



Biofuncionalización de superficies de nylon con anticuerpos anti-ricina para su uso en inmunobiosensores

Peraile Muñoz, Ines^{1,*}, Gil García, Matilde², Murillo, Nieves³, Maudes, Jon³, Rozas Sanz, Gabriel², González López, Laura², Dabbagh Escalante, Nushin², Pérez, Ana³, Cabria Ramos, Juan Carlos² y Lorenzo Lozano, Paloma²

¹ Ingeniería de Sistemas para la Defensa de España (ISDEFE).

² Área de Defensa Biológica, Departamento de Sistemas de Defensa NBQ y Materiales Energéticos, Instituto Nacional de Técnica Aeroespacial «Esteban Terradas» (INTA)-Campus La Marañosa, Crta. San Martín de la Vega (M-301), km 10,5, 28330 Madrid, Spain.

³ División Industria y Transporte, TECNALIA, Pº Mikeletegi, 2. Parque Tecnológico, E-200009 Donostia-San Sebastián, Spain.

* Corresponding author: e-mail: iperaile@isdefe.es, Phone: +34 911742375.

1. Introducción

Los agentes de guerra biológica constituyen un riesgo creciente en la actualidad, pudiendo ser dirigidos tanto a la población como a los cultivos y al ganado, produciendo efectos devastadores tanto en la salud de la población como en la economía de los países [1]. Por ello, la mayoría de los países invierten en la investigación y el desarrollo de técnicas de detección e identificación de dichos agentes, siendo un objetivo prioritario el desarrollo de dispositivos que permitan una identificación temprana *in situ* lo más específica y sensible posible, de bajo coste, alta estabilidad y fáciles de usar, que permitan una miniaturización [2]. Dentro de estos dispositivos, los inmunobiosensores, basados en técnicas inmunológicas, resultan ser los candidatos de elección, puesto que la unión antígeno-anticuerpo es rápida y altamente específica.

En un inmunobiosensor, el tipo de sensado determinará el umbral de detección mientras que la especificidad y sensibilidad de la detección dependerá de los anticuerpos seleccionados y la forma en que estos son inmovilizados. Es por ello que tanto la superficie como el método de inmovilización determinarán la densidad y orientación del anticuerpo retenido y, en consecuencia, la eficiencia de la unión antígeno-anticuerpo y el éxito del sistema de inmunocaptura [3,4].

El objetivo de este trabajo consiste en el diseño de un modelo capaz de reproducir el proceso de inmunocaptura que tendría lugar en un dispositivo de tipo inmunológico (inmunobiosensor), independientemente del tipo de sensado, en su optimización y posterior validación para su aplicación en la detección de agentes reales susceptibles de ser usados en guerra biológica.

Como agente de guerra biológica se eligió la ricina (RCA60). La ricina es una toxina muy potente que se extrae de las semillas de la planta *Ricinus communis* de la familia *Euphorbiaceae*. Esta toxina actúa bloqueando la síntesis proteica, con resultado de muerte celular, lo que conduce al fallo multiorgánico y, finalmente, la muerte entre las 36-72 h posteriores a la exposición [5]. Se considera un arma biológica y un arma química, apareciendo en la lista 1 de las sustancias químicas tóxicas sujetas a control por la Organización para la Prohibición de las Armas Químicas (OPAQ).

2. Desarrollo

2.1. Superficies de inmovilización

Puesto que el nylon (poliamida 6, PA6) es una de las superficies de inmovilización más utilizadas en bioensayos, se propuso utilizarlo como material de inmovilización. Para este estudio se eligió una superficie planar comercial (Zprobe) y una superficie químicamente similar constituida por nanofibras, manufacturada por los autores.

2.1.1. Fabricación de las nanofibras

Se fabricaron nanofibras (NF) ultrafinas de poliamida 6, PA6, 6 % en peso, disueltas en 2:1 de ácido acético y ácido fórmico (Aldrich), mediante electrospinning (Nanospider™ 500, El Marco). La forma-

ción de las NF tiene lugar cuando la disolución polimérica es sometida a grandes campos electromagnéticos, aplicados entre el electrodo rotatorio, que se encuentra sumergido en la cubeta, y el electrodo conectado a tierra delante del cual se sitúa el substrato colector (figura 1). Las fibras se forman durante el vuelo entre ambos electrodos, al mismo tiempo que sucede la evaporación del disolvente y las elevadas fuerzas a las que se ve sometida la fibra inducen el estiramiento de la misma hasta llegar a diámetros nanométricos [6].

Las fibras ultra-finas de PA6 se recogieron sobre un rectángulo de silicio de 25 mm² pulido para evitar la formación de arrugas en la malla obtenida (figura 2). Los parámetros óptimos de fabricación de las NF fueron 65 kV de voltaje aplicado para una distancia entre el electrodo rotatorio y el de tierra de 170 mm a 19±2°C y 40 ± 5 % de humedad relativa.

La morfología de las NF obtenidas fue estudiada mediante microscopía electrónica de barrido de emisión de campo (FESEM), modelo Zeiss Ultra 55. Las muestras obtenidas presentan una elevada homogeneidad sin que se observen defectos (figura 3A). Se utilizó el programa de análisis de imágenes Image-J para determinar el diámetro promedio de las nanofibras, obteniéndose un diámetro de $\bar{D}=23\pm5,8$ nm (figura 3.B).

2.2. Modelo de inmunocaptura

En el dispositivo final del inmunobiosensor, los anticuerpos capturarán al antígeno de interés y el sistema de sensado acoplado será capaz de detectarlo directa y simultáneamente. Por lo tanto, para monitorizar el proceso de inmunocaptura de un modo directo, sin añadir ningún paso intermedio que pudiera afectar al resultado final, se marcó, tanto el antígeno como el anticuerpo, con fluorocromos que pudieran ser detectados simultánea e independientemente uno de otro.

Para el estudio de este modelo se utilizó como antígeno un simulante de toxina proteica, la albúmina de suero bovino (BSA) (Sigma-Aldrich). La BSA fue preparada a una concentración de 1 mg/mL en tampón fisiológico fosfato salino pH 7,4 (PBS) marcada con ficoeritrina (RPE) con un kit de conjugación comercial (Biorad). Posteriormente, fue ensayada a distintas concentraciones: 25, 50, 100 y 200 µg/mL en 10 µL (lo que corresponde a 2,5, 5, 10 y 20 ng).

El anticuerpo elegido para nuestro modelo fue un anticuerpo policlonal de oveja anti-BS, marcado con fluoresceína (FITC) (ThermoFisher) para el seguimiento de su inmovilización y cuantificación. Se utilizó diluido en tampón fisiológico fosfato salino pH 7,4 (PBS) a una concentración de 100 µg/mL en 10 µL.

Como métodos de inmovilización y basándonos en ensayos previos de los autores, se eligieron la adsorción pasiva (anticuerpo: 100 ng/µL, 10 µL) tomada como grupo control de referencia, y la inmovilización a través de proteína A/G (100 ng/µL, 10µL).

2.2.1. Parámetros determinados

- Densidad del anticuerpo inmovilizado

Se determinó como el cociente entre la medida de fluorescencia (λ excitación=490 nm; λ emisión= 521 nm; λ cutoff=515 nm) asociada al anticuerpo (FITC), tras su incubación y lavado, y la medida de autofluorescencia del sistema antes de la inmovilización del anticuerpo. Para cada método de inmovilización, los datos de las NF se representaron en porcentaje respecto los datos de inmovilización en nylon comercial (Zprobe). Estos se analizaron mediante One Way ANOVA, comparando los datos entre sí mediante un test de comparación múltiple (test de Tukey).

- El porcentaje de BSA inmunocapturada

Se determinó como el cociente entre la medida de fluorescencia (λ excitación=495 nm; λ emisión= 576 nm; λ cutoff=570 nm) asociada al antígeno (RPE), tras su incubación y lavado, y la auto-fluorescencia del sistema, en términos de porcentaje. Los datos se analizaron mediante Two Way ANOVA, utilizando un post-test Bonferroni para estudiar las diferencias estadísticas entre los grupos.

- Eficiencia del sistema:

Se determinó como el cociente entre la fluorescencia de la ficoeritrina (RPE; λ excitación=495 nm; λ emisión= 576 nm; λ cutoff=570 nm) asociada a BSA y la fluorescencia debida a la fluoescéina (FITC; λ excitación=490 nm; λ emisión= 521 nm; λ cutoff=515 nm) asociada al anticuerpo, en términos de porcentaje. Los datos se analizaron mediante Two Way ANOVA, utilizando un post-test Bonferroni para estudiar las diferencias estadísticas entre los grupos.

Las medidas de fluorescencia se obtienen mediante un lector de fluorescencia multipocillo (SpectraMax-Gemini XPS, Molecular Devices).

Los análisis estadísticos se llevaron a cabo utilizando el *software GraphPad Prism*.

2.3. Validación del modelo de inmunocaptura con agentes reales

Basándonos en los parámetros anteriormente definidos, se eligió el modelo de inmunocaptura más adecuado, según los resultados obtenidos con el simulante.

Como agente de guerra biológica se eligió la ricina (RCA60). RCA60 se marcó con ficoeritrina (RPE) con un kit de conjugación comercial (Biorad).

El modelo de inmunocaptura se validó determinando el porcentaje de inmunocaptura del agente real (RCA60). Este porcentaje se determinó como el cociente entre la medida de fluorescencia asociada al antígeno debido a su marcaje con ficoeritrina (RPE), tras su incubación y lavado, y la auto-fluorescencia del sistema antes de la inmovilización del anticuerpo, en términos de porcentaje.

3. Figuras

1) Primer elemento

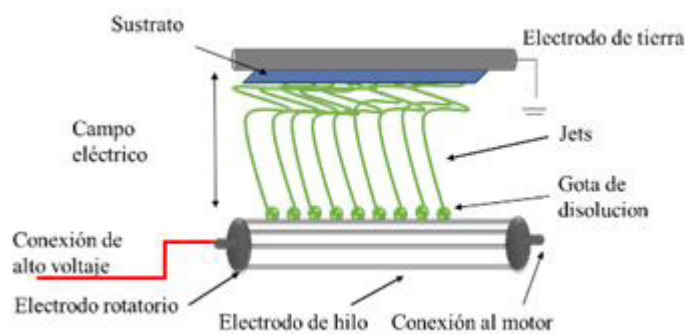


Figura 1. Representación esquemática del proceso de electrospinning denominado *needle free electrospinning*.

2) Segundo elemento

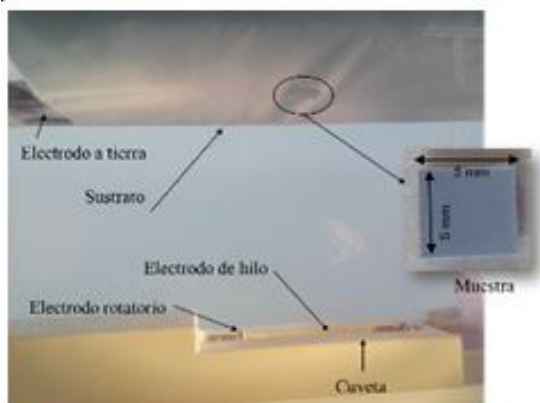


Figura 2. Equipo de electrospinning Nanospaider™ 500 empleado en la preparación de nanofibras ultrafinas de PA6.

3) Tercer elemento

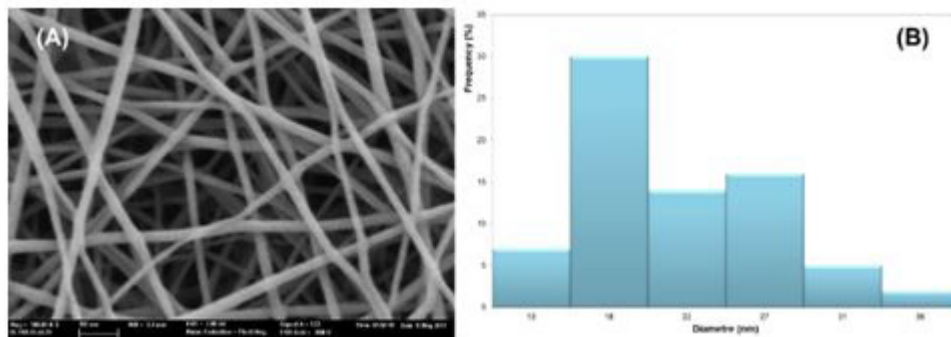


Figura 3. Micrografía FESEM de nanofibras ultrafinas de PA6 ultra-thin depositadas mediante electrospinning (A) and histograma de la distribution de diámetros (B) mediante electrospinning (A) and histograma de la distribution de diámetros (B).

4) Cuarto elemento

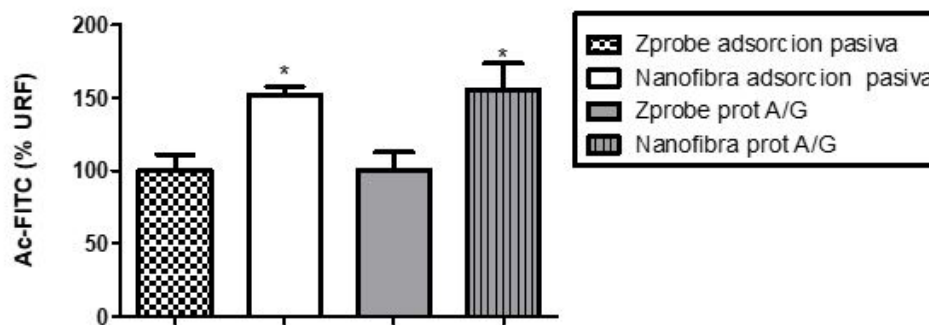


Figura 4. Porcentaje de anticuerpo anti-BSA marcado con FITC (Ac-FITC). Resultados de nanofibras (NF) en porcentaje respecto Zprobe, en cada uno de los métodos de inmovilización (adsorción pasiva, proteínas A/G). * $p < 0,05$. Diferencias respecto a su correspondiente método de inmovilización en Zprobe. One Way ANOVA y el postest de comparación múltiple Tukey.

5) Quinto elemento

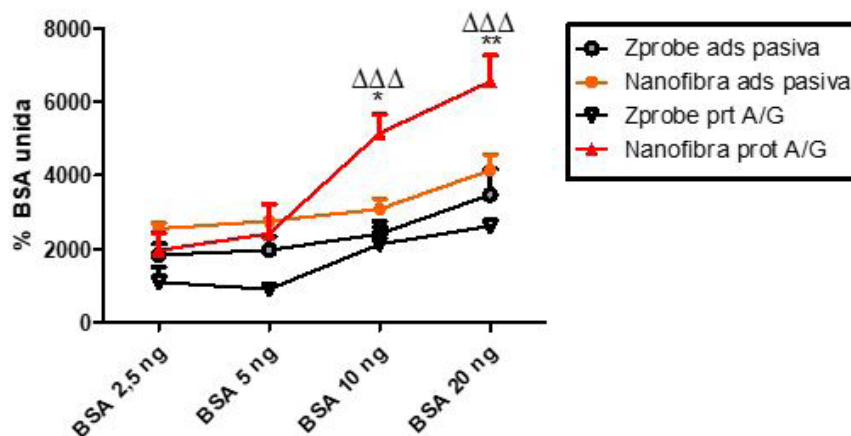


Figura 5. Valores de BSA inmunocapturada en porcentaje respecto a su control (autofluorescencia con BSA 0 ng). * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$. Diferencias entre adsorción pasiva y proteína A/G, en ambas superficies de inmovilización. ΔΔΔ $p < 0,001$ Diferencias entre NF con proteína A/G y Zprobe con proteína A/G. Two Way ANOVA y postest de Bonferroni.

6) Sexto elemento

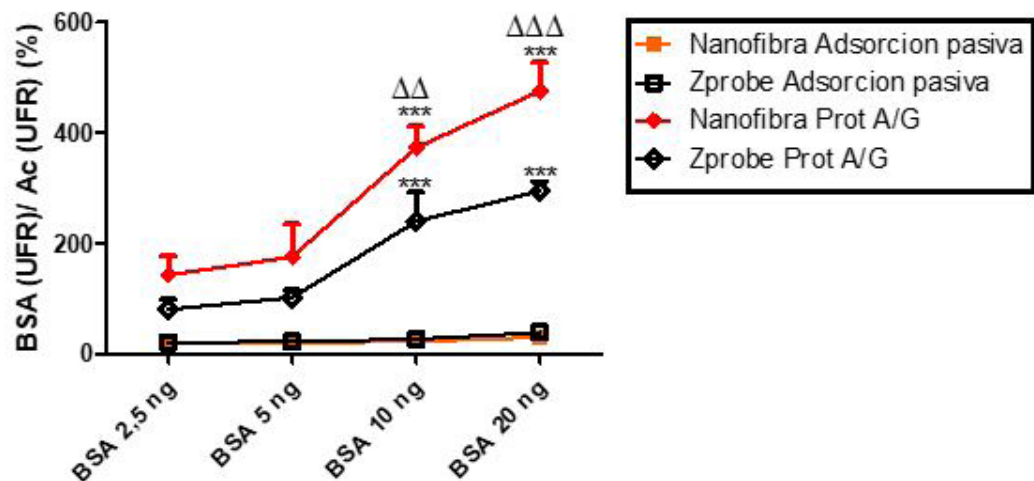


Figura 6. Eficiencia calculada como el cociente entre la fluorescencia debida a BSA y la fluorescencia debida al anticuerpo en términos de porcentaje. *** $p < 0,001$. Diferencias entre adsorción pasiva y proteína A/G, en ambas superficies de inmovilización. $\Delta\Delta$ $p < 0,01$; $\Delta\Delta\Delta$ $p < 0,001$. Diferencias entre NF y Zprobe, ambos utilizando la proteína A/G como método de inmovilización. Two Way ANOVA y postest de Bonferroni.

7) Séptimo elemento

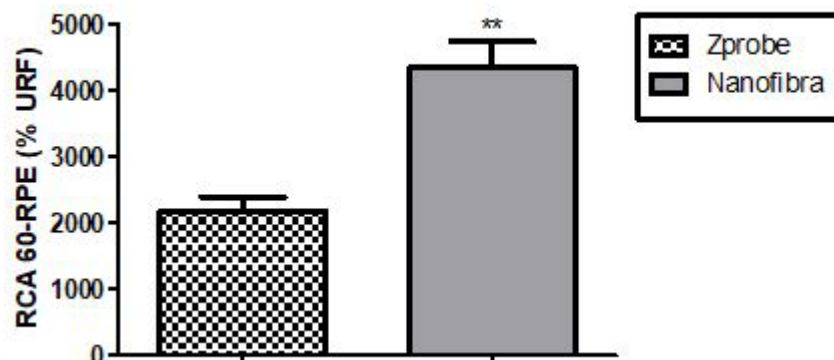


Figura 7. Valores de fluorescencia ligada a la ricina (RCA60) marcada con ficoeritrina (RPE), en porcentaje respecto a su control (autofluorescencia del sistema). ** $p < 0,01$. Diferencias entre NF y Zprobe. T-student.

4. Resultados y discusión

Los métodos de inmovilización del anticuerpo resultaron ser similares en cada una de las superficies ensayadas (NF y Zprobe), mostrando una capacidad de retención del anticuerpo ligeramente mayor en las nanofibras (NF). Para visualizar mejor este incremento, los datos se presentaron en porcentaje respecto a su correspondiente grupo de Zprobe (figura 4).

El sistema fue enfrentado a cantidades crecientes de BSA (de 2,5 a 20 ng), observándose una señal creciente en todos los grupos. Sin embargo, el grupo de las NF en combinación con la proteína A/G mostró

una señal estadísticamente superior a la de las mismas NF con adsorción pasiva y aún mayor respecto a Zprobe en combinación con proteína A/G (figura 5).

Los resultados de la eficiencia de los sistemas ensayados mostraron que la proteína A/G resultaba ser el método de inmovilización más eficaz, en ambas superficies. Estudios previos muestran que la inmovilización mediante proteínas mediadoras, como son la proteína A, la proteína G, o la proteína quimérica A/G, permite una unión orientada del anticuerpo al unirse específicamente a la región constante (Fc) del mismo, de forma que la región variable de unión al antígeno (Fab) queda accesible para la unión antígeno-anticuerpo [7]. La combinación de proteína A/G con las NF resultó ser el modelo de inmunocaptura estadísticamente más eficiente en cuanto a método y superficie de inmovilización utilizados, cuando la cantidad del antígeno capturado era igual o mayor a 10 ng (figura 6). Es un resultado coherente con las características de las NF, que presentan una mayor superficie/volumen, y de la proteína A/G, que orientan eficazmente el anticuerpo inmovilizado. Por tanto, al incrementar la cantidad del antígeno se puede visualizar este doble efecto. Datos previos realizados en nuestro laboratorio confirman estos resultados [8].

Para validar este modelo de inmunocaptura con agentes reales se seleccionó ricina (RCA60), marcada con RPE para monitorizar su captación. Este modelo se llevó a cabo tanto en las NF como en las membranas Zprobe, para poder verificar que las NF seguían siendo el sistema de inmunocaptura más eficaz, y se eligió el punto de 10 ng de RCA60. Los resultados evidenciaron que el modelo propuesto era válido para su aplicación con agentes reales confirmándose una mayor capacidad de captación con las NF que con la superficie planar Zprobe (figura 7).

5. Conclusiones

El modelo de inmunocaptura con el marcaje doble fluorescente de anticuerpo y antígeno permite reproducir el proceso de inmunocaptura que tendría lugar en un dispositivo de detección/identificación de tipo inmunológico (inmunobiosensor).

El cálculo de los parámetros establecidos de densidad de anticuerpo retenido, antígeno inmunocapturado y eficiencia del sistema, permiten comparar diferentes métodos de inmunocaptura, combinando diferentes técnicas y superficies de inmovilización del anticuerpo.

La utilización de proteína A/G sobre NF es el método de inmunocaptura seleccionado, siendo este sistema válido para ser aplicado utilizando agentes de guerra biológica.

Agradecimientos

Becas de formación del INTA, Resolución 3D0/38136/2015 de 21 de septiembre.

Los trabajos recogidos en esta comunicación están incluidos en el proyecto coordinado OPTONANOSENS TEC2015-63838-C3-2-R financiado con fondos MINECO / FEDER.

Referencias

1. Thavaselvam D, Vijayaraghavan R. *Biological warfare agents. J Pharm Bioallied Sci.* 2010;2(3):179-188.
2. Alahi MEE, Chandra Mukhopadhyay SC. *Detection Methodologies for Pathogen and Toxins: A Review. Sensors (Basel).* 2017, 17(8).
3. Koch S, Wolf H, Danapel C, Feller KA. *Optical flow-cell multichannel immunobiosensor for the detection of biological warfare agents. Biosens Bioelectron* 2000; 14(10-11):779-784.
4. Petrakova AV, Urusov AE, Gubaydullina MK, Bartosh AV, Zherdev AV, Dzantiev BB. "External" antibodies as the simplest tool for sensitive immunochromatographic tests. *Talanta.* 2017; 175:77-81.
5. Smith ME, Hayoun MA. *Toxicity, Ricin. StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing.* 2018 - 2017.

6. Greiner A, Wendorff JH. *Electrospinning: A Fascinating method for the preparation of ultrathin fibres. Angewandte Chemie*. 2007; 46:5670–5703.
7. Shen M, J Rusling J, Dixit CK. *Site-Selective Orientated Immobilization of Antibodies and Conjugates for Immunodiagnostics Development. Methods*. 2017; 116: 95–111.
8. Peraile I, Lorenzo P, Murillo N, Maudes J, Rozas G, Pérez A, González-López L, Cabria JC, Gil M. *Biofunctionalization of nylon nanofibers to be used in immunobiosensor for biological warfare agents detecting. Global progress in applied microbiology: a multidisciplinary approach*. 2018. Accepted.