IV. Evaluación de la capacidad de los V_HH producidos de interaccionar con GlcCer y de inhibir el crecimiento de <i>Botrytis cinerea in vitro</i>	83
A. Evaluación de la interacción de los V _H Hs con diferentes GlcCer <i>in vitro</i>	83
B. Evaluación de la actividad antifúngica de los V _H Hs producidos	88
Conclusiones.....	94
Referencias bibliográficas	96

Anexo	100
--------------------	------------

Índice de Figuras

Figura 1.....	19
Figura 2.....	24
Figura 3.....	26
Figura 4.....	36
Figura 5.....	58
Figura 6.....	59
Figura 7.....	61
Figura 8.....	63
Figura 9.....	64
Figura 10.....	65
Figura 11.....	66
Figura 12.....	67
Figura 13.....	69
Figura 14.....	70
Figura 15.....	71
Figura 16.....	72
Figura 17.....	73
Figura 18.....	74
Figura 19.....	75
Figura 20.....	76
Figura 21.....	77
Figura 22.....	78
Figura 23.....	79
Figura 24.....	80
Figura 25.....	81

Figura 26.....	82
Figura 27.....	82
Figura 28.....	85
Figura 29.....	86
Figura 30.....	87
Figura 31.....	91
Figura 32.....	92
Figura 33.....	100
Figura 34.....	100

Índice de Tablas

Tabla 1.	36
Tabla 2.	39
Tabla 3.	40
Tabla 4.	48
Tabla 5.	51
Tabla 6.	51
Tabla 7.	89

Introducción

I. Biopesticidas y enfermedades fúngicas

Debido a que las enfermedades fúngicas son una amenaza para las plantas y llevan a una pérdida del 20% del rendimiento del cultivo y del 10% post-cosecha, el uso de fungicidas permite maximizar la producción y reducir dichas pérdidas (1-3). Desde la aplicación de esta tecnología a partir de 1940, fue posible incrementar la producción de alimentos al tiempo de que aumentaba también la población mundial; como consecuencia, la producción anual de pesticidas aumentó un 11% (4). Algunos de los productos rociados sobre las plantas llegan al suelo y al agua, contaminando las zonas de mayor actividad de los microorganismos, afectando la fauna presente, degradando el suelo, llevando a la obtención de tierras improductivas, y dañando los recursos alimenticios acuáticos (3, 5). Además, su mecanismo de acción no se limita a los organismos objetivo y afecta la biodiversidad y la salud del ecosistema. En todo el mundo, alrededor de 25 millones de agricultores sufren intoxicación por pesticidas; esta exposición está relacionada, por ejemplo, con el cáncer, la obesidad y la alteración del sistema endocrino (4). Entonces, debido a que generan resistencia en los patógenos y son tóxicos para humanos y otras especies animales, el uso de diversos pesticidas tradicionales ha sido suspendido (2, 6, 7).

Por lo anterior, se buscan soluciones cada vez más innovadoras y flexibles para proporcionar una protección de cultivos más eficiente, más amigable con el medio ambiente, menos dañina para la salud humana y animal, y específica contra determinada plaga (8). Así, los biopesticidas a base de microorganismos vivos o sus derivados, extractos de plantas y otros compuestos naturales representan alternativas potenciales para el control de plagas, cuyo interés también ha ido en aumento debido al alto costo de descubrir, desarrollar y registrar nuevos pesticidas sintéticos junto con el surgimiento de la resistencia a diversas plagas (6, 9). Esto implica una disminución significativa en la aplicación de pesticidas convencionales, donde, además, sus efectos adversos, ya sean directos por exposición a estos productos o indirectos a través de residuos en alimentos y agua potable, han llevado al establecimiento de ciertas regulaciones nacionales e internacionales que restringen su producción, comercio y uso (8).

Es de destacar que los biopesticidas deben ser biodegradables, renovables y no tóxicos, excepto para el patógeno objetivo. El interés en ellos radica en que son productos menos dañinos, diseñados contra una plaga específica, se descomponen rápidamente por lo que se evita el problema de contaminación, son seguros para organismos no objetivos, y no causan efectos nocivos en el medio ambiente y salud humana (5, 10). Si bien estos agentes representan actualmente una pequeña proporción del mercado de protección de cultivos, se estima que el mercado irá en aumento, debido a la mayor conciencia ambiental y los riesgos para la salud de los pesticidas convencionales (8).

A. Defensinas vegetales

Todos los organismos han desarrollado estrategias de supervivencia para evadir la infección por patógenos (1, 7). Los mecanismos de defensa de las plantas pueden dividirse en constitutivos e inducidos, siendo la defensa constitutiva aquella que se encuentra presente ya sea en presencia o ausencia de un ataque, y la inducida la que se activa cuando es necesario (11). A su vez, estas pueden clasificarse como defensas directas o indirectas, la primera intenta afectar la supervivencia o el rendimiento de los patógenos, mientras que la segunda protege a las plantas con la ayuda proporcionada por otros organismos (11). Finalmente, existen mecanismos de defensa físicos y químicos. La defensa física es principalmente constitutiva e incluye las características morfológicas y estructurales tanto a nivel macro como microscópico (11). La defensa química es el tipo de defensa más importante; se estima que se sintetizan al menos 200.000 metabolitos secundarios y péptidos antimicrobianos, dentro de los cuales se encuentran las defensinas, que constituyen una herramienta importante para contrarrestar ciertos patógenos (1, 11).

Las defensinas son los principales componentes del sistema inmune innato de las plantas y consisten en pequeñas proteínas catiónicas, ricas en cisteína, con una longitud aproximada de 45-54 aminoácidos, unidas por cuatro enlaces disulfuro que le proveen estabilidad frente a proteasas, pH y temperatura (Figura 1) (1, 12, 13). También son parte de la inmunidad adaptativa, donde regulan diferentes procesos, como la expresión de

citoquinas y quimioquinas, la mejora de las respuestas de anticuerpos contra patógenos invasores y la producción de algunos neurotransmisores como la histamina (14).



Figura 1. Representación esquemática de una defensina vegetal. Su estructura típica comprende un motivo $\alpha\beta$ estabilizado por cisteína ($CS\alpha\beta$), con una hélice α y una hoja β antiparalela de tres cadenas que se estabiliza mediante cuatro puentes disulfuro.

Además de la cisteína, los residuos que están presentes en las distintas clases de defensinas y contribuyen al plegamiento estructural son dos residuos de glicina, un residuo aromático y un glutamato (1). Las defensinas vegetales suelen tener una estructura tridimensional que consta de una hoja β antiparalela de triple hebra y una hélice α paralela a la hoja β (14). La secuencia de estas proteínas de las plantas se puede dividir en siete bucles, definidos como la región entre los residuos de cisteína conservados, cuya variabilidad de secuencia determina las diversas funciones biológicas que presenta. Se encuentran principalmente en células epidérmicas y células de estoma, y se producen en áreas que pueden entrar en contacto con patógenos (1).

Según la estructura de la proteína precursora, las defensinas vegetales se dividen en tipo I y tipo II. Las primeras contienen una secuencia señal del retículo endoplásmico seguida de un dominio de defensina maduro, carecen de señales para modificaciones postraduccionales o direccionamiento subcelular, y se acumulan en la pared celular y el espacio extracelular, mientras que las segundas contienen un propéptido C-terminal de entre 27 y 33 aminoácidos que se elimina proteolíticamente durante la maduración y se

dirigen a la vacuola, donde se procesan proteolíticamente para liberar la defensina madura (1, 15).

Las funciones de las defensinas incluyen la inhibición de la síntesis proteica a través de interacciones con ácidos nucleicos, actividad antibacteriana, inhibición de tripsina y amilasa que interfieren con la digestión de los insectos, rol en la tolerancia a metales pesados, maduración de frutos e inhibición del crecimiento de raíces (1, 15). Asimismo, su función principal es inhibir el crecimiento de una variedad de hongos patógenos de plantas y animales, como *Botrytis cinerea*, *Alternaria brassicola*, *Acanthopplus longipes*, *Fusarium culmorum*, *Verticillium dahliae*, *Rhizoctonia solani*, *Neurospora crassa*, *Magnaporthe oryzae* y levaduras como *Candida albicans* (1, 7, 15). Por esta razón, las plantas interactúan con objetivos en las membranas fúngicas, ya sean esfingolípidos o fosfolípidos, y median la muerte celular (15). Los primeros son lípidos de la membrana celular eucariota, que presentan una ceramida unida a un grupo polar, y se dividen en fosfoesfingolípidos, que contienen un oligosacárido como grupo polar, y glucoesfingolípidos que presentan un azúcar (glucosa o galactosa) o un grupo ionizable (fosfato o sulfato) (15). Estos últimos comprenden a la glucosilceramida que contiene glucosa (GlcCer) y es el glucoesfingolípidos más común en los hongos, sintetizado por la enzima *GlcCer sintasa* (15). Se encuentra en plantas, hongos y animales, y está ausente en bacterias y en algunos organismos eucariotas (12).

Además de las defensinas que interactúan con las glucosilceramidas de hongos (fGlcCer), existe evidencia de que los anticuerpos contra ellas también presentan actividad antifúngica, lo que las convierte en *targets* interesantes para desarrollar nuevos compuestos antifúngicos (12). Esto se debe, en primer lugar, a que la estructura de fGlcCer está muy conservada en una amplia variedad de hongos y es estructuralmente diferente de sus homólogos de mamíferos o plantas (12). Esta especificidad por el huésped asegura la no toxicidad de los compuestos que se dirigen a fGlcCer, mientras mantiene un amplio espectro de actividad antifúngica (12). En segundo lugar, fGlcCer es un factor de virulencia importante para los patógenos de levaduras y hongos, y es poco probable que cause resistencia *in vivo* contra los compuestos dirigidos a GlcCer (12).

II. Anticuerpos convencionales

Los anticuerpos son proteínas producidas por los linfocitos B en respuesta a la exposición a los antígenos (16, 27), denominados inmunoglobulinas, y que se encuentran en el plasma y el líquido extracelular (17). Se unen a la membrana celular en forma de receptores de células B (BCR, del inglés *B cell receptor*) que no presentan funciones efectoras. Una vez que encuentran a su antígeno, estas células se activan, proliferan y se diferencian en células plasmáticas secretoras de anticuerpos de igual especificidad que el receptor (16, 17, 27).

A. Funciones generales

Estas moléculas cumplen diversas funciones efectoras en la defensa del huésped. Por un lado, se unen a los patógenos o a sus productos, bloqueando su acceso a las células *target*, lo que se conoce como neutralización (17). Son capaces de cubrir la superficie de los patógenos para marcarlos y que sean fagocitados ya que las células fagocíticas poseen receptores que se unen a la región Fc de los anticuerpos; a esta función se la conoce como opsonización (17). Además, los anticuerpos pueden activar el sistema del complemento por la vía clásica, dado que, al unirse la región constante del anticuerpo a la superficie bacteriana, se genera el receptor para la primera proteína de dicho sistema (17). Finalmente, la cuarta función es la citotoxicidad celular mediada por anticuerpos, a través de la cual éstos marcan células infectadas para ser lisadas por células del sistema inmune (16).

B. Estructura

La estructura del anticuerpo separa las funciones de reconocimiento y efectoras; una región se une al antígeno, mientras que la otra está relacionada con los mecanismos de eliminación (17). La primera, denominada región variable o región V, es variable entre distintas moléculas, es la que determina la especificidad de unión al antígeno y se ubica en el extremo amino (17, 27). La segunda no varía entre la misma clase de anticuerpos,

por lo que se llama región constante o región C, define la función efectora del anticuerpo, se ubica en el extremo carboxilo y tiene cinco formas principales especializadas en la activación de distintos mecanismos efectores (16, 17).

Presentan una estructura simétrica y están compuestos por cuatro cadenas polipeptídicas; dos cadenas pesadas idénticas y dos cadenas ligeras idénticas, cada una con una región constante y una región variable (16, 27). Las regiones variables de una cadena pesada y de una liviana forman el sitio de unión al antígeno, lo que contribuye a la especificidad de unión de la molécula, y dado que cada anticuerpo tiene dos regiones variables, cada uno presenta dos sitios de unión idénticos (17). A su vez, las dos cadenas pesadas están conectadas por puentes disulfuro entre residuos de cisteína, y cada cadena pesada se une a la cadena liviana por un puente disulfuro (16, 17). La molécula contiene tres porciones globulares de igual tamaño unidas por una cadena polipeptídica flexible conocida como región bisagra (17).

Hay dos tipos de cadenas livianas, lambda (λ) y kappa (κ), pero cada anticuerpo presenta solo una de ellas. Por otro lado, existen cinco clases de cadenas pesadas que definen las funciones efectoras por presentar diferencias estructurales en la región constante, y que se nombran por las letras griegas γ , μ , δ , α y ϵ . Éstas corresponden a la inmunoglobulina G (IgG), inmunoglobulina M (IgM), inmunoglobulina D (IgD), inmunoglobulina A (IgA) e inmunoglobulina E (IgE), respectivamente (17, 27). Además, cada cadena contiene una serie de secuencias similares, de aproximadamente 110 aminoácidos de longitud, donde cada secuencia repetida forma una estructura llamada dominio de inmunoglobulina. La cadena liviana posee dos, mientras que la cadena pesada de un anticuerpo IgG presenta cuatro (17).

Las secuencias amino-terminales del primer dominio de las cadenas pesada y liviana varían mucho entre anticuerpos. Estos dominios variables (VH y VL) forman la región V, le dan la capacidad de unirse a antígenos específicos y contienen tres fragmentos variables llamados regiones hipervariables, mientras que los dominios constantes (CH y CL) forman la región C (17). La cadena liviana tiene un solo dominio CL, mientras que la cadena pesada tiene tres o cuatro dominios CH, dependiendo del

isotipo (27). La región hipervariable de cada dominio contiene 10 residuos de aminoácidos que se unen para formar un sitio de unión al antígeno, determinando la especificidad del antígeno de ese anticuerpo (16). Estas zonas se denominan regiones determinantes de complementariedad (CDR, del inglés *complementarity determining region*) (17).

C. Aplicaciones

En el ámbito de la medicina, las aplicaciones de los anticuerpos abarcan el uso de tecnología de inmunodiagnóstico para detectar tanto antígenos que causan enfermedades infecciosas, como anticuerpos específicos para el diagnóstico de enfermedades y también para la detección de embarazos por unión de anticuerpos a la gonadotropina coriónica humana. A su vez, se utilizan para tratar inmunodeficiencias, como hipogammaglobulinemia, enfermedades autoinmunes (artritis reumatoide, psoriasis, entre otras) y diversos tipos de cáncer (18).

En investigación biomédica, la alta especificidad y sensibilidad de los anticuerpos son ventajas importantes y, por lo tanto, presentan diversas aplicaciones, principalmente para la detección de proteínas (18). Con este fin, en los ensayos de inmunoprecipitación se utilizan para marcar y precipitar antígenos formando inmunocomplejos antígeno-anticuerpo; en inmunoadsorción, se utiliza el ELISA (del inglés *enzyme-linked immunosorbent assay*) para analizar cualitativa y cuantitativamente un antígeno determinado; en inmunocitoquímica e inmunohistoquímica para evaluar la presencia y localización de proteínas en tejidos y células; y en citometría de flujo para teñir la superficie celular con anticuerpos marcados con fluorocromos altamente específicos y fácilmente detectables (18). Además, también se aplican en *western blot*, en donde las proteínas separadas por electroforesis se transfieren, por carga eléctrica, a una membrana absorbente y se detectan con anticuerpos marcados; y en *dot blotting*, donde las proteínas no se separan por electroforesis, sino que las muestras que contienen a las proteínas se aplican directamente sobre la membrana (18).

III. Anticuerpos monodominio de llama

A. Anticuerpos de cadena pesada

Los camélidos poseen anticuerpos clásicos con dos cadenas pesadas y dos cadenas ligeras, pero también presentan los denominados anticuerpos de cadena pesada (HCAb, del inglés *heavy-chain antibodies*) que carecen de cadenas livianas y del primer dominio canónico constante de cadena pesada (CH1, del inglés *first constant domain in the heavy chain*), que es esencial para la unión a la cadena liviana y la estabilización del heterodímero en los anticuerpos convencionales. En comparación con los 170 kDa de la IgG1 tradicional, esta estructura compacta les confiere un tamaño más pequeño, de alrededor de 90 kDa (Figura 2) (12, 19). Estos anticuerpos reconocen los antígenos a través de dominios variables únicos, llamados V_HH, que están ubicados en la región amino-terminal (12, 13, 19). Como estos fragmentos derivan de anticuerpos naturales que carecen de cadenas livianas, las regiones CDR (del inglés *complementarity- determining region*) se optimizaron durante la selección y maduración *in vivo* de los camélidos, obteniendo así una excelente estabilidad, y alta afinidad y especificidad por su antígeno (12).

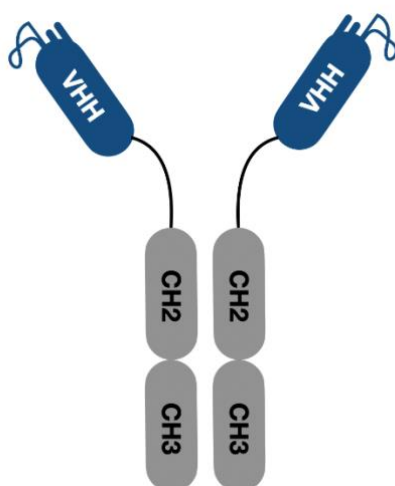


Figura 2. Representación esquemática de los anticuerpos homodiméricos de cadena pesada presentes en camélidos (HCAbs). Cada cadena pesada contiene un dominio V_HH en su región

amino-terminal, que se une mediante una bisagra al dominio constante CH2 y, a través de este, al dominio constante CH3 en dirección carboxi-terminal.

Además de las características mencionadas, los V_HH tienen una serie de ventajas frente a los anticuerpos convencionales; se pueden clonar fácilmente al estar codificados por genes individuales, poseen buena solubilidad, su producción es eficiente y con altos rendimientos en microorganismos como *Escherichia coli*, *Saccharomyces cerevisiae* o *Pichia pastoris*, presentan una estructura robusta, alta estabilidad térmica, costo de producción relativamente bajo, mayor tasa de penetración en tejidos, y baja inmunogenicidad (12, 13, 19, 20). Su corta vida media en la circulación es útil para ciertas aplicaciones, pero la misma puede incrementarse ya sea mediante la adición química de polietilenglicol, conocido como PEGilación, o por fusión a albúmina sérica (20, 21). Gracias a su gran estabilidad, su logística de almacenamiento y distribución es simple, se pueden administrar en *spray* y están potencialmente preparados para resistir diferentes condiciones climáticas (12, 13).

B. Nanoanticuerpos o V_HHs

Los V_HH están compuestos por homodímeros de dos cadenas pesadas, tienen un peso molecular de 12-15 KDa y adoptan, similar a los VH de las IgG convencionales, una estructura de dominio inmunoglobulina (Ig) que presenta una hoja β de cuatro cadenas y otra de cinco cadenas. Estas se conectan mediante tres bucles hipervariables, llamadas CDR, y por un puente disulfuro (Figura 3). Los tres CDR del extremo amino forman el paratope que reconoce al epítipo del antígeno (12, 13, 19).

Aunque se han encontrado nanoanticuerpos en camélidos y peces cartilaginosos, la mayor parte de la investigación sobre sus aplicaciones biotecnológicas se ha realizado en camélidos debido a su facilidad de manejo e inmunización (21).

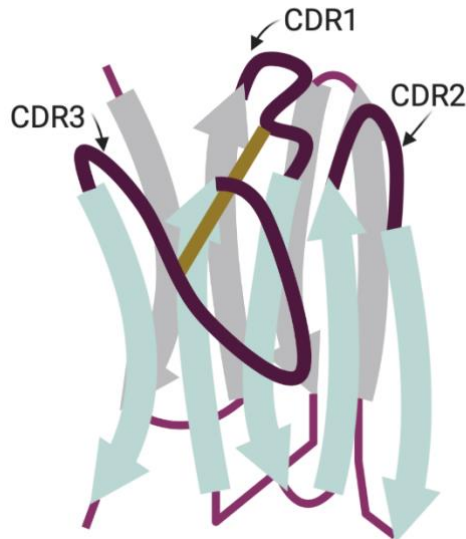


Figura 3. Representación esquemática del dominio V_HH. Se observan las nueve cadenas β que forman una hoja β de cuatro cadenas y otra de cinco cadenas, los tres CDR y el puente disulfuro.

De todas formas, existen diferencias entre los dominios V_HH y V_H. En primer lugar, ciertos aminoácidos hidrofóbicos altamente conservados que se encuentran dentro del *framework 2* (FR2) de la región V_H, se reemplazan por aminoácidos hidrofílicos y/o más pequeños, que intervienen en la interacción con chaperonas y con el dominio V_L durante el ensamblaje de las cadenas pesadas y livianas. Esto lleva a una mejora en la solubilidad y una reducción de la agregación de V_HH en ausencia de un dominio V_L (19). En segundo lugar, en los V_HH, especialmente en las regiones CDR1 y CDR3, los bucles hipervariables tienen un repertorio estructural más amplio. Estos bucles están más extendidos, proporcionando una superficie de interacción con el antígeno con un tamaño equivalente a los seis bucles del dominio V_H-V_L de las IgG tradicionales. Por otro lado, el bucle extendido implica una mayor flexibilidad que sería entrópicamente contraproducente para la unión, pero el bucle CDR3 está conectado al bucle CDR1 por un puente disulfuro, estabilizando el dominio de unión (19). Además, ciertos dromedarios contienen V_HH con un CDR3 más extendido, que generalmente es estabilizado por un puente disulfuro adicional con una cisteína del CDR1 o FR2 (21).

1. Ventajas de los nanoanticuerpos

Los nanoanticuerpos son estables a niveles extremos de pH y en una amplia gama de temperaturas, siendo reversible su despliegue a altas temperaturas a diferencia de los fragmentos de anticuerpos convencionales (22). Esto se debe, en parte, a que su replegamiento solo requiere del plegamiento del dominio, mientras que los convencionales también necesitan de la asociación de los dominios VH y VL (21). Dado que tienen regiones hidrófilas, no presentan problemas de solubilidad y agregación (22).

Su estructura de dominio único facilita su manipulación molecular; para muchas aplicaciones se utilizan fragmentos de anticuerpos monovalentes en formatos multivalentes para aumentar la avidéz o para producir anticuerpos biespecíficos que puedan unirse simultáneamente a diferentes antígenos (21). Los V_{HH} son más adecuados que los VH para la producción de estos últimos ya que permiten una unión más flexible entre ellos, lo que es importante para la unión simultánea de los antígenos, evitando problemas de apareamiento incorrecto de dominios (21).

Los anticuerpos monoclonales se utilizan en terapia tumoral de varios tipos de cáncer, pero su tamaño suele ser grande, con cuatro cadenas polipeptídicas, lo que limita su acceso a los tumores (22). Así, los nanoanticuerpos proporcionan una alternativa altamente estable y más pequeña, con un tamaño de $1/10$ de los anticuerpos convencionales, capaz de penetrar rápidamente en los tumores (21, 22). A su vez, esta característica les proporciona la capacidad de pasar por el filtro renal, que tiene un tamaño aproximado de 60 kDa, llevando a una rápida eliminación de la sangre (21).

Los nanoanticuerpos son más simples de producir que los anticuerpos policlonales. Si bien su producción se realiza con protocolos similares a la producción tradicional de anticuerpos, tiene ciertas ventajas, como mejores técnicas de detección y aislamiento, y ausencia de sacrificio de animales (22).

2. Aplicaciones de los nanoanticuerpos

Debido a su estabilidad, naturaleza monomérica y fácil inmovilización sobre sustratos sólidos, los nanoanticuerpos se pueden utilizar como ligandos para purificar biomoléculas, permitiendo obtener una mayor capacidad de regeneración de columna, una mayor cantidad de paratopes por gramo de material de soporte y, además, requieren de condiciones de elución más suaves (19). Su alta afinidad y especificidad los convierte en excelentes candidatos para la inmunoprecipitación de cromatina utilizando tecnología de *microarrays* de *DNA*, lo que facilita el descubrimiento de nuevos sitios de unión a factores de transcripción. A su vez, combinando los nanoanticuerpos con magnetosomas, se logra la inmunoprecipitación *in vitro* e *in vivo* mediante el reclutamiento magnético de antígenos en extractos celulares o dentro de bacterias (19). Se utilizan como chaperonas para asistir la cristalización y la determinación de la estructura de proteínas de membrana y complejos proteicos para los que se dificulta realizarlo por cristalografía de rayos X (19). A consecuencia de su pequeño tamaño y su alta afinidad contra varios *targets*, como marcadores tumorales y moléculas de señalización intracelular, los nanoanticuerpos fusionados con proteínas fluorescentes se han aplicado como agentes de bioimagen en células vivas (19).

Por otra parte, se utilizan como sondas para la detección *in vivo* de cáncer, enfermedades infecciosas, lesiones ateroscleróticas, respuesta inflamatoria y otras enfermedades, tanto en entornos preclínicos como clínicos. Además, su pequeño tamaño permite una rápida eliminación del torrente sanguíneo y facilita su extravasación y penetración tumoral, llevando a la obtención de imágenes del tejido sólo unas pocas horas luego de la inyección (19, 20). Debido a su tamaño pequeño y CDR3 extendido, los nanoanticuerpos tienen ciertas ventajas como agentes terapéuticos para enfermedades infecciosas sobre los anticuerpos convencionales, ya que pueden acceder a epítopes ocultos en los patógenos. El valor agregado de los nanoanticuerpos reside en su capacidad para distinguir entre su objetivo y las variantes estrechamente relacionadas (19). Además, debido a su resistencia frente a pH extremos y su capacidad de unión al *target* en

concentraciones elevadas de agentes caotrópicos, son adecuados para la inmunoterapia oral (21). Finalmente, se pueden utilizar como inhibidores enzimáticos para regular las condiciones fisiológicas de las plantas y aumentar su contenido de almidón, o como portadores para una entrega más eficiente y específica de los productos químicos existentes a los cultivos y las malezas (19).

C. Producción de proteínas recombinantes

Con el fin de seleccionar el sistema de expresión, se deben considerar tanto factores genéticos como fisiológicos. Dentro de los primeros, se encuentra el número de copias del plásmido dentro del huésped, las características del gen heterólogo como, por ejemplo, el uso de codones raros para el huésped, la estabilidad del *mRNA* que permite un control eficiente de los niveles de expresión de proteínas, y el tipo de promotor que controlará la expresión del gen de interés. A su vez, la cepa hospedera debe carecer de la mayoría de las proteasas naturales, mantener la estabilidad del vector de expresión y contener los elementos genéticos necesarios según el sistema de expresión utilizado. En cuanto a los factores fisiológicos, estos abarcan el proceso de fermentación, la composición del medio de cultivo, y las estrategias de cultivo y de purificación (23). Es importante considerar si la proteína de interés es de origen eucariota ya que la utilización de un sistema de expresión eucariota en dicho caso sería más eficiente. Hay que analizar la secuencia nucleotídica de la proteína para estudiar la necesidad del uso de codones raros, la secuencia aminoacídica para determinar su peso molecular, punto isoelectrico y modificaciones postraduccionales, la estabilidad frente a cambios de pH y temperatura, el grado de pureza esperado y la localización celular deseada (24).

Hoy en día, se utiliza una amplia variedad de huéspedes, que abarcan tanto organismos unicelulares como bacterias, hongos, levaduras y líneas celulares de mamíferos, insectos o plantas, como también animales y plantas transgénicas (24). Entre las bacterias, *Escherichia coli* es la más utilizada, debido a que el alto nivel de conocimientos sobre su fisiología y genética permitió el desarrollo de diversos vectores de expresión y cepas mutantes (24). Ha sido caracterizada genética y fisiológicamente, presenta una tasa de crecimiento más alta que levaduras y células de mamífero, es de fácil

manipulación genética, puede crecer en medios simples, tiene un tiempo de desarrollo más corto desde el gen hasta el producto, y requiere de condiciones de fermentación simples que se pueden realizar a gran escala con bajo costo de producción (21, 23, 25). Además, debido a la eficiencia transcripcional y traduccional, y a la estabilidad del vector de expresión en el ambiente proteolítico del huésped, permiten una producción exitosa de proteínas recombinantes (23). De todas formas, si la proteína requiere de modificaciones postraduccionales que las bacterias no pueden realizar, se deben producir en células eucariotas (25). Los anticuerpos convencionales funcionales se producen en células de mamíferos ya que requieren de una glicosilación apropiada para aplicaciones terapéuticas, mientras que los fragmentos que carecen de Fc con su oligosacárido unido al grupo amino, se producen preferentemente en bacterias (21).

Dentro de *E. coli*, según aspectos cinéticos, genotipo y fenotipo, se selecciona la cepa de producción adecuada, considerando que la misma presenta baja tasa de mutación o de inserción de secuencias provenientes del plásmido (25). Han sido diseñadas especialmente ciertas cepas como BL21 y Rosetta, ambas inducibles por *IPTG*. La primera carece de las proteasas Lon y Omp-t, lo que reduce la degradación de proteínas dentro de la bacteria, y además produce bajas cantidades de acetato, un subproducto metabólico, mientras que Rosetta se diseñó para incrementar la producción de proteínas que requieren el uso de codones raros (25). También tiene desventajas, como que suelen precipitar en cuerpos de inclusión en el citoplasma y presentan baja eficiencia de secreción de las proteínas al medio de cultivo. Adicionalmente, la expresión de proteínas recombinantes en *E. coli* puede generar endotoxinas dañinas para la salud, lleva a un incremento en la proteólisis celular y no permite realizar ciertas modificaciones postraduccionales (24). Se suelen utilizar cepas que contienen el operón lac, cuya función consiste en asegurar la presencia de enzimas capaces de degradar la lactosa cuando ésta está presente en el medio. Está conformado por tres secuencias operadoras, seguidas de tres genes estructurales (Z, Y y A) que codifican las enzimas mencionadas previamente, y un cuarto gen (I) que regula el operón. Este operón es activado por la presencia de un inductor natural, como la lactosa o la alolactosa, o sintético, como el *IPTG*. El control de la transcripción se realiza en función de la presencia o ausencia del inductor (26). En ausencia de inductor, la proteína represora impide que la enzima *RNA polimerasa* se una al promotor, por lo que no se transcriben los genes y el operón está reprimido (26). En

presencia del inductor, éste se une al represor, reduciendo su afinidad por el operador, y permitiendo la unión de la *RNA polimerasa* al promotor, transcribiendo así los genes (26). La utilización de *Bacillus subtilis* presenta la ventaja que la proteína de interés es secretada al medio de cultivo, pero junto con ella también secreta una alta cantidad de proteasas. Además, existe una menor cantidad de vectores de expresión y promotores para regular la expresión de los genes, y los plásmidos incorporados en el huésped presentan una estabilidad genética menor (24).

Se ha demostrado que los sistemas basados en levaduras son una fuente eficiente y económica para producir proteínas recombinantes de eucariotas superiores de interés industrial o académico. Proporcionan un entorno adecuado para el plegamiento de proteínas eucariotas, realizan ciertas modificaciones postraduccionales y son capaces de secretar las proteínas expresadas al medio de cultivo. A su vez, también presentan las ventajas de los demás organismos unicelulares, como la facilidad de manipulación y la velocidad de crecimiento. El uso de *Saccharomyces cerevisiae* como hospedero tiene como ventajas principales que es uno de los organismos eucariotas más caracterizado, con su genoma secuenciado completamente, y que es considerado como organismo GRAS (del inglés *generally recognized as safe*) por la FDA (del inglés *Food and Drug Administration*). Por estas razones, muchos de los sistemas de expresión desarrollados para la producción de proteínas recombinantes se basan en *S. cerevisiae*. De todas formas, presentan ciertas limitaciones frente a los nuevos sistemas de expresión basados en levaduras no convencionales. Entre estos sistemas, se encuentra *Pichia pastoris*, que comparte con *S. cerevisiae* las ventajas de fácil manipulación genética y bioquímica, pero permite niveles de expresión de proteínas recombinantes de entre 10 y 100 veces más, además de que es más fácil de cultivar (24).

Los sistemas de expresión de mamíferos se usan para producir proteínas con altos niveles de procesamiento postraducciona l y actividad funcional. Estos sistemas se pueden usar para la producción de anticuerpos, proteínas complejas y proteínas para ensayos funcionales basados en células. Sin embargo, dichos beneficios van acompañados de condiciones de cultivo más exigentes. Las células de insectos se utilizan para expresar altos niveles de proteínas, con modificaciones similares a los sistemas de mamíferos. Hay varios sistemas que pueden usarse para producir baculovirus recombinantes, que luego

permiten expresar la proteína de interés en células de insectos. Aunque el rendimiento puede ser de hasta 500 mg/L, la producción de baculovirus recombinante lleva mucho tiempo y las condiciones de cultivo son más exigentes que los sistemas procariotas (28).

Con respecto al vector de expresión donde se insertará la información genética de la proteína a producir, se seleccionan aquellos con un alto número de copias ya que esto se suele relacionar con un alto número de copias del gen de interés y, por tanto, una alta cantidad de proteína producida. Por otra parte, esto provocará una alta carga metabólica para la célula, reduciendo así la tasa de crecimiento y el rendimiento de biomasa en sustrato. Es necesario encontrar el nivel de expresión óptimo para producir la proteína de interés en una cepa específica de *E. coli*, lo que también depende del promotor seleccionado con el fin de regular la intensidad de la inducción (25).

Finalmente, la purificación de la proteína producida depende de su localización subcelular. En caso de que la misma se exprese y se dirija al citoplasma, primero se debe lisar la célula, ya sea mecánica o químicamente. Una expresión muy alta del gen heterólogo puede conducir a la formación de cuerpos de inclusión, lo que a veces es deseable ya que protegen a la proteína de la proteólisis, pero requieren de pasos adicionales de purificación y de recuperación del plegamiento correcto, y pueden contener agregadas cantidades contaminantes de *DNA*, *RNA* y chaperonas llevando a la disminución de la cantidad de proteína presente. La purificación final de la proteína puede realizarse por métodos cromatográficos, como intercambio iónico o interacción hidrofóbica (25).

Objetivos

Objetivo general

Probar la actividad antifúngica de dos nanoanticuerpos previamente descritos por *De Coninck et al.* (12), para ser propuestos como nuevos biopesticidas antifúngicos para la protección de cultivos en la región del Cono Sur. Evaluar, a su vez, la viabilidad técnica y económica de su aplicación en grandes superficies.

Objetivos específicos

1. Producir los nanoanticuerpos dirigidos contra fGlcCer ya descritos por *De Coninck et al.* (12) en cantidades suficientes para los ensayos descritos en 2 y 3, con elevado grado de pureza. Calcular los rendimientos.
2. Evaluar su capacidad de interacción con fGlcCer *in vitro*, así como su actividad antifúngica *in vitro*. Calcular la concentración mínima requerida para inhibir al menos un 90% de crecimiento.
3. Evaluar costos asociados a su aplicación en grandes superficies.

Metodología

I. Puesta a punto de la producción del V_HH B₃4

A. Producción de B₃4 en *E. coli* BL21(DE3) a escala de laboratorio

Con el fin de replicar y mejorar las condiciones de expresión evaluadas por Bernasconi, Lorente y Ripoll (29), se transformaron por electroporación (ver Sección V. C de Metodología) células de *E. coli* BL21(DE3) electrocompetentes (ver Sección V. B de Metodología) con la *miniprep* del V_HH de interés realizada en la tesis mencionada (29) en BL21, cuya concentración es de 184,2 ng/μL. La cepa seleccionada contiene el profago λDE3 que presenta el gen de la enzima *T7 RNA polimerasa* bajo control del promotor lacUV5, permitiendo la inducción de la expresión de dicha enzima con *IPTG* y su unión al promotor T7 para expresar la proteína de interés (30). Esto es importante ya que la enzima mencionada sintetiza *RNA* a mayor velocidad que la *RNA polimerasa* de *E. coli* y es más selectiva, lo que evita que transcriba secuencias presentes en el *DNA* de *E. coli* (31). Las bacterias transformadas fueron plaqueadas en medio *LB* agar suplementado con 50 mg/mL de Kanamicina.

Se seleccionaron tres colonias para inducir la expresión de la proteína en 10 mL de medio LB-Kanamicina, debido a que el plásmido en el que fue clonado B₃4 presenta un *cassette* de resistencia a dicho antibiótico. Para ello, se inoculó el medio de cultivo con 400 μL de precultivo de forma de tener una proporción $1/25$ y, al llegar a una OD₆₀₀ de alrededor de 0.6, se indujo la expresión con 10 mM de *IPTG*. Se incubó por 4 horas a 37°C y 250 rpm, para luego centrifugar a 3500 *xg* por 10 minutos, resuspender el pellet en 3.33 mL de PBS y sonicar utilizando el equipo *Vibra-Cell™* (SONICS®, #VCX 130), de modo de lisar las bacterias y liberar la proteína al medio de cultivo. El programa de sonicación utilizado consistió en una amplitud de 30%, pulsos de 2 segundos ON y 6 segundos OFF por 30 segundos, añadiendo 33 μL de inhibidor de proteasas *PMSF* 100X. Posteriormente, se centrifugó a 14000 *xg* por 15 minutos a 4°C y las fracciones solubles obtenidas se analizaron en una electroforesis en condiciones desnaturalizantes (*SDS-PAGE*) (ver Sección V. D de Metodología).

En las siguientes instancias, se probaron distintas condiciones de expresión, sin modificar el procesamiento posterior a la incubación con *IPTG*. Primeramente, se realizó un gradiente de *IPTG*, induciendo la expresión de la proteína en 10 mL de medio conteniendo 400 μ L de precultivo, con 0 μ M, 3.2 μ M, 16 μ M, 80 μ M, 0.4 mM, 2 mM y 10 mM de *IPTG*. En segundo lugar, se realizó la inducción en el mismo volumen de cultivo, pero únicamente con 3 μ M de *IPTG*, y se solubilizaron los *pellets* con 1 mL de urea 8 M cada 0.1 g de *pellet* para evaluar si la proteína estaba precipitando en cuerpos de inclusión. Luego, se cambiaron las células BL21, se transformaron nuevamente y se indujo la expresión de tres colonias en 3 mL de medio LB con 120 μ L de precultivo, con 0 y 10 μ M de *IPTG* tanto durante 4 horas como *overnight*. También se utilizaron precultivos que contenían, cada uno, cinco colonias diferentes, y se indujo la expresión con 10 mM de *IPTG*. Por último, se realizó una nueva inducción con gradiente de *IPTG* (3, 10, 30 y 200 μ M, y 1 mM) pero en este caso se incubaron los cultivos a 25 y 37 °C, se tomaron muestras de 1 mL a las 2 y a las 4 horas, y el volumen restante se incubó *overnight*.

B. Clonado de B₃₄ en el vector de expresión pET28a (+)

Dada la incapacidad de lograr la expresión de B₃₄ tras variar todas las condiciones de expresión mencionadas en la sección I. A. de Metodología, se decidió volver a clonar el V_HH para descartar una posible degradación del vector original como causa de ello.

A continuación, se procedió a clonar el V_HH de interés en el vector pET28a (+) (Novagen, #69864-3), que contiene la secuencia OmpA para dirigir la proteína expresada al espacio periplásmico, una cola de seis histidinas (6xHis) y un epítipo HA, que simplifican la purificación y detección del V_HH una vez expresado (Figura 4) (32). Dicho vector presenta el promotor fuerte T7, para poder inducir la expresión con *IPTG*, así como también un *cassette* de resistencia a Kanamicina. En este caso, ya se contaba con el vector mencionado, digerido, purificado y desfosforilado por *Bernasconi, Lorente y Ripoll* (29).

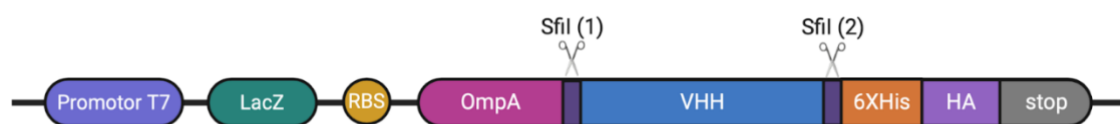


Figura 4. Esquema del vector de expresión pET28a (+); presentando el promotor T7 inducible por *IPTG*, el sitio de unión a ribosomas (RBS) y la secuencia OmpA para dirigir la expresión al periplasma en dirección 5' del sitio de clonado del V_HH, y la cola de 6 histidinas y la secuencia del epítipo HA en dirección 3' del mismo.

En primer lugar, se digirieron 5 µg del vector conteniendo a B₃4 con la enzima de restricción *SfiI* (NEB, #R0123S), a razón de 20 U/µg de *DNA* durante 3 horas a 50 °C. De esta forma, las cantidades utilizadas en la reacción fueron 29.2 µL pETOmpA+B₃4, 5 µL *SfiI*, 10 µL de *buffer CutSmart* y 55.8 µL de agua libre de *DNA*sas. Los productos se corrieron en un gel de agarosa 1% (ver Sección V. E de Metodología) para luego purificar las bandas correspondientes al peso molecular de interés utilizando el kit *Monarch PCR and DNA Cleaning*, siguiendo el protocolo del fabricante, y cuantificar los fragmentos de *DNA* siguiendo el protocolo descrito en la sección V. F de Metodología.

Para clonar el V_HH digerido en el vector de expresión, se realizó la ligación de 22 ng de B₃4 con 100 ng del vector en una relación molar 1:3 (vector:inserto) utilizando 1 U de enzima *T4 DNA ligasa* (Thermo Scientific™, #EL0011) (Tabla 1). Se adicionaron dos controles; un control de religación que contiene únicamente al vector ya digerido y a la enzima, para analizar si la desfosforilación del vector fue efectiva; y un control de digestión que contiene el vector digerido sin el inserto ni la enzima, para corroborar que todo el vector fue correctamente digerido. La reacción de ligación se realizó a 25°C por 2 horas, seguido de la inactivación a 65°C durante 10 minutos.

Tabla 1. Reacciones de ligación para un volumen final de 21.25 µL.

Componente	Control de religación	Ligación VHH-Vector
<i>Buffer</i> T4 (10X)	2 µL	2 µL
Vector	2 µL	2 µL
V _H H <i>DNA</i>	-	1.1 µL
<i>T4 DNA ligase</i>	0.7 µL	0.7 µL
H ₂ O <i>DNAse free</i>	16.55 µL	15.45 µL

Por último, se transformaron células *E. coli* DH5 α con la nueva construcción, con el control de religación y el control negativo, que se plaquearon en medio LB agar suplementado con Kanamicina. También se hizo un control de viabilidad de las células. En paralelo, se transformaron células de *E. coli* BL21(DE3) con el control negativo y con la nueva construcción, y se indujo la expresión de dos colonias con 0, 10 y 500 μ M de *IPTG* en 3 mL de cultivo. El procesamiento siguiente fue igual a lo explicado en la sección I. A de Metodología.

C. Producción y purificación de B₃₄ en *E. coli* BL21(DE3) Rosetta

Se transformaron con la nueva construcción de B₃₄ y por electroporación (ver sección IV. C de Metodología), bacterias de *E. coli* BL21(DE3) Rosetta electrocompetentes (ver sección V. B de Metodología). Dichas bacterias fueron brindadas por la Dra. Cecilia Ruibal (Facultad de Ciencias, UdelAR). Esta cepa fue diseñada con el fin de mejorar la expresión de proteínas con codones raros para *E. coli*, por lo que presentan los *RNA* de transferencia para los mismos en un plásmido con un *cassette* de resistencia a Cloranfenicol (33). Se indujo la expresión de cinco colonias que crecieron en medio LB suplementado con 50 mg/mL Kanamicina y 34 mg/mL Cloranfenicol, con un gradiente de concentración de *IPTG* (0, 3, 9, 27 y 81 μ M) en 3 mL de cultivo.

Luego se escaló la expresión, pasando a escala de matraz en 250 mL, e induciendo con 9 μ M de *IPTG*. En este último caso, el programa de sonicación utilizado se modificó y el mismo consistió en amplitud 60%, tiempo 15 minutos, pulso 10 segundos ON y 10 segundos OFF, y la proteína fue purificada por *FPLC-IMAC*, utilizando el equipo ÄKTA Avant 25 (G.E. Healthcare Life Sciences) y la columna *HiTrap Chelating HP 5 mL*[®] (G.E. Healthcare Life Sciences), pre-empaquetada con sefarosa, que presenta como ligando el ácido iminodiacético (IDA), y que fue cargada con la solución de sulfato de níquel 100 mM. Todas las soluciones utilizadas fueron previamente filtradas y sonicadas para eliminar tanto posibles precipitados como gases. A la muestra se le añadió imidazol de forma de tener una concentración igual a la del *buffer* A (20 mM), para que el mismo se una a la cola de histidinas permitiendo la interacción de la proteína de interés con la matriz de la columna y su posterior elución, y fue filtrada con el equipo un *Merck Millipore*

Sterifil™ 47mm Aseptic Vacuum Filter System utilizando filtros de membrana *Merck Millipore* de 0.22 μm . Para configurar el método, se utilizó el *software* UNICORN™ 7.0.

En este caso, se aplicó un método en gradiente. Para ello, se equilibró la columna con 100% de *buffer* A (20 mM imidazol), 10 CV, a un flujo de 5 mL/min. Luego, se aplicaron los 11 mL de muestra, que consiste en la fracción soluble del lisado de B₃₄, a un flujo de 1 mL/min, para luego realizar un lavado con 100% de *buffer* A, 10 CV, a un flujo de 5 mL/min. Posteriormente, se llevó a cabo la elución en gradiente hasta alcanzar un 50% de *buffer* B (40 mM imidazol), con 10 CV a un flujo de 1 mL/min, y la elución final con 50% de *buffer* B, 1 CV y flujo de 1 mL/min. Por último, se realiza un lavado con 100% de *buffer* B, 1 CV y flujo de 5 mL/min, y un lavado final con agua Milli-Q®, 5 CV a un flujo de 5 mL/min. Las fracciones de interés fueron recolectadas en el colector de fracciones del equipo y los resultados se procesaron en el *software* UNICORN™ 7.0.

El pico de elución fue colectado en 3 mL de *buffer* B y dializado contra PBS como se detalla en la sección IV. G de Metodología y las fracciones dializadas fueron corridas en una electroforesis SDS-PAGE (ver Sección V. D de Metodología).

II. Selección y clonado de V_HH monoespecíficos y biespecíficos

A. Selección de diferentes clones positivos para su expresión a dos escalas

Las secuencias de los V_HHs fueron obtenidas de la investigación realizada por *De Coninck et al.* (12), en la cual se identificaron V_HHs contra glucosílceraidas de hongos mediante *Phage display*. De los clones obtenidos, se seleccionaron los V_HH 41D01 y 56F11 por presentar mayor actividad antifúngica, y, a su vez, se diseñaron dos anticuerpos biespecíficos conteniendo al V_HH 41D01 y un V_HH anti-hoja unidos por un *linker*. Las secuencias fueron sintetizadas por la empresa GenScript® y clonadas en el vector pUC57.

B. Clonado de los V_HHs en un vector de expresión

Para clonar las secuencias desde el pUC57 al vector de expresión pET28a (+), se transformaron células de *E. coli* DH5 α con el vector pUC57 por electroporación. A partir de cuatro colonias que crecieron en medio LB, se realizó una *miniprep* con *Zyppy plasmid miniprep kit* de Zymo Research con el fin de extraer el *DNA* plasmídico y un gel de agarosa 1% para verificar la presencia del plásmido dentro de las células (ver sección V. E de Metodología).

Se amplificó el *DNA* extraído utilizando *primers* específicos diseñados con el *software SnapGene* versión 4.1 y sintetizados por MacroGen Inc. (Tabla 2), que contienen, a su vez, sitios de corte para la enzima de restricción *SfiI*. Las reacciones se realizaron con diluciones $1/10$ de los plásmidos conteniendo los V_HHs y 2.5 μ M de *primers*. Para visualizar si la amplificación fue exitosa, se sembraron los productos de *PCR* en un gel de agarosa 1% y también 2% para el caso de los biespecíficos, junto con los controles correspondientes (ver Sección V. E de Metodología). El *DNA* fue purificado utilizando el kit *ZymoClean gel DNA Recovery kit* y el *DNA* fue cuantificado (ver Sección V. F de Metodología).

Tabla 2. Secuencias de los *primers* diseñados para clonar los V_HHs. Se resaltan los sitios de corte de la enzima de restricción *SfiI*.

Nombre	Secuencia 5'—3'
41-56 <i>F_w</i>	CATGCCATGACTCGCGGCCCAGGCGGCCATGGCGCAGGTGCAACTG CAGGAAAGCGGT
41-56 <i>R_v</i>	CCACGATTCTGGCCGGCCTGGCCGCTGCTAACGGTCACCTGGGTACC

A continuación, se llevó a cabo la digestión enzimática con *SfiI*, colocando 40 μ L del V_HH, 1.5 μ L de *SfiI*, 10 μ L de Buffer *CutSmart* y c.s.p. de agua libre de DNasas hasta un volumen final de 100 μ L. Las reacciones se incubaron durante 3 horas a 50°C y, luego, se purificaron utilizando el kit *Monarch PCR and DNA Cleaning* a partir de un gel de agarosa 1% siguiendo el protocolo del fabricante, y se cuantificaron los fragmentos de *DNA* siguiendo el protocolo descrito en la sección V. F de Metodología. Por último, se realizó la ligación en el vector ya digerido, purificado y desfosforilado, con los V_HHs de

interés, y también se realizó un control de religación, que contiene vector y enzima, pero no inserto. Las reacciones y sus volúmenes se detallan en la Tabla 3; la incubación se realizó durante 1.5 horas a 22°C y se inactivó la enzima a 65°C por 10 minutos.

Tabla 3. Reacciones de ligación para un volumen final de 20µL.

Componente	Control de religación	Ligación V _H H monoespecífico - Vector	Ligación anti-hongo-hoja - Vector	Ligación anti-hoja-hongo - Vector
<i>Buffer</i> T4 (10X)	2 µL	2 µL	2 µL	2 µL
Vector	0.75 µL	0.75 µL	0.75 µL	0.75 µL
V _H H DNA	-	0.5 µL	1.44 µL	0.75 µL
<i>T4 DNA ligase</i>	1 µL	1 µL	1 µL	1 µL
H ₂ O <i>DNAse free</i>	16.25 µL	15.75 µL	14.81 µL	15.5 µL

III. Producción de nanoanticuerpos monoespecíficos anti-fGlcCer a escala piloto y de laboratorio

A. Electroporación de Rosetta con las construcciones generadas y selección de clones positivos para el inserto

Con este objetivo se transformaron alícuotas de células *E. coli* BL21(DE3) Rosetta electrocompetentes (realizadas siguiendo el protocolo descrito en la sección V. B de Metodología), una por cada reacción de ligación y una por cada control, mediante electroporación (procedimiento descrito en la sección V. C de Metodología). Las células transformadas se plaquearon en medio LB agar suplementado con 50 mg/mL de Kanamicina y 34 mg/mL de Cloranfenicol, y permanecieron en estufa a 37 °C durante 24 horas.

Una vez obtenidas colonias aisladas presuntamente conteniendo las construcciones de interés, se seleccionaron cinco de cada placa para realizar cultivos *overnight* de 3 mL en medio LB suplementado con 50 mg/mL de Kanamicina y 34 mg/mL de Cloranfenicol. Al día siguiente se realizaron *minipreps* de los cultivos utilizando el kit

Zyppy Plasmid Miniprep Kit, siguiendo las recomendaciones del fabricante, y el *DNA* fue cuantificado según el protocolo descrito en la Sección V. F de Metodología. Finalmente, a partir de ellas se realizaron reacciones de *PCR* con *primers* específicos para los V_HHs 41D01 y 56F11 (ver sección V. A de Metodología), de esta manera se buscó identificar si los clones seleccionados efectivamente contenían los insertos de interés. Además, se utilizó como control positivo de la *PCR*, el plásmido pET28a-6P que contiene un V_HH de especificidad irrelevante.

B. Producción de 41D01 y 56F11 a escala pequeña

Para una primera evaluación de la expresión de los V_HH de interés, se seleccionaron dos clones positivos para cada uno de ellos de la etapa anterior, y a partir de colonias aisladas y frescas de los mismos, se realizaron precultivos *overnight* en tubos Falcon de 15 mL conteniendo 3 mL de medio LB suplementado con 50 mg/mL de Kanamicina y 34 mg/mL de Cloranfenicol. A su vez, se creció en paralelo un precultivo *overnight* de *E. coli* BL21(DE3) Rosetta sin transformar en Falcon de 15 mL conteniendo 3 mL de medio LB suplementado con 34 mg/mL de Cloranfenicol, el objetivo de este fue contar con un control negativo de expresión (y será utilizado como tal en todas las producciones subsecuentes). Los precultivos se incubaron a 37 °C y 250 rpm. Al día siguiente, se inocularon tubos Falcon de 15 mL con 3 mL de LB-Kanamicina-Cloranfenicol o de LB-Cloranfenicol en el caso del control negativo, utilizando una proporción $1/25$ del precultivo correspondiente como inóculo (en este caso 120 μ L). Estos cultivos crecieron a 37 °C y 250 rpm hasta alcanzar una OD₆₀₀ de alrededor de 0.6; en ese momento se indujo la expresión de los V_HHs añadiendo 9 μ M de *IPTG* a cada uno de ellos. Esta inducción se llevó a cabo durante 4 horas a 37 °C y 250 rpm, y transcurrido ese tiempo se centrifugaron los cultivos durante 10 minutos a 3500 *xg*. Los *pellets* celulares obtenidos se resuspendieron en 1mL de *PBS* para ser lisados mediante sonicación, utilizando el equipo *Vibra-Cell*TM (SONICS®, #VCX 130), al igual que se describió en la sección I. A de Metodología. Los lisados celulares se centrifugaron a 14000 *xg* durante 15 minutos a 4 °C para separar la fracción soluble de la insoluble. Finalmente se realizó una electroforesis en gel de poliacrilamida al 15% (como se describe en la sección V. D de Metodología), en el que se sembraron 25 μ L de cada fracción soluble para poder observar el resultado de la inducción.

C. Producción de los nanoanticuerpos biespecíficos

Una vez clonadas las secuencias en el vector de expresión (ver Sección II. B de Metodología), se procedió a transformar por electroporación células de *E. coli* BL21(DE3) Rosetta electrocompetentes, que se plaquearon en medio LB agar suplementado con 50 mg/mL de Kanamicina y 34 mg/mL de Cloranfenicol. En una primera instancia, se realizó *colony PCR* de diez colonias del biespecífico anti-hongo-hoja y de siete colonias del biespecífico anti-hoja-hongo, para verificar la presencia del V_HH, añadiendo una porción de cada colonia con un *tip* estéril al mix de *PCR*. En base a lo obtenido, se largaron precultivos de cuatro colonias del primer biespecífico y tres del segundo, para, al día siguiente, inducir la expresión de estos en cultivos de 3 mL con 120 µL de inóculo y 9 µM de *IPTG*. Se incubaron 4 horas a 37°C y 250 rpm, y el procesamiento siguiente es idéntico al descrito en la sección I. A de Metodología.

Posteriormente, se electroporaron células de *E. coli* BL21(DE3) electrocompetentes (ver Sección V. B y V. C de Metodología), las cuales fueron plaqueadas en medio LB agar suplementado con 50 mg/mL de Kanamicina. Se realizó *miniprep* con *Zyppy plasmid miniprep kit*, tanto de colonias *E. coli* BL21(DE3) como de colonias de *E. coli* BL21(DE3) Rosetta transformadas previamente. El *DNA* fue cuantificado (ver Sección V. F de Metodología.) y se realizó una reacción de *PCR* para evaluar la presencia del inserto. Luego, se largaron precultivos de cuatro colonias de cada uno de los V_HH en BL21, y del V_HH anti-hongo-hoja en *E. coli* BL21(DE3) Rosetta, y de dos colonias del V_HH anti-hoja-hongo en *E. coli* BL21(DE3) Rosetta. A las 24 horas, se inocularon 3 mL de medio LB con 120 µL de cada precultivo y, al alcanzar una OD₆₀₀ de alrededor de 0.6, se indujo la expresión con 9 µM de *IPTG*. El procesamiento restante se describió en la sección I. A de Metodología.

Por último, se largaron precultivos de una colonia de cada V_HH en *E. coli* BL21(DE3) Rosetta para inducir la expresión con 9 µM de *IPTG*, pero en 250 mL de medio LB y evaluar si la proteína se expresa en pequeñas cantidades.

D. Evaluación de la expresión del V_HH 56F11 utilizando gradiente de *IPTG*

Con el objetivo de analizar si se obtenía una mayor expresión al variar la concentración de *IPTG* utilizada para inducir los cultivos, se realizó un precultivo *overnight* de una colonia positiva para la expresión de 56F11 en tubo Falcon de 50 mL conteniendo medio LB-Kanamicina-Cloranfenicol. Al día siguiente se inocularon cultivos de 3 mL en tubos Falcon de 50 mL y en el mismo medio, con una proporción $1/25$ del precultivo. Una vez alcanzada una OD₆₀₀ de aproximadamente 0.6, se indujo la expresión del V_HH utilizando un gradiente de *IPTG* comprendiendo las concentraciones: 3, 9, 27 y 81 μ M, este experimento incluyó además un cultivo sin inducir para observar la expresión basal del nanoanticuerpo dada por las *E. coli* BL21(DE3) Rosetta electrocompetentes. Una vez transcurridas las 4 horas de inducción, se centrifugaron los cultivos a 3500 $\times g$ por 10 minutos, se descartó el sobrenadante y se resuspendieron los *pellets* celulares en *PBS* para su lisis por sonicado. El sonicado y la obtención de la fracción soluble se realizó de igual forma que en todas las producciones a escala de 3 mL. Posteriormente, se analizaron las fracciones obtenidas por electroforesis tal como se describe en la sección V. D de Metodología, sembrándose también 25 μ L de una muestra de *E. coli* BL21(DE3) Rosetta sin transformar como control negativo de expresión. Todos los cultivos descritos se llevaron a cabo a 37 °C y 250 rpm.

E. Producción de los V_HH a escala matraz

Una vez determinada la concentración óptima de *IPTG* para inducir los cultivos, se buscó escalar la producción a 250 mL de cultivo utilizando matraces Erlenmeyer de 1 L. Para ello se realizaron precultivos *overnight* en tubos Falcon de 50 mL con 11 mL de medio LB-Kanamicina-Cloranfenicol, manteniendo las concentraciones de antibióticos y las condiciones de incubación utilizadas en los cultivos de 3 mL. Posteriormente, se inoculó un cultivo de 250 mL de medio LB-Kanamicina-Cloranfenicol con 10 mL del precultivo. Éste se creció a 37°C y 250 rpm hasta alcanzar una OD₆₀₀ de alrededor de 0.6, allí se indujo la expresión con 9 μ M de *IPTG*. Pasadas las 4 horas de inducción, se dividió el cultivo en Falcon de 50 mL para su centrifugación a 3500 $\times g$ por 10 minutos, los *pellets* celulares se resuspendieron en *PBS* manteniendo la relación $1/3$ de acuerdo con el volumen

de cultivo inicial en cada tubo Falcon. A continuación, se procedió con la lisis celular mediante sonicación utilizando un programa de amplitud 60%, pulso *ON* 10 s, pulso *OFF* 10 s, durante 15 minutos, añadiendo previamente *PMSF* 100X. Los lisados celulares se centrifugaron a 14000 $\times g$ por 15 minutos a 4°C, y las fracciones solubles se conservaron a -20 °C en tubos Falcon de 50 mL para su posterior evaluación mediante electroforesis (ver Sección V. D de Metodología).

F. Producción a escala mediana

Se realizó un último escalado en la producción de 56F11 y 41D01 buscando obtener una mayor concentración de ambos V_HHs en su posterior purificación. De esta forma, se realizaron cultivos de 1 L dividiendo el volumen en varios matraces Erlenmeyer de 1 L conteniendo 250 mL de medio LB-Kanamicina-Cloranfenicol cada uno.

Con este objetivo, se largaron precultivos *overnight* de 100 mL en medio LB-Kanamicina-Cloranfenicol en matraces Erlenmeyer de 250 mL; al día siguiente se inocularon 5 matraces Erlenmeyer de 1 L por V_HH, cada uno con 10 mL del precultivo correspondiente. Los cultivos crecieron a 37 °C y 250 rpm hasta alcanzar la OD₆₀₀ deseada de 0.6, momento en que se indujo la expresión de los nanoanticuerpos con el agregado de 9 μ M de *IPTG*. Una vez transcurridas las 4 horas de inducción, el procedimiento fue el mismo que el descrito en la sección anterior, incluyendo el programa de sonicado y la conservación de las fracciones solubles a – 20 °C, las cuales también fueron evaluadas mediante electroforesis en gel de poliacrilamida (ver Sección V. D de Metodología).

G. Purificación del V_HH 56F11 mediante *FPLC-IMAC* por método en gradiente

Dado que los nanoanticuerpos producidos poseen un *tag* de seis histidinas (6xHis), se realizó una primera purificación de estos mediante *IMAC* (del inglés *Immobilized Metal Affinity Chromatography*) en cromatógrafo *FPLC* (del inglés *Fast Protein Liquid Chromatography*), con un método en gradiente. El objetivo fue evaluar si el V_HH eluía a la concentración esperada de imidazol, y se seleccionó el producto de la producción de 250 mL de 56F11 para este proceso.

Como primera instancia, se prepararon todas soluciones necesarias para la cromatografía, las cuales fueron filtradas y degasificadas previo a su utilización. A su vez, la fracción soluble del lisado celular de 56F11 fue sometida a un acondicionamiento, en el cual se la centrifugó a máxima velocidad durante 30 minutos a 4°C para desprender la mayor cantidad de impurezas remanentes posible, tras lo cual se le adicionó la cantidad necesaria de imidazol para imitar la concentración del *buffer A* (20 mM). Finalmente, fue filtrada utilizando un *Merck Millipore Sterifil™ 47mm Aseptic Vacuum Filter System* con filtros de membrana *Merk Millipore* de 0.22 µm.

La cromatografía se realizó en el equipo ÄKTA Avant 25 (G.E. Healthcare Life Sciences), en la *HiTrap™ Chelating HP 5 mL®* (G.E. Healthcare Life Sciences), ya descrita en la sección I. C de Metodología. El método en gradiente fue configurado en el equipo mediante el *software* UNICORN™ 7.0, a partir del cual se obtuvo también el cromatograma del proceso, considerándose la absorbancia a 280 nm y el porcentaje de *buffer B* los parámetros más relevantes a considerar. Las fracciones de interés fueron colectadas a través del colector del equipo, obteniéndose el nanoanticuerpo eluido en fracciones de 2 mL de *buffer B*. Estas fracciones fueron posteriormente dializadas para eliminar el imidazol presente en ellas, como se describe en la sección V. G de Metodología, ya que el mismo afectaría la cuantificación proteica subsiguiente y los ensayos de interacción *in vitro*.

H. Purificación de los V_HHs 56F11 y 41D01 mediante *FPLC-IMAC* por método isocrático

Debido a que los resultados de la purificación con el método en gradiente no fueron satisfactorios, se decidió utilizar un método isocrático para la purificación de los nanoanticuerpos producidos en la escala de 1 L de cultivo y ver si de esta manera se obtenía una mayor concentración proteica y un mayor grado de pureza. Para ello se utilizó el mismo equipamiento descrito en la sección II. G de Metodología, manteniéndose el modelo de columna y el *software* para el análisis del proceso. La preparación de las soluciones y el acondicionamiento de la muestra también se realizaron de igual forma,

teniendo como única diferencia el volumen de fracción soluble a analizar, siendo en este caso considerablemente mayor.

En esta cromatografía, tras cargar la columna con la solución de sulfato de níquel 100 mM, se equilibró la columna con 10 CV de 100% *buffer A* (20 mM de imidazol) a un flujo de 5 mL/minuto. Este flujo se mantuvo constante tanto en el aplicado de la muestra (dado el mayor volumen de esta), como en el primer lavado que se realizó a continuación con 100% de *buffer A*. Seguidamente, se realizaron dos lavados a un flujo de 2,5 mL/minuto, el primero con 4% de *buffer B* (40 mM de imidazol) y el segundo con 6% de *buffer B* (60 mM de imidazol). Finalmente, se eluyó la proteína con el aplicado de 50% de *buffer B* (500 mM de imidazol) a 1 mL/minuto y se realizó un último lavado con 2 CV de 100% *buffer B* (1 M de imidazol) a un flujo de 5 mL/minuto. En este método, desde el primer lavado hasta la elución de la muestra, los flujos de cada paso se mantuvieron continuos hasta que la absorbancia a 280 nm permaneció constante.

Los parámetros de interés para el cromatograma fueron los mismos que para el método en gradiente, y las fracciones obtenidas fueron colectadas de igual forma. A su vez, las fracciones que contenían el V_HH purificado también fueron sometidas al proceso de diálisis descrito en la sección IV. G de Metodología.

I. Cuantificación de proteínas por el método de *BCA*

Con el objetivo de cuantificar la cantidad de proteína presente en las fracciones dializadas tras la purificación de los nanoanticuerpos, se utilizó el método del ácido bicínico (*BCA*) siguiendo el protocolo establecido por el fabricante para los reactivos Sigma-Aldrich® #BCA1 y #B9643-1L-KC. Los ensayos se llevaron a cabo en placas de 96 pocillos de superficie no tratada, realizando mezclas por duplicado de 25 µL de muestra y 200 µL del reactivo *BCA*, este reactivo estuvo formado por 50 partes de *Bicinchoninic Acid solution* (reactivo A) y una parte de sulfato de cobre pentahidratado al 4 % (reactivo B). Se generó además una curva estándar utilizando seroalbúmina bovina (*BSA*, Sigma-Aldrich®, #A2153), comprendiendo las concentraciones 0, 50, 100, 200, 400, 600, 800 y 1000 µg/mL por duplicado. Una vez sembrada la placa, se protegió de la luz con papel aluminio y se incubó 30 minutos a 37 °C en estufa, tras lo cual se midió

absorbancia a 562 nm en el equipo Infinite® M200 PRO NanoQuant (Tecan). Los datos obtenidos fueron analizados con el *software* de Microsoft Excel (2021), graficando la curva estándar y realizando un ajuste lineal que permitió evaluar su valor de R^2 y obtener la ecuación del gráfico. A partir de ella se extrapolaron los valores de absorbancia arrojados por las muestras evaluadas, y se calculó la concentración proteica de cada una de ellas.

IV. Evaluación de la capacidad de los V_HH producidos de interaccionar con GlcCer y de inhibir el crecimiento de *Botrytis cinerea in vitro*

A. Evaluación de la interacción de los V_HH con diferentes GlcCer *in vitro*

En base a los experimentos reportados en *De Coninck et al.* (12), se buscó evaluar la capacidad de los V_HHs producidos y purificados de interaccionar con diferentes glucosilceramidas *in vitro*. Éstas fueron obtenidas ya purificadas (99%) a partir de la empresa *Nacalai Tesque Inc.*, decidiéndose evaluar la interacción de los V_HH con GlcCer de tres especies diferentes: hongo, planta y mamífero, correspondiendo a *Pleurotus citrinopileatus* (Tamogitake), *Glycine max* (Soja) y leche respectivamente. Su reconstitución se llevó a cabo siguiendo el protocolo descrito en *De Coninck et al.* (12), realizándose una mezcla de cloroformo:metanol:agua (16:16:5, v/v/v) para la GlcCer de Tamogitake, y una de cloroformo:metanol (2:1, v/v) para las GlcCer de soja y leche. Dada la concentración inicial de 10 mg y el volumen de resuspensión de 2 mL, cada GlcCer quedó a una concentración final de 5 mg/mL.

En el primer ensayo de ELISA realizado, se sensibilizó una placa de 96 pocillos *Invitrogen™ Nunc MaxiSorp™ flat-bottom* (Thermo Scientific™) con 1 µg/pocillo de cada GlcCer y 1 µg/pocillo de BSA, utilizando metanol y PBS 1X para las diluciones respectivamente. El volumen utilizado fue 100 µL por pocillo, y la sensibilización se llevó a cabo *overnight* a temperatura ambiente por evaporación de las diluciones de GlcCer, e incubación de la BSA protegiendo los pocillos correspondientes con *PARAFILM® M* (Sigma-Aldrich®). Al día siguiente, se bloquearon los pocillos con 300 µL de PBS BSA 1% durante 1 hora a temperatura ambiente. Luego se realizaron 3 lavados con 300 µL de

PBS TWEEEN® 20 0.05 %, seguidos de la incubación con 100 µL de los V_{HH} purificados. En este caso se quiso evaluar la interacción ofrecida por 1 µg/pocillo y 10 µg/pocillo de 41D01, 56F11 y B₃4, utilizando este último como control negativo ya que no debería interaccionar con ninguna de las GlcCer. Las diluciones se realizaron en *PBS* BSA 0.01% y la incubación fue de 1 hora a temperatura ambiente. Tras 6 lavados con 300 µL de *PBS* TWEEEN® 20 0.05 %, se agregaron 100 µL/pocillo de una dilución ¹/₅₀₀ del anticuerpo secundario *anti-HA-Peroxidase* (Roche, #11667475001), las diluciones y la incubación se realizaron de igual forma que para los V_{HH}. Posteriormente, se volvieron a realizar 6 lavados de 300 µL de *PBS* TWEEEN® 20 0.05 %, y se procedió al agregado de 100 µL de la solución de sustrato de la *HRP* (ver sección VI.A.ii de Metodología), la cual se incubó protegida de la luz a temperatura ambiente por 10 minutos. Finalmente se detuvo la reacción con 50 µL de ácido sulfúrico 2 N y se midió la absorbancia a 450 nm en Infinite® M200 PRO NanoQuant (Tecan).

Debido a que los resultados obtenidos en el primer ensayo no fueron los esperados, principalmente por lo que pareció ser una gran cantidad de señal dada por uniones inespecíficas, se quisieron evaluar otras condiciones diferentes para los ensayos de ELISA. Las condiciones evaluadas se resumen en la tabla 4, y se probaron combinaciones de ellas hasta encontrar la óptima. Todos los ensayos de ELISA realizados mantuvieron los pasos de lavado y las incubaciones de cada etapa incambiados, así como también la solución de bloqueo y el tipo de placa utilizado.

Los datos obtenidos en cada ensayo fueron analizados mediante gráficos utilizando el *software GraphPad Prism* (versión 8.0.1).

Tabla 4. Resumen de las diferentes condiciones evaluadas en los ensayos de ELISA realizados.

Concentración de coating	- 1 µg por pocillo - 10 µg por pocillo
Concentración de V_{HH}	- 1 µg por pocillo de V_{HH} purificado - 10 µg por pocillo de V_{HH} purificado - Dilución 1/10 de extracto sin purificar

Concentración de Ac. secundario	- Dilución 1/500 - Dilución 1/2000 - Dilución 1/8000
Diluciones de V_HH	- En PBS BSA 0.01% - En PBS BSA 1% - En PBS BSA 1% TWEEN® 20 0.05 %
Diluciones de Ac. Secundario	- En PBS BSA 0.01% - En PBS BSA 1% - En PBS BSA 1% TWEEN® 20 0.05 %

B. Evaluación de la actividad antifúngica de los V_HHs producidos

Una vez confirmada la interacción *in vitro* de ambos V_HH con la fGlcCer, se evaluó si su presencia inhibía el crecimiento del hongo *Botrytis cinerea* en cultivos *in vitro*.

Placas de Petri con *B. cinerea* creciendo en medio *PDA* fueron gentilmente proporcionadas por el Ing. Felipe Machado; a partir de ellas se realizó la recolección de las esporas del hongo bajo esterilidad entre mecheros, añadiendo 12 mL de una solución estéril de suero con TWEEN® 20 0,02 %, también proporcionada por Felipe Machado, y rastrillando la superficie del micelio para desprenderlas. Luego, éstas fueron recolectadas de a 1 mL con micropipeta y colectadas en un tubo Falcon de 50 mL, y finalmente, se realizó un recuento de estas en cámara de *Neubauer*.

Para los ensayos de inhibición *in vitro* se utilizó el protocolo estipulado en la patente US2016/0075769A1 (13) con algunas modificaciones. En primer lugar, se utilizó el medio de crecimiento *YES* en lugar de *PDB*, ya que era el disponible en el laboratorio. En segundo lugar, la patente establece comenzar con una concentración de V_HH de 1,5 mg/mL, lo cual no fue posible en el caso del 41D01 ya que ninguna de las fracciones purificadas de este V_HH alcanzaba dicha concentración inicial. Dadas estas condiciones,

los ensayos se llevaron a cabo en placas de cultivo estériles de 96 pocillos (Greiner CELLSTAR®), colocando 80 µL de una dilución de esporas de *B. cinerea* en medio YES a una concentración de 1E+05 esporas/mL y 20 µL de solución de V_{HH}. En el caso de 56F11 la concentración obtenida tras su purificación superaba los 1,5 mg/mL, por lo tanto, se diluyó el mismo en agua mQ estéril hasta alcanzar esa concentración y una de 0,75 mg/mL tal como indica la patente. Para el 41D01, se utilizaron las concentraciones máximas obtenidas de dos fracciones diferentes llamadas 1A4 y 1A5, y una dilución al medio en agua mQ estéril de esas concentraciones. Se sembraron además 2 controles negativos, el primero correspondió nuevamente al V_{HH} B₃₄ de *Bernasconi, Lorente y Ripoll* (29), ya que su presencia no debería inhibir el crecimiento del hongo *in vitro*, y dada su concentración inicial de 1,48 mg/mL se siguió el mismo procedimiento que con el 41D01. Para el segundo control negativo de inhibición se utilizó agua mQ estéril, agregando 20 µL de la misma a la dilución de esporas presente en el pocillo. Cada concentración de V_{HH} y cada control negativo se evaluó por triplicado, midiendo absorbancia a 600 nm a las 0, 24, 48, 72, 96 y 168 horas utilizando el equipo Infinite® M200 PRO NanoQuant (Tecan).

En paralelo a lo especificado por la patente, se realizaron curvas de crecimiento de esporas de *B. cinerea* al ser expuestas a diluciones seriadas al medio de 41D01 y 56F11. Para ello se utilizaron nuevamente 80 µL de una dilución de esporas a 1E+05 esporas/mL y 20 µL de dilución de V_{HH} por pocillo. Cada curva consistió en 12 diluciones seriadas al medio, partiendo de las concentraciones máximas obtenidas de ambos nanoanticuerpos tras la purificación, y se realizaron por duplicado. En el caso del 41D01 se realizaron 2 curvas, una para la fracción 1A4 y otra para la 1A5. Al igual que en el ensayo descrito anteriormente, se midió absorbancia a 600 nm a las 0, 24, 48, 72, 96 y 168 horas utilizando el equipo Infinite® M200 PRO NanoQuant (Tecan).

Los datos recabados en ambos ensayos fueron analizados mediante gráficos realizados con el *software GraphPad Prism* (versión 8.0.1).

V. Procedimientos generales

Durante esta tesis se realizaron ciertos procedimientos comunes a varias etapas, que se describen a continuación.

A. *PCR* en tiempo final

En la presente tesis, se utilizó un único ciclado para las distintas reacciones de *PCR* en tiempo final realizadas, que se describe a continuación en la tabla 5.

Tabla 5. Ciclado de *PCR*.

Etap	Temperatura	Tiempo	
Pre-desnaturalización	95°C	30 segundos	
Desnaturalización	95°C	10 segundos	
<i>Annealing</i>	60°C	30 segundos	x30
Extensión	72°C	60 segundos	
Extensión final	72°C	10 minutos	
Almacenamiento	4°C	∞	

El mix de *PCR* se realizó según el protocolo del fabricante de la enzima *Taq DNA polimerasa* utilizada (Thermo Scientific™, #EP0402); de acuerdo con ello se calcularon los volúmenes necesarios para realizar una reacción en un volumen final de 25 µL (Tabla 6).

Tabla 6. Reacción de *PCR* para la enzima *Taq DNA polimerasa* de Thermo Scientific™.

Reactivo	Mix 1X
<i>Buffer Taq KCl</i>	2.5 µL

Mix <i>dNTPs</i> 2 mM	2.5 µL
Primer <i>forward</i>	1.25 µL
Primer <i>reverse</i>	1.25 µL
MgCl ₂ 25 mM	1.5 µL
<i>Taq DNA polimerasa</i>	0.125 µL
Agua libre de <i>DNAsas</i>	15.375 µL

Por último, al mix de *PCR* se le agregaron 0.5 µL del *DNA* de interés o de agua libre de *DNAsas* para el caso del control negativo.

B. Producción de células electrocompetentes

Con el fin de transformar células por electroporación para introducir el *DNA* de interés, se deben generar células electrocompetentes. Para ello, se inoculan 15 mL de medio de cultivo LB con una colonia de *E. coli* BL21(DE3) o de *E. coli* BL21(DE3) Rosetta, y se incuba *ON* a 37°C y 200 rpm. Al día siguiente, se inocularon 250 mL de medio LB con 1 mL del precultivo, se incubaron a 37°C y 200 rpm hasta alcanzar una OD₆₀₀ de 0.6 y se colocó el matraz en hielo por 15 minutos. Luego, se repartió el volumen en 6 Falcon de 50 mL para realizar cuatro centrifugaciones a 1000 *xg* por 10 minutos a 4°C. Luego de cada una, se resuspendieron los pellets en distintos volúmenes de Glicerol 10% (40, 20, 10 y aproximadamente 1 mL, respectivamente). Se alicuotaron las células de a 50 µL en microtubos estériles de 0.5 mL y se almacenaron a -80°C.

C. Transformación por electroporación

Se incubaron en hielo durante un minuto 40 µL de células electrocompetentes con 1 µL del *DNA* de interés, así como también las celdas de electroporación de 0.1 cm de ancho (Sigma-Aldrich® #Z706078-50EA). Luego, se transfirió el volumen a dicha celda y se aplicó el pulso eléctrico del programa EC1 en el electroporador *Bio-Rad MicroPulser 165-210*. A continuación, se añadió 1 mL de medio SOC, se recolectaron las células

electroporadas y se recuperaron a 37°C y 200 rpm durante 1 hora. Las bacterias se plaquearon en medio LB agar suplementado con Kanamicina para el caso de *E. coli* BL21(DE3) y Kanamicina y Cloranfenicol para *E. coli* BL21(DE3) Rosetta. Además, se realizó un control negativo y un control de viabilidad creciendo bacterias electroporadas con 1 µL de agua en vez de *DNA*, en medio LB con antibiótico y sin antibiótico, respectivamente. Las placas se incubaron 24 horas en estufa a 37°C.

D. Electroforesis de proteínas *SDS-PAGE*

Para poder analizar fracciones proteicas por *SDS-PAGE*, se realizó un gel de poliacrilamida de 1 mm de espesor, partiendo de la solución de poliacrilamida 30%, conformada por 29% de acrilamida y 1% de bisacrilamida (N,N'-metilén-bis-acrilamida). El porcentaje del gel separador utilizado fue de 15% y tanto dicho gel como el concentrador, se prepararon según se indica en las tablas A8-9 y A8-10 respectivamente del libro *Antibodies: A Laboratory Manual* (Harlow, E. and Lane, D.). Por otra parte, se preparan las muestras a cargar, añadiendo *buffer* de carga reductor 6X a las muestras, que luego son termostatzadas durante 5 minutos a 100°C para contribuir en la desnaturalización de las proteínas y reducir los puentes disulfuro. En cuanto al marcador de peso molecular, durante esta tesis se utilizó el *AccuRuler RGB Plus Prestained Protein Ladder* (MaestroGen Inc., #02102-250), el *Prestained Protein Ladder Broad Range* (NEB®, #P7703), el *PageRuler™ Prestained Protein Ladder* (Thermo Scientific™, #26616), y el *PageRuler™ Unstained Low Range Protein Ladder* (Thermo Scientific™, #26632), de acuerdo con su disponibilidad en el laboratorio; sembrando 5 µL en cualquiera de los casos.

Para correr el gel, se utilizó *buffer* Tris-glicina 10X, una cuba de electroforesis Bio-Rad Mini-PROTEAN® y se ajustó el voltaje a 120V. Una vez finalizada la corrida, se tiñó el gel con Azul de Coomassie, se lavó con agua destilada y se destiñó con la solución decolorante correspondiente. En este último paso, se cambió la solución decolorante cuando la misma se saturó de colorante.

Finalmente, se utilizó el *software* GelCapture y el equipo E-Gel™ Imager System (Thermo Scientific™, #4466611) para registrar el resultado obtenido.

E. Electroforesis de *DNA*

Para poder analizar muestras de *DNA*, se preparó un gel de agarosa en *buffer TAE* 0.5X, del porcentaje requerido según el tamaño del *DNA* a analizar, y utilizando el agente intercalante *GoodView™* (SBS Genetech Co. Ltd., %HGV-2). Se utilizó el marcador de peso molecular *GeneRuler DNA Ladder Mix* (Thermo Scientific™, #SM0331) y se sembraron las muestras con *buffer* de carga *Gel Loading Dye Purple (6X)* (NEB®, #B7024S). El gel se corre utilizando *buffer TAE* 0.5X en una cuba de electroforesis *Bioer Mini Run* (GE-100) a 100V y se revela utilizando el equipo Transiluminador UV 312 (#ZFD015).

F. Cuantificación de *DNA*

Con el fin de determinar la concentración de *DNA*, se midió la absorbancia a 260 nm en el lector de microplaca Infinite® M200 PRO NanoQuant (Tecan), utilizando la placa NanoQuant Plate™ y el software i-control™.

G. Diálisis de fracciones proteicas

Para remover el imidazol presente en las muestras y evitar que afecte la cuantificación y ensayos posteriores, las fracciones fueron dializadas utilizando una membrana con corte en 14 kDa (Sigma-Aldrich®, #D6191-25EA). Para ello, se repartió el volumen en microtubos de 1.5 mL conteniendo cada uno 500 µL de muestra y el *buffer* de diálisis (*PBS* 1X) se cambió cada 24 horas por 2 días, manteniéndose en agitación y a 4 °C durante ese tiempo.

VI. Soluciones, *buffers* y medios de cultivo

A. Soluciones

1. Soluciones estériles

Las soluciones mencionadas a continuación fueron filtradas con filtros Millex-GV de 0.22 μm , bajo flujo laminar, a excepción del glicerol 10% que fue esterilizado en autoclave, durante 20 minutos a 121°C.

Kanamicina 50 mg/mL: 0.5 g de Kanamicina en 10 mL de agua mQ.

Cloranfenicol 34 mg/mL: 0.34 g de Cloranfenicol en 10 mL de isopropanol.

IPTG 1 M: 2.389 g de *IPTG* en 10 mL de agua mQ.

IPTG 10 mM: 0.2389 g de *IPTG* en 10 mL de agua mQ.

Glucosa 40%: 400 g de glucosa en 1 L de agua mQ.

Glicerol 10%: 45 mL de glicerol en 405 mL de agua mQ.

2. Soluciones no estériles

Colorante Azul de Coomassie: 0.25 g de Coomassie R250 en 100 mL de metanol: agua destilada: ácido acético en relación volumétrica 5:4:1.

Solución decolorante de Coomassie: Solución con una relación volumétrica metanol: agua destilada: ácido acético de 3:6:1.

Poliacrilamida 30%: 29 g de acrilamida y 1 g de bisacrilamida en 100 mL de agua destilada.

EDTA 0.5M: 9.305 g en 50 mL de agua mQ, pH 8.

Sulfato de níquel (NaH_2PO_4) 100 mM: 2.628 g de $\text{NiSO}_4 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ en 100 mL de agua mQ.

Solución de carga 0.1 M NiSO_4 : 2.63 g NiSO_4 en 200 mL de agua mQ.

BSA 1%: 1 g de BSA en 100 mL de PBS 1X.

PBS-Tween 0.05%: 250 μL de Tween 20 en 500 mL de PBS 1X.

TMB: 60 mg de TMB en 10 mL de DMSO

H_2O_2 3%: 1 mL de H_2O_2 30 volúmenes en 9 mL de agua mQ.

H_2SO_4 2N: 23.5 mL de H_2SO_4 17 M en 200 mL de agua destilada.

Sustrato *HRP*: 12.5 mL de *buffer* acetato de sodio 0.1 M, 200 μL TMB y 50 μL H_2O_2 3%.

PMSF 1 M: 0.174 g de *PMSF* en 10 mL de isopropanol.

Urea 8 M: 7.2 g de urea en 15 mL de agua destilada.

B. Buffers

Tris-Glicina 10X: Tris base 0.25 M, glicina 1.92 M y SDS 1 %, pH 8.4.

Buffer Tris-HCl 1 M pH=6.8: 30.2 g $C_4H_{11}NO_3$ en 250 mL de agua destilada.

Buffer Tris-HCl 1.5 M pH=8.8: 45.4 g $C_4H_{11}NO_3$ en 250 mL de agua destilada.

PBS 10X: KH_2PO_4 18 mM, Na_2HPO_4 100 mM, NaCl 1.37 M y KCl 27 mM, pH 7.4.

Tris Acetato EDTA (TAE) 50X: Tris base- HCl 2 M, CH_3COOH 1 M, EDTA 50 mM, pH 8.0.

Buffer de carga reductor 6x: Tris base- HCl 300 mM pH 6.8, SDS 12 %, glicerol 30 %, azul de bromofenol 0.6 % y ditioneitol 600 mM.

Buffer A (IMAC): NaH_2PO_4 50 mM, NaCl 300 mM, imidazol 20 mM, pH 8.

Buffer B (IMAC): NaH_2PO_4 50 mM, NaCl 300 mM, imidazol 500 mM, pH 8.

Buffer de stripping: 0.02 M NaH_2PO_4 , 0.5 M NaCl y 0.05 M EDTA.

Buffer acetato de sodio 0.1 M pH=5.5: CH_3COOH 15,4 mM, $CH_3COONa \cdot 3H_2O$ 84.6 mM.

C. Medios de cultivo

Los medios de cultivo, luego de masar sus componentes en balanzas de precisión, disolverlos en agua destilada, ajustar el pH y enrasar al volumen final, fueron esterilizados en autoclave durante 20 minutos a 121°C.

LB: 10 g/L triptona, 5 g/L extracto de levadura y 10 g/L cloruro de sodio.

LB agar: medio LB suplementado con 15 g/L de agar bacteriológico.

SOB: 20 g/L triptona, 5 g/L extracto de levadura, 0.5 g/L cloruro de sodio, 2.5 mM cloruro de potasio, 10 mM cloruro de magnesio y 10 mM sulfato de magnesio.

SOC: medio SOB suplementado con 20 mM glucosa.

YES: 30 g/L de glucosa y 5 g/L de extracto de levadura.

Resultados y Discusión

I. Puesta a punto de la producción del V_HH B₃4

A. Producción de B₃4 en *E. coli* BL21(DE3) a escala de laboratorio

En el comienzo de esta tesis de grado, mientras se esperaba la llegada de los V_HHs de interés, se buscó la familiarización con los procesos que se llevarían a cabo más adelante. Para ello, se quiso poner a punto la expresión del V_HH B₃4 generado en la tesis de *Bernasconi, Lorente y Ripoll* (30), ya que dichas condiciones podrían extrapolarse a los V_HHs anti-fGlcCer.

Tras electroporar células de *E. coli* BL21(DE3) electrocompetentes con la *miniprep* del V_HH B₃4, se seleccionaron tres colonias para inducir la expresión de dicha proteína imitando las condiciones óptimas determinadas por *Bernasconi, Lorente y Ripoll* (30), como se describe en la sección I. A. de Metodología.

Al analizar las fracciones solubles obtenidas en este primer experimento mediante una electroforesis *SDS-PAGE*, se observó una banda más intensa correspondiente al peso molecular del V_HH (aproximadamente 15 kDa) (Figura 5, carriles c-h), que está ausente en la muestra de *E. coli* BL21(DE3) sin transformar (Figura 5, carril b). Por lo tanto, la proteína de interés fue expresada en todas las colonias analizadas, observándose en las fracciones inducidas con *IPTG*, así como en aquellas sin inducir.

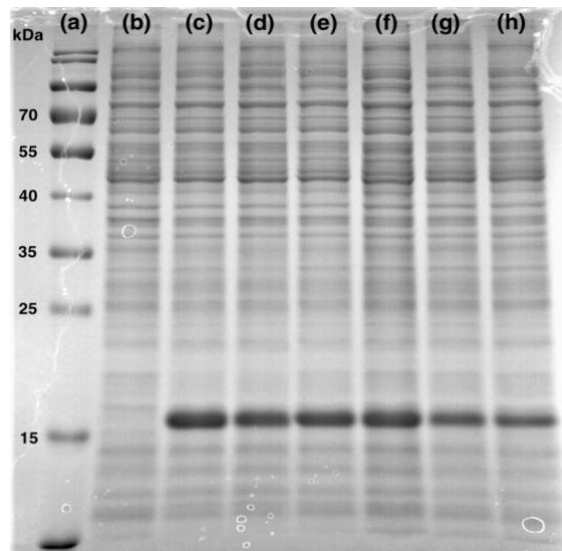


Figura 5. Evaluación de la expresión a escala pequeña de tres colonias del V_HH B₃4 mediante electroforesis SDS-PAGE. Carril a: *PageRuler™ Prestained Protein Ladder*; Carril b: control negativo (*E. coli* BL21(DE3) sin transformar); Carriles c-e: colonias 1-3 sin inducir; Carriles f-h: colonias 1-3 inducidas con 3 μ M de IPTG.

Como siguiente paso, se quiso repetir el experimento utilizando una de las colonias positivas observadas en la figura 5 pero aumentando la escala a 250 mL. Lamentablemente, dicho experimento no arrojó resultados positivos y esa tendencia continuó en los experimentos siguientes.

Durante semanas se estudiaron otras condiciones de inducción, como un gradiente de concentración de IPTG, se modificaron las células electrocompetentes, la temperatura y el tiempo de incubación, e incluso se analizó la fracción insoluble para determinar si la proteína estaba formando cuerpos de inclusión. Esto se puede visualizar en la figura 6; la figura 6A muestra las fracciones inducidas con un gradiente de concentraciones de IPTG (0 μ M, 3.2 μ M, 16 μ M, 80 μ M, 0.4 mM, 2 mM y 10 mM), la figura 6B expone los resultados obtenidos de seis inducciones realizadas a partir de precultivos que contenían, cada uno, cinco colonias diferentes y con una concentración de IPTG de 10 mM, y en la figura 6C se aprecian los resultados de las muestras tomadas a las 2 horas de la inducción con gradiente de IPTG (3, 10, 30 y 200 μ M, y 1 mM) a 25 y 37 °C. En ninguna de todas las condiciones mencionadas se observó expresión de B₃4. Una de las teorías manejadas debido al por qué pudo haber sucedido esta pérdida de expresión, fue que hayan ocurrido posibles cambios en la metilación del DNA que impidieran la correcta expresión. Por ello,

finalmente se decidió volver a clonar el V_HH en el vector de expresión pET28a y evaluar si este proceso restauraba la expresión de B₃4.

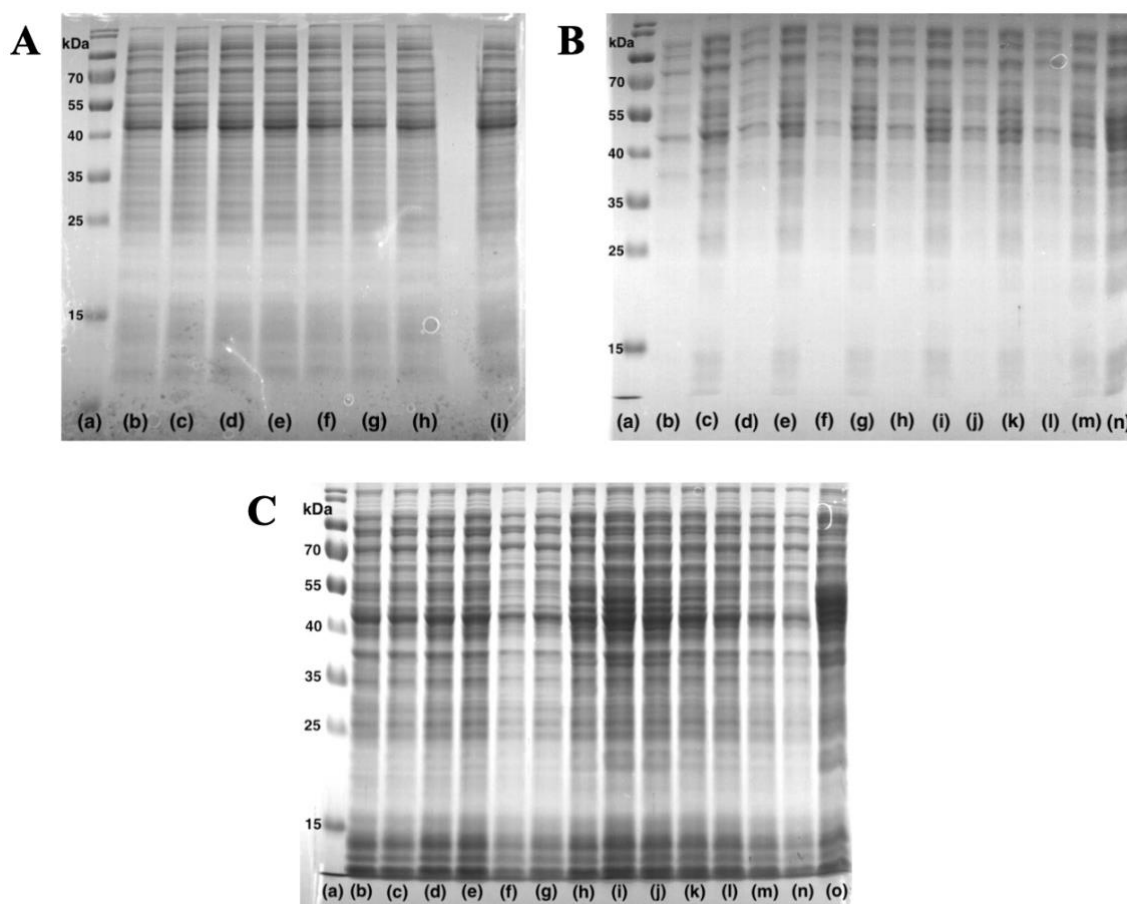


Figura 6. Análisis por electroforesis *SDS-PAGE* de distintas condiciones de expresión del V_HH B₃4. En **A**, **B** y **C**: Carril a: *PageRuler™ Prestained Protein Ladder*. En **A**: inducción con distintas concentraciones de *IPTG*; Carriles b-h: concentración de 0 μ M, 3.2 μ M, 16 μ M, 80 μ M, 0.4 mM, 2 mM y 10 mM, respectivamente; Carril i: control negativo (*E. coli* BL21(DE3) sin transformar). En **B**: resultados de la inducción a partir de precultivos que contenían una mezcla de cinco colonias; Carriles b y c: colonia 1 con 10 μ M y 0 μ M; Carriles d y e: colonia 2 con 10 μ M y 0 μ M; Carriles f y g: colonia 3 con 10 μ M y 0 μ M; Carriles h e i: colonia 4 con 10 μ M y 0 μ M; Carriles j y k: colonia 5 con 10 μ M y 0 μ M; Carriles l y m: colonia 6 con 10 μ M y 0 μ M; Carril n: control negativo (*E. coli* BL21(DE3) sin transformar). En **C**: inducción con gradiente de concentración de *IPTG* durante 2 horas a 25 y 37°C; Carriles b-g: gradiente de *IPTG* (3, 10, 30 y 200 μ M, y 1 mM) incubadas a 25°C; Carril h: control negativo (*E. coli* BL21(DE3) sin transformar) incubado a 25°C; Carriles i-n: gradiente de *IPTG* (3, 10, 30 y 200 μ M, y 1 mM) incubadas a 37°C; Carril o: control negativo (*E. coli* BL21(DE3) sin transformar) incubado a 37°C.

B. Clonado de B₃4 en el vector de expresión pET28a

Por las razones explicadas anteriormente, se volvió a clonar el V_{HH} en el vector pET28a (+) con el protocolo detallado en la sección I. B. de Metodología.

Luego de realizar la digestión con la enzima de restricción *SfiI*, se purificó y cuantificó el *DNA* por duplicado, y se obtuvo como resultado una concentración de 19.7 ng/μL. Esto corresponde a 157.6 ng en el volumen total con el que se contaba (8 μL), y en función de este valor se realizaron los cálculos para la reacción de ligación.

Una vez ligado el gen de interés en el vector de expresión, se procedió a electroporar células *E. coli* DH5α con la construcción obtenida, con el control negativo y con el control de religación. En ninguno de los controles mencionados se obtuvieron colonias, mientras que en la placa correspondiente a *E. coli* DH5α + B₃4, sí. Por otro lado, se transformaron células de *E. coli* BL21(DE3) con el control negativo y con la nueva construcción, obteniéndose en ambos casos los resultados esperados. A partir de dos colonias crecidas en la placa de *E. coli* BL21(DE3) + B₃4, se indujo la expresión con 0, 10 y 500 μM de *IPTG* en 3 mL de cultivo. Se analizaron las fracciones solubles mediante una electroforesis *SDS-PAGE* y en ningún caso se observó expresión de la proteína de interés (Figura 7).

Debido a estos resultados negativos, y habiendo descartado un problema con el vector de partida, se decidió modificar la cepa de expresión y comenzar a utilizar células de *E. coli* BL21(DE3) Rosetta.

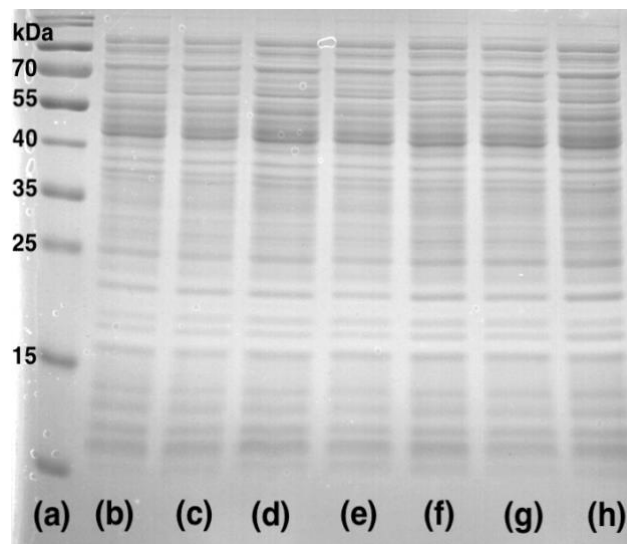


Figura 7. Análisis por electroforesis *SDS-PAGE* de la expresión del V_HH B₃4 con 0, 10 y 500 μ M de *IPTG*. Carril a: *PageRuler™ Prestained Protein Ladder*; Carril b: control negativo (*E. coli* BL21(DE3) sin transformar); Carriles c-e: gradiente de *IPTG* en la colonia 1, 0, 10 y 500 μ M de *IPTG* respectivamente; Carriles f-h: gradiente de *IPTG* en la colonia 2, 0, 10 y 500 μ M de *IPTG* respectivamente.

C. Producción y purificación de B₃4 en *E. coli* BL21(DE3) Rosetta

Con el objetivo de evaluar si en esta nueva cepa se lograba expresar el V_HH, se indujo la expresión de cinco colonias que crecieron en medio LB+Kanamicina+Cloranfenicol tras la transformación de células de *E. coli* BL21(DE3) Rosetta con el constructo que contiene a B₃4. En este caso, se realizó un gradiente de concentraciones de *IPTG* (0, 3, 9, 27 y 81 μ M) para poder determinar la condición óptima de expresión. Luego de realizar el procesamiento necesario, se corrieron las fracciones solubles en cinco electroforesis *SDS-PAGE*, una correspondiente a cada colonia (Figura 8). En las colonias 1, 2 y 4 (Figura 8A, B y D, respectivamente) se observó la banda en el peso molecular adecuado que indica expresión de la proteína de interés con intensidad similar en las fracciones correspondientes a 0, 3 y 9 μ M de *IPTG*, y con una intensidad significativamente menor en la fracción de inducción con 27 μ M. En la colonia 5, la banda está presente en las mismas tres fracciones, pero con una intensidad mayor en la que corresponde a 9 μ M de *IPTG* (Figura 8E). A su vez, en las colonias 1, 2 y 5 no se observó dicha banda en el carril correspondiente a la inducción con 81 μ M de *IPTG*, mientras que en la colonia 4 si se observó y con una intensidad similar a la banda de 27 μ M. En el caso de la colonia 3 (Figura 8C), la banda del peso molecular esperado está presente en las

fracciones de 0, 3, 9 y 27 μM de *IPTG*, siendo la de 9 μM la más intensa. También está ausente en la fracción de 81 μM . Esta ausencia se puede deber a que un exceso en la concentración de *IPTG* puede llevar al enlentecimiento y posible detención del crecimiento celular porque el metabolismo celular se centra en la expresión de la proteína recombinante, y a la producción de proteínas insolubles que forman cuerpos de inclusión (34).

En base a los resultados obtenidos, se realizaron los ensayos siguientes con una concentración de *IPTG* de 9 μM . Esto se debe, por un lado, a la mayor intensidad en la banda correspondiente a dicha concentración en las colonias 3 y 5, y por otro, a que si bien con 3 μM se observa expresión, se decide no utilizar el mínimo de concentración de *IPTG*.

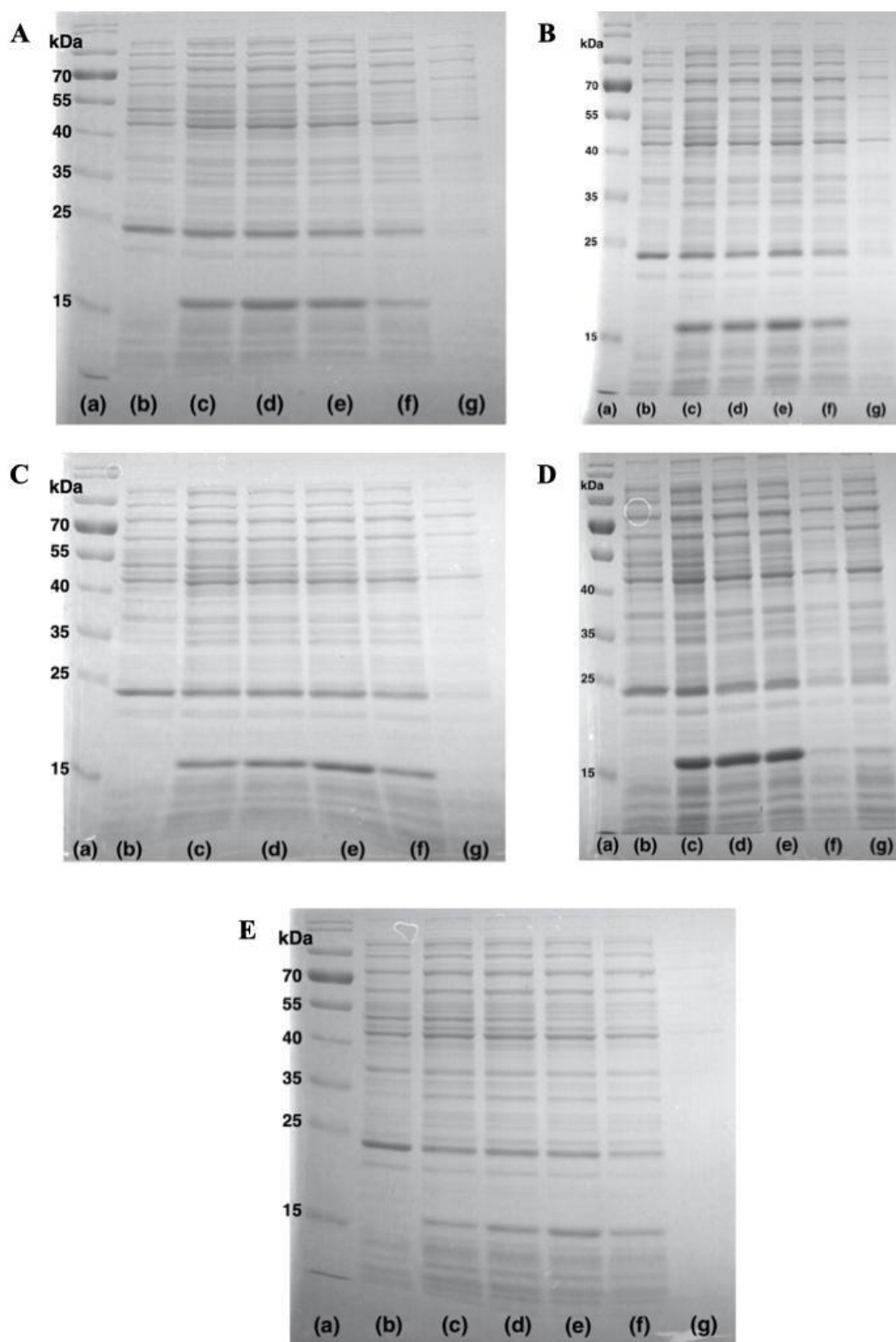


Figura 8. Evaluación por electroforesis *SDS-PAGE* de la expresión de B₃₄ en cinco colonias. En **A**: colonia 1; en **B**: colonia 2; en **C**: colonia 3; en **D**: colonia 4; en **E**: colonia 5. En **A**, **B**, **C**, **D** y **E**: Carril a: *PageRuler™ Prestained Protein Ladder*; Carril b: control negativo (*E. coli* BL21(DE3) Rosetta sin transformar); Carriles c-g: muestras inducidas con 0, 3, 9, 27 y 81 μ M de *IPTG*.

A continuación, se indujo la expresión en escala de matraz con el fin de obtener una mayor cantidad de proteína capaz de ser purificada. Para ello, se inocularon 250 mL de medio de cultivo con una proporción 1/25 de precultivo y se indujo la expresión con 9 μ M de IPTG. Una vez realizado el proceso correspondiente, se ajustó el programa de sonicación a este volumen mayor para lograr lisar todas las células presentes y así liberar efectivamente la proteína de interés al medio de cultivo. Luego, al igual que en los casos anteriores, se analizaron las fracciones de proteínas solubles en una electroforesis SDS-PAGE (Figura 9). Allí se observó la expresión de la proteína de interés en las dos fracciones sonicadas, y su ausencia en la muestra correspondiente a *E. coli* BL21(DE3) Rosetta sin el plásmido que contiene a B₃4.

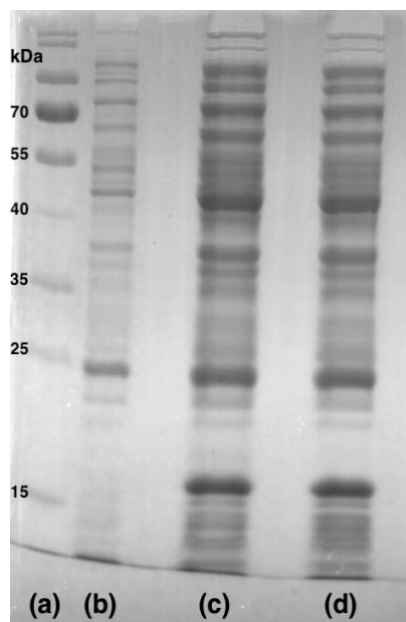


Figura 9. Análisis mediante electroforesis SDS-PAGE de las dos fracciones sonicadas tras inducir la expresión del V_HH B₃4 en 250 mL, con 9 μ M de IPTG. Carril a: *PageRuler™ Prestained Protein Ladder*; Carril b: control negativo (*E. coli* BL21(DE3) Rosetta sin transformar); Carril c: fracción A obtenida de la sonicación; Carril d: fracción B obtenida de la sonicación.

Con el resultado de la expresión de B₃4, se procedió a purificar la proteína por FPLC-IMAC utilizando un método de elución en gradiente. No se obtuvo un pico definido como era esperado, de igual forma se decidió evaluar esas fracciones por electroforesis (Figura 10).

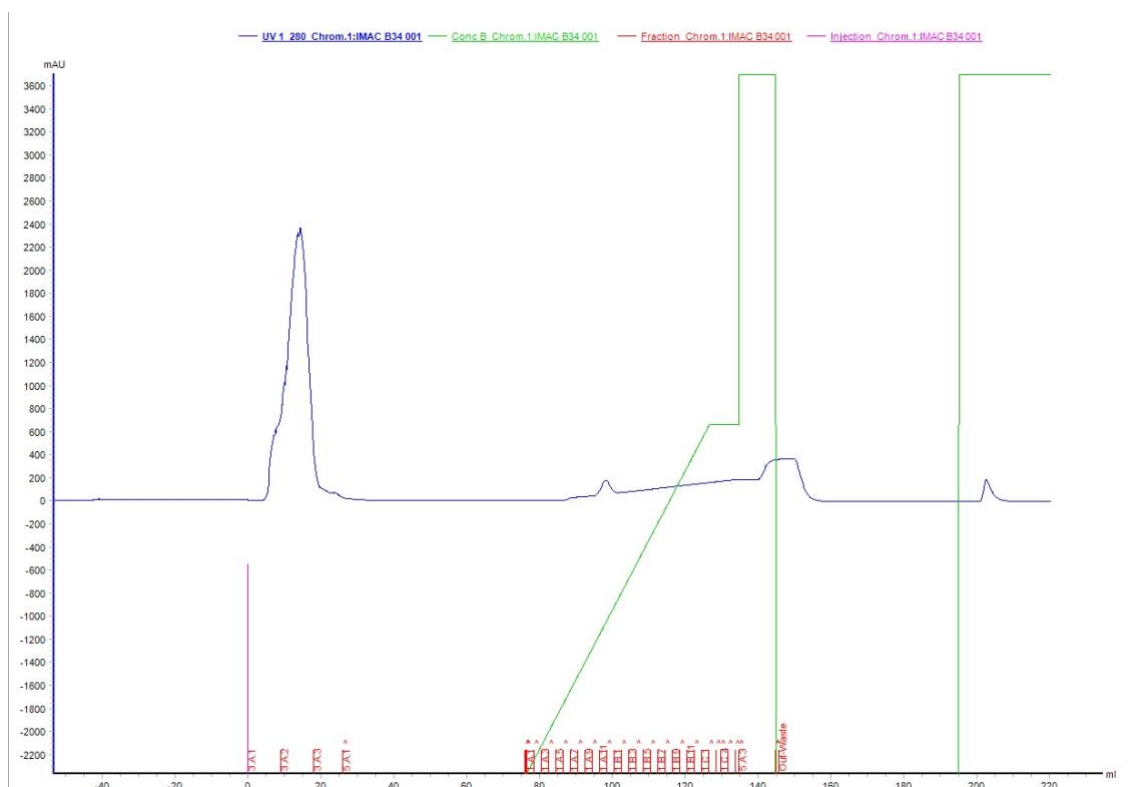


Figura 10. Cromatograma obtenido mediante el *software* UNICORN 7.0 a partir de la purificación del V_HH B₃4 mediante *FPLC-IMAC* en el equipo ÄKTA Avant™. En el eje de las abscisas se representa el volumen de las fracciones en mL, y en el eje de las ordenadas se representa el valor de absorbancia en mUA. El gráfico en color azul representa la absorbancia a 280 nm, la línea de color verde representa el porcentaje de *buffer B*, y la línea de color rosado marca el punto de aplicación de la muestra y el inicio de la recolección de las fracciones. En color rojo se indica el nombre de cada fracción colectada.

Una vez recolectadas las fracciones de interés, las mismas fueron cargadas en un gel de poliacrilamida para identificar aquellas fracciones que presentan la proteína de interés. En este caso, se observó una banda de intensidad fuerte en las dos fracciones pertenecientes al pico principal, y una banda de menor intensidad en el pre-pico, en el peso molecular esperado (Figura 11).

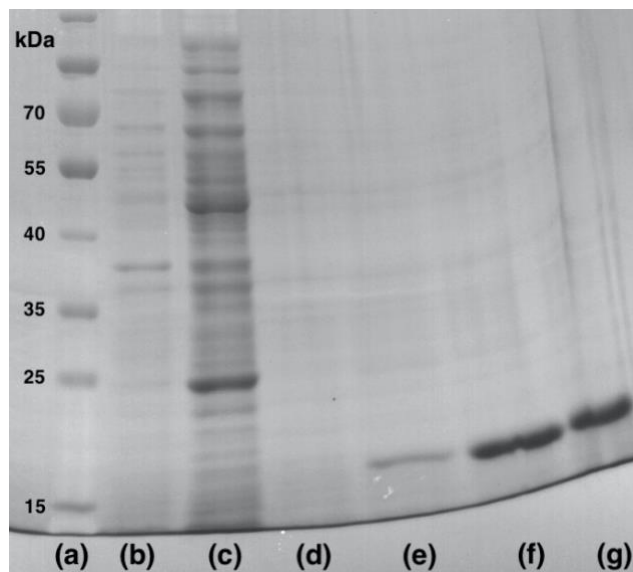


Figura 11. Análisis de las fracciones obtenidas tras la purificación de B₃4 mediante *FPLC-IMAC*. Carril a: *PageRuler™ Prestained Protein Ladder*; Carriles b y c: percolado (fracciones 3A1 y 3A2, respectivamente); Carril d: lavado (fracción 5A1); Carril e: pre-pico (fracción 1A10); Carriles f y g: pico (fracciones 1A11 y 1A12, respectivamente).

En base a lo obtenido en la Figura 10, se dializaron las tres fracciones que demostraron contener al V_HH con el fin de cambiar el buffer en el que está resuspendida la proteína, eliminando el imidazol utilizado para la purificación. El objetivo de esto fue familiarizarse con el método de diálisis, ya que una vez restablecida la expresión se decidió volcar los esfuerzos a producir los V_HHs de interés y que competen a esta tesis.

II. Selección y clonado de V_HH monoespecíficos y biespecíficos

Con el objetivo de clonar los V_HHs de interés en el vector de expresión, se transformaron células de *E. coli* DH5 α con el vector pUC57 por electroporación, y se realizó *miniprep* de cuatro colonias transformadas. Luego, se amplificó el *DNA* para introducir los sitios de corte de la enzima de restricción *Sfi*I, y se corrieron los productos en un gel de agarosa 1% y 2% para los V_HHs monoespecíficos y biespecíficos, respectivamente. En primer lugar, se corrieron el 56F11 y el biespecífico anti-hongo-hoja en un gel de agarosa 1% (Figura 12A), y si bien se observaron las bandas de interés, se decidió analizar el biespecífico en un gel 2% para evaluar si se obtenía una mayor separación entre las dos bandas (Figura 12B). Estas dos bandas, una de aproximadamente 800 *bp* y una de aproximadamente 400 *bp*, corresponden al biespecífico y al V_HH 41D01

respectivamente. Esto se debe, como se explicó anteriormente, a que cada biespecífico está formado por un V_HH anti-hoja y el 41D01 unidos por un *linker*, y debido a que los V_HHs poseen dominios conservados, los primers 41-56 Fw y Rv diseñados son capaces de amplificar tanto al 41D01 como a la unión de éste con el anti-hoja.

El paso siguiente consistió en purificar y cuantificar el *DNA* para poder realizar las reacciones de digestión. Así, se obtuvieron las siguientes concentraciones; 28.52 ng/μL de 41D01, 17.08 ng/μL de 56F11, 20.24 ng/μL del anti-hongo-hoja y 23.2 ng/μL del anti-hoja-hongo. Luego de la digestión enzimática, las fracciones fueron corridas en un gel de agarosa, purificadas y cuantificadas. En este caso, las concentraciones obtenidas fueron 89.36 ng/μL para el 41D01, 51.52 ng/μL para el 56F11, 30.3 ng/μL para el biespecífico anti-hongo-hoja y 32.6 ng/μL para el anti-hoja-hongo. A partir de estos valores, se realizó la ligación de cada V_HH en el vector de expresión pET28a (+) digerido, purificado y desfosforilado. Al culminar la ligación y contar con los V_HHs clonados en el vector de expresión pET28a, se procedió a electroporar células de *E. coli* BL21(DE3) Rosetta con dichas construcciones y también se realizó un control de religación. En todos los casos menos en este último, se obtuvieron colonias.

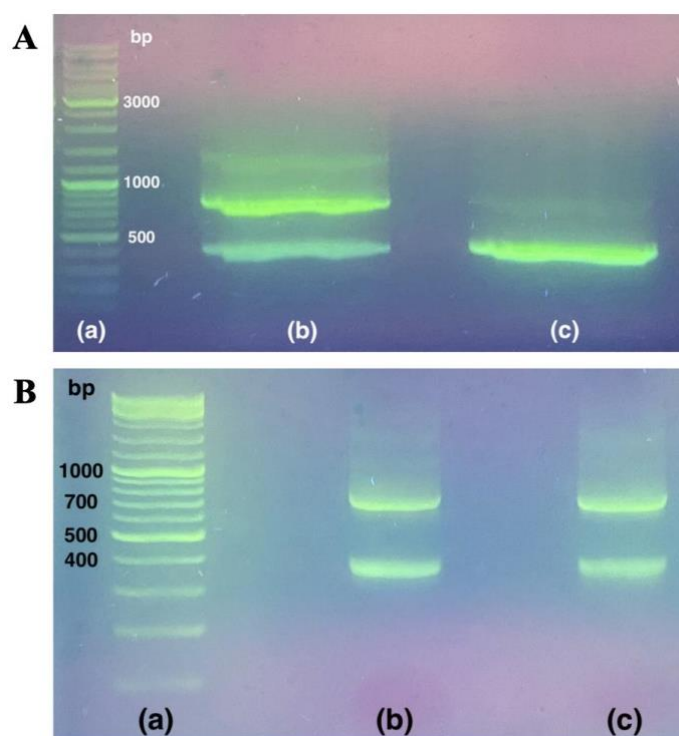


Figura 12. Visualización en gel de agarosa de los productos obtenidos de la *PCR* de los V_HHs de interés que introdujo los sitios de corte para la enzima de restricción *Sfi*I. En **A** y **B**: Carril a:

GeneRuler DNA Ladder Mix. En **A**: electroforesis en gel de agarosa 1%; Carril b: nanoanticuerpo biespecífico anti-hongo-hoja; Carril c: nanoanticuerpo monoespecífico 56F11. En **B**: electroforesis en gel de agarosa 2%; Carril b: nanoanticuerpo biespecífico anti-hongo-hoja; Carril c: nanoanticuerpo biespecífico anti-hoja-hongo.

III. Producción de nanoanticuerpos monoespecíficos anti-fGlcCer a escala piloto y de laboratorio

A. Electroporación de Rosetta con las construcciones generadas y selección de clones positivos para el inserto

Se buscó evaluar la presencia de los V_HHs monoespecíficos en doce colonias de *E. coli* BL21(DE3) Rosetta transformadas con las construcciones generadas como se describe en la sección III. A. de Metodología. Los productos de *PCR* obtenidos se analizaron en un gel de agarosa 1% que se muestra en la figura 13A.

De las cinco colonias evaluadas para la presencia del 41D01, en todas se observó la presencia de la banda correspondiente a los pares de bases de los V_HHs monoespecíficos (Figura 13A, carriles b-f), siendo más tenue la intensidad en el carril correspondiente a la colonia 5 debido a que se sembró una menor cantidad de muestra en el gel (Figura 13A, carril f). Lo mismo sucedió para las cinco colonias transformadas con el plásmido conteniendo al 56F11, todas presentaron la banda de interés de aproximadamente 400 *bp* (Figura 13A, carriles g-k). En el caso del control positivo utilizado, el plásmido pET28a-6P, se amplificó el V_HH que presenta tanto con *primers* específicos para él como con los *primers* 41-56 Fw y 41-56 Rv, diseñados para los V_HHs de interés. En la figura 13A carril k, se observa la amplificación de 6P con sus *primers* específicos, y en la figura 13B carril b, la amplificación con los 41-56 Fw y Rv. Por las diferencias entre las bandas obtenidas, se observa como los *primers* 41-56 Fw y Rv son específicos para el 41D01 y el 56F11 y no así para el 6P, ya que, si bien existe amplificación, esta está dada por la presencia de dominios conservados en todos los V_HHs. En cambio, al utilizar los *primers* específicos de 6P, este se amplificó en igual medida que el 41D01 y el 56F11 con los *primers* diseñados para ellos.

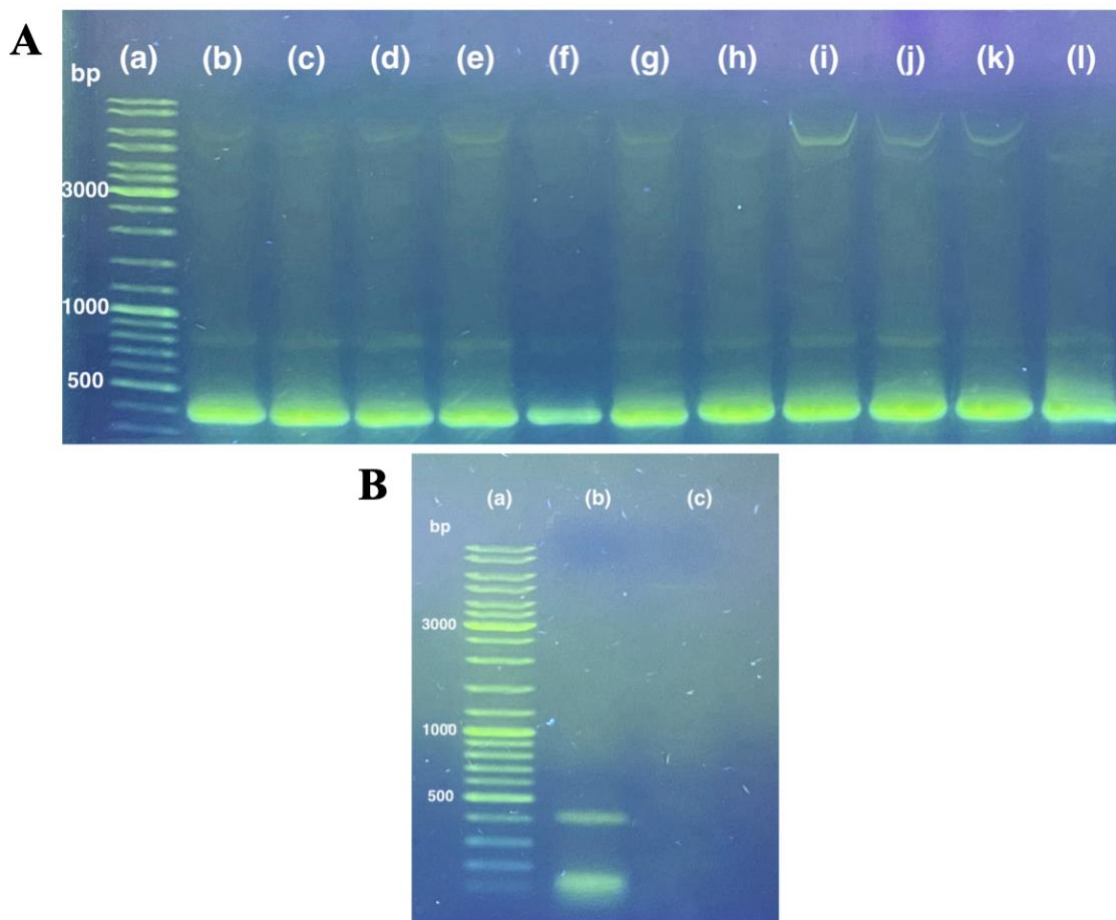


Figura 13. Visualización en gel de agarosa 1% de la presencia de los V_HHs monoespecíficos en las colonias seleccionadas. En **A** y **B**: Carril a: *GeneRuler DNA Ladder Mix*. En **A**: Carriles b-f: colonias 1-5 del 41D01; Carriles g-k: colonias 1-5 del 56F11; Carril l: amplificación del V_HH 6P con *primers* específicos para él. En **B**: Carril b: amplificación del V_HH 6P con *primers* 41-56 Fw y Rv; Carril c: control negativo.

B. Producción de 41D01 y 56F11 a escala pequeña

Una vez confirmada la presencia de los insertos de interés en las colonias transformadas, se buscó realizar una primera aproximación en la producción de los V_HH monoespecíficos, seleccionando dos colonias de las observadas en la figura 13A. En este caso se indujo la expresión en las colonias 1 y 4 de 41D01 y 1 y 4 de 56F11, evaluando concentraciones de 0 μ M y 9 μ M de *IPTG* ya que con la segunda se obtuvieron los mejores resultados de expresión del V_HH B₃₄ (sección I. C de Resultados y Discusión).

Luego de realizar el procesamiento correspondiente, sonicar las bacterias y liberar las proteínas al medio de cultivo, las fracciones analizadas fueron corridas en una electroforesis *SDS-PAGE* con el fin de observar si había expresión de los V_HH de interés (Figura 14).

En el caso del 56F11, se observó expresión en las dos colonias analizadas, tanto en las fracciones sin inducir como en las inducidas con 9 μ M de *IPTG* (Figura 14, carriles f-i), ya que existe la presencia en ellas de una banda en el peso molecular correspondiente a los V_HHs (alrededor de 15 kDa). Sin embargo, la expresión dada por la colonia 4 fue mayor que la de la colonia 1, observándose bandas de mayor intensidad en ella (Figura 14, carriles h e i), y en ambos casos no se observa diferencia en la expresión ante la presencia de *IPTG*. Por otro lado, no hubo expresión del 41D01 en ninguna de las colonias analizadas, dada la ausencia de bandas en el peso molecular deseado (Figura 14, carriles b-e). Esto también sucedió, como era esperado, en el caso del control negativo con *E. coli* BL21(DE3) Rosetta sin transformar (Figura 14, carriles j y k).

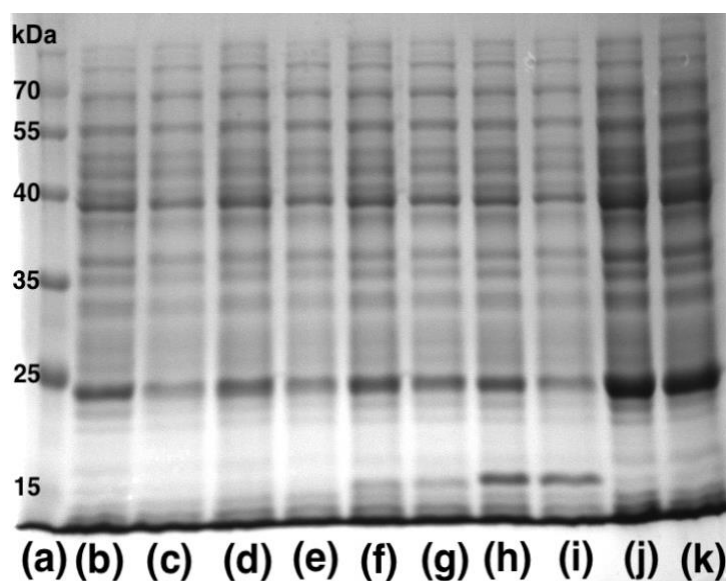


Figura 14. Evaluación mediante electroforesis *SDS-PAGE* de la inducción de tres colonias que contenían el plásmido con los V_HHs 56F11 y 41D01, con 9 μ M de *IPTG*. Carril a: *PageRuler*TM *Prestained Protein Ladder*; Carril b: colonia 1 41D01 0 μ M de *IPTG*; Carril c: colonia 1 41D01 9 μ M de *IPTG*; Carril d: colonia 4 41D01 0 μ M de *IPTG*; Carril e: colonia 4 41D01 9 μ M de *IPTG*; Carril f: colonia 1 56F11 0 μ M de *IPTG*; Carril g: colonia 1 56F11 9 μ M de *IPTG*; Carril h: colonia 4 56F11 0 μ M de *IPTG*; Carril i: colonia 4 56F11 9 μ M de *IPTG*; Carril j: control negativo 0 μ M de *IPTG* (*E. coli* BL21(DE3) Rosetta sin transformar); Carril k: control negativo 9 μ M de *IPTG* (*E. coli* BL21(DE3) Rosetta sin transformar).

Debido a la ausencia de expresión en las colonias seleccionadas para el primer experimento de expresión de 41D01, se decidió evaluar las otras tres colonias positivas observadas en la figura 13A utilizando las mismas condiciones de inducción. En este caso, como muestra la figura 15, sí hubo expresión del V_HH en todas las fracciones analizadas (carriles c-h). Pero a diferencia del 56F11, en las colonias 2 y 3 la inducción con 9 μ M de *IPTG* generó bandas más intensas correspondientes al peso molecular del 41D01 (Figura 15, carriles d y f).

Con los resultados obtenidos, se decidió seguir trabajando con la colonia 4 de 56F11 y se eligió la colonia 3 de 41D01. También se decidió utilizar una concentración de *IPTG* de 9 μ M para los experimentos de inducción posteriores, ya que demostró mejorar la expresión del segundo.

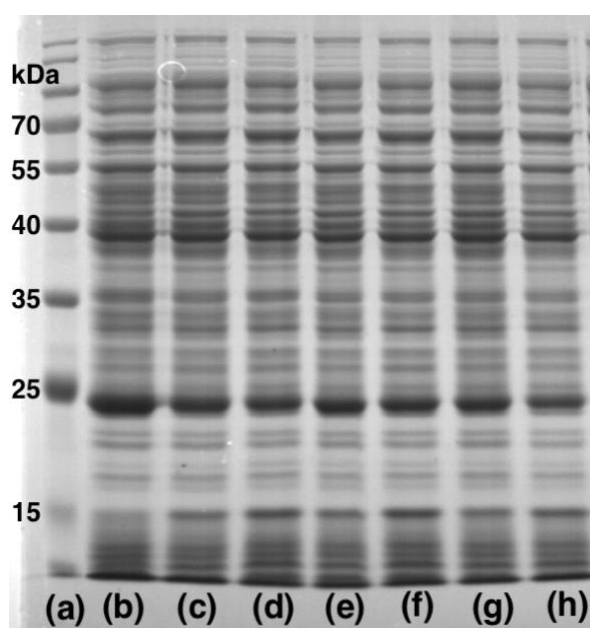


Figura 15. Evaluación mediante electroforesis *SDS-PAGE* de la inducción de tres colonias que contenían el plásmido con el V_HH 41D01, con 9 μ M de *IPTG*. Carril a: *PageRuler™ Prestained Protein Ladder*; Carril b: control negativo (*E. coli* BL21(DE3) Rosetta sin transformar); Carril c: colonia 2 41D01 0 μ M de *IPTG*; Carril d: colonia 2 41D01 9 μ M de *IPTG*; Carril e: colonia 3 41D01 0 μ M de *IPTG*; Carril f: colonia 3 41D01 9 μ M de *IPTG*; Carril g: colonia 5 41D01 0 μ M de *IPTG*; Carril h: colonia 5 41D01 9 μ M de *IPTG*.

C. Producción de los nanoanticuerpos biespecíficos

Como se describió en la sección III. C. de Metodología, se realizó una reacción de *colony PCR* de diez colonias del biespecífico anti-hongo-hoja y de siete colonias del biespecífico anti-hoja-hongo con el objetivo de verificar si efectivamente contenían el inserto de interés. Se decidió utilizar esta técnica debido a la cantidad de reacciones que se querían llevar a cabo, ya que ésta es más económica que una *PCR* convencional.

Al observar la figura 16 A y B, puede apreciarse que los resultados obtenidos con esta técnica no presentaron una buena resolución. A pesar de ello, se decidió igualmente inducir la expresión de cuatro colonias del biespecífico anti-hoja-hongo y de tres del biespecífico anti-hongo-hoja, en las que se vislumbraba una banda alrededor de los 800 *bp* que es el tamaño esperado para un nanoanticuerpo biespecífico. Al igual que anteriormente, las fracciones solubles obtenidas del proceso fueron analizadas en una electroforesis *SDS-PAGE*, y en este caso no hubo expresión ya que el patrón de bandas obtenido en las colonias transformadas es igual al del control de Rosetta sin transformar (resultado no mostrado). Lo que se esperaba obtener era una banda diferenciable en ellas, correspondiente al peso molecular de aproximadamente 30 kDa deseado para los biespecíficos.

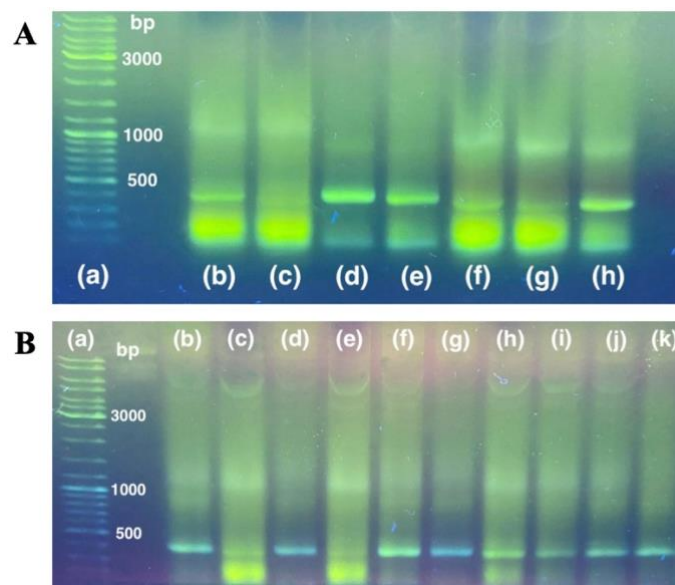


Figura 16. Verificación de la presencia del inserto mediante *Colony PCR*. En **A** y **B**: Carril a: *GeneRuler DNA Ladder Mix*. En **A**: carriles b-h: siete colonias del biespecífico anti-hoja-hongo. En **B**: carriles b-k: diez colonias del biespecífico anti-hongo-hoja.

Dados los resultados anteriores, se decidió probar nuevas células electrocompetentes de la cepa *E. coli* BL21(DE3) para evaluar si estas sí eran capaces de expresar los nanoanticuerpos biespecíficos; ya que un cambio de cepa fue lo que logró restaurar la expresión de B₃4 anteriormente. Tras la transformación de estas, se realizaron reacciones de *miniprep* tanto de colonias aisladas de *E. coli* BL21(DE3), como de las *E. coli* BL21(DE3) Rosetta transformadas anteriormente; ya que los resultados poco claros de la *colony PCR* pudieron haber llevado a evaluar colonias que no contenían el inserto de interés. Debido a ello también, en este caso se decidió evaluar la presencia del inserto a través de *PCR* convencional. Los resultados se observan en la figura 17 A y B, donde se confirmó la presencia de los biespecíficos en todas las colonias exceptuando la colonia 1 de *E. coli* BL21(DE3) + anti-hongo-hoja (Figura 17A, carril b). Esta confirmación fue dada por la presencia de una banda de alrededor de 800 *bp* en el resto de las colonias.

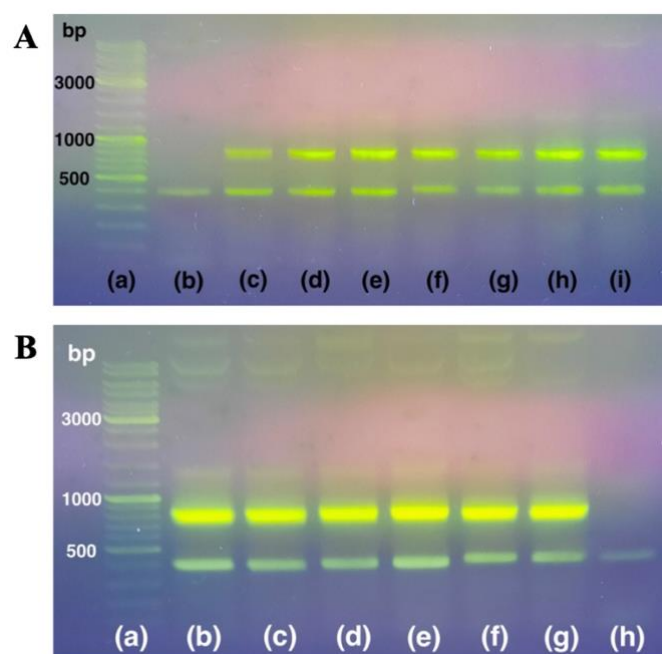


Figura 17. Visualización en gel de agarosa 1% de los productos de *PCR* obtenidos tras las reacciones de *miniprep*. En **A** y **B**: Carril a: *GeneRuler DNA Ladder Mix*. En **A**: Carriles b-e: clones de *E. coli* BL21(DE3) + anti-hongo-hoja; Carriles f-i: clones de *E. coli* BL21(DE3) + anti-hoja-hongo. En **B**: Carriles b-e: clones de *E. coli* BL21(DE3) Rosetta + anti-hongo-hoja; Carriles f y g: clones de *E. coli* BL21(DE3) Rosetta + anti-hoja-hongo; Carril h: control negativo.

Se indujo la expresión de los clones positivos tanto de BL21 como de Rosetta, con el fin de determinar si alguna de las cepas es capaz de expresarlos, como se describe en la sección III. C. de Metodología. En ninguna de las colonias evaluadas para ambos

biespecíficos se observó la banda correspondiente a su peso molecular, y en ninguna de las dos cepas (Figura 18 y Figura 19). Finalmente, se realizó un último intento de expresión aumentando el volumen de cultivo a 250 mL, para evaluar si la proteína se expresaba en pequeñas cantidades que no eran visibles en fracciones solubles de cultivos pequeños. El resultado de esta inducción también se analizó en un gel de poliacrilamida, en el que tampoco se observó expresión (resultado no mostrado).

Una posible explicación a la incapacidad de expresar los nanoanticuerpos biespecíficos, es que hayan resultado tóxicos para las células y que por ello ninguna de las cepas analizadas fue capaz de expresarlos. Otra, pudo ser la expresión, pero en cuerpos de inclusión, lo que se podría haber confirmado con un análisis de las fracciones insolubles tras la sonicación.

Frente a los resultados obtenidos en esta sección, se decidió dedicar esta tesis a la evaluación de los nanoanticuerpos monoespecíficos y a continuación se describirán resultados únicamente referentes a ellos.

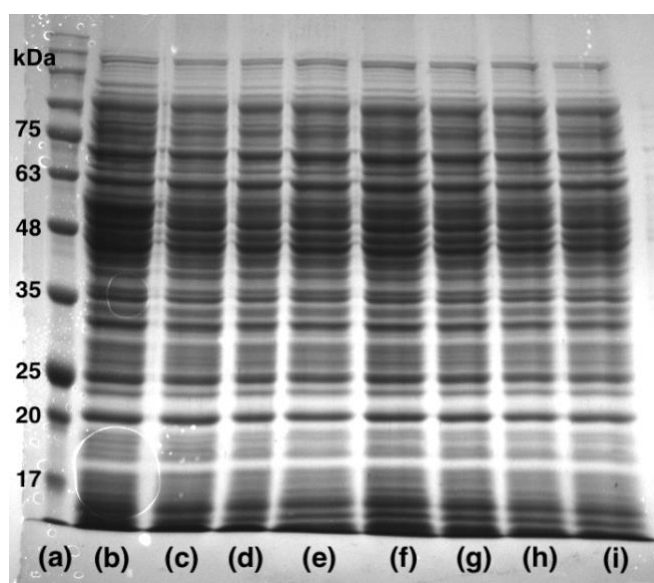


Figura 18. Evaluación por electroforesis *SDS-PAGE* de la expresión de los nanoanticuerpos biespecíficos en *E. coli* BL21(DE3). Carril a: *AccuRuler RGB Plus Prestained Protein Ladder*; Carril b: control negativo (*E. coli* BL21(DE3) sin transformar); Carriles c-e: clones del biespecífico anti-hongo-hoja; Carriles f-i: clones del biespecífico anti-hoja-hongo.

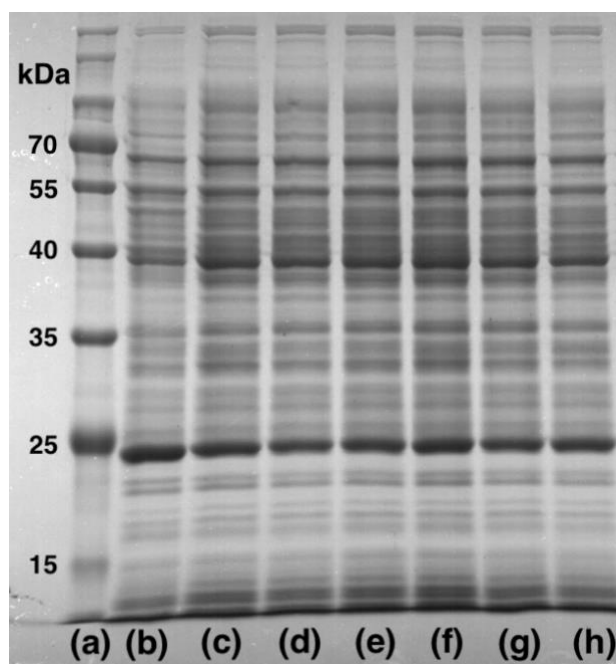


Figura 19. Evaluación por electroforesis *SDS-PAGE* de la expresión de los nanoanticuerpos biespecíficos en *E. coli* BL21(DE3) Rosetta. Carril a: *PageRuler™ Prestained Protein Ladder*; Carril b: control negativo (*E. coli* BL21(DE3) Rosetta sin transformar); Carriles c-d: colonias del V_HH anti-hoja-hongo; Carriles e-h: colonias del V_HH anti-hongo-hoja.

D. Evaluación de la expresión del V_HH 56F11 utilizando gradiente de *IPTG* y producción de este a escala matraz

Se buscó evaluar la influencia de distintas concentraciones de *IPTG* en la expresión del 56F11, ya que la expresión de este no había demostrado ser susceptible a él (Sección III. B. de Resultados y Discusión). Para ello, se realizó una inducción utilizando un gradiente de *IPTG* en 3 mL de cultivo.

Al analizar las fracciones obtenidas en una electroforesis *SDS-PAGE*, se observó la expresión de la proteína en todas las fracciones (Figura 20, carriles c-g), siendo menor la intensidad en la fracción correspondiente a 81 μ M de *IPTG* (Figura 20, carril g), posiblemente debido a lo explicado en la sección I. C de Resultados y Discusión. Considerando los resultados obtenidos a escala pequeña del 41D01, que mostraron una mayor expresión en las fracciones inducidas con 9 μ M de *IPTG* (Figura 15), y a pesar de la ausencia de diferencia entre la intensidad de las bandas de 0, 3, 9 y 27 μ M en este caso

(Figura 20, carriles c-f), se decidió realizar las siguientes producciones de ambos V_HHs induciendo con 9 μ M.

De esta manera, en un siguiente paso, se indujo la expresión del 56F11 a escala de matraz (cultivo de 250 mL), con el fin de obtener un volumen de fracción soluble significativo para una primera evaluación de la purificación del V_HH. En ambas fracciones sonicadas se observó una banda correspondiente al peso molecular esperado, indicando la expresión del 56F11 (Figura 20, carriles h e i).

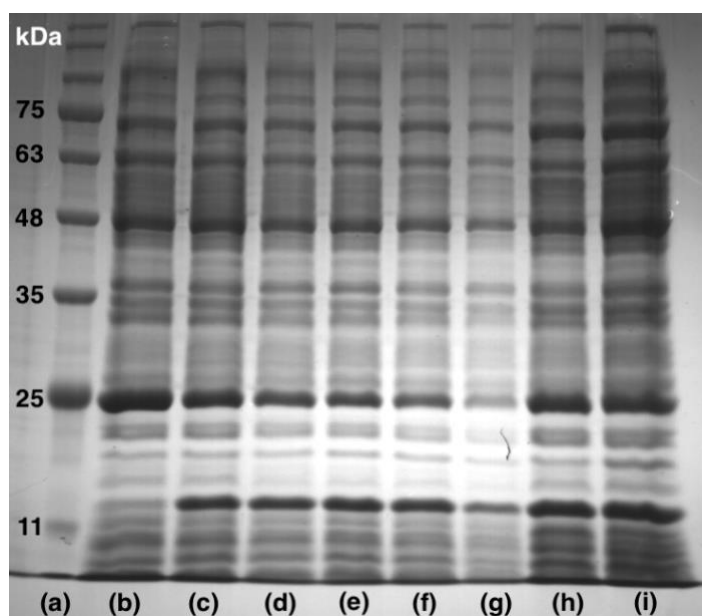


Figura 20. Análisis mediante electroforesis SDS-PAGE de la expresión del V_HH 56F11. Carril a: *AccuRuler RGB Plus Prestained Protein Ladder*; Carril b: control negativo (*E. coli* BL21(DE3) Rosetta sin transformar); Carriles c-g: inducción con gradiente de concentraciones de *IPTG* (0, 3, 9, 27 y 81 μ M); Carriles h e i: fracciones A y B sonicadas tras inducción con 9 μ M de *IPTG* a escala de matraz (250 mL).

E. Producción a escala mediana

Como siguiente paso, se escaló la producción de ambos V_HHs monoespecíficos a 1 L, buscando obtener cantidades suficientes para realizar futuros ensayos *in vitro*. Así, se indujo la expresión de ambos con 9 μ M de *IPTG* y al igual que en los casos anteriores, se analizaron las fracciones solubles obtenidas tras la lisis celular en una electroforesis SDS-PAGE, todas correspondientes a un mismo cultivo, pero a diferentes sonicaciones.

En todos los casos, tanto para el 56F11 como para el 41D01, se observó una banda en el peso molecular esperado y con una intensidad significativa, indicando la expresión de estos (Figura 21 A y B).

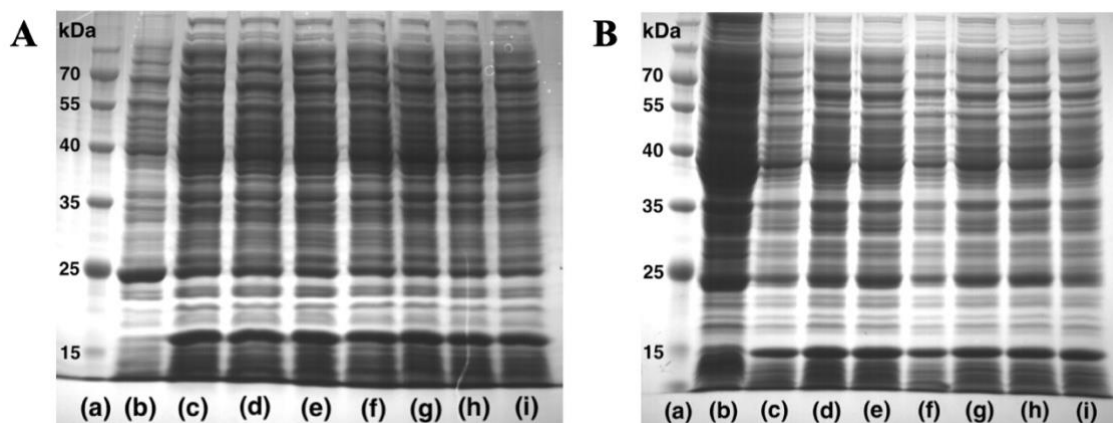


Figura 21. Análisis de la expresión de los V_HH mono-específicos con 9 μ M de IPTG a escala mediana (1 L). En **A** y **B**: Carril a: *PageRuler™ Prestained Protein Ladder*; carril b: control negativo (*E. coli* BL21(DE3) Rosetta sin transformar). En **A**: carriles c-i: distintas fracciones sonicadas tras la expresión del V_HH 56F11. En **B**: fracciones sonicadas al expresar el V_HH 41D01.

F. Purificación del V_HH 56F11 mediante *FPLC-IMAC* por método en gradiente

Se utilizó el *tag* de histidinas que poseen los V_HHs producidos para poder purificarlos mediante *FPLC-IMAC*, eluyendo en esta instancia con un gradiente de imidazol con el fin de observar el comportamiento de la proteína. En este caso, se utilizó la fracción soluble obtenida del cultivo de 56F11 en 250 mL.

Como se observa en el cromatograma de la figura 22 se obtuvo un pico de elución pequeño y no definido. Este estuvo comprendido en las fracciones 1B2, 1B3 y 1B4, correspondientes a una concentración de imidazol de aproximadamente 100 mM (10% de B) (Figura 22).

Una vez recolectadas todas las fracciones de interés, las mismas fueron analizadas mediante una electroforesis *SDS-PAGE* para poder observar si el V_HH se encontraba presente en ellas. En la figura 23 se observa la presencia de la proteína purificada en las

fracciones 1A10, 1B2 y 1B3, dada la presencia de una banda correspondiente al peso molecular deseado de 15 kDa en cada una de ellas (carriles d, e y f respectivamente). La fracción 1A10, corresponde a lo colectado inmediatamente antes a la aparición del pico de elución, la presencia de V_HH en ella demuestra que ya se había desprendido proteína de la columna y esto se observa como una meseta antes del pequeño pico en el cromatograma (Figura 22). En el caso de la fracción 1B2, la banda correspondiente al 56F11 posee mayor intensidad que la presente en la muestra ofrecida (Figura 23, carriles b y e respectivamente), lo que indica que si bien el método no fue completamente exitoso, logró concentrar la proteína de interés.

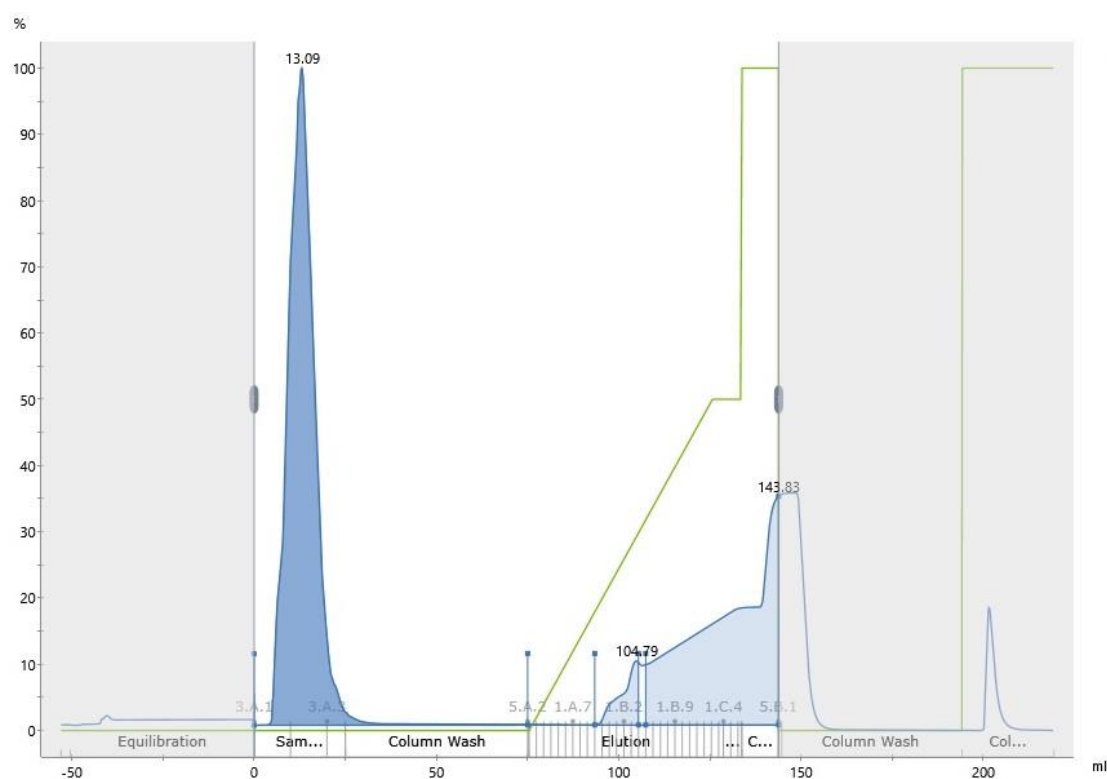


Figura 22. Cromatograma obtenido mediante el *software* UNICORN 7.0 a partir de la purificación del V_HH 56F11 mediante *FPLC-IMAC* con elución en gradiente, en el equipo ÄKTA Avant™, luego de su expresión en 250 mL. En este caso se muestra una porción del mismo, para poder observar con mayor claridad el momento de elución del V_HH. En el eje de las abscisas se representa el volumen de las fracciones en mL, y en el eje de las ordenadas se representa el porcentaje de *buffer B*. La línea en color azul representa la absorbancia a 280 nm, y la línea de color verde representa el porcentaje de *buffer B*. En gris se indica el nombre de cada fracción colectada.

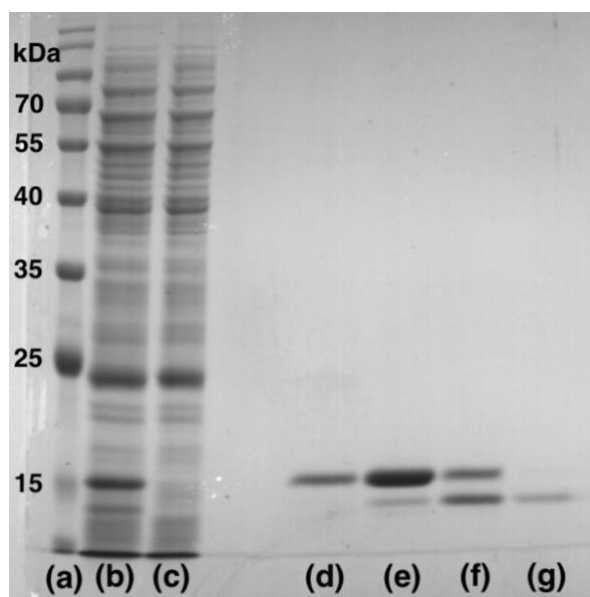


Figura 23. Análisis de las fracciones obtenidas luego de la purificación del V_HH 56F11 mediante *FPLC-IMAC*. Carril a: *PageRuler™ Prestained Protein Ladder*; Carril b: muestra aplicada; Carril c: percolado (fracción 3A2); Carril d: pre-pico (fracción 1A10); Carriles e-g: pico (fracciones 1B2, 1B3 y 1B4).

Debido a que los resultados no fueron los esperados, ya que no se obtuvo un pico definido de elución en el cromatograma, se decidió cambiar el método de purificación en las siguientes instancias.

G. Purificación de los nanoanticuerpos 56F11 y 41D01 mediante *FPLC-IMAC* por método isocrático

Para purificar las proteínas obtenidas de los cultivos de 1 L, se realizó una *FPLC-IMAC* por elución isocrática debido a que la elución en gradiente no arrojó resultados satisfactorios, y así poder evaluar también, si con este método la concentración y pureza obtenida era mayor.

Se comenzó con la purificación del 56F11, y a diferencia que lo observado anteriormente en la figura 22, en este caso se obtuvo un pico definido y concentrado, como se observa en el cromatograma de la figura 24. Analizando el cromatograma se observó que la elución del V_HH estaría comprendida en 2 fracciones, la 5A4 y la 5A5, encontrándose mayoritariamente en la primera. Esto se evaluó mediante una

electroforesis *SDS-PAGE*, junto con otras fracciones de interés colectadas, para poder analizar todo el proceso (Figura 25). Tanto en 5A4 como en 5A5 se observó la banda en el peso molecular esperado de 15 kDa, obteniéndose de forma significativamente más concentrada en ellas que en la muestra ofrecida (Figura 25, carriles g, h y b respectivamente); igualmente, la fracción 5A5 demostró una mayor pureza por la menor presencia de bandas correspondientes a otras proteínas. Por otro lado, se observa la presencia de la banda de interés en el resto de las fracciones analizadas, pero en cantidades mucho menores, por lo que se puede decir que hubo cierto desprendimiento del V_HH de la columna pero éste no fue significativo al comparar la intensidad de esta banda en las fracciones 5A4 y 5A5.

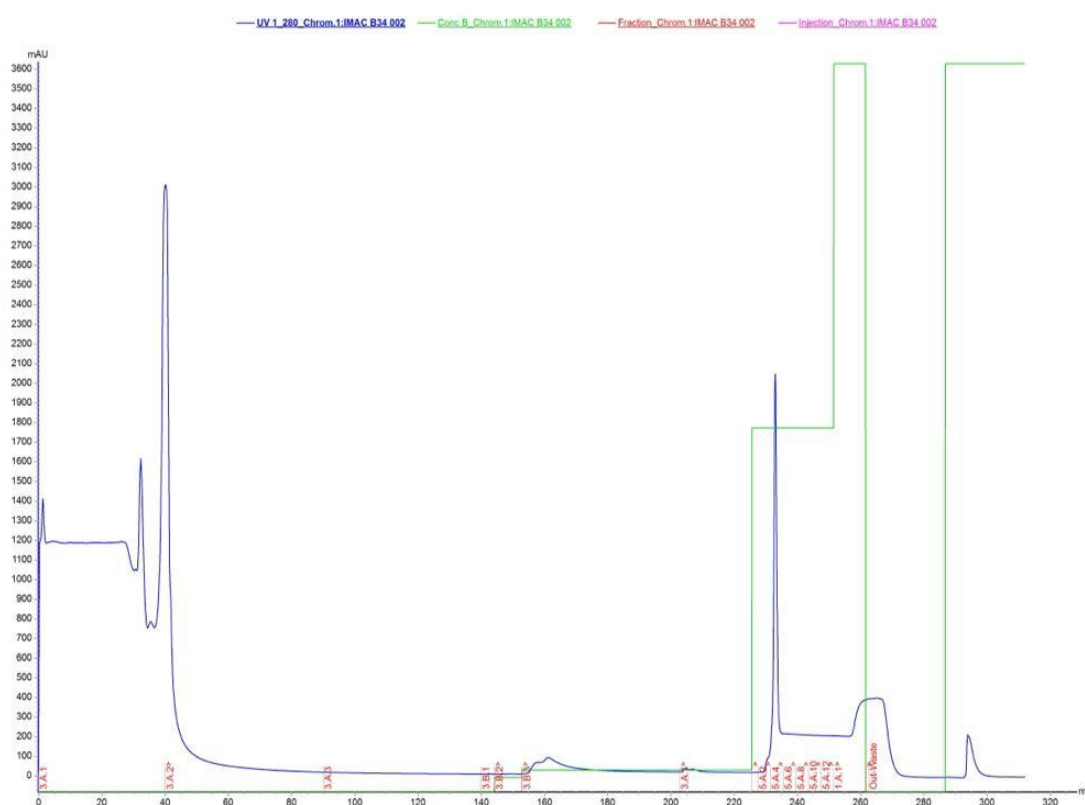


Figura 24. Cromatograma obtenido mediante el *software* UNICORN 7.0 a partir de la purificación del V_HH 56F11 mediante *FPLC-IMAC* con elución isocrática, en el equipo ÄKTA Avant™, luego de su expresión en 1 L. En el eje de las abscisas se representa el volumen de las fracciones en mL, y en el eje de las ordenadas se representa el valor de absorbancia en mUA. El linea en color azul representa la absorbancia a 280 nm y la línea de color verde representa el porcentaje de *buffer B*. En color rojo se indica el nombre de cada fracción colectada.

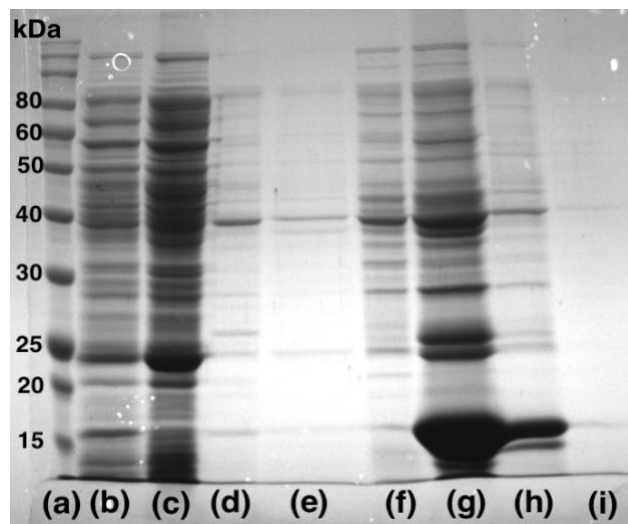


Figura 25. Análisis de las fracciones obtenidas tras la purificación del V_HH 56F11 mediante *FPLC-IMAC*. Carril a: *Prestained Protein Ladder Broad Range*; Carril b: muestra aplicada; Carril c: percolado (fracción 3A1 A); Carriles d y e: lavados (fracciones 3B3 A y 3A1B); Carril f: pre-pico (fracción 5A3); Carriles g y h: pico (fracciones 5A4 y 5A5); Carril i: lavado 100% *buffer B* (fracción 1A1).

Dados los resultados obtenidos en la purificación del 56F11, se decidió que este método superó ampliamente los resultados obtenidos en la purificación por elución en gradiente, y por ello se decidió utilizar el mismo método para purificar el 41D01.

En relación con este V_HH, en el cromatograma de la figura 26 también se observó un pico significativo, aunque menor que en el caso del 56F11, comprendido en las fracciones 1A4, 1A5 y 1A6. Igual que anteriormente, las fracciones de interés se analizaron en una electroforesis *SDS-PAGE*, ésta se muestra en la figura 27. Se observó la banda correspondiente al V_HH en las fracciones esperadas del pico, siendo mayor la intensidad en 1A4 y 1A5 que en 1A6 (Figura 27, carriles g, h e i respectivamente). A su vez, la concentración proteica en estas bandas fue considerablemente mayor que la presente en la muestra ofrecida (Figura 27, carril b). Finalmente, se observa que la pureza de la fracción 5A5 es mayor que la de 5A4, dado que la intensidad de las bandas correspondientes a otras proteínas es menor en ella.

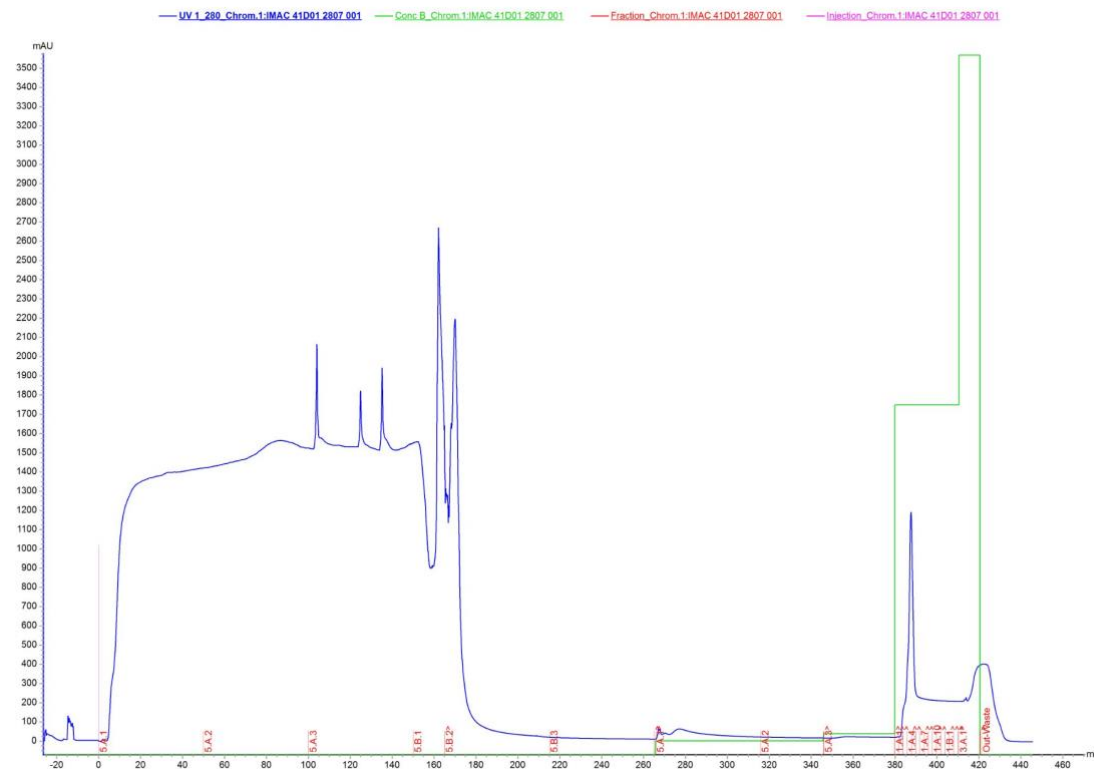


Figura 26. Cromatograma obtenido mediante el *software* UNICORN 7.0 a partir de la purificación del V_HH 41D01 mediante *FPLC-IMAC* con elución isocrática, en el equipo ÄKTA Avant™, luego de su expresión en 1 L. En el eje de las abscisas se representa el volumen de las fracciones en mL, y en el eje de las ordenadas se representa el valor de absorbancia en mUA. La línea azul representa la absorbancia a 280 nm, la línea de color verde representa el porcentaje de *buffer B*, y la línea vertical de color rosado marca el punto de aplicación de la muestra y el inicio de la recolección de las fracciones. En color rojo se indica el nombre de cada fracción colectada.

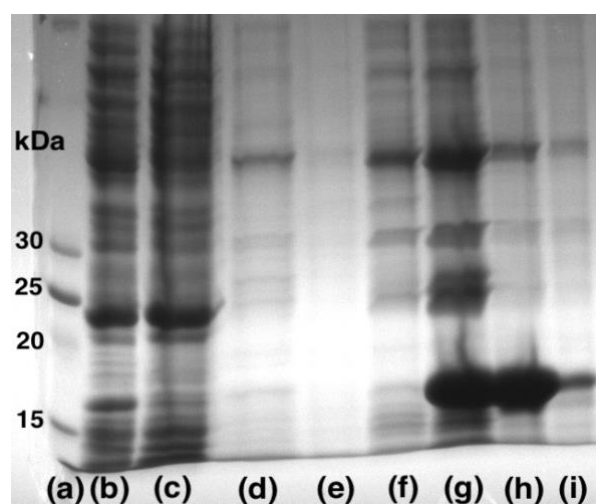


Figura 27. Análisis de las fracciones obtenidas luego de la purificación del V_HH 41D01 mediante *FPLC-IMAC*. Carril a: *PageRuler™ Unstained Low Range Protein Ladder*; Carril b: muestra aplicada; Carril c: percolado (mezcla de fracciones 5A1 y 5B3); Carril d: lavados (mezcla de

fracciones 5B3, 5A1 B, 5A2 B, 5A3 B); Carril e: pre-pico (mezcla fracciones 1A1 y 1A2); Carril f: pre-pico (fracción 1A3); Carriles g-i: pico (fracciones 1A4, 1A5 y 1A6).

Posteriormente, fueron seleccionadas para ser dializadas las fracciones 5A4 y 5A5 de 56F11 y 5A4, 5A5 y 5A6 de 41D01, como se describe en la sección V. G. de Metodología. Esto permitió cuantificar la cantidad de proteínas totales en un siguiente paso.

H. Cuantificación de proteínas por el método de *BCA*

Una vez purificados los V_HHs y dializadas las fracciones que contenían a la proteína de interés, se procedió a cuantificar las proteínas totales en ellas por el método de *BCA*, como se detalla en la sección III. I. de Metodología. Para el caso del 56F11, las fracciones cuantificadas fueron 5A4 y 5A5, obteniéndose como concentración 2489.8 y 335.4 µg/mL, mientras que para el 41D01 se analizaron 1A4, 1A5 y 1A6, y las concentraciones fueron de 1249.7, 932.5 y 104.4 µg/mL, respectivamente. Estos valores se obtuvieron a partir de las curvas de calibración realizadas con concentraciones conocidas de *BSA* (Anexo) y los valores de absorbancia obtenidos para cada V_HH. Frente a estos resultados, se decidió continuar los experimentos de *ELISA* posteriores con las fracciones 5A4 del 56F11 y 1A4 del 41D01.

IV. Evaluación de la capacidad de los V_HH producidos de interactuar con GlcCer y de inhibir el crecimiento de *Botrytis cinerea* *in vitro*

A. Evaluación de la interacción de los V_HHs con diferentes GlcCer *in vitro*

Como se explicó en la sección IV. A. de Metodología, la cantidad de uniones inespecíficas obtenidas en el primer ensayo de *ELISA* llevaron a la necesidad de realizar nuevos ensayos variando las condiciones de cada paso, para así poder determinar la combinación óptima a utilizar. Los resultados de estos se resumen en la figura 28 y 29, donde se observan las variaciones de la señal obtenida dependiendo de las condiciones

utilizadas. Tras el análisis de esos resultados, se concluyó que utilizar 10 µg por pocillo de *coating* y la mezcla PBS BSA 1% TWEEN® 20 0.05 % para las diluciones del V_HH y de 1/500 del anticuerpo secundario, eran las mejores condiciones para evaluar la interacción *in vitro* del 41D01 y el 56F11 con las GlcCer. Esto se determinó en base a la señal emitida por el *coating* de BSA, que fue la proteína de bloqueo utilizada en todos los ensayos realizados, la señal no fue completamente inhibida, pero se seleccionó la combinación que la disminuyó en mayor medida; y en la mayor diferencia en la señal observada en el ensayo realizado en dichas condiciones (Figura 28B), utilizando 10 µg por pocillo del antígeno proveniente del hongo *P. citrinopileatus*.

En cuanto al reconocimiento por las GlcCer dado por los V_HHs, el B₃4 que fue utilizado como control negativo, no presenta afinidad por ninguna ellas, exhibiendo valores de absorbancia a 450 nm menores a 0.010 en todos los casos (Figura 30A). En cambio, en el caso de 41D01 y 56F11, se puede decir que ambos reconocen con mayor afinidad la GlcCer de hongo (*P. citrinopileatus*) que las de otras especies. Para el caso en que se utilizaron 10 µg de V_HH, el 41D01 posee una capacidad mayor de reconocimiento, alcanzando valores de absorbancia a 450 nm de alrededor de 1.5 (Figura 30B), mientras que el 56F11 arroja valores máximos cercanos a 0.5 (Figura 30C). Ambos resultados están en concordancia con lo reportado por *De Coninck et al.* (12), es decir que, en este caso, se emularon los resultados obtenidos por el grupo con los V_HH producidos y purificados en esta tesis. Por otro lado, tanto el 41D01 como el 56F11 son capaces de reconocer la GlcCer de planta (*G. max*) con una afinidad menor pero similar que a la de *P. citrinopileatus*, pero no así a la GlcCer de mamífero (leche) (Figura 30B y Figura 30C). Este resultado no se corresponde con lo reportado por el grupo, ya que alegaban un no reconocimiento por ninguna de las dos GlcCer, es decir, una alta especificidad por la de hongo.

A su vez, también se evaluó el reconocimiento utilizando 1 µg de 56F11 y el extracto no purificado del 41D01, dado que en este último caso ya se había analizado 1 µg en las pruebas previas (Figura 28 y 29). En ambos casos, el reconocimiento observado fue menor que con 10 µg, alcanzando valores de absorbancia de alrededor de 0.3 para el 56F11 (Figura 30C) y de 0.8 para el extracto del 41D01 (Figura 30B).

La implicancia de este resultado se determinaría con pruebas *in vivo* en plantas, ya que las GlcCer son un componente importante de la membrana plasmática y del

sistema de endomembranas, pero su función a nivel celular aún no está bien caracterizada (35). Debido a esto, exponer un espécimen a estos V_HH podría tener algún tipo de efecto adverso no reportado; y si bien en *De Coninck et al.* (12) realizan pruebas *in vivo* sin informar datos de esta índole, los V_HH 41D01 y 56F11 producidos en este trabajo demostraron tener diferencias con los del grupo belga.

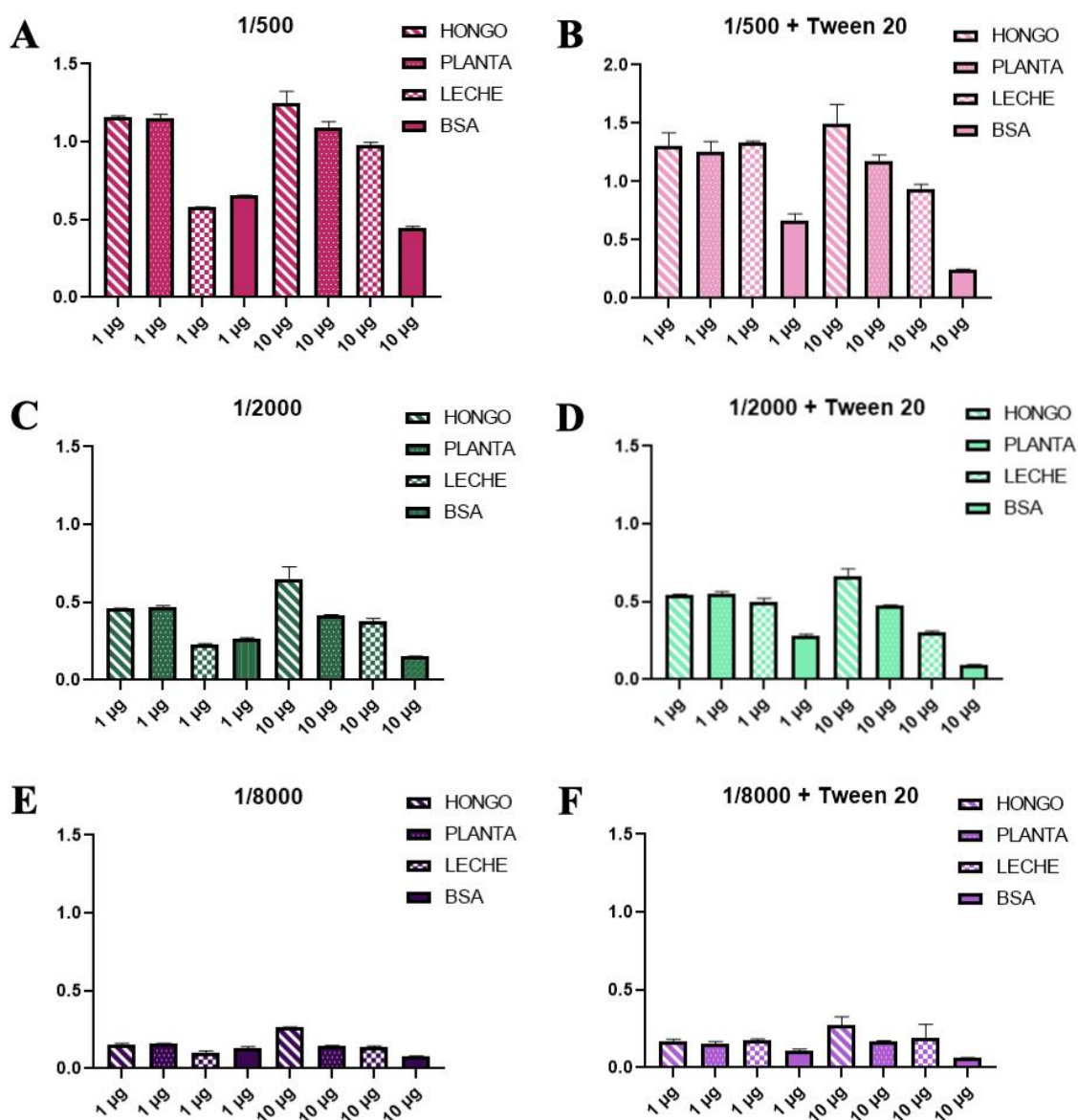


Figura 28. Optimización del ensayo de ELISA para la evaluación de la interacción de los V_HHs con diferentes GlcCer *in vitro*, realizando la dilución del V_HH en PBS BSA 1% Tween® 20 0.05 % (chequear que foto es cual). En A-F: coating con 1 µg y con 10 µg de cada antígeno. En A: dilución del anticuerpo secundario 1/500, en PBS BSA 1%; en B: dilución del anticuerpo secundario 1/500, en PBS BSA 1% Tween® 20 0.05%; en C: dilución del anticuerpo secundario 1/2000, en PBS BSA 1%; en D: dilución del anticuerpo secundario 1/2000, en PBS BSA 1% Tween® 20 0.05%; en E: dilución del anticuerpo secundario 1/8000, en PBS BSA 1%; en F: dilución del anticuerpo secundario 1/8000, en PBS BSA 1% Tween® 20 0.05%.

20[®] 0.05%; en **E**: dilución del anticuerpo secundario 1/8000, en *PBS BSA* 1%; en **F**: dilución del anticuerpo secundario 1/8000, en *PBS BSA* 1% Tween[®] 20 0.05%.

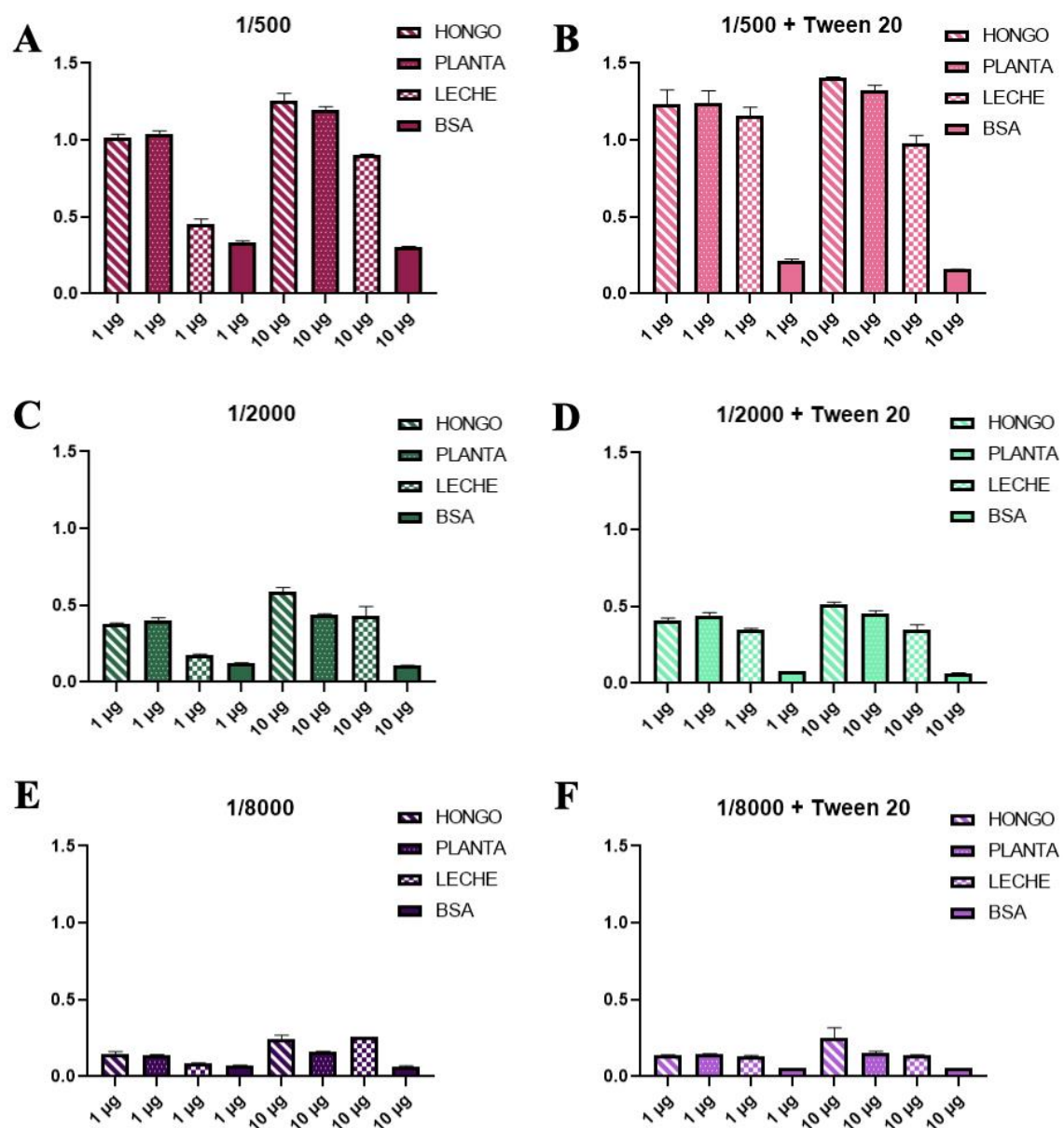


Figura 29. Optimización del ensayo de ELISA para la evaluación de la interacción de los V_HHs con diferentes GlcCer *in vitro*, realizando la dilución del V_HH en *PBS BSA* 1% (chequear que foto es cual). En **A-F**: *coating* con 1 µg y con 10 µg de cada antígeno. En **A**: dilución del anticuerpo secundario 1/500, en *PBS BSA* 1%; en **B**: dilución del anticuerpo secundario 1/500, en *PBS BSA* 1% Tween[®] 20 0.05%; en **C**: dilución del anticuerpo secundario 1/2000, en *PBS BSA* 1%; en **D**: dilución del anticuerpo secundario 1/2000, en *PBS BSA* 1% Tween 20[®] 0.05%; en **E**: dilución del anticuerpo secundario 1/8000, en *PBS BSA* 1%; en **F**: dilución del anticuerpo secundario 1/8000, en *PBS BSA* 1% Tween[®] 20 0.05%.

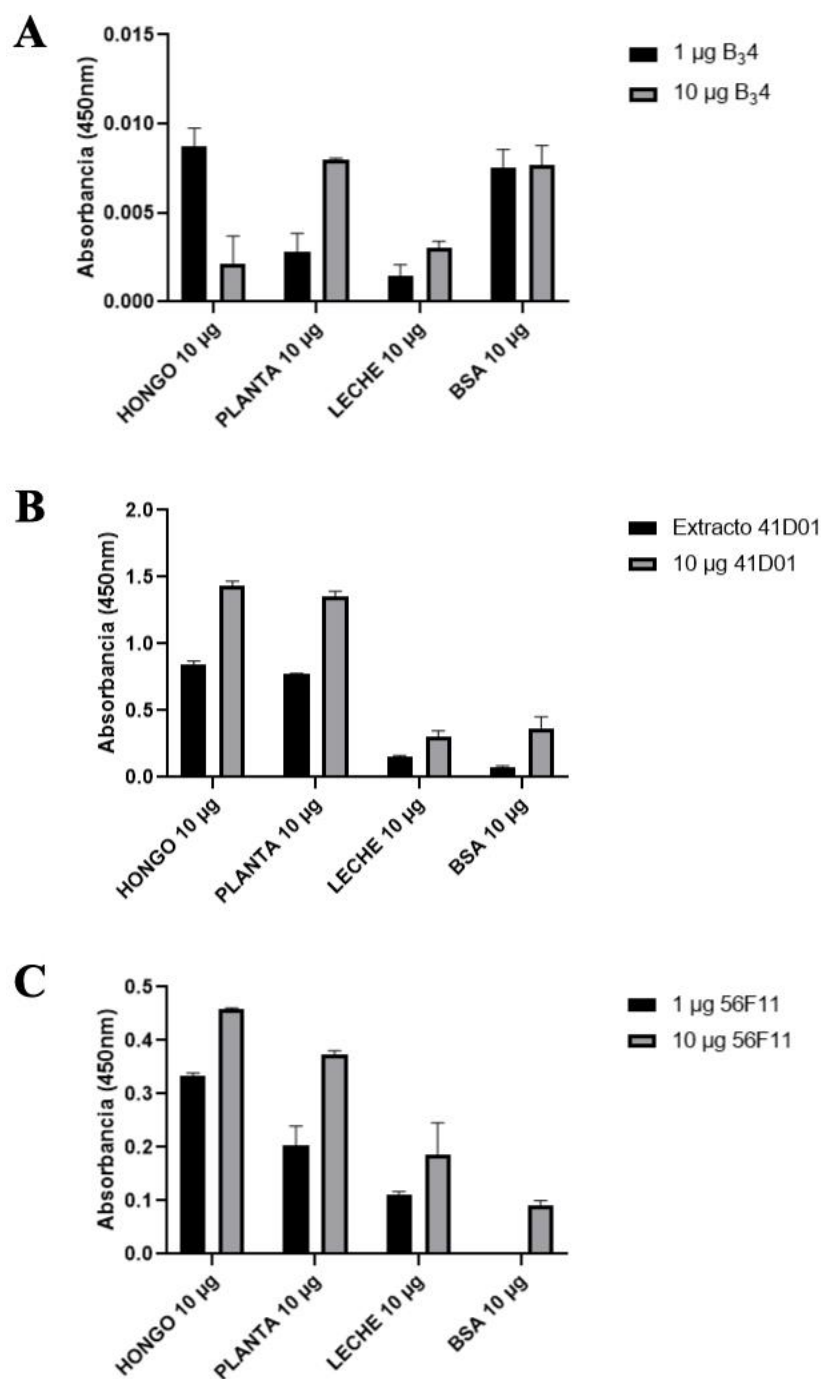


Figura 30. Evaluación del reconocimiento de las GlcCer por parte de los V_HHs. El eje y representa los valores de absorbancia medidos a 450 nm, y en el eje x se representan las distintas condiciones de *coating*. En **A**: control negativo (B₃4). En **B**: 41D01, en color negro se grafican los resultados obtenidos utilizando el extracto del V_HH (no purificado) y en color gris los valores obtenidos con 10 µg de 41D01. En **C**: 56F11. En **A** y **C**: en color negro se exponen los resultados obtenidos utilizando 1 µg del V_HH y en color gris los valores obtenidos con 10 µg del V_HH.

B. Evaluación de la actividad antifúngica de los V_HHs producidos

Una vez confirmada la interacción con las GlcCer, se buscó evaluar si los V_HHs producidos producían un efecto fungistático en *Botrytis cinerea*, es decir, si eran capaces de detener su crecimiento *in vitro*.

Luego de recolectar las esporas de *B. cinerea* utilizando una solución estéril de suero con TWEEN® 20 0,02 %, se realizó su recuento en cámara de *Neubauer*. El resultado obtenido fue de 2.45E09 esporas/mL, y con este valor se realizaron los cálculos para las pruebas posteriores. Se llevaron a cabo las pruebas en cultivos *in vitro* como se describe en la sección IV. B. de Metodología.

En el caso del 56F11 se utilizó la fracción 5A4, con una concentración de 2489.8 µg/mL. Para este ensayo, se realizaron diluciones de la misma para alcanzar concentraciones iniciales de 1500 µg/mL y 750 µg/mL, enfrentando así las esporas en placa a concentraciones de 300 y 150 µg/mL respectivamente, imitando las condiciones de la patente US2016/0075769A1 (13). Para el 41D01, se analizaron las fracciones 1A4 y 1A5, cuyas concentraciones de 1249.7 y 932.5 µg/mL respectivamente no les permitió alcanzar las concentraciones estipuladas. Debido a ello, las esporas se enfrentaron a concentraciones de 249.9 y 125.0 µg/mL de 1A4, y 186.5 y 93.3 µg/mL de 1A5. Se evaluó además al V_HH B₃₄ como control negativo, utilizando concentraciones del mismo de 296.4 y 148.2 µg/mL en placa. El objetivo de éste fue evaluar si la sola presencia de un V_HH inhibía el crecimiento de las esporas, y poder observar a su vez diferencias con el comportamiento del 56F11 y 41D01 que habían demostrado previamente interaccionar con las fGlcCer.

En cuanto a estas pruebas basadas en la patente, se observó que todas las fracciones de los V_HHs de interés enlentecen y disminuyen el crecimiento de *B. cinerea* *in vitro* durante siete días, comparado con el crecimiento de este en los controles negativos. En los gráficos obtenidos se observa que el 56F11 presenta una alta inhibición a la concentración de 300 µg/mL pero, de todas formas, el crecimiento también se ve disminuido a 150 µg/mL (Figura 31A). Para el 41D01, la inhibición es mayor en la fracción 1A5 que en la 1A4. En la primera, las dos concentraciones analizadas (93.3 y

186.5 µg/mL) presentan una alta inhibición del crecimiento (Figura 31B), mientras que, en la segunda, la disminución es más significativa en la concentración de 249.9 µg/mL que en la de 125.0 µg/mL (Figura 31C). Esto tiene concordancia con lo observado en la figura 27, el V_{HH} se encuentra más puro en la fracción 1A5 que en la 1A4, por lo que la ausencia de proteínas contaminantes permite que la primera posea una mayor actividad antifúngica a una menor concentración. Por último, el V_{HH} B₃₄, utilizado como control negativo, no mostró inhibición significativa del crecimiento de *B. cinerea* ya que su OD₆₀₀ se comporta a la par que la del control con agua mQ (Figura 31D). Por lo tanto, se puede decir que la inhibición observada en las figuras 31A-C se debe a las propiedades particulares de los V_{HH} analizados en este trabajo. Tomando el valor de absorbancia del control negativo con agua mQ a los siete días como el crecimiento máximo de *B. cinerea* en placa, y adjudicándole un 100%, se utilizaron los valores de absorbancia alcanzados por las concentraciones de V_{HH} en ese tiempo para estimar porcentajes de crecimiento y de inhibición del hongo; estos resultados se resumen en la tabla 7. Cabe destacar que a los valores de absorbancia del séptimo día de incubación se le restaron los valores del tiempo 0, de esta manera se trabajó con valores que representan cuánto creció el hongo en ese período de tiempo.

Tabla 7. Cálculos de porcentajes de crecimiento e inhibición de *B. cinerea in vitro*, realizados tomando el crecimiento máximo del control negativo de inhibición (agua mQ) como un 100% y en base a los valores de absorbancia obtenidos durante el ensayo.

V _{HH}	Concentración (µg/mL)	Crecimiento (%)	Inhibición (%)
56F11	300	18.2	81.8
	150	57.8	42.2
1A4	249.9	21.8	78.2
41D01	125.0	65.7	34.3
1A5	186.5	20.7	79.3
41D01	93.3	39.1	60.9

En primer lugar, se observa que ambos V_{HH} en su mayor concentración evaluada logran alcanzar un porcentaje de inhibición de alrededor de un 80%. El mayor valor, y por lo tanto el menor crecimiento de *B. cinerea*, está dado por el 56F11, siendo también el que aportó mayor concentración de V_{HH} en el ensayo. Las fracciones del 41D01 alcanzan valores similares habiéndose evaluado a concentraciones menores, lo que se traduce en una mayor actividad antifúngica. Este resultado está en concordancia con lo reportado por *De Coninck et al.* (12), donde se describía al 41D01 como el V_{HH} generado con mayor capacidad de inhibir el crecimiento de hongos. Por otro lado, puede decirse también, que los V_{HH} producidos poseen actividad antifúngica permitiendo solamente un 20% de crecimiento *B. cinerea* en 7 días.

Las curvas de crecimiento realizadas fueron un método para evaluar un amplio rango de concentraciones de los V_{HH}s más allá de las estipuladas en la patente. En relación con ellas, se observó que el 56F11 es capaz de inhibir completamente el crecimiento del hongo a una concentración de 498.0 µg/mL, manteniendo una OD₆₀₀ estable durante los 7 días del ensayo; la concentración de 249.0 µg/mL reduce significativamente el crecimiento y en el caso de la concentración de 124.5 µg/mL, ésta es capaz de inhibir por completo el crecimiento durante 2 días y luego éste se ve reducido hasta el quinto día de incubación (Figura 32A). Concentraciones menores de este V_{HH} no demostraron tener actividad relevante, ya que la OD₆₀₀ aumentó proporcionalmente al tiempo de incubación (Figura 32A). Por otra parte, del 41D01 se hicieron curvas de crecimiento para las dos fracciones ya mencionadas y se observó claramente como la fracción 1A5, que presentaba una menor concentración de proteínas totales pero una mayor pureza, exhibe una mayor actividad antifúngica. Así, esta fracción inhibe el crecimiento del hongo en gran medida durante siete días a una concentración de 186.5 µg/mL, y se observa una inhibición, pero no tan pronunciada a concentraciones de entre 93.3 y 23.3 µg/mL (Figura 32B). En cuanto a la fracción 1A4, el crecimiento del hongo se ve disminuído a una concentración proteica de 249.9 µg/mL y en menor medida a la concentración de 125.0 µg/mL (Figura 32C). Si bien se demostró que los V_{HH}s producidos son capaces de inhibir el crecimiento de *B. cinerea in vitro*, queda en evidencia mediante estas curvas de crecimiento que las concentraciones a las que producen este efecto son muy altas, lo que plantea una inhabilidad económica para una aplicación de los mismos a mayor escala. Un camino para lograr superar este obstáculo,

podría ser la maduración de la afinidad de los V_HHs, de esta manera podría ser posible su utilización a concentraciones menores.

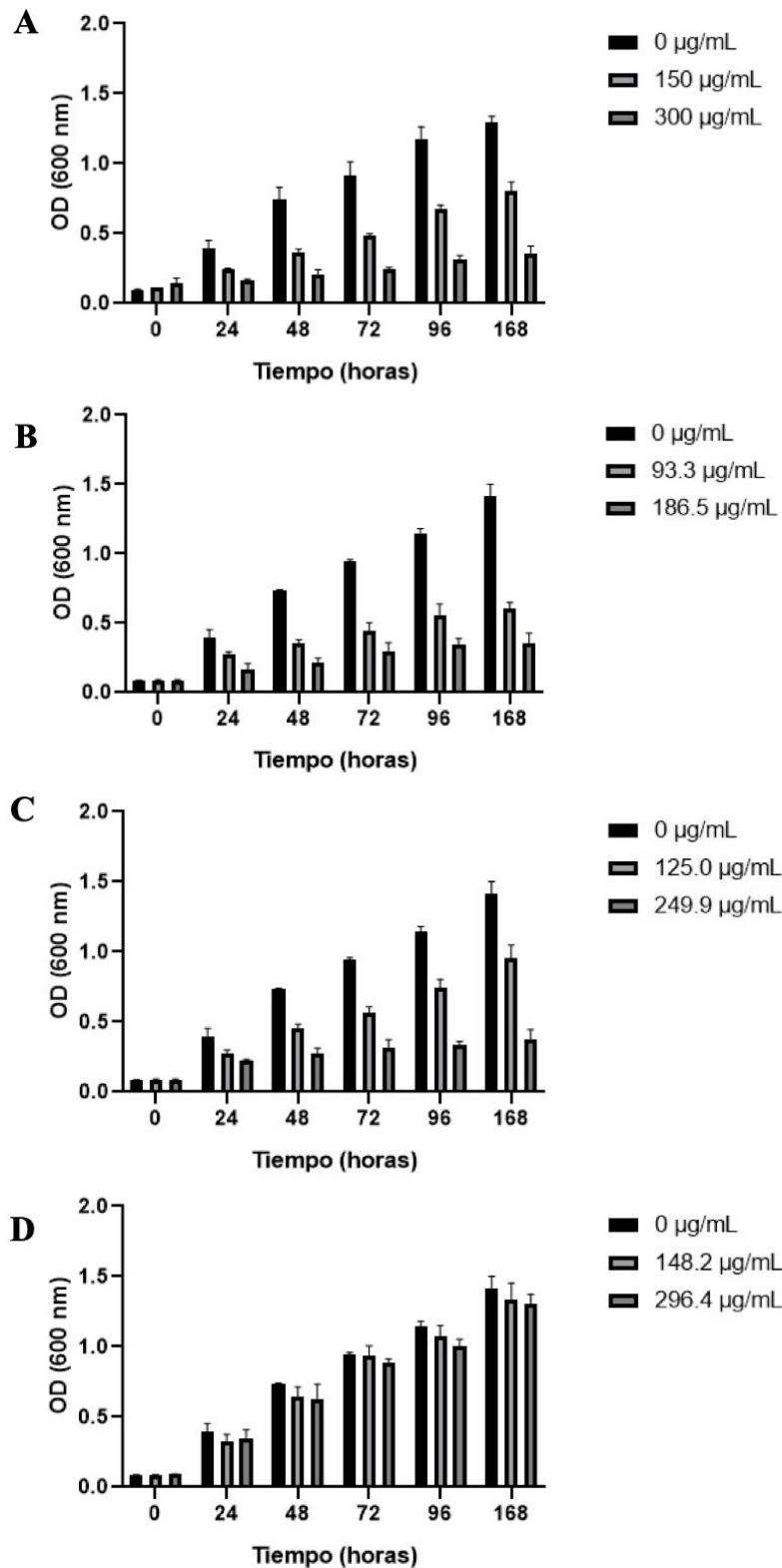


Figura 31. Evaluación de la actividad antifúngica de los V_HHs producidos, imitando las condiciones establecidas en la patente US2016/0075769A1. En el eje x se grafica el tiempo en

horas, y en el eje y la densidad óptica, medida a 600 nm. En **A-D**: en color negro se representa la concentración de V_HH de 0 µg/mL. En **A**: análisis del V_HH 56F11; en color gris claro se grafica la concentración de 150 µg/mL y en gris oscuro 300 µg/mL. En **B**: estudio del V_HH 41D01, fracción 1A5; en color gris claro se exponen los resultados para la concentración de 93.3 µg/mL y en gris oscuro para 186.5 µg/mL. En **C**: evaluación del V_HH 41D01, fracción 1A4; en color gris claro se representa la concentración de 125.0 µg/mL y en gris oscuro 249.9 µg/mL. En **D**: análisis del V_HH B₃4; en color gris claro se grafica la concentración de 148.2 µg/mL y en gris oscuro 296.4 µg/mL.

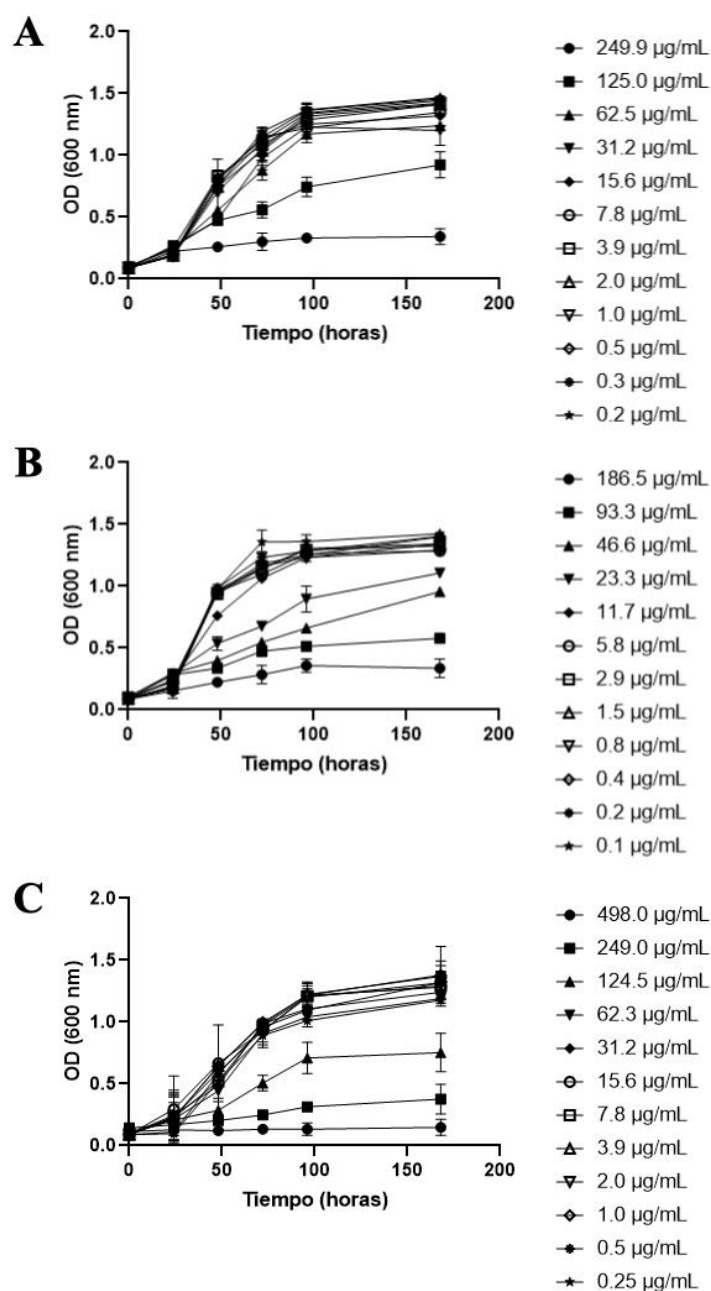


Figura 32. Representación de las curvas de crecimiento obtenidas para los distintos V_HHs. En el eje x se grafica el tiempo en horas y en el eje y la densidad óptica a 600 nm. En cada figura, cada

curva representa una concentración distinta del V_HH . En **A**: curva de crecimiento para el 56F11. En **B**: curva de crecimiento para el 41D01, fracción 1A5. En **C**: curva de crecimiento para el 41D01, fracción 1A4.

Conclusiones

Se logró cumplir con el objetivo general de esta tesis, ya que se obtuvieron cantidades suficientes de ambos nanoanticuerpos descritos por *De Coninck et al.* (12) para probar su actividad antifúngica *in vitro*. Ambos demostraron inhibir el crecimiento de *Botrytis cinerea*, pero las concentraciones a las que producen este efecto son muy altas. Esto implica que, si bien existe la viabilidad técnica para su producción, en este momento su aplicación en grandes superficies no es posible debido a que la cantidad de estos que sería necesario producir no sería económicamente rentable. Si bien sus ventajas biológicas y ecológicas son indiscutibles, en este momento no poseen competitividad en el mercado frente a los fungicidas tradicionales.

En cuanto a los objetivos específicos, se puede decir que se cumplió exitosamente con el primero, ya que se logró producir ambos nanoanticuerpos a escala mediana en el laboratorio, obteniendo cantidades suficientes de los mismos y con un grado de pureza adecuado para poder continuar con el objetivo específico siguiente. El rendimiento obtenido fue de 2 mg por litro de cultivo en el caso del 56F11, y 1 mg por litro para el 41D01.

También se logró cumplir con el segundo objetivo específico, ya que una vez obtenidos ambos V_HHs purificados y las GlcCer, se realizaron exitosamente ensayos de ELISA para evaluar su interacción con las mismas *in vitro*. En ambos se observó una mayor interacción con la fGlcCer, siendo el 41D01 el que posee una mayor capacidad de interacción alcanzando valores de absorbancia a 450 nm de aproximadamente 1.5, frente al máximo de 0.5 alcanzado por el 56F11. Sin embargo, a diferencia de lo reportado por *De Coninck et al.*, se observó que ambos interaccionan con la GlcCer de planta *in vitro*. Las implicancias de este resultado deberán ser evaluada *in vivo*, ya que las GlcCer están presentes en la membrana plasmática de las células vegetales y una unión a ellas podría bloquear la capacidad de estos V_HHs de unirse a las fGlcCer e impedir que cumplan su función. Por otro lado, la actividad antifúngica de ambos fue evaluada *in vitro* ante *B. Cinerea*, y ambos demostraron inhibir el crecimiento del hongo en un 80% a las concentraciones utilizadas. La capacidad antifúngica del 41D01 demostró ser mayor que la del 56F11, inhibiendo en la misma proporción pero a menor concentración.

El tercer objetivo aún está en proceso de finalización, pero los resultados preliminares muestran que la aplicación de estos nanoanticuerpos, sin ningún tipo de modificación o mejora, en grandes superficies, no sería económicamente viable.

Referencias bibliográficas

1. Parisi K, Shafee TMA, Quimbar P, Van der Weerden NL, Bleackley MR, Anderson MA. The evolution, function and mechanisms of action for plant defensins. *Semin Cell Dev Biol.* 2019;88:107–118.
2. Bleackley MR, et al. The interaction with fungal cell wall polysaccharides determines the salt tolerance of antifungal plant defensins. *Cell Surf.* 2019;5:100026.
3. Al-Assiuty ANIM, Khalil MA, Ismail AWA, Van Straalen NM, Ageba MF. Effects of fungicides and biofungicides on population density and community structure of soil oribatid mites. *Sci Total Environ.* 2014;466–467:412–420.
4. Carvalho FP. Pesticides, environment, and food safety. *Food Energy Secur.* 2017;6(2):48–60.
5. Gupta S, Dikshit AK. Biopesticides: An ecofriendly approach for pest control. *J Biopestic.* 2009;3:186–188.
6. Kumar KK, Sridhar J, Murali-Baskaran RK, Senthil-Nathan S, Kaushal P, Dara SK, Arthurs S. Microbial biopesticides for insect pest management in India: Current status and future prospects. *J Invertebr Pathol.* 2018;165:74–81.
7. Rojas Arias AC, Zamora Espitia HM. Defensinas de plantas y su uso potencial como controladores de plagas en la agricultura. *Acta Biológica Colombiana* [Internet]. 2010 [citado 12 de marzo de 2021]; 15(3), 33-46. Disponible desde: <https://revistas.unal.edu.co/index.php/actabiol/article/view/10316/23373>
8. Thakore Y. The biopesticide market for global agricultural use. *Industrial Biotechnol.* 2006;2:194-208.
9. Glare T, Caradus J, Gelernter W, Jackson T, Keyhani N, Köhl J, Marrone P, Morin L, Stewart A. Have biopesticides come of age? *Trends Biotechnol.* 2012;30(5):250–258.
10. Kachhawa D. Microorganisms as a biopesticides. *J Entomol Zool Stud.* 2017;5(3):468–473.

11. Mithöfer A, Maffei ME. General mechanisms of plant defense and plant toxins. En: Gopalakrishnakone P, Carlini C, Ligabue-Braun R. Plant Toxins. Dordrecht: Springer Science+Business Media; 2017. p 3–24.
12. De Coninck B, Verheesen P, Vos CM, Van Daele I, De Bolle MF, Vieira J V., Peferoen M, Cammue BPA, Thevissen K. Fungal glucosylceramide-specific camelid single domain antibodies are characterized by broad spectrum antifungal activity. *Front Microbiol.* 2017;8:1–10.
13. Verheesen P, De Jonghe C, Van Daele E, Inventors; AgroSavfe N.V., assignee. Agrochemical compositions comprising antibodies binding to sphingolipids. United States Patent US 2016/0075769A1; 2016 Mar 17.
14. Sher Khan R, Iqbal A, Malak R, Shehryar K, Attia S, Ahmed T, Ali Khan M, Arif M, Mii M. Plant defensins: types, mechanism of action and prospects of genetic engineering for enhanced disease resistance in plants. *3Biotech.* 2019;9(5):1–12.
15. Cools TL, Struyfs C, Cammue BP, Thevissen K. Antifungal plant defensins: Increased insight in their mode of action as a basis for their use to combat fungal infections. *Future Microbiol.* 2017;12(5):441–454.
16. Abbas AK, Lichtman AH, Pillai S. Cellular and Molecular Immunology. 8th ed. Philadelphia: Elsevier Saunders; 2014 [citado 18 de Marzo de 2021]. Disponible desde: https://books.google.com.uy/books?id=RWYWBAQAQBAJ&pg=PA87&dq=antibody&hl=es-419&sa=X&ved=0ahUKEwinzPb_0Y3oAhUGH7kGHWMrArs4HhDoAQhdMAU#v=onepage&q=antibody&f=false
17. Murphy K, Travers P, Walport M. Janeway's immunobiology. 7th ed. New York: Garland Science; 2008.
18. Cheriyaedath S. Antibody Applications [Internet]. Manchester: AZoLifeSciences; February 2021 [citado 15 de Marzo de 2021]. Disponible desde: <https://www.azolifesciences.com/article/Antibody-Applications.aspx>

19. Wang Y, Fan Z, Shao L, Kong X, Hou X, Tian D, Sun Y, Xiao Y, Yu L. Nanobody-derived nanobiotechnology tool kits for diverse biomedical and biotechnology applications. *Int J oNanomedicine*. 2016;11:3287–3303.
20. Arbabi-Ghahroudi M. Camelid single-domain antibodies: Historical perspective and future outlook. *Front Immunol*. 2017;8:1–8.
21. Harmsen MM, De Haard HJ. Properties, production and applications of camelid single-domain antibody fragments. *Appl Microbiol Biotechnol* 2007(77):13–22.
22. Ryding S. V_{HH} antibodies (nanobodies) advantages and limitations [Internet]. Manchester: AZoLifeSciences; February 2021 [citado 15 de Marzo de 2021]. Disponible desde: [https://www.azolifesciences.com/article/VHH-Antibodies-\(Nanobodies\)-Advantages-and-Limitations.aspx](https://www.azolifesciences.com/article/VHH-Antibodies-(Nanobodies)-Advantages-and-Limitations.aspx)
23. García J, Santana Z, Zumalacárregui L, Quintana M, González D, Furrázola G, Habana L. Estrategias de obtención de proteínas recombinantes en *Escherichia coli*. *VacciMonitor*. 2013;22:30–39.
24. Guerrero-Olazarán M, Cab-Barrera EL, Galán-Wong LJ, Viader-Salvadó JM. Biotecnología de proteínas recombinantes para la aplicación en acuicultura. En: Cruz Suárez LE, Ricque Marie D, Nieto López MG, Villarreal D, Scholz U, González M. Avances en nutrición acuícola VII, Memorias del VII Simposium Internacional de nutrición acuícola. Hermosillo; 2004. p. 418–440.
25. Lara AR. Producción de proteínas recombinantes en *Escherichia Coli*. *Rev Mex Ing Quím*. 2011(10);209-223.
26. Claros MG. El operón de la lactosa en *E. coli* [Internet]. Málaga: Universidad de Málaga; 2011 [citado 20 de Marzo de 2021]. Disponible desde: http://www.biorom.uma.es/contenido/av_bma/apuntes/T10/opeLac.html
27. Parham P. Estructura de los anticuerpos y generación de la diversidad de los linfocitos B. *Inmunología*. 2nd ed. Madrid: Editorial Médica Panamericana; 2005 [citado 18 de Marzo de 2021]. Disponible desde: https://books.google.com.uy/books?id=IX3Sqib_1ooC&pg=PA39&dq=anticuerpos&hl=es-

419&sa=X&ved=0ahUKEwjY_MCa0Y3oAhX_JLkGHUhTBgoQ6AEIUTAG#v=onepage&q=anticuerpos&f=false

28. Thermo Scientific. Overview of protein expression [Internet]. United States: Thermo Scientific; [citado 23 de Marzo de 2021]. Disponible desde: <https://www.thermofisher.com/uy/en/home/life-science/protein-biology/protein-biology-learning-center/protein-biology-resource-library/pierce-protein-methods/overview-protein-expression-systems.html>

29. Bernasconi F, Lorente S, Ripoll M. Implementación de una plataforma de Phage display para la generación de anticuerpos monodominio de llama. Universidad ORT Uruguay; 2019.

30. Thermo Scientific. BL21(DE3) competent cells [Internet]. United States: Thermo Scientific; [citado 16 de Julio de 2021]. Disponible desde: <https://www.thermofisher.com/order/catalog/product/EC0114#/EC0114>

31. Tabor S. Expression using the T7 RNA polymerase/promoter system. En: Ausubel FM, Brent R, Kingston RE, Moore DD, Seidman JG, Smith JA, Struhl K. Current Protocols in Molecular Biology. New York: John Wiley & Sons Inc; 2001.

32. Rossotti M, Tabares S, Alfaya L, Leizagoyen C, Moron G and González-Sapienza G. Streamlined method for parallel identification of single domain antibodies to membrane receptors on whole cells. *Biochim Biophys Acta*. 2015; 1850(7): 1397–1404.

33. Sigma-Aldrich. Rosetta(DE3) competent cells – Novagen [Internet].]. United States: Sigma-Aldrich; [citado 16 de Julio de 2021]. Disponible desde: <https://www.sigmaaldrich.com/UY/es/product/mm/70954>

34. Quiroga A. Optimización del cultivo de *Escherichia coli* para la producción de cutinasas recombinantes. Universidad de Chile; 2010.

35. Msanne J, Chen M, Luttgeharm KD, Bradley AM, Mays ES, Paper JM, Boyle DL, Cahoon RE, Schrick K, Cahoon EB. Glucosylceramides are critical for cell-type differentiation and organogenesis, but not for cell viability in *Arabidopsis*. *Plant J*. 2015;84(1):188–201.

Anexo

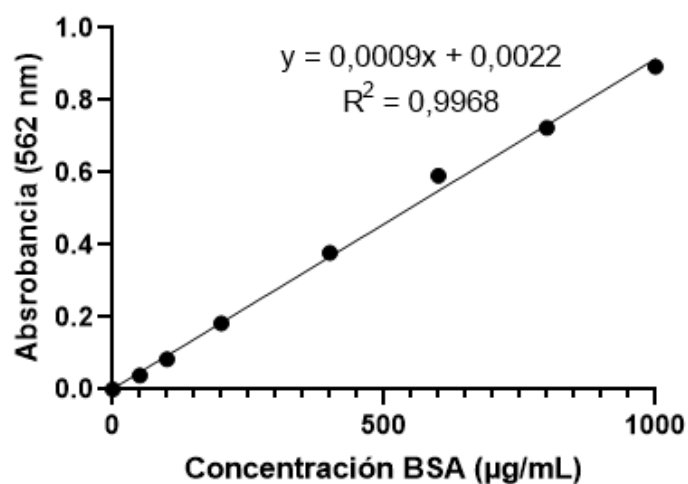


Figura 33. Curva estándar para el V_{HH} 56F11. En el eje de las ordenadas se representa la absorbancia determinada a 562 nm y en el eje de las abscisas la concentración de BSA en µg/mL. A su vez, se indica la ecuación de la recta de regresión lineal que se ajusta a los valores obtenidos y el correspondiente coeficiente de correlación de Pearson (R^2).

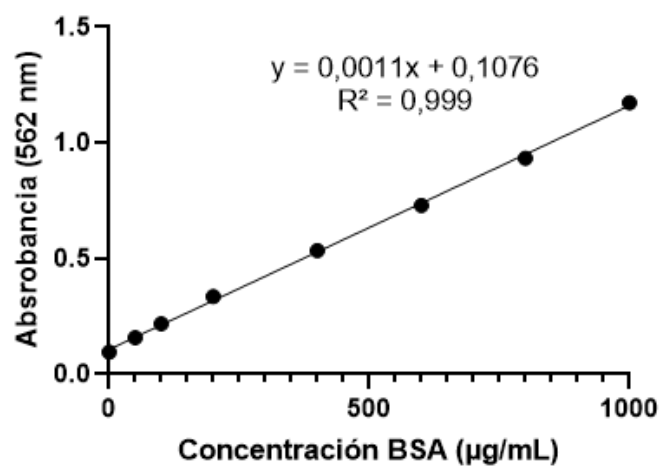


Figura 34. Curva estándar para el V_{HH} 41D01. En el eje de las ordenadas se representa la absorbancia determinada a 562 nm y en el eje de las abscisas la concentración de BSA en µg/mL. A su vez, se indica la ecuación de la recta de regresión lineal que se ajusta a los valores obtenidos y el correspondiente coeficiente de correlación de Pearson (R^2).