



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE QUÍMICA

TECNOLOGÍA DE SISTEMAS LIBRES DE
CÉLULAS: NUEVAS APLICACIONES

TRABAJO MONOGRÁFICO DE
ACTUALIZACIÓN

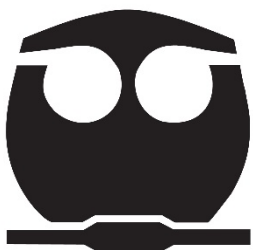
QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

LICENCIADA EN QUÍMICA

PRESENTA:

ARANZA LÓPEZ LÓPEZ

CIUDAD UNIVERSITARIA, CDMX, 2022





Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

JURADO ASIGNADO:

PRESIDENTE: Profesora: **Sánchez Nieto Sobeida**

VOCAL: Profesora: **Dimitrova Dinkova Tzvetanka**

SECRETARIO: Profesora: **Rodríguez Romero Adela**

1er. SUPLENTE: Profesora: **González Segura Lilian**

2º SUPLENTE: Profesora: **Montiel Pacheco Carmina**

SITIO EN DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA:

INSTITUTO DE QUÍMICA, UNAM

ASESOR DEL TEMA:

Dra. Adela Rodríguez Romero

SUSTENTANTE:

Aranza López López

AGRADECIMIENTOS

Quisiera agradecer a mis amigos que también fueron mis compañeros en la facultad y nos acompañamos en este camino que a veces se me hizo tan largo pero otras veces tan corto, Alejandro, Jairo y Arturo. A mi mejor amiga, Mariana la cual me ayudó a levantarme tantas veces de traspies emocionales y acompañó en las risas del siguiente día.

Gracias a mi asesora, la Dra. Adela Rodríguez por haberme dado un lugar en su laboratorio, en donde aprendí a trabajar con disciplina y compromiso, me siento honrada de haber trabajado bajo la dirección de una mujer científica tan inspiradora. También, gracias a las otras dos mujeres que forman parte de mi comité, la Dra. Tzvetanka Dinkova y la Dra. Sobeida Sánchez de las cuales recibí dos de los mejores cursos durante la carrera.

Le agradezco enormemente a toda mi familia, a mi hermana Alexa, a mis abuelos que quiero tanto, a mis tías, especialmente a Fabiola que desde que tengo memoria ha sido una inspiración para mí y que nos ha apoyado tanto a mi hermana como a mí para completar nuestras carreras universitarias.

Definitivamente dedico este trabajo a las personas que más amo en este mundo, mis padres Laura y Roberto a los cuales no sólo les debo mis oportunidades académicas si no todo lo que soy hoy como persona. Los tengo presentes cada día de mi vida.

Debo dar un especial agradecimiento a la persona gracias a la cual se realizó este trabajo. A la Dra. Annia Rodríguez que tuvo la paciencia de transmitirme una pequeña parte de sus amplios conocimientos en biología molecular además de inspirarme y haber sido mi sostén durante la escritura de esta tesis. Gracias por tanto Annia.

Finalmente agradezco a mi gata Minju quien se sentaba a lado de mi computadora día y noche mientras escribía este trabajo.

ÍNDICE

1. RESUMEN

2. INTRODUCCIÓN

3. SISTEMAS LIBRES DE CÉLULAS (SLC)

3.1 Composición de los sistemas libres de células para la expresión de un gen

3.1.1 Sistemas libres de células basados en un extracto celular

3.1.2 Sistemas libres de células para la síntesis de proteínas utilizando elementos recombinantes PURE

4. APLICACIONES DE LOS SISTEMAS LIBRES DE CÉLULAS

4.1 Síntesis de proteínas difíciles de expresar en SLC

4.1.1 Proteínas de membrana

4.1.2 Proteínas con puentes disulfuro

4.1.3 Anticuerpos

4.1.4 Bioterapéuticos

4.2 Biosensores basados en SLC

4.2.1 Biosensores para evaluar la calidad del agua

4.2.1.1 Detección de patógenos en agua

3.2.1.1.1 Biosensor para la identificación de presencia de material fecal humano en muestras de agua

4.2.1.2 Detección de contaminantes químicos en agua

4.2.1.2.1.1 Biosensor para campo para la detección de flúor utilizando un ribointerruptor

4.2.1.2.1.2 Biosensor para la detección de atrazina

4.2.2 Biosensores para el diagnóstico de enfermedades utilizando sistemas libres de células

3.2.2.1 Detección del virus del ZIKA

4.3 Ingeniería de metabolitos con SLC

4.4 Uso de SLC para crear células artificiales

4.5 Otras aplicaciones de los SLC

5. CONCLUSIONES

6. REFERENCIAS

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Diagrama simplificado del proceso experimental para la síntesis de una proteína en un SLC.....	11
Figura 2. Los tres formatos más usados para las reacciones con base en sistemas libres de células (Gregorio et al., 2019).	17
Figura 3. Representación simplificada del proceso de síntesis de proteínas (Shimizu et al., 2005).	20
Figura 4. Nanodiscos. A) Representación de la bicapa lipídica que conforma a un nanodisco. B) Representación de una proteína ensamblada en un nanodisco (color rosa) rodeado de una proteína “cinturón” (color verde).....	24
Figura 5. Construcción de un biosensor. Ambos el sensor y el reportero están contenidos en la plataforma que puede ser una célula o un sistema libre de células.	31
Figura 6. Los tres pasos para la detección de patógenos con un biosensor en un SLC (Thavarajah et al., 2020).	34
Figura 7. Diagrama de una sonda tipo baliza molecular (Kim et al., 2008).....	35
Figura 8. Amplificación isotérmica mediada por asa (LAMP) y desplazamiento de una sola hebra (OSD) (Jiang et al., 2015).	37
Figura 9. Método de aislamiento y amplificación de material genético en muestras de agua para la detección de materia fecal (Jiang et al., 2018).....	38
Figura 10. Biosensor de flúor con ribointerruptor (Thavarajah et al., 2019).....	40
Figura 11. Uso de un SLC para la producción de biosensores de flúor utilizando una enzima colorimétrica (Thavarajah et al., 2020).	42
Figura 12. Sistema de detección de atrazina (Silverman et al., 2020).	44
Figura 13. Interruptor de pie para la detección del virus del Zika (Pardee et al., 2016).....	47
Figura 14. Método de amplificación de ácidos nucleicos NASBA de ARN viral para su detección con un sensor tipo toehold (Pardee et al., 2016).	48
Figura 15. Detección del virus del Zika y virus del Dengue utilizando el biosensor de interruptor de pie aunado a la amplificación isotérmica de ácidos nucleicos NASBA (Pardee et al., 2016).	49
Figura 16. Metodología de detección del virus del Zika utilizando un SLC soportado en un disco de papel para su fácil transporte.....	50

NDICE DE TABLAS

Tabla 1. Comparación entre los sistemas libres de células <i>in vitro</i> contra los sistemas celulares tradicionales <i>in vivo</i>	30
--	----

ABREVIATURAS

SLC: Sistema libre de células

ADN, ADNs: Ácido(s) desoxirribonucleico(s)

ADP: Adenosin difosfato

AMP: Adenosin monofosfato

ARN, ARNs: Ácido(s) ribonucleico(s)

ARNm: Ácido ribonucleico mensajero

ARNr: Ácido ribonucleico ribosomal

ARNt, ARNts: Ácido(s) ribonucleico de transferencia

ATP: Adenosin trifosfato

GDP: Guanosín difosfato

GTP: Guanosín trifosfato

NTP: nucleósido trifosfato

PCR: Reacción de la polimerasa en cadena

PEP: Fosfoenol piruvato

PM, PMs: Proteína(s) de Membrana

PURE: Protein synthesis using recombinant elements

qPCR: Reacción de la polimerasa en cadena cuantitativa

scFvs: Fragmentos variables de anticuerpos funcionales de una sola cadena

SLC: Sistema libre de células

1 RESUMEN

Los sistemas libres de células (SLC) son una herramienta para la expresión genética y para la obtención de bioproductos que se basa en utilizar la maquinaria transcripcional y traduccional celular descartando el resto de la célula. Estos sistemas se presentan principalmente en dos formatos diferentes: El primero utiliza como base un extracto celular cuyo origen puede ser procarionte o eucarionte y que se obtiene después de un lisado de células, una serie de centrifugaciones y otros tratamientos para descartar la membrana celular y el material genético endógeno. El segundo (sistema PURE) se obtiene después de la integración de componentes recombinantes previamente purificados. A cualquiera de los dos formatos se les agrega un templado de ADN o ARN, energía y demás elementos necesarios para la traducción de una proteína y se incuban a 37° C por un par de horas. Posteriormente sólo hace falta una sencilla purificación y listo, obtenemos el producto deseado con un alto rendimiento usualmente.

Entre las aplicaciones más novedosas de los SLCs se encuentran la producción de proteínas que comúnmente son difíciles de expresar (proteínas de membrana, proteínas con puentes disulfuro, anticuerpos y bioterapéuticos), la construcción de biosensores para la identificación de patógenos, iones y moléculas y material viral, la construcción de células sintéticas, entre otras. Los beneficios que se les atribuyen a estos sistemas son, por ejemplo, el mejoramiento en el control de la calidad del producto ya que permite una fácil estandarización de los reactivos y un acceso directo a la maquinaria celular. Además, ya que estos sistemas carecen de una membrana celular selectiva, permiten la producción rápida de productos difíciles de expresar por su toxicidad en un sistema celular o por su necesidad de condiciones especiales para su expresión. Asimismo, ya que estos sistemas realizan todo el proceso de transcripción y traducción de una proteína, se pueden evaluar redes genéticas para estudiar procesos celulares. Por el otro lado, este tipo de sistemas aún no son comúnmente utilizados en la gran mayoría de los laboratorios alrededor del mundo por la complejidad y el costo que conlleva obtener un extracto celular que funcione correctamente por lo que hoy en día solo es utilizado como alternativa cuando no se obtienen resultados favorables con sistemas de expresión tradicionales.

2 INTRODUCCIÓN

Diferentes sistemas vivos han sido utilizados durante años para la expresión genética, producción de proteínas recombinantes y otras biomoléculas de interés en laboratorios alrededor de todo el mundo. Cuando se introduce ADN seleccionado a alguna célula,

comúnmente de bacteria o levadura, y se hace crecer en condiciones adecuadas, esta célula puede funcionar como una pequeña fábrica que produce la proteína cuya secuencia de aminoácidos está codificada en el ADN introducido, esta técnica conocida como expresión de proteínas recombinantes, permite utilizar un cultivo celular para expresar una proteína ya sea para su purificación o para estudiar procesos biológicos. Sin embargo, la técnica demanda cuidados especiales. Por ejemplo, para mantener a las células vivas y funcionando adecuadamente, éstas tienen que mantenerse a una temperatura específica en una cantidad considerable de medio de cultivo que contenga los nutrientes necesarios para su reproducción. Condiciones como éstas, pueden ser conseguidas en laboratorios de investigación con equipo especializado. Para la obtención de proteínas recombinantes, después del proceso de expresión de la proteína, ésta debe pasar por un paso complejo de purificación descartando el resto de la célula y otras proteínas. Cabe notar que los productos que se pueden obtener con la técnica de expresión de proteínas recombinantes son limitados, ya que en ocasiones éstos pueden ser tóxicos para la propia célula y pueden incluso matarla antes de producir la proteína de interés. Otro factor que hay que considerar es el tiempo necesario para la obtención de una proteína con este método, ya que pueden existir dificultades en la selección del tipo de organismo para la expresión de la proteína, en la expresión de esta y en los procesos de purificación, de manera que se requieran varias semanas o meses y numerosos intentos para lograr obtenerla. En resumen, la producción de enzimas y otras biomoléculas utilizando líneas celulares resulta tardada y muchas veces complicada.

Un sistema libre de células (SLC) es una herramienta que permite sintetizar proteínas y otros metabolitos sin necesidad de la presencia de una célula completa, haciendo uso únicamente de sus maquinarias de transcripción y traducción (Silverman et al., 2020). Esta herramienta ha sido objeto de estudio por varios años y actualmente está teniendo auge para aplicaciones como la producción de proteínas complejas, fármacos, vacunas y otras biomoléculas de interés para su investigación permitiendo, además, llevar la biotecnología a lugares a los cuales “las células no pueden ir” gracias a la practicidad de su conservación y transporte (Jiang et al., 2015).

Además de la obtención de biomoléculas, los SLCs han transformado la biología sintética facilitando el estudio de sistemas biológicos, la producción de células sintéticas y la detección de compuestos por medio de biosensores. Este trabajo compila información novedosa sobre los SLCs, abordando los componentes necesarios del sistema, las

aplicaciones más innovadoras reportadas en los últimos años y las ventajas y desventajas que ofrece sobre los sistemas celulares tradicionales.

3 SISTEMAS LIBRES DE CÉLULAS

Es sabido desde hace aproximadamente 60 años que la activación de procesos biológicos sin necesidad de células vivas íntegras es posible. Con el interés particular de estudiar el proceso de traducción, en ese momento desconocida, del ARNm a una proteína, Marshall Nirenberg y Heinrich Matthaei rompieron células de *E. coli*, sacaron su contenido y a éste le agregaron ARNm externo monitoreando los aminoácidos de las proteínas expresadas. Con esta herramienta pudieron descifrar el código genético emparejando aminoácidos con tripletes sintéticos de nucleótidos presentes en el ARNm. En 1968 le fue otorgado a Nirenberg el premio Nobel de medicina por la descripción del código genético (Nirenberg y Matthaei, 1961).

Al realizar una expresión génica en sistemas libres de células, comúnmente se utiliza un extracto celular por lo que aun cuando no se tiene la célula íntegra, se conservan los elementos que componen su maquinaria molecular. Por ejemplo, polimerasas para la transcripción y ribosomas para la traducción, entre otros. A este extracto obtenido en la fase exponencial de crecimiento, se agregan otros elementos como aminoácidos, nucleótidos, cofactores y sales además de un sistema de generación continua de energía en forma de ATP y GTP (Fig. 1). De esa manera, se activan los mecanismos de transcripción y traducción y se realiza la síntesis de proteínas *in vitro* (Silverman et al., 2020).

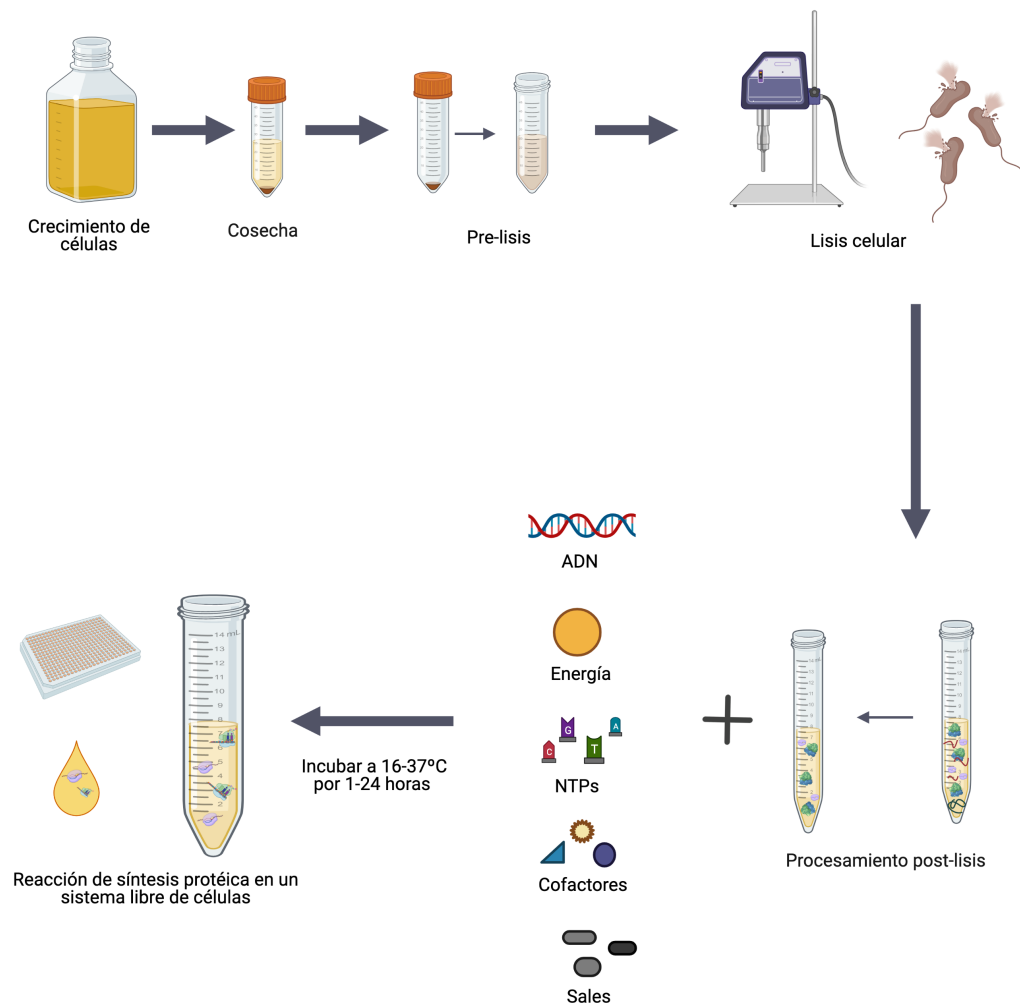


Figura 1. Diagrama simplificado del proceso experimental para la síntesis de una proteína en un SLC.

Una de las ventajas de la expresión génica en sistemas libres de células es la posibilidad de manipular el sistema directamente a nivel molecular para la expresión de genes permitiendo centrar todos los recursos para la biosíntesis de un solo producto. Otra ventaja sumamente importante es que los extractos celulares pueden ser liofilizados con nitrógeno líquido evitando la degradación de proteínas y de otras moléculas, como los ribosomas, lo cual permite su transporte a cualquier lugar en donde con la adición de agua y un templado (ADN o ARNm) se activa el sistema. Del mismo modo, se debe considerar que el hecho de congelar y descongelar estos sistemas múltiples veces puede provocar una degradación en los componentes (Jiang et al., 2018).

Además de los sistemas libres de células basados en extractos celulares, se ha desarrollado recientemente otra modalidad, la cual pretende resolver problemas como la degradación de producto por nucleasas y proteasas. El sistema "PURE" es un sistema de síntesis de proteínas reconstituido que usa componentes recombinantes purificados de las maquinarias traduccional y transcripcional (Shimizu et al., 2005; Shimizu & Ueda, 2010). Sobre este sistema se hablará a fondo más adelante.

Aunque los SLCs son conocidos desde hace muchos años, su uso para la síntesis de proteínas no es frecuente ya que los tiempos de reacción solían ser muy cortos, los costos de los reactivos (por ejemplo, los nucleótidos) son altos, las proteínas con puentes disulfuro no podían plegarse correctamente y en general no se conocía a detalle el funcionamiento del sistema. Como consecuencia de esto, los rendimientos eran bajos y variables. Por ejemplo, antes del año 2000, los rendimientos rondaban el 0.1 mg de proteína sintetizada por mL de reacción (Carlson et al., 2012). Por el otro lado, en los últimos años se han establecido protocolos para la síntesis de proteínas en SLCs que garantizan rendimientos mayores a 1 mg de proteína por mL de reacción y la duración de los procesos discontinuos o *batch* se ha conseguido prolongar a varias horas gracias a que se han estudiado nuevas formas para regenerar el ATP durante la síntesis de proteínas (Madin et al., 2000).

En síntesis, el estudio detallado de estos sistemas para la optimización energética dentro de ellos ha permitido la transformación de la tecnología de los SLCs de una "caja negra" a una colección de reacciones químicas que se entiende y se controla alterando la presencia y la proporción de sus componentes (Kim et al., 2011, Swartz, 2006).

Otros avances que se han logrado en la síntesis de proteínas utilizando SLC es la posibilidad de optimizar la formación de puentes disulfuro *in vitro* en las proteínas que los requieren (Goerke y Swartz, 2008; Kim y Swartz, 2004; Yin y Swartz, 2004) e inclusive existen protocolos para la producción con altos rendimientos de proteínas "difíciles de expresar" (Thoring et al., 2017). Algo de suma importancia es que los costos de utilizar esta herramienta han disminuido. Por ejemplo, un sistema para la síntesis de una proteína libre de células con un extracto preparado "en casa" cuesta alrededor de 0.019/ μ L USD por reacción (Gregorio et al., 2019). Así pues, en los últimos años se ha alcanzado el precio de \$0,021 USD por μ g de proteína producida (Levine et al., 2019).

Por otra parte, en contraste con los ensayos a pequeña escala que se realizaban en el pasado, la escala de las reacciones se ha conseguido aumentar hasta volúmenes de reacción de 100 litros en procesos discontinuos o *batch* (Carlson et al., 2012).

El estudio a profundidad de los SLC también ha permitido tener en cuenta, entre otros factores, que igualar las condiciones fisiológicas que se tendrían en el citoplasma de una célula de *E. coli* por ejemplo, dentro de un sistema libre de células puede permitir una más eficiente traducción de proteínas dentro de éste (Jewett y Swartz, 2004).

Los avances anteriormente mencionados, entre otros, han inspirado a científicos alrededor del mundo a desarrollar nuevas aplicaciones en la síntesis de proteínas. Tal es el caso de la construcción de librerías de proteínas para la biología estructural, la producción de fármacos, anticuerpos monoclonales y proteínas integrales de membrana.

En el ámbito industrial, los sistemas libres de células prometen ayudar en procesos en donde los tiempos de producción necesiten ser cortos. Además, en la producción eficiente de biocombustibles y otras sustancias químicas (Hodgman y Jewett, 2012).

Por otra parte, en el ámbito de la investigación, los SLCs presumen ser una gran herramienta para la identificación de moléculas presentes en diferentes muestras, ya que actualmente se trabaja en el desarrollo de biosensores soportados en SLCs los cuales al contacto con la muestra emiten una señal visible dependiendo de la presencia de un analito lo cual podría presentar una alternativa a las pruebas qPCR por ejemplo (Thavarajah et al., 2020).

3.1 Composición de un sistema libre de células para la expresión de un gen/síntesis de una proteína

3.1.1 Sistemas libres de células basados en un extracto celular

Un sistema libre de células para la expresión de un gen y la posterior obtención de una proteína tiene tres componentes básicos: el extracto celular, una mezcla de reacción y el ADN o ARN molde.

El extracto celular: Este se obtiene de una cepa “fuente” y contiene los elementos necesarios para la transcripción, traducción, plegamiento de la proteína y metabolismo básico para el uso de energía. También contiene ribosomas, la ARN polimerasa, factores sigma en el caso de procariontes, factores de iniciación y elongación, aminoacil-tARN sintetasas, factores de liberación, chaperonas y enzimas relacionadas con la energía (Carlson et al., 2012, Saibil, 2013).

La cepa fuente es crecida en medio de cultivo enriquecido y lisada para obtener el extracto celular funcional también llamado S30 (sobrenadante después de una centrifugación a

30,000 g), por lo que el extracto celular consiste en una mezcla de todos los componentes solubles de la célula excepto macromoléculas como las membranas plasmáticas y el ADN genómico que son retiradas mediante múltiples rondas de lavados y centrifugaciones (Jin y Hong., 2018, Shimizu et al., 2005).

En función de la aplicación para la cual sea destinado el SLC, existen diversos protocolos para el tratamiento de los extractos celulares antes de introducir el templado de ADN o ARNm (Liu et al., 2005). Por ejemplo, se suele realizar una incubación previa del extracto celular con la mezcla de reacción pero sin un templado con el objetivo de que los ribosomas en el extracto terminen de trabajar sobre los ARNs mensajeros endógenos (*ribosomal RUN-OFF reaction*), Posteriormente, después del lisado, se realiza una diálisis contra una disolución amortiguadora para descartar los productos obtenidos en la reacción *run-off*, lo cual ha demostrado una mejora en la expresión de la proteína ya que los ribosomas están completamente disponibles para la síntesis de ésta (Liu et al., 2005, Silverman et al., 2019). La eliminación de fosfatasa en el espacio periplásmico para disminuir su actividad de hidrólisis de ATP también ha sido utilizada para aumentar la producción de enzima total de un 30 % a un 70 % (Kang et al., 2000). Otra opción es utilizar una cepa optimizada genéticamente para reducir las actividades de proteasas y la estabilización de aminoácidos y ADN exógenos. Igualmente, se han hecho tratamientos controlados con nucleasas para remover ADN o ARN endógenos. Por otro lado, si los ARNm's a expresar son de origen eucarionte se pueden utilizar cepas optimizadas que expresen ARNt's capaces de reconocer los codones correspondientes (Chong et al., 2014, Gregorio et al., 2019, Kim et al., 2020, Michel-Reydellet et al., 2004, Michel-Reydellet et al., 2005).

Mezcla de reacción: Esta mezcla se compone de factores necesarios para la síntesis de una proteína como aminoácidos, NTPs, sales (por ejemplo, cationes amonio, magnesio y potasio), ARNs de transferencia, poliaminas, agentes para el hacinamiento molecular, ATP, GTP y otros aditivos metabólicos como pueden ser el oxalato para inhibir la gluconeogénesis, glutatión para formar puentes disulfuro y ácido folínico para la síntesis de formilmetionina (Silverman et al., 2019).

El ADN o ARNm molde: el ADN que funciona como templado para la reacción puede estar en forma de plásmido o puede ser un ADN lineal obtenido por PCR. Usualmente se adiciona en una concentración de 10 a 20 µg/mL (Silverman et al., 2019).

El extracto celular, la mezcla de reacción y el ADN o ARNm se incuban juntos a temperaturas de 16 °C a 37 °C y la reacción de síntesis de proteínas se prolonga hasta que alguno de los sustratos, por ejemplo, el ATP se agota o hasta que la acumulación de algún producto alcanza una concentración inhibitoria; por ejemplo, la del fosfato inorgánico el cual disminuye la concentración del ion magnesio libre requerido para la transcripción del ADN (Tarui et al., 2001).

Los sistemas de expresión genética libres de células que más se utilizan se basan en los extractos de *Escherichia coli* S30, pero también se pueden utilizar extractos de levadura, de células germen de trigo, de células de insecto, de reticulocitos de conejo, de células de ovarios de hámster chino, de células HeLa y de otras líneas celulares poco exploradas como *Streptomyces lividans*, *Vibrio natriegens*, *Bacillus subtilis*, *Bacillus megaterium*, *Pseudomonas Putida*, *Neurospora crassa*, *Nicotiana tabacum*, *Arabidopsis thaliana*, *Leishmania tarentolae* y algunos organismos Archea (Gregorio et al., 2019). La elección de la fuente celular para el sistema de expresión se realiza de acuerdo con la disponibilidad de las células, al rendimiento de síntesis de proteína que se requiere, al tipo de proteína a expresar y al costo, ya que, al provenir de células diferentes, los componentes de la maquinaria de transcripción y traducción varían en su eficiencia para producir diferentes proteínas. Los extractos de *E. coli* se obtienen después de una preparación sencilla y barata, tienen rendimientos de síntesis de proteína altos que van desde cientos de microgramos por mililitro a miligramos por mililitro en reacciones *batch*. Además, se sabe que el sistema de *E. coli* es el sistema bacteriano más estudiado del mundo, no obstante, las limitaciones que esta fuente presenta incluyen, por ejemplo, que la bacteria no es capaz de hacer modificaciones post-traduccionales específicas de eucariotes (Carlson et al., 2012). Los extractos basados en el sistema de levadura *Saccharomyces cerevisiae* tienen beneficios parecidos al sistema de *E. coli* al ser un sistema muy estudiado y utilizado (Iizuka et al., 1994). Destaca en este sistema la posibilidad de obtener algunas modificaciones específicas de eucariotes y que se puede conseguir el plegamiento correcto de proteínas complejas, lo cual algunas veces no es posible conseguir expresándolas en *E. coli* (Chang et al., 2005). Por otro lado, se debe tener en cuenta que las paredes celulares de levaduras están compuestas por una red rígida de polisacáridos haciendo que la lisis celular sea un poco más complicada que la de las células de bacteria. Asimismo, las levaduras tienen abundantes ATPasas y fosfatasa en su interior y los rendimientos de síntesis de proteínas obtenidos no son muy altos (Carlson et al., 2012). Los extractos de células de germen de trigo se han utilizado para expresar múltiples proteínas de origen eucariote, permiten los

más altos rendimientos en la síntesis de proteínas de este origen incluyendo proteínas complejas y son una línea celular comúnmente utilizada en proteómica debido a los altos rendimientos obtenidos (Takai et al., 2010). Sin embargo, la cantidad de extracto obtenido es baja y es necesario hacer un proceso de lavado especial al germen que toma un tiempo considerable (Madin et al., 2000). Por otra parte, las células de insecto, *Spodoptera frugiperda*, se utilizan por su fácil lisis y preparación del extracto (Ezure et al., 2010). Además, se pueden obtener fácilmente modificaciones postraduccionales como glicosilaciones (Tarui et al., 2001), por lo que, aún cuando el cultivo de estas células es caro, tardado y las herramientas de modificación genética son pocas, este sistema basado en células de insecto es el que más rápidamente se está desarrollando para la expresión de proteínas de naturaleza eucariote (Carlson et al., 2012). Para todos los formatos antes mencionados existen actualmente disponibles en el mercado kits de sistemas libres de células comerciales listos para usarse que garantizan rendimientos que van desde los 100 µg/mL para los extractos de células de insecto, por ejemplo, hasta los 10 mg/mL para extractos de germen de trigo (Chong S., 2014). Esto representa una buena opción para laboratorios que carecen de equipo o de conocimiento para preparar sus propios sistemas libres de células, aunque se debe considerar que el costo por reacción utilizando un kit comercial basado en un lisado celular es de 0.15–0.57/µL USD lo cual es aproximadamente 8 veces el costo con un lisado celular preparado “en casa” (Gregorio et al., 2019).

El proceso de biosíntesis utilizando un SLC puede durar desde 1 a 24 horas en un proceso *batch* (Levine et al. 2019). Con respecto al volumen de la reacción, el estándar para reacciones a pequeña escala es del orden de los 10 µL pero dependiendo de la aplicación puede variar desde 10^{-15} a 10^{-3} L. Normalmente la reacción se lleva a cabo en tubos de 1 mL o en una microplaca de pozos. Los rendimientos de este tipo de reacciones se encuentran en el rango de entre 100 µg/mL hasta 1 mg/mL, aunque se han reportado rendimientos de hasta 2.3 mg/mL de proteína producida en un proceso *batch* (Caschera y Noireaux, 2014; Silverman et al., 2019).

Además de los procesos *batch* para síntesis de proteínas, se han desarrollado sistemas de intercambio continuo (con un constante suministro de los sustratos necesarios) o de flujo continuo (constante suministro de sustratos y constante extracción de productos y subproductos) (Fig. 2) con los que se pueden obtener mayores rendimientos que con las reacciones por lotes. Este intercambio se consigue, por ejemplo, utilizando una membrana para diálisis que permita la continua administración de sustratos (Gregorio et al., 2019).

Las reacciones de síntesis de proteínas utilizando SLC se pueden realizar en un formato acoplado o desacoplado. En las reacciones en formato acoplado, la transcripción y la traducción de la proteína se llevan a cabo en un mismo tubo. En las reacciones en formato desacoplado, se realiza la transcripción *in vitro* en un primer tubo, se purifica el ARNm que se produce y posteriormente es adicionado a un segundo tubo en donde se encuentra la maquinaria celular restante para realizar la traducción de la proteína. Esta segunda opción se utiliza para plataformas libres de células de origen eucarionte debido al procesamiento requerido del ARNm para obtener una mejor traducción de algunos transcritos o para manejar condiciones distintas en la transcripción y traducción de la proteína (Gregorio et al., 2019, Hansen et al., 2016).

En síntesis, el contar con un SLC óptimo para la expresión de una proteína no es algo trivial. Se deben optimizar diversos parámetros como la concentración de componentes, la concentración de sales, el pH y el continuo abasto de energía. Por esta razón hoy en día su uso en México, por ejemplo, es prácticamente nulo.

Formatos de reacción para sistemas libres de células

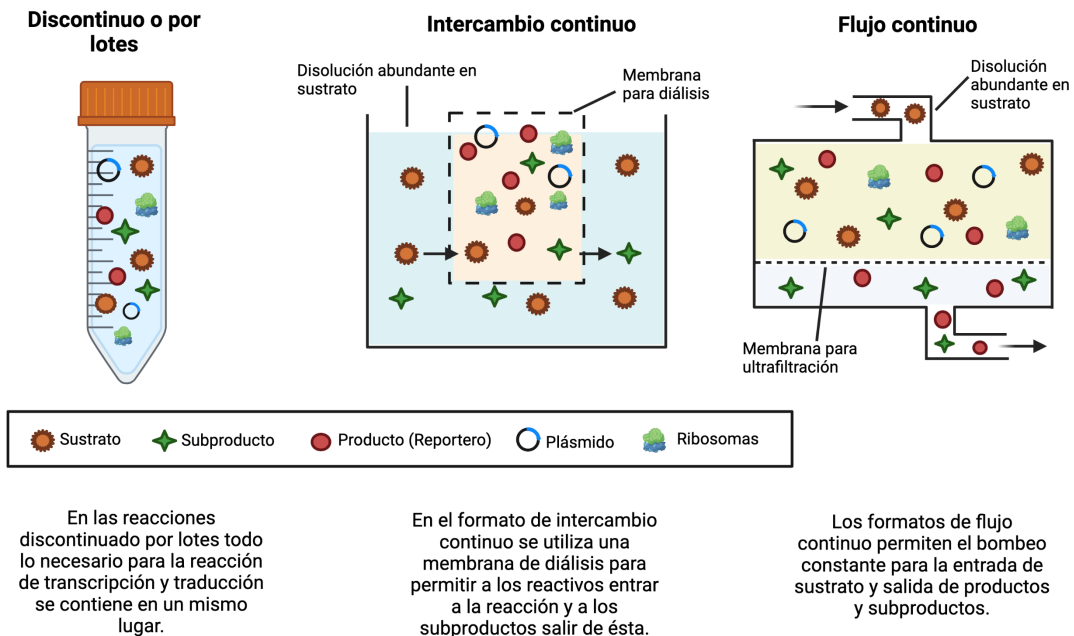


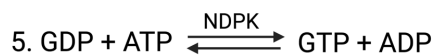
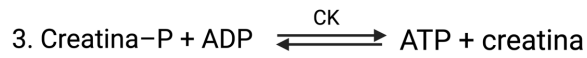
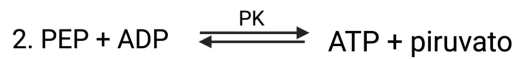
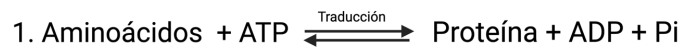
Figura 2. Los tres formatos más usados para las reacciones con base en sistemas libres de células (Gregorio et al., 2019).

3.1.2 Sistemas libres de células para la síntesis de proteínas utilizando elementos recombinantes PURE

Es importante mencionar que, dentro de los extractos celulares utilizados para la producción de proteínas en sistemas libres de células, solo una parte de los factores presentes participan en el proceso de la síntesis de una proteína e incluso algunos de los factores que no participan en este proceso pueden inhibir la reacción. Ejemplo de estos son las nucleasas y proteasas que degradan los sustratos utilizados y/o los productos de las reacciones.

Los sistemas llamados PURE por sus siglas en inglés (Protein synthesis using recombinant elements) contienen todos los factores estrictamente necesarios para la traducción de una proteína previamente purificados y con actividad comprobada lo cual permite una producción eficiente de la proteína. Estos están disponibles a la venta como PURESYSYSTEM kits por diversos laboratorios como el Instituto Post Genome Institute Co., Ltd de Japón (Shimizu et al., 2005).

Para completar la traducción de un marco abierto de lectura codificado en una secuencia de ARNm en *E. coli* por ejemplo, diversos factores son necesarios (Fig. 3): tres factores de iniciación (IF1, IF2 y IF3), tres factores de elongación (EF-G, EFTu y EF-Ts), tres factores de terminación (RF1, RF2 y RF3, aunque se sabe que RF2 no es requerido para la traducción de genes que terminan con los codones UAG y UAA) y un factor para el reciclaje de los ribosomas (RRF) (Shimizu et al., 2005). Además, existen tres reacciones necesarias para que el paso de traducción ocurra: la transcripción para la síntesis de ARNm, la aminoacilación de ARNts y la regeneración de energía. Debido a esto, el sistema PURE incluye los 10 factores anteriormente mencionados, una ARN polimerasa T7, 20 aminoácidos, 20 aminoacil-ARNt sintetasas para la aminoacilación de los ARNts, ribosomas, 46 ARNts, NTPs, pirofosfatasa, metionil-ARNt transformilasa, creatina fosfato, PEP, ATP, GTP, tetrahidrofolato y los elementos necesarios para la regeneración de energía: piruvato cinasa (PK), creatina cinasa (CK), adelinato cinasa (AK) y nucleósido difosfato cinasa (NDPK) las cuales catalizan la reacción de fosforilación de mono y di nucleótidos asegurando la existencia de una reserva constante de ATP y GTP. La regeneración de energía en los SLCs se basa principalmente en las siguientes reacciones que utilizan como reactivos la creatina fosfato para sistemas eucariontes y el fosfoenol piruvato y creatina fosfato para sistemas procariontes (Biondi, 1996, Shimizu et al., 2005, Swartz, 2006):



Todos los factores mencionados previamente se sobre expresan y purifican. Posteriormente, a esta mezcla de factores se le añade el templado (ADN, producto de PCR o ARNm) y se incuba a 37° C por 1 ó 2 horas para continuar con la purificación de la proteína objetivo (Shimizu et al., 2005).

Una ventaja de los sistemas PURE es que utilizan un método de purificación contrario al de los sistemas de extracto celular, en donde los factores de traducción que componen al sistema PURE están marcados con una etiqueta de histidina. Por lo tanto, la purificación de la proteína producto se puede conseguir, por ejemplo, después de agregar resina quelante con Ni⁺ (Ni-NTA agarosa) incubar la mezcla por 1 hora a 4 °C y realizar una ultrafiltración a través de una membrana para remover todos los factores marcados con la etiqueta de histidina y los ribosomas, quedando una solución con la proteína producto (Shimizu et al., 2005).

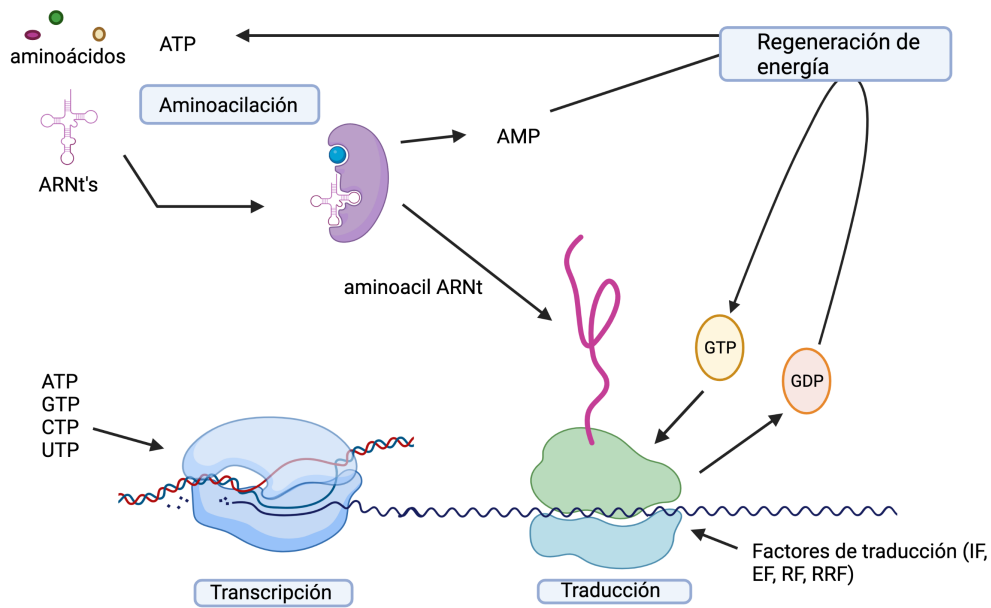


Figura 3. Representación simplificada del proceso de síntesis de proteínas (Shimizu et al., 2005).

Se ha demostrado que utilizando un sistema PURE se pueden producir proteínas con una muy alta actividad y con buenos rendimientos (50-200 µg/mL), ya que al utilizar componentes puros el sistema no contiene sustancias inhibitorias como nucleasas y proteasas. Además, se ha visto que la actividad de ATPasas en este tipo de sistemas es baja en contraste con el rápido agotamiento de energía que se observa cuando se utilizan los extractos celulares de *E. coli*, por lo que la productividad de la síntesis de proteínas comparada con la concentración de la fuente de energía que se le provee es más alta. Los rendimientos de producción de una proteína utilizando este sistema para una reacción *batch* se encuentran en el orden de los cientos de microgramos por mL por hora (Chong S., 2014, Shimizu et al., 2001).

Para obtener un correcto plegamiento se sabe que, en ocasiones, algunas proteínas requieren chaperonas o chaperonas moleculares durante o al final de la traducción (Saibi, 2013). Sin la presencia de estas chaperonas moleculares la proteína que se obtiene como producto de una síntesis forma agregados no activos. Este fenómeno se mantiene durante la síntesis de una proteína utilizando el sistema PURE original, por lo que se ha probado la

adición de las chaperonas moleculares DnaK y GroEL/GroES al sistema PURE obteniéndose como resultado el plegamiento correcto de las proteínas que mantienen una alta actividad (Shimizu et al., 2005).

En resumen, para estudios con interés en la traducción de proteínas y para aplicaciones biotecnológicas, el sistema PURE provee de un mejor control sobre la reacción en comparación a los sistemas basados en extractos celulares y se puede ajustar dependiendo de los requisitos específicos de la síntesis de cada proteína. Esto lo convierte en un sistema de mucho interés para su continuo desarrollo y aplicación, aunque sus rendimientos no representan una diferencia sustancial con respecto a los SLCs basados en extractos celulares.

4 APLICACIONES DE LOS SLC

4.1 Síntesis de proteínas difíciles de expresar

La formación de cuerpos de inclusión y pérdida de solubilidad, la pérdida de actividad debido a un plegamiento incorrecto o la degradación de las proteínas por proteasas son problemas comunes al sobreexpresar una proteína en un sistema como *E. coli*. Debido a la constante demanda de proteínas recombinantes tanto en la investigación como en la industria, numerosas herramientas moleculares y protocolos se han publicado para ayudar a la obtención y al mejoramiento del rendimiento en la producción de estas proteínas “difíciles de expresar”. No obstante, la expresión *in vivo* de cualquier proteína tiene una limitación constante de la que no es posible librarse: El tener que mantener saludables y estables a las células para que el plegamiento y actividad de las proteínas sean correctos (Jin y Hong., 2018). Este amplio grupo de proteínas difíciles de expresar abarca terapéuticos contra el cáncer, vacunas, anticuerpos, proteínas con aminoácidos no naturales, entre otras. Asimismo, hay proteínas que resultan ser tóxicas para la célula por lo que su producción no puede ser completada como, por ejemplo, las proteínas de membrana, que pueden perturbar el metabolismo central celular y detener el crecimiento celular (Jensen et al., 2017).

4.1.1 Proteínas de membrana

Las proteínas de membrana (PMs) son esenciales para la supervivencia de la célula participando en la transducción de señales, en la comunicación celular, el metabolismo de energía y en los procesos de transporte. Estas proteínas juegan papeles clave en enfermedades por lo que son el objetivo de gran parte de las drogas terapéuticas (Mathieu

et al., 2019). La extracción de PMs nativas para estudios bioquímicos y estructurales comúnmente resulta insuficiente debido a su baja abundancia en la fuente natural, por lo que el poder recuperar el material necesario es complicado. Por esta razón, las PMs son regularmente sobreexpresadas en sistemas heterólogos (Mathieu et al., 2019). Sin embargo, debido a que naturalmente están embebidas en membranas celulares, la expresión y caracterización de las PMs se puede convertir en un gran reto. La dificultad para sobreexpresar este tipo de proteínas funcionales de manera recombinante se debe a su naturaleza hidrofóbica, a limitaciones intrínsecas en cuanto a su plegamiento y algunas veces, al ensamblado de distintas subunidades que conforman la proteína. Asimismo, la expresión de las PMs es baja debido a que las células regulan fuertemente la síntesis de este tipo de proteínas para producir sólo la cantidad requerida para mantener la integridad de la membrana (Henrich et al., 2015). Debido a esto al sobreexpresar PMs en un sistema heterólogo frecuentemente se presentan problemas de agregación, pérdida de actividad y muerte de la célula en la cual se expresa (Sachse et al., 2014). Además, la función y actividad de una PM no depende solamente de la producción de ésta sino también en gran parte de que la proteína se encuentre inmersa en un ambiente favorable. Parámetros importantes a nivel de la membrana como la composición lipídica, la tensión, la fluidez, la longitud de la cadena hidrofóbica, la carga, el potencial transmembranal, la hidratación, entre otros, regulan la función y las propiedades de las PMs. Estas propiedades membranales dictan la estructura y la función de las PMs a diferentes escalas y se deben tomar en cuenta al intentar obtener una proteína de membrana correctamente plegada y funcional (Sachse et al., 2014). Dentro de este marco, los sistemas libres de células se han vuelto una creciente plataforma para la producción y caracterización de PMs, eliminando la mayoría de los problemas presentes durante su producción debido a la naturaleza abierta de las reacciones y a su versatilidad para diseñar y optimizar ambientes de expresión, independientemente de su origen, tamaño, topología y función (Junge et al., 2011). En años recientes, un número creciente de ejemplos de PMs producidas en SLC incluyen proteínas como la ATP sintasa (Matthies et al., 2011) y receptores acoplados a proteínas G (Proverbio et al., 2013).

Las reacciones de síntesis en SLC pueden ser suplementadas con una variedad de aditivos compatibles con el sistema para estabilizar la síntesis de proteínas y proveer de un ambiente hidrofóbico para la estabilidad de las PMs (Sachse et al., 2014). Detergentes formadores de micelas, liposomas y nanodiscos han sido adicionados para conseguir la presencia de estructuras tipo membranas. La selección de detergentes se realiza

cuidadosamente escogiendo aquel en el que la proteína de membrana se comporte adecuadamente ya que diferentes proteínas de membrana se comportan de manera diferente en el mismo detergente, así como una PM se comporta diferente en distintos detergentes.

Un ejemplo de la expresión de PMs en SLC es el caso de la producción de receptores del olfato de *Drosophila melanogaster*, DmOR67a, DmOR85b y DmORCO, la cual había sido reportada como no exitosa en células de *E. coli* y en SLC con extractos celulares de *E. coli* sin aditivos (Carragher et al., 2013), pero resultó ser óptima en la presencia de un surfactante muy parecido al Brij-35. Pruebas de dicroísmo circular y termoforesis a microescala indicaron un plegamiento adecuado y unión con sus ligandos. Además, los receptores se obtuvieron con el nivel de pureza necesario para ser analizados estructuralmente (Tegler et al., 2015).

Históricamente, para la solubilización de proteínas de membrana en sistemas de células completas y SLC se utilizaban detergentes para formar micelas constituidas por una mezcla de detergente-proteínas-lípidos. Sin embargo, además de las diferencias de estabilidad que presentan las proteínas en los diferentes detergentes como la ejemplificada anteriormente, un exceso de fase micelar puede interferir en técnicas de análisis; por ejemplo, modificando las señales ópticas de absorbancia y dispersión de la luz (Bayburt y Sligart 2010). También, varios sistemas de proteínas membranales requieren la presencia de ciertos tipos de fosfolípidos para mantenerse activos, lo cual no puede ser imitado por micelas de detergente. La preparación de liposomas surgió como una opción para la producción de PMs y se ha encontrado útil para las pruebas en donde la actividad de ambos lados de la bicapa es necesaria, por ejemplo, para los ensayos de canales iónicos. Sin embargo, los liposomas comúnmente resultan de gran tamaño, inestables y difíciles de preparar con el control preciso de tamaño y estequiometría (Bayburt y Sligart 2010). Debido a esto, recientemente fueron introducidos en SLC los nanodiscos, los cuales proveen de un ambiente hidrofóbico artificial para mejorar el plegamiento y funcionalidad de proteínas (Jin y Hong, 2018). Los nanodiscos son bicapas fosfolipídicas a nano escala (Fig. 4A) rodeadas por una proteína andamio que actúa como “cinturón”. Estos nanodiscos tienen la capacidad de auto-ensamblar proteínas de membrana post-traduccionalmente para su investigación biofísica, enzimática y estructural manteniendo su plegamiento en solución (Fig. 4B) (Bayburt y Sligar, 2010). Las ventajas que ofrecen los nanodiscos sobre los liposomas o las micelas de detergente son su menor tamaño, alta estabilidad y fácil acceso a ambos lados del dominio de la bicapa fosfolipídica, lo cual permite estudiar las interacciones de unión

con el ligando, así como las interacciones de unión con moléculas de señalización en el lado citoplasmático (Babyburt y Sligar, 2010, Sachse et al., 2014).

Otro tipo de PMs que han sido producidas de manera exitosa en SLC son las oligosacariltransferasas (OSTs). Estas PMs son enzimas que catalizan la unión de glicanos a residuos de aminoácidos específicos en ciertas proteínas. La producción de este tipo de enzimas es complicada ya que suelen ser grandes (>70 kDa) y poseen múltiples hélices transmembranales por lo que sobreexpresarlas en células completas es un reto (Schoborg et al., 2018). Una OST, la Proteína de glicosilación B (PglB) de *Campylobacter jejuni*, fue sintetizada recientemente utilizando un SLC de *E. coli* con nanodiscos lipídicos (Schoborg et al., 2018). La optimización del uso de detergentes y nanodiscos como imitadores de membrana celular permitió la producción de PglB activa con rendimientos 420 µg/mL (Schoborg et al., 2018).

En resumen, dependiendo del tipo de PM y del propósito de la síntesis de ésta, se debe escoger la herramienta adecuada para imitar la membrana celular. La optimización de ambientes en sistemas libres de células generados por la incorporación de aditivos puede expandir el estudio de diferentes proteínas de membrana y permitir la caracterización más detallada de sus funciones.

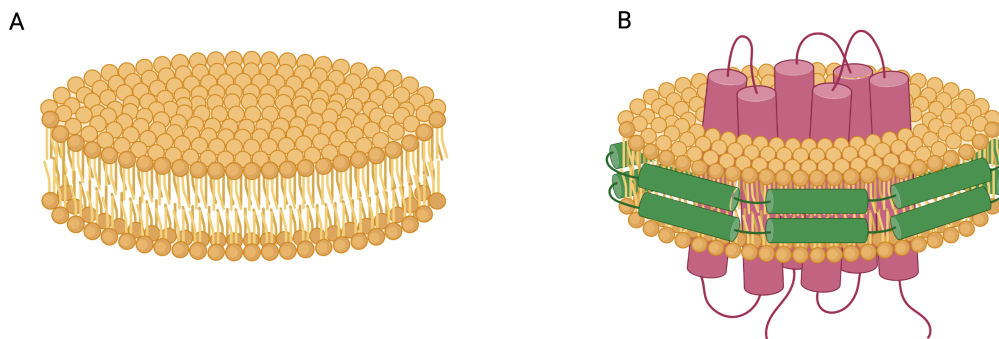


Figura 4. Nanodiscos. A) Representación de la bicapa lipídica que conforma a un nanodisco. B) Representación de una proteína ensamblada en un nanodisco (color rosa) rodeado de una proteína "cinturón" (color verde).

4.1.3 Proteínas con puentes disulfuro

Algunas de las estrategias para favorecer la formación de los puentes disulfuro correctos en una proteína en un SLC incluyen optimizar las condiciones rédox del ambiente

adicionando glutatión oxidado (GSH) y glutatión reducido (GSSG). Además, se requiere adicionar/expresar enzimas que ayudan al reordenamiento como la proteína disulfuro isomerasa, la cual cataliza el intercambio interno de puentes disulfuro evitando la acumulación de los intermediarios con puentes disulfuro incorrectos en el retículo endoplasmático de células eucariotas y la adición o expresión de chaperonas (DnaK, DnaJ, GroEL, GroES), que comúnmente asisten el plegamiento de las proteínas (Stetch y Kubick, 2015). También, los extractos celulares pueden ser pretratados con yodoacetamida y mezclas de GSH y GSSG para desactivar reductasas endógenas presentes en los extractos (Stetch y Kubick, 2015).

4.1.4 Anticuerpos

Los anticuerpos monoclonales y los fragmentos de anticuerpos son los productos biofarmacéuticos más importantes hoy en día ya que son piezas clave para el diagnóstico, la terapia y la investigación de enfermedades (Stech y Kubick, 2015). Existen dos grandes problemas que se presentan durante la producción de anticuerpos. El primero es la incorrecta formación de los puentes disulfuro intramoleculares, los cuales son cruciales para el plegamiento de cada dominio. El segundo problema que se puede presentar durante la expresión de anticuerpos, debido a su naturaleza eucariote, es la carencia de modificaciones postraduccionales como las N-glicosilaciones que se presenta si se utilizan sistemas de expresión como *E. coli*. Tanto la formación de puentes disulfuro como las modificaciones postraduccionales son necesarias para la correcta actividad de los anticuerpos por lo que contar con un sistema que pueda proveer ambas características es necesario (Stech y Kubick, 2015). Un sistema frecuentemente utilizado para expresar anticuerpos en células completas son las células de mamífero; sin embargo, utilizar este sistema para la expresión heteróloga de proteínas tiene varios inconvenientes como son la lenta tasa de crecimiento, los bajos rendimientos del producto, la alta probabilidad de contaminación viral y la necesidad de suero para la expresión. Debido a esto, el uso de células de mamífero es una opción costosa y tardada para la producción a gran escala de anticuerpos por lo que es de gran interés encontrar otras alternativas (Spadiut et al., 2014). En la última década, se han establecido estrategias exitosas utilizando SLC para producir anticuerpos en menos tiempo y utilizando menos recursos que la producción de anticuerpos basada en células completas (Stetch y Kubick, 2015). Extractos celulares eucariotes y procariotes se utilizan para producir anticuerpos y fragmentos de anticuerpos en sistemas

libres de células optimizando las condiciones para estabilizar la estructura y solubilidad de los productos (Jin y Hong, 2018).

Stech et al. del Instituto Fraunhofer para la terapia e inmunología celular demostraron la expresión de fragmentos variables de anticuerpos funcionales de una sola cadena (scFvs) en un sistema de traducción in vitro eucariote basado en extractos de células de insecto *Spodoptera frugiperda* (Sf21). Los ScFv son los fragmentos de anticuerpos más pequeños que conservan el sitio completo de unión antígeno-anticuerpo. Estos fragmentos consisten en el dominio variable de la cadena pesada y el dominio variable de la cadena ligera conectados por un linker peptídico (Stech et al., 2014). La expresión de 3 moléculas scFv solubles y funcionales con diferentes especificidades fue conseguida con el uso de extractos de células de insecto Sf21, debido a que se ha demostrado que un tratamiento en condiciones suaves durante la lisis celular de estos extractos asegura la presencia de estructuras membranosas subcelulares intactas (microsomas) derivadas del retículo endoplásmico (Sachse et al., 2012). Esto último permite la traslocación cotraduccional de proteínas objetivo hacia el lumen de las vesículas y garantiza el correcto plegamiento y actividad de las scFv. Los templados utilizados en dicho estudio para la expresión de las scFv fueron ADNs lineales productos de PCRs adicionados directamente al sistema de traducción y las condiciones redox para la producción de las scFv fueron optimizadas adicionando glutatión oxidado y reducido. Los fragmentos de anticuerpos producidos demostraron ser altamente específicos para su antígeno correspondiente. (Stech et al., 2014)

Martin et al. de la universidad de Northwestern crearon una plataforma para la síntesis novedosa de anticuerpos monoclonales no glicosilados (mAbs por sus siglas en inglés) utilizando un kit comercial de SLC basado en extractos celulares de ovarios de hámster chino (Martin et al., 2017). Para permitir la correcta formación de los puentes disulfuro, se adicionaron glutatión oxidado y reducido en el amortiguador lo cual inactivó las reductasas presentes en el extracto celular que en un principio se identificó reducían y oxidaban los anticuerpos. La adición de glutatión oxidado y reducido confirió un ambiente oxidante y permitió la formación de los puentes disulfuro necesarios para producir al anticuerpo completo. También, se identificó que la adición de una proteína asistente para el plegamiento: la proteína disulfuro isomerasa (PDI) mejora el rendimiento de obtención del anticuerpo. Finalmente, se demostró que el agregar a destiempo los plásmidos con las secuencias codificantes para las cadenas ligera y pesada del anticuerpo juega un papel importante para minimizar agregados ya que parece ser que para este tipo de anticuerpos

las cadenas ligeras sirven como andamio para las cadenas pesadas por lo que al adicionar tarde el plásmido codificante para esta última es favorecedor para el correcto plegamiento del anticuerpo completo. En este estudio se logró producir más de 100 mg/L en un reactor tipo batch o lote (Martin et al., 2017). En el caso de los anticuerpos se debe prestar mayor atención en la adecuada modificación postraduccional de la proteína, tanto a nivel de glicosilaciones, como en la correcta formación de puentes disulfuro. Por otra parte, la formación del anticuerpo completo dependerá del correcto ensamblaje de sus partes, por lo que existen técnicas para optimizar la unión de las cadenas pesadas y ligeras. En los sistemas SLC existen soluciones y métodos de optimización para todos estos detalles y además, la mejora de los rendimientos es importante comparado con el uso de células eucariontes, por lo que la técnica de los SLCs podría ser la mejor opción para la producción de anticuerpos en masa (Martin et al., 2017).

4.1.5 Bioterapéuticos

Los bioterapéuticos o biofármacos tienen diversas aplicaciones; tratamientos contra el cáncer, inmunosupresores y vacunas son algunas de ellas. Sin embargo, debido a su naturaleza biológica, algunas proteínas terapéuticas pueden ser difíciles de expresar y purificar resultando en largos tiempos y altos costos de producción (Jin y Hong, 2018). Los SLC son utilizados para producir proteínas terapéuticas citotóxicas para investigación contra el cáncer y representan una alternativa prometedora debido a la accesibilidad de sus reacciones y a la maleabilidad del ambiente de expresión (Salehi et al., 2016).

La onconasa es una ribonucleasa que promete funcionar como droga contra el cáncer por lo que actualmente está en ensayos clínicos. Esta enzima, destruye las células de mesotelioma maligno sin afectar el tejido sano. No obstante, la obtención de onconasa de los ovocitos de la rana leopardo del norte es complicada y laboriosa ya que requiere de una purificación que incluye cromatografías de intercambio aniónico, catiónico y de exclusión molecular (Salehi et al., 2016). La producción recombinante de las onconasas también resulta difícil ya que todas las proteínas citotóxicas son complicadas de sobreexpresar debido a sus propiedades tóxicas intrínsecas (Salehi et al., 2016). En un intento por obtener onconasa de forma recombinante utilizando células de *E. coli*, se presentaron complicaciones como la formación de cuerpos de inclusión y la necesidad de una laboriosa purificación y procedimientos de replegamiento de hasta más de 3 días resultando en un rendimiento de producción de 40 µg/mL (Notomista et al., 2000). Además, se sabe que la onconasa degrada predominantemente ARNs y otros tipos de ARN (ARNm y ARNr), lo cual

puede contribuir a los problemas durante la expresión (Salehi et al., 2016). Dentro de este marco, científicos de la Universidad Brigham Young reportaron la producción de onconasa activa con alto rendimiento en un SLC (Salehi et al., 2016) adicionando ARNts puros en intervalos de 15 minutos para resolver el problema de la degradación de ARNts. La plataforma de SLC pudo producir onconasa activa y soluble (>95%) con rendimientos de 1,860 µg/mL. La actividad que presenta la onconasa previa a ser purificada fue comprobada resultando en una inhibición de síntesis de proteína y reducción de la viabilidad de las células del cáncer de mama. Finalmente, se reportó un SLC liofilizado para la producción de onconasa el cual conserva su actividad después de estar almacenado a -80° hasta por un año (Salehi et al., 2016).

En el año 1996, se identificó una proteína citotóxica llamada pierisin-1 en la mariposa de col *Pieris rapae* cuyas propiedades para inducir la apoptosis de varias líneas celulares cancerosas la volvió una opción prometedora para tratamientos contra el cáncer (Koyama et al., 1996). Debido a la alta citotoxicidad de esta enzima, su expresión recombinante en *E. coli* no es posible. Sin embargo, más recientemente, en 2011, Orth et al. Reportaron una plataforma que permite la síntesis de la proteína pierisin-1b clonada de *P. rapae* en un SLC utilizando extractos de células de insecto Sf21 con un rendimiento de 13.5 µg/mL (Orth et al., 2011). Los ensayos de actividad para la proteína pierisin-1b sintetizada en SLC causó cambios morfológicos, alteración en la viabilidad celular e inducción de la muerte celular vía apoptosis en células HeLa carcinoma (Orth et al., 2011).

Gracias a que el procesamiento para obtener una proteína suele ser rápido, los SLCs se han utilizado para la producción y el estudio de vacunas, como la de la malaria para la cual se han usado extractos celulares eucariontes de germen de trigo (Tsuboi et al., 2010). También, el uso de SLCs y su flexibilidad de optimización han permitido la producción de péptidos o proteínas antimicrobianas con diversos mecanismos de acción como la inhibición de la síntesis de la pared celular, la despolarización de la membrana y la degradación de ADN, ARN y proteínas de bacterias resistentes a múltiples fármacos por lo que son una alternativa prometedora para el uso de antibióticos (Cotter et al., 2013, Jin et al., 2019).

Aunque al día de hoy el uso de SLC como plataformas para la bioproducción comercial de fármacos es prácticamente nulo, existen laboratorios que las consideran como opción importante para la obtención de sus productos. Tal es el caso de Sutro Biopharma, un laboratorio situado en el sur de San Francisco que trabaja en conjunto con Bristol-Meyers Squibb, EMD Serono y Merck. Este laboratorio utiliza su propia plataforma patentada Xpress CF+ libre de células para producir conjugados anticuerpo-fármaco, anticuerpos

bioespecíficos y terapias basadas en citocinas para ensayos clínicos desde su descubrimiento hasta la fase 1 (Melinek et al., 2020).

Ipsen Biopharm es una compañía biofarmacéutica internacional con productos dentro de las áreas de neurociencia, oncología, enfermedades raras y el cuidado de la salud general. Una futura colaboración entre Ipsen Biopharm, Touchlight Genetics y el Centro para la Innovación de Procesos de Reino Unido utilizará un SLC para el desarrollo de un proceso completamente cerrado para la producción de uno de sus productos, la toxina botulínica la cual es usada como terapéutico para alteraciones causadas por la sobre actividad de los músculos. La producción de esta toxina se realiza a pequeña escala, ya que son requeridas dosis bajas para el tratamiento, pero los empleados están sometidos a un alto riesgo durante su producción ya que es muy tóxica, por lo que ahí recae el interés de usar un SLC que disminuya la intervención manual durante su síntesis (Ipsen Biopharm, 2020). Como último ejemplo podemos mencionar a GreenLight Biosciences, una compañía que produce ARN utilizando la plataforma libre de células de GreenWorX y que tiene colaboraciones con Bayer Crop Science y AgroSphere. Esta empresa tiene interés en el desarrollo de vacunas como respuesta ante pandemias y en la protección de plantas ante plagas y enfermedades. Ya que para estos fines es benéfico el acortamiento en tiempo de la obtención y de las pruebas de una tecnología que se base ARN, la compañía ha optado por un SLC para este fin (Melinek et al., 2020, Rodrigues et al., 2021).

En general los sistemas libres de células presentan ventajas en algunos parámetros para la producción de bioproductos en comparación con los sistemas tradicionales. Sin embargo, como se muestra en la Tabla 1 existen parámetros importantes en los que los sistemas de células completas son superiores al día de hoy por lo cual los SLCs usualmente son utilizados como sistemas de producción cuando los bioproductos no han podido ser obtenido por sistemas celulares tradicionales.

Tabla 2. Comparación entre los sistemas libres de células *in vitro* contra los sistemas celulares tradicionales *in vivo* (Lu, 2017)

Parámetro	Sistemas de células completas <i>in vivo</i>	Sistemas libres de células <i>in vitro</i>
Manipulación de traducción y transcripción	Difícil control debido a que la membrana celular actúa como barrera selectiva.	Fácil control debido a su naturaleza de sistema abierto.

Modificaciones post-traduccionales	Fácil en la mayoría de los casos debido al estudio a fondo de estos sistemas.	Difícil, pero en proceso de hacerlo más accesible.
Templado de ADN	Plásmidos o genomas	Plásmidos o productos de PCR
Síntesis de proteínas de membrana y proteínas complejas	Difícil debido a las limitaciones impuestas por el entorno intracelular.	Fácil en muchos casos gracias a la adición de surfactantes y al ajuste de las condiciones del entorno.
Obtención de los productos deseados	Difícil obtención y bajos rendimientos debido al metabolismo celular complejo que requiere de la utilización de energía para vías metabólicas que no derivan en el producto objetivo*.	Fácil obtención con altos rendimientos debido al enfoque completo en las vías metabólicas que derivan en el producto objetivo*.
Tolerancia tóxica	Baja	Alta
Tiempo promedio de obtención de producto	Semanas	Días
Purificación del producto	Lisis celular necesaria previa a la purificación.	Purificación sencilla sin necesidad de lisis celular
Costos	Bajo a moderado	Moderado a alto

* Las ventajas de los SLCs hoy en día siguen siendo muchas veces teóricas ya que es un sistema aún en desarrollo.

4.2 Biosensores basados en SLC

Uno de los avances relacionados con la síntesis de proteínas es el monitoreo de sustancias químicas, contaminantes y patógenos. En la naturaleza, los organismos poseen biosensores propios que detectan y provocan una respuesta a cambios en su ambiente. Por ejemplo, existen múltiples biosensores que detectan toxinas y activan la producción de proteínas que neutralizan o metabolizan estas toxinas (Thavarajah et al., 2020). También existen biosensores que responden a la presencia de agentes externos para permitir la expresión de un gen (Rogers et al., 2015).

En términos generales y como se muestra en la figura 5 los biosensores están conformados por dos partes: un sensor (comúnmente son ácidos nucleicos o proteínas que se puedan plegar de manera específica al interactuar con la partícula objetivo) y un reportero (también suelen ser ácidos nucleicos o proteínas). La función del sensor es la de reconocer la partícula de interés presente en la muestra. Una vez que se reconoce esta partícula, el sensor cambiará su forma inicial para activar la producción del reportero y finalmente el reportero creará una respuesta detectable siendo esta comúnmente del tipo fluorescente o un cambio de color. El ADN que codifica al sensor y al reportero está contenido en una plataforma, ya sea en una célula íntegra o en una disolución libre de células que contenga la maquinaria celular necesaria para los procesos de transcripción y traducción (Rogers et al., 2015).

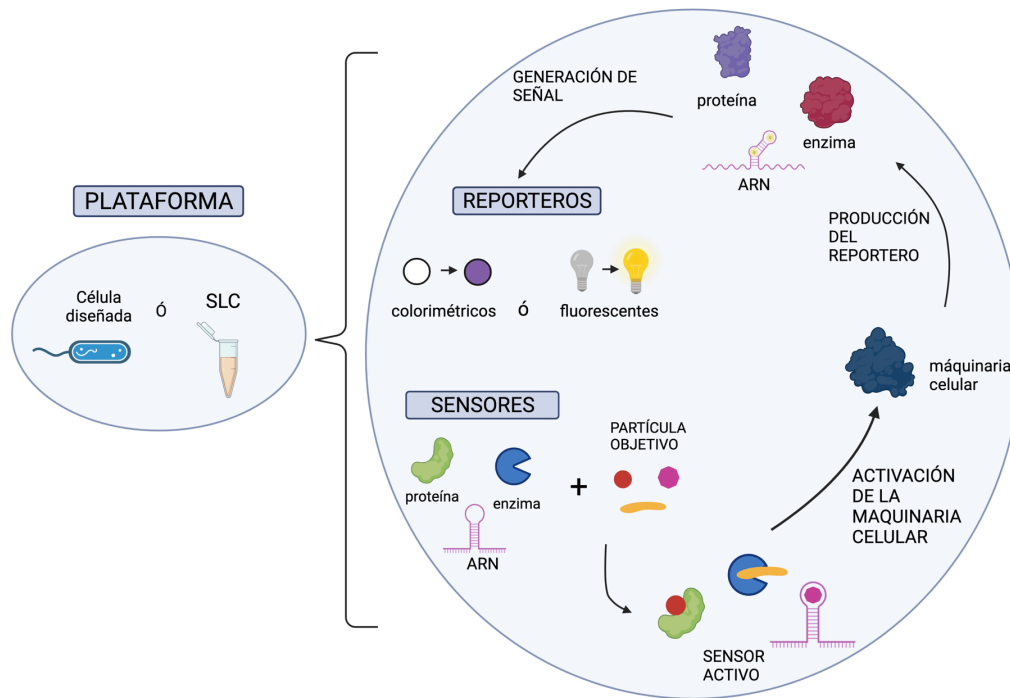


Figura 5. Construcción de un biosensor. Ambos el sensor y el reportero están contenidos en la plataforma que puede ser una célula o un sistema libre de células.

Las ventajas que tiene un biosensor soportado en una disolución libre de células sobre un biosensor que se encuentra en una célula completa se resumen en los siguientes puntos (Thavarajah et al., 2020):

- Evita la necesidad de mantener células vivas durante el proceso lo cual requiere equipo especializado como incubadoras difíciles de transportar.
- Provee de la posibilidad de detección de partículas objetivo que puedan matar o ser tóxicas en una célula.
- Se evita el riesgo de que el ADN que contiene la información codificante para el sensor y el reportero dentro de la célula mute o se pierda durante el proceso de crecimiento y división de ésta.
- Se amplía el rango de contaminantes que se pueden detectar. Ya que algunos organelos de protección originales de la célula que restringen la entrada de algunas moléculas, como la membrana, son removidos.

4.2.1 Biosensores para evaluar la calidad del agua

El monitoreo constante de contaminantes, metales, antibióticos y otras sustancias presentes en el agua es importante no solo para mantener una buena calidad de vida para los seres humanos, sino también para la conservación de especies de flora y fauna que habitan la zona en la que se encuentran los cuerpos acuíferos de los cuales se extrae el agua. La crisis por falta de agua segura y limpia que sea accesible para todos los humanos es un problema actual muy importante. Basándose en la importancia que tiene el garantizar la presencia o ausencia de ciertas moléculas o sustancias en el agua que bebemos, se han desarrollado biosensores en sistemas libres de células que además de ser específicos para un contaminante o aditivo, son prácticos, rápidos, baratos y cómodos para poderse llevar prácticamente a cualquier lugar (Thavarajah et al., 2020). Los resultados arrojados por estos biosensores en un primer enfoque no necesitan ser cuantitativos, pero sí concluir si un contaminante está por arriba o por debajo de un límite que signifique un riesgo para la salud.

La forma en que el sensor y el reportero interactúan dentro del biosensor en un sistema libre de células varía dependiendo del diseño de éstos. Existen sensores basados en proteínas que se unen o se separan de regiones específicas del ADN para interrumpir o permitir la producción del reportero que regulan. Por otra parte, existen sensores basados en ARN que se pueden plegar de diferentes maneras dependiendo si el objetivo a detectar está presente o no. Las diferentes configuraciones que el sensor adopta permiten o evitan la producción del reportero como se ejemplifica más adelante con los biosensores que se mencionan a continuación. La variedad que brindan estas diferencias en funcionamiento de

los diferentes sensores y reporteros permite un amplio espacio de diseño para pares sensor-receptor que detecten casi cualquier contaminante presente en el agua.

4.2.1.1 Detección de patógenos en el agua

En el caso de los patógenos contaminantes en el agua como bacterias, protozoarios y virus, cada uno de ellos tienen una secuencia genética única la cual se puede “escanear” para identificar una especie o cepa específica en una muestra (Jiang et al., 2018).

Los pasos para la detección de un patógeno en una muestra de agua se pueden resumir en los siguientes (Fig. 6):

- **Preparación de la muestra:** se provoca la ruptura de los patógenos para exponer su material genético con técnicas de lisis celular por ejemplo de sonicación o un choque osmótico.
- **Amplificación selectiva del ADN objetivo:** ya que los contaminantes patógenos se encuentran usualmente en cantidades de trazas, se amplifica el ADN para mejorar la sensibilidad de la prueba. Los métodos más utilizados para este fin son las amplificaciones isotérmicas, las cuales constituyen un método alternativo para la reacción de PCR en donde los ácidos nucleicos se amplifican a una temperatura constante haciendo uso de un baño María o de un bloque de calor (de Paz et al., 2014, Zhao et al., 2015). Estos métodos con una duración promedio de un par de horas permiten dirigir la amplificación a solo una secuencia genómica específica del patógeno objetivo. Una ventaja de las amplificaciones isotérmicas es que una reacción congelada en seco que contenga las partes biológicas necesarias para la amplificación se puede transportar en un tubo al lugar de donde se tomará la muestra a amplificar y ahí rehidratarse con la muestra filtrada.
- **Inducción de una señal:** el método más utilizado para el monitoreo de ADN patógeno utiliza oligonucleótidos que al identificar la secuencia blanco producen una señal fluorescente. Un ejemplo de esto son las balizas moleculares (Fig. 7) las cuales son sondas que adoptan una forma de horquilla debido a que contienen de 5 a 7 pares de bases complementarias en sus extremos. Estas sondas, además, tienen atado en su extremo 5' un fluorocromo y en el extremo 3' un quéncher que apaga la fluorescencia cuando ambos están próximos. La parte media (el giro) de la sonda está conformada por una secuencia específica y complementaria a la secuencia objetivo que se quiere detectar (Kim et al, 2008). Cuando el giro en la

sonda identifica su secuencia complementaria/diana esta se hibridiza y se induce un cambio conformacional en la baliza molecular lo cual aumenta la distancia entre el fluorocromo y su quéncher generando una señal de fluorescencia. Este tipo de indicador de señal tipo interruptor que se puede prender y apagar es muy útil para detectar secuencias objetivo tanto de ADN como de ARN (Kim et al., 2008).

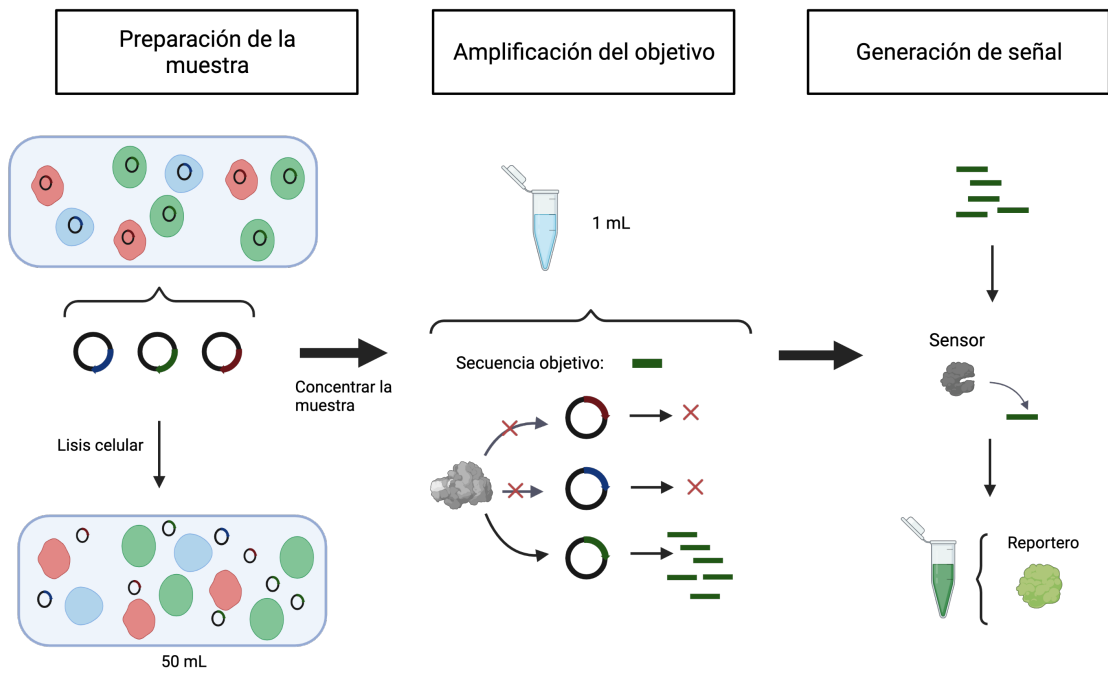


Figura 6. Los tres pasos para la detección de patógenos con un biosensor en un SLC (Thavarajah et al., 2020).

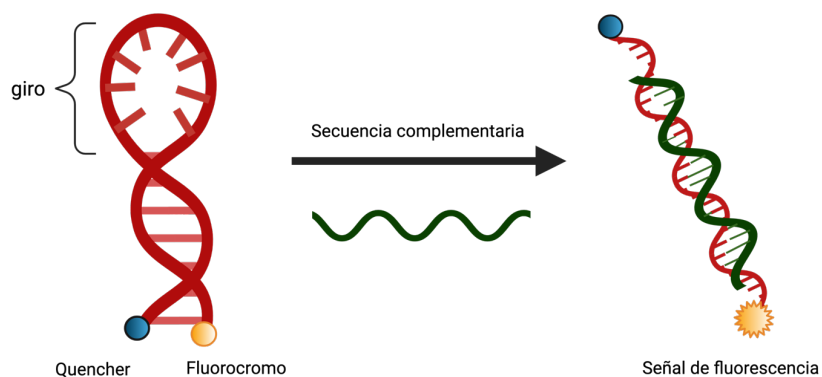


Figura 7. Diagrama de una sonda tipo baliza molecular (Kim et al., 2008).

Esta técnica de detección de patógenos utilizando un biosensor que detecte una secuencia objetivo en el ADN difiere de los métodos que comúnmente se utilizan en campo donde lo que se monitorea es algún indicador secundario de patógenos como la producción de ácido sulfhídrico (H_2S) derivado del metabolismo de una bacteria (Pillai et al., 1999) o la actividad de alguna proteína (IDEXX Colilert kit). Las ventajas de esta alternativa para la identificación de patógenos es que la detección se vuelve más específica y que indica exactamente cuáles patógenos están presentes en la muestra. Por otro lado, entre las desventajas que presenta este método para la detección de patógenos, se menciona la falta de discriminación entre patógenos vivos o muertos ya que su ADN permanece detectable aún en organismos durante días después de su muerte (Eichmiller et al., 2016). También, debido a la etapa de amplificación de ADN se puede complicar la determinación de la concentración original del patógeno en la muestra lo que hace a estos métodos semi-cuantitativos. Sobre esto ya se han reportado estrategias basadas en métodos matemáticos para permitir relacionar la concentración del patógeno con la señal final de fluorescencia; sin embargo, la cuantificación precisa de la concentración aún requiere de equipos más sofisticados (Jung et al., 2020, Takahashi et al., 2018).

4.2.1.1.1 Biosensor para la identificación de presencia de material fecal humano en muestras de agua.

De acuerdo con la OMS: “El mayor riesgo microbiano del agua es el relacionado con el consumo de agua contaminada con excrementos humanos” (Organización Mundial de la

Salud, 2006, p. 105). Jiang y colaboradores de la Universidad de Texas, diseñaron una plataforma portátil para identificar la presencia de material fecal humano en muestras de diferentes fuentes de agua en solo 80 minutos, basándose en la presencia del marcador genético *Bacteroides* HF183, el cual es asociado al ser humano. Este marcador fue amplificado utilizando la técnica de amplificación isotérmica mediada por asa LAMP (por sus siglas en inglés) (Fig. 8), la cual es ventajosa sobre la PCR porque no necesita termociclador y su sensibilidad es muy parecida (de Paz et al., 2014).

Para la amplificación isotérmica LAMP es necesario el diseño de 4 cebadores altamente especializados como mínimo. Además, es necesaria la Bst polimerasa la cual es una DNA polimerasa con actividad desplazante de cadena proveniente de *Bacillus stearothermophilus*. Todo esto en conjunto permite una posterior amplificación de la región de interés sin necesidad de un termociclador (Fig. 8). Finalmente, la señal se obtiene gracias al desplazamiento de hebra de un solo paso también llamada OSD. Esta técnica utiliza un fragmento de ADN semidúplex corto en donde hay una hebra más larga que la otra. La hebra más larga tiene una región que actúa como punto de apoyo reconociendo y provocando la hibridación con una secuencia diana complementaria en la región del asa de los amplicones derivados de la amplificación isotérmica. Después, se inicia un intercambio de hebras que finalmente separa al fluorocromo de su *quencher* y provoca una señal de fluorescencia intensa en tiempo real permitiendo al OSD reportar la acumulación desde décimas a cientos de amplicones con la secuencia específica y falsos positivos mínimos (Jiang et al., 2015; Zhang y Seeling, 2011).

Esta combinación de técnicas demostró ser efectiva para detectar 17 copias de la secuencia del *Bacteroides* HF183 por mL y no dar resultados positivos para la presencia de heces de otros seres vivos como perros y gatos. Además, la metodología de aplicación de la prueba es muy sencilla ya que se necesita un tratamiento mínimo de la muestra que consiste en una filtración usando un sistema de jeringas. La respuesta positiva se puede medir detectando la fluorescencia en tiempo real con un equipo para PCR o al punto final con un teléfono inteligente (Fig. 9). Otra ventaja de este biosensor frente a otras técnicas de análisis es que no requiere la purificación de ácidos nucleicos. Todo lo anteriormente mencionado convierte a este método en una buena alternativa para el ensayo HF183 TaqMan qPCR el cual es considerado como uno de los mejores métodos para la identificación de contaminantes de tipo materia fecal humana en agua (Jiang et al., 2018).

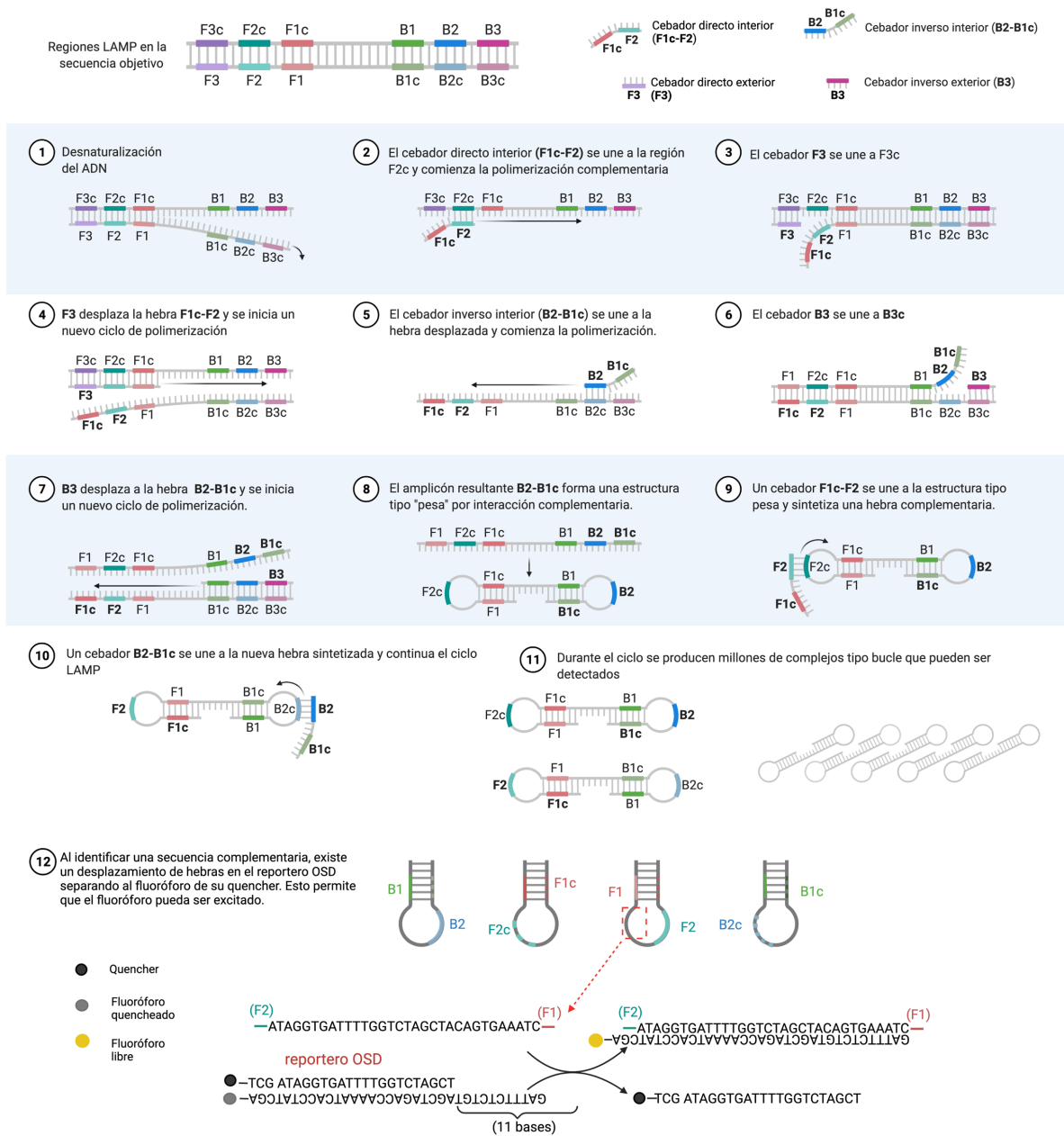


Figura 8. Amplificación isotérmica mediada por asa (LAMP) y desplazamiento de una sola hebra (OSD) (Jiang et al., 2015).

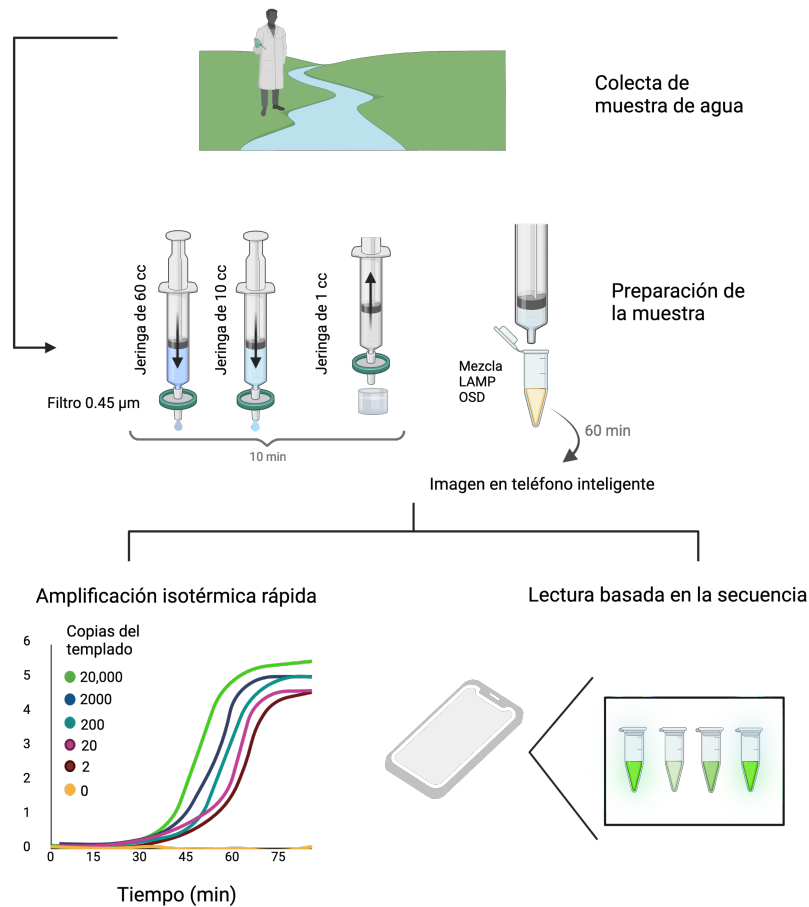


Figura 9. Método de aislamiento y amplificación de material genético en muestras de agua para la detección de materia fecal (Jiang et al., 2018).

4.2.1.2 Detección de contaminantes químicos en agua

Ciertos contaminantes químicos en el agua causan efectos adversos para la salud de las personas como consecuencia de una exposición prolongada al consumirla. En su mayoría, la cantidad de contaminantes químicos nocivos para la salud por una exposición breve, presentes en una fuente de agua es conocida y controlada. Sin embargo, pueden surgir problemas si se desconoce la presencia de sustancias químicas peligrosas cuyo efecto nocivo es causado por una exposición crónica (OMS, 2006). Según la OMS, los contaminantes químicos en el agua de consumo pueden provenir de procesos naturales, de la minería, de las actividades agropecuarias, del uso de plaguicidas, etc. Entre las

sustancias químicas contaminantes del agua cuya presencia puede afectar a la salud humana se encuentran el arsénico, bario, boro, cromo, flúor, manganeso, molibdeno, selenio y uranio (OMS, 2006).

Para el caso del monitoreo de contaminantes químicos en el agua, el paso de amplificación de material genético no es requerido y el funcionamiento del sistema se reduce a las etapas de reconocimiento del objetivo por el sensor y posterior producción del reportero el cual generará una señal detectable. Tal es el caso del biosensor para campo para la detección de flúor desarrollado por Thavarajah y colaboradores de la universidad de Northwestern (Thavarajah et al., 2019).

4.2.1.2.1 Biosensor de campo para la detección de flúor utilizando un ribointerruptor.

La incorporación de flúor en el ser humano es beneficioso para reducir la incidencia de caries dentales; sin embargo, la ingestión prolongada de concentraciones superiores a 2 ppm puede causar fluorosis del esmalte y de los huesos lo cual constituye un problema grave en comunidades en entornos con recursos escasos (Meenakshi y Maheshwari, 2006). La mayoría de los sensores fluorescentes o colorimétricos desarrollados en los últimos años requieren equipo extra para el procesamiento de imágenes o utilizan disolventes orgánicos tóxicos, los cuáles son difíciles de tratar para su desecho en el campo. Una alternativa práctica y simple que se pueda transportar a los lugares en donde se realice el muestreo de agua es la construcción de sensores, como los ribointerruptores.

Existen regiones de los ARNm conocidas como regiones riborreguladoras o ribointerruptores las cuales tienen la capacidad de interactuar directamente con una molécula pequeña ocasionando un cambio en la expresión de uno o varios genes. Dentro de estas regiones se pueden definir dos dominios: una sección que se une directamente al ligando con gran afinidad y otra sección la cual va a sufrir los cambios conformacionales en respuesta a las interacciones que tenga la primera. En esta segunda sección, los cambios conformacionales que se induzcan provocarán una regulación en la expresión génica transcripcional, postranscripcional o traduccional tanto activando como inhibiendo la expresión de genes (Breaker, 2012). Estas propiedades de regulación génica gracias a los cambios conformacionales del ARNm son aprovechadas en áreas como la biología sintética para crear herramientas de software sofisticadas que predigan interacciones entre el ARN y demás moléculas (otro ARN, iones, etc.). También son aprovechadas para desarrollar elementos regulatorios basados en ARN que al identificar la presencia de moléculas

pequeñas o ligandos generen como respuesta la síntesis de una proteína (Green et al., 2014).

En el caso de este biosensor para flúor se utilizó una secuencia de ARN que actúa como un ribointerruptor sensible al flúor, pero que rechaza otros pequeños aniones como el cloro y regula la expresión CrcB, la bomba de flujo de flúor en *Bacillus cereus*. Este interruptor se configuró para controlar la transcripción de genes reporteros río abajo y se adicionó a un sistema de expresión libre de células para conferirle la propiedad de activar la expresión de una proteína cuando se identifica la presencia de flúor resultando en una regulación a nivel transcripcional. El ribointerruptor se pliega cotranscripcionalmente en alguno de dos estados dependiendo de la presencia de flúor. Cuando no hay flúor el ribointerruptor se pliega en una estructura terminadora tipo horquilla que impide la expresión de genes río abajo y por tanto la producción de la proteína reportera. Al contrario, cuando iones flúor se unen al interruptor provoca una estabilización de una estructura alterna y por lo tanto la producción del reportero es posible (Fig. 10) (Thavarajah et al., 2019, Watters et al., 2016).

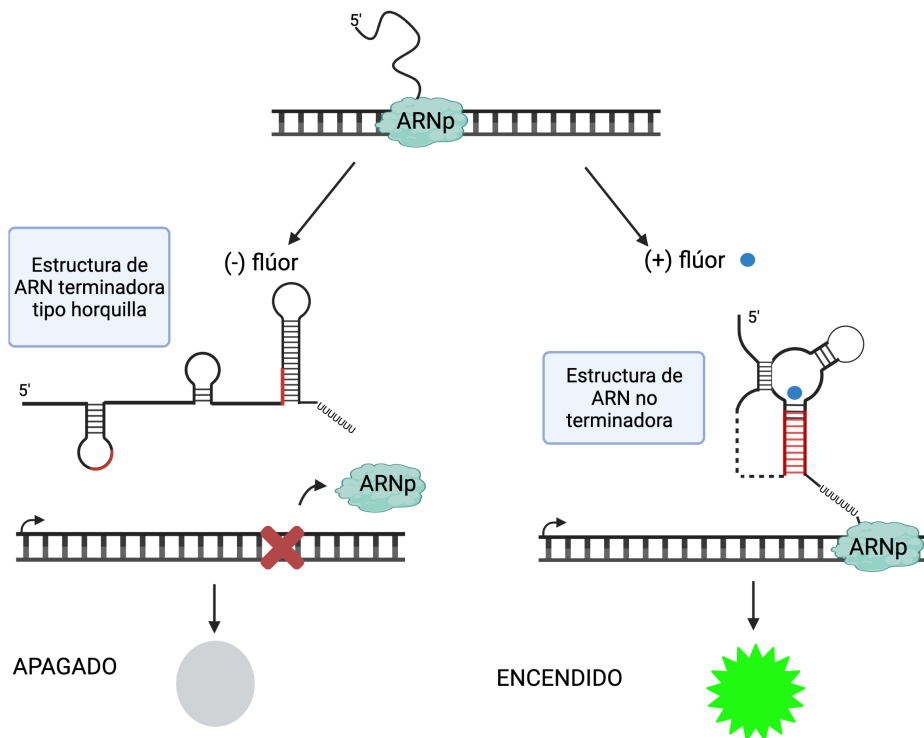


Figura 10. Biosensor de flúor con ribointerruptor (Thavarajah et al., 2019).

El biosensor anteriormente descrito puede ser utilizado con reporteros fluorescentes y colorimétricos con una detección arriba de 2 ppm, que es el límite de detección más bajo de varios kits de prueba de fluoruro disponibles comercialmente (Thavarajah et al., 2019). Algo sumamente importante y útil es que todo el sistema libre de células incluyendo el ADN codificante para el biosensor, puede ser liofilizado para su almacenamiento durante meses o para su transporte a largo plazo y basta con hacer una rehidratación y posteriormente incubarlo a una temperatura de 36°C a 37°C para activar su funcionamiento. Esto permite la detección de flúor en agua subterránea sin necesidad de un procesamiento previo (Thavarajah et al., 2020). Como una alternativa a la respuesta fluorescente y para mejorar las señales débiles que se obtuvieron con este tipo de respuesta, se utilizó la enzima colorimétrica catecol 2,3-dioxigenasa (C23DO) como reportera únicamente modificando el vector y reemplazando el gen que codifica a la proteína verde fluorescente por el gen que codifica a C23DO. Esta enzima produce un cambio de color oxidando su sustrato incoloro, el catecol, a su forma semialdehído amarillo (Fig. 11) (Thavarajah et al., 2020).

Una ventaja importante de la detección de contaminantes utilizando SLC sobre los ribointerruptores en células completas es que parámetros bioquímicos como la concentración de ADN se pueden ajustar fácilmente para reducir los falsos positivos y mejorar el rango dinámico. Además, dado que los ribointerruptores actúan en cis, solo es necesario ajustar la concentración ADN por sensor lo cual es mucho más simple que ajustar diversos parámetros en sistemas que utilizan reguladores de proteínas o ARN que actúan en trans (Thavarajah, 2019). Económicamente esta tecnología también representa una ventaja sobre los kits comercialmente disponibles y los métodos electroquímicos para la detección de flúor ya que al utilizar estándares de oro los costos van desde cientos a miles de USD mientras que con este ribointerruptor en SLC el costo promedio por reacción es de 0.40 USD (Thavarajah et al., 2020).

Además de la identificación de flúor, existen biosensores en sistemas libres de células que detectan otros contaminantes de interés como metales y productos farmacéuticos o de cuidado personal como antibióticos o cosméticos (Alam et al., 2019).

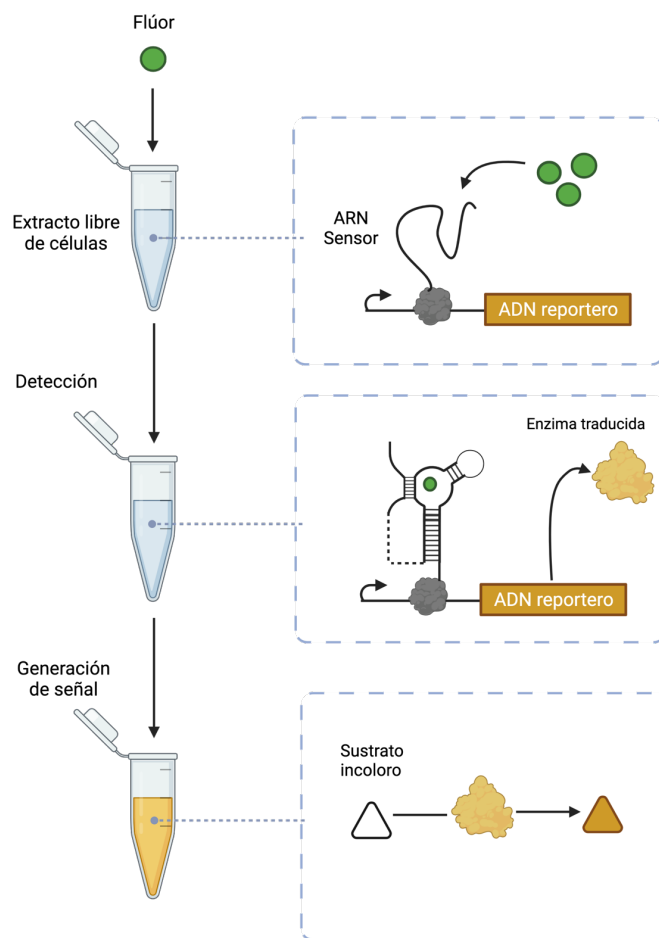


Figura 11. Uso de un SLC para la producción de biosensores de flúor utilizando una enzima colorimétrica (Thavarajah et al., 2020).

4.2.1.2.2 Identificación de atrazina con un biosensor en un sistema libre de células

Se ha reportado el desarrollo y optimización de un biosensor soportado en un SLC para atrazina, con un funcionamiento diferente a los anteriormente expuestos. Este biosensor integra la codificación de una vía metabólica natural para la conversión de la atrazina en ácido cianúrico con un sensor previamente caracterizado para realizar la detección de ácido cianúrico (Silverman et al., 2020).

En la actualidad, el desarrollo de sensores para contaminantes de agua con base en compuestos orgánicos sintéticos como lo son varios pesticidas no ha sido tan fructífera ya que al ser compuestos sintéticos no se conocen sensores naturales a los cuales imitar. La atrazina pertenece a las triazinas, un grupo de herbicidas comúnmente usado para controlar

el crecimiento de hierbas no deseadas en cultivos como lo son el de la caña de azúcar, maíz y piña. No obstante, se ha demostrado que la exposición a atrazina presente en cuerpos de agua aún en concentración de trazas produce afectaciones a la salud de peces, anfibios y reptiles (Hayes et al., 2010, Rohr & McCoy, 2010). Asimismo, se ha propuesto que la exposición crónica a este herbicida puede provocar daño al sistema reproductivo humano, aunque esto aún se sigue investigando (Harper et al., 2020). La Agencia para la Protección del Medioambiente de Estados Unidos EPA (por sus siglas en inglés) recomienda una presencia ideal no mayor a 3 ppb o 14 nM en cuerpos de agua, lo cual se encuentra frecuentemente superado (Silverman et al., 2020).

Para la construcción del biosensor en cuestión se mimetizó la reacción de conversión de atrazina a ácido cianúrico que realiza la cepa ADP-1 de *Pseudomonas* sp a través de una vía en la que participan tres enzimas (AtzA, AtzB y AtzC) (Fig. 12). Posteriormente el ácido cianúrico activa la transcripción a través de la inducción del factor de transcripción AtzR, el cual reconoce la secuencia del operador dentro de un promotor diseñado. En el caso específico de la parte del sensor, se utilizó la estrategia de un sensor para ácido cianúrico en un SLC previamente caracterizado el cual se puede mantener congelado en seco y activarse con una muestra de agua que contenga cientos de micromolar de ácido cianúrico (Liu et al., 2019). La combinación de este biosensor con la vía metabólica reconstituida que convierte atrazina a ácido cianúrico fundamenta este trabajo. Debido a las complicaciones que a veces se presentan al sintetizar varias proteínas *in situ* en una misma reacción *batch* en un SLC, se desarrolló una alternativa para la expresión previa de cada una de las proteínas necesarias en extractos separados para posteriormente mezclarlas en la reacción propia para el biosensor. Para esto, se sobre expresaron las proteínas AtzA, AtzB, AtzC y AtzR utilizando la maquinaria transcripcional endógena de *E. coli* en células completas que después fueron lisadas. Cada proteína fue sobre expresada en un extracto individual por lo que al final se disponían de cuatro extractos enriquecidos con su respectiva proteína. Esta estrategia simplifica el diseño y la construcción del sensor al evitar tener que sintetizar las 4 proteínas en la misma reacción con el riesgo de no tenerlas presentes en concentración suficiente. Además, esto permite jugar con la optimización del sensor únicamente alterando las proporciones de los extractos adicionados a la mezcla final (Silverman et al., 2020).

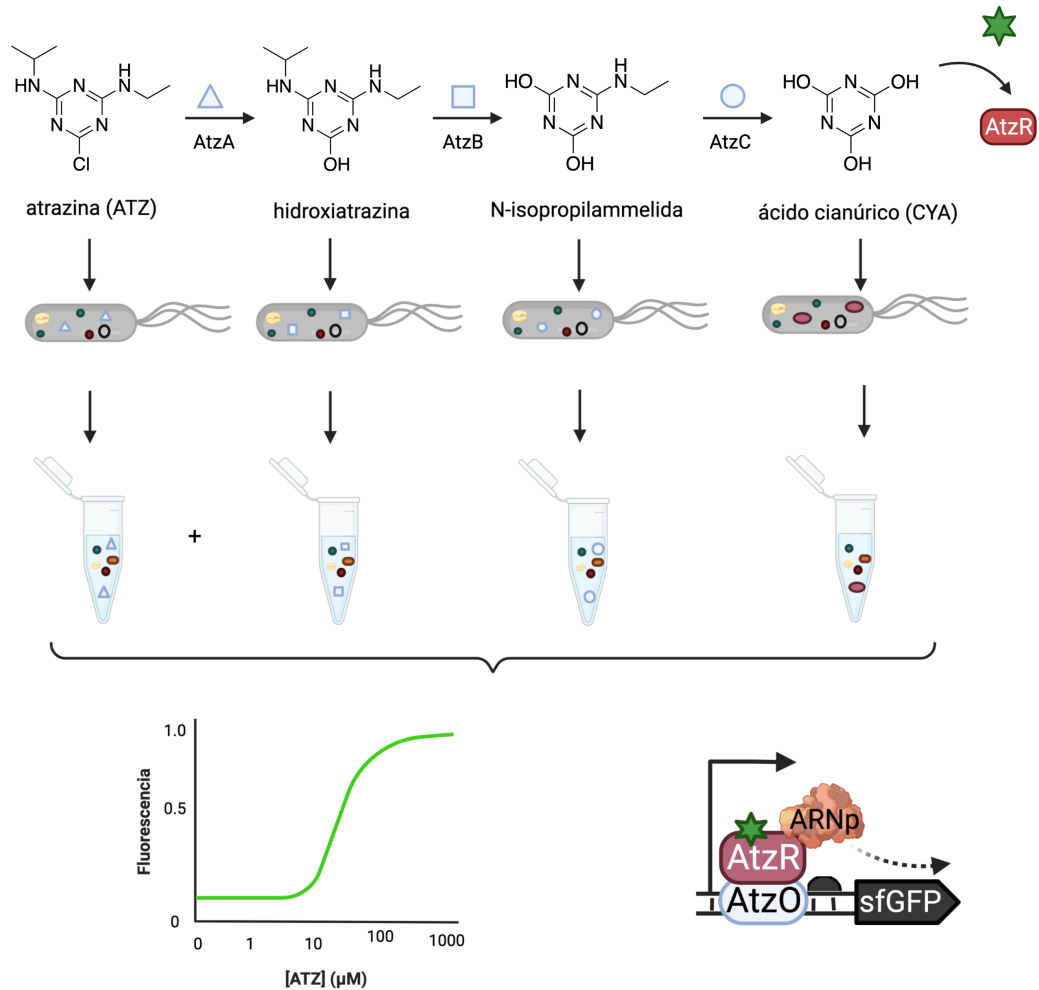


Figura 12. Sistema de detección de atrazina (Silverman et al., 2020).

Como se muestra en la figura 12, todos los extractos enriquecidos individualmente se mezclaron junto con un extracto celular sin previa expresión de proteínas (extracto no enriquecido) y un plásmido codificante para la proteína verde fluorescente como reportero (sfGFP). Después de una hora de incubación, este sensor fue capaz de identificar concentraciones de atrazina de 10 μM a 100 μM (Silverman et al., 2020).

En los biosensores en células completas ha sido identificada la disminución notable de su sensibilidad debido al gasto energético para producir la maquinaria enzimática para la vía de conversión a ácido cianúrico antes de su identificación por otro sistema enzimático, lo

que supone un segundo gasto energético (Hua et al., 2015). Además, en estos mismos biosensores, fue identificado un efecto de inhibición de crecimiento de las células causado por la sobreexpresión de la proteína AtzB lo que también dificulta el funcionamiento del biosensor en una célula completa. Realizar la expresión previa de esta proteína en lugar de expresarla *in situ* resuelve estos problemas de inhibición ya que la carga de expresión de las proteínas está amortiguada por el extracto no enriquecido altamente productivo que es añadido a la mezcla final. Esta estrategia focaliza los recursos energéticos del extracto celular directamente hacia la síntesis del reportero y no hacia la producción de las enzimas y factores de transcripción. Por esto, para vías de múltiples pasos enzimáticos, los sensores en sistemas libres de células son ventajosos (Silverman et al., 2020, Voyvodic et al., 2019). Aunque este biosensor aún no es capaz de detectar los 14 nM de límite de atrazina establecido por la EPA, actualmente se trabajan en propuestas para mejorar la sensibilidad (Silverman et al., 2020).

Con este trabajo se espera establecer un punto de partida para la expansión del rango de moléculas detectables por sensores en sistemas libres de células combinando cascadas metabólicas sintéticas con redes basadas en factores de transcripción. Se considera el uso de esta estrategia de combinación de vías metabólicas y biosensores para la rápida detección en SLC de otros pesticidas y contaminantes en el agua.

4.2.2 Biosensores para el diagnóstico de enfermedades utilizando sistemas libres de células

4.2.2.1 Detección del virus del ZIKA

Otra forma en la que se utilizan los sistemas libres de células es en pruebas para el diagnóstico de enfermedades. Científicos de la Universidad de Toronto, el MIT, la Universidad de Boston y otros centros de investigación desarrollaron una prueba para detectar el genoma viral del virus del Zika con base en un SLC. El Zika, es un virus causante de una enfermedad propagado por ciertas especies de mosquitos. Este virus causó una pandemia en Sudamérica y América central en 2015 y 2016 y también, debido al movimiento de las personas a través del mundo se presentaron casos en diversos países de Europa (Barzon et al., 2016). En mujeres embarazadas se ha encontrado que el virus del Zika puede causar daños graves al cerebro fetal en desarrollo como la microcefalia. Además, también se le ha asociado con anomalías oculares, contracturas articulares y potencialmente discapacidades (Fitzgerald et al., 2018).

Las formas para la identificación del virus en un individuo, como la detección de anticuerpos, son limitadas en su valor diagnóstico debido a la reactividad cruzada que se puede presentar en pacientes que hubieran estado previamente infectados por otros flavivirus. Debido a esto, un diagnóstico válido requiere de un método caro de detección de ácidos nucleicos como una prueba PCR, para lo cual se necesita un laboratorio bien equipado poco común en localidades de bajos recursos (Campos et al., 2016). En este caso, como propuesta de un biosensor semicuantitativo para el virus del Zika en un sistema libre de células se utilizó un ribointerruptor similar a los anteriormente presentados, pero con un par de diferencias en su funcionamiento.

Los “sensores de interruptor de pie” (toehold switches) son riborreguladores sintéticos en SLCs programados para controlar la traducción de un gen por medio de la unión tipo *trans* de un ARN desencadenante. Estos sensores tienen una estructura tipo horquilla que impide la traducción de un gen en *cis* al secuestrar el sitio de unión a ribosoma (RBS) y el codón de inicio. Cuando el interruptor reconoce una región específica de un ARN complementario (ADN desencadenante) existe un cambio conformacional que resulta en la liberación del RBS y el codón de inicio por lo que se activa la traducción del gen (Green et al., 2014). Estos sensores toehold se diseñan siguiendo un algoritmo *in silico* e insertando un sitio de detección específico para una región del ARN viral, en este caso, del virus del Zika. En el caso de este sensor en específico el interruptor se introduce en el SLC que contiene la muestra en la que se quiere detectar el virus. Al hibridizar con el ARN objetivo la horquilla se libera y se permite la traducción del gen reportero. Con la finalidad de detectar la presencia del virus en una muestra, el sensor se diseñó para regular la traducción de la enzima LacZ (Fig. 13), la cual provoca un cambio de color convirtiendo un sustrato amarillo (*clorofenol rojo-β-D-galactopiranosido*) a un producto morado (clorofenol rojo) (Pardee et al., 2016).

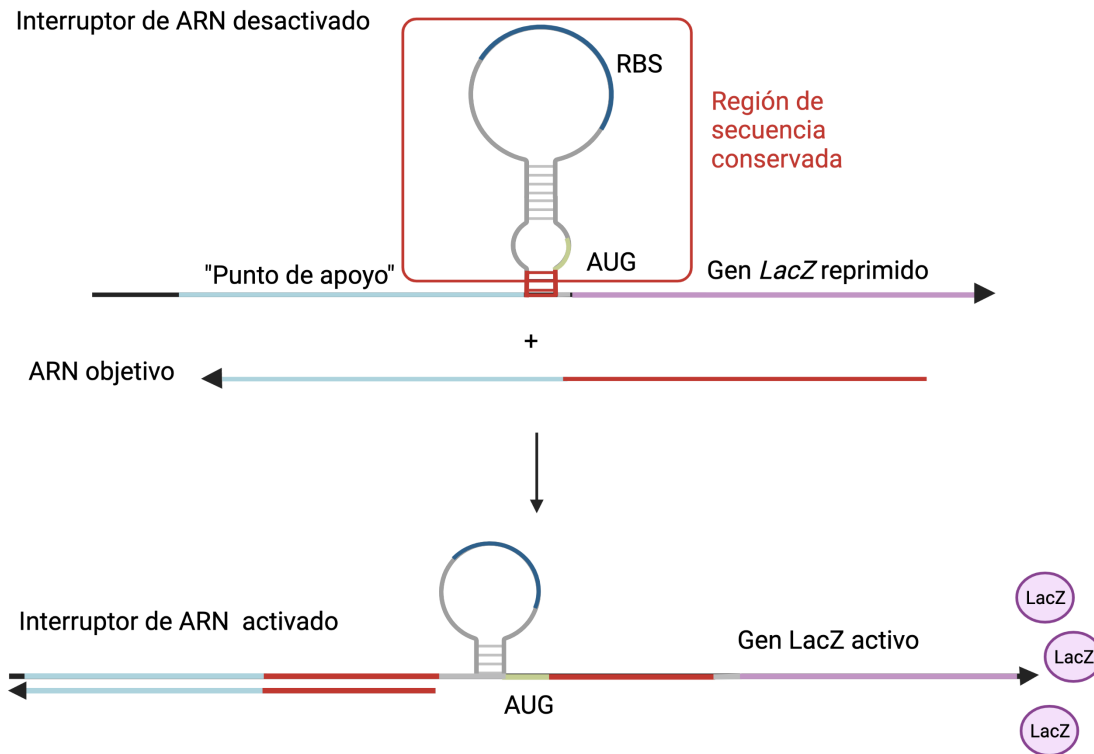


Figura 13. Interruptor de pie para la detección del virus del Zika (Pardee et al., 2016).

Para aumentar la sensibilidad de esta plataforma para el diagnóstico del virus del Zika, se acopló al sensor una previa amplificación isotérmica de ácidos nucleicos después de la extracción de ARN viral (Fig. 14). Esta amplificación conocida como NASBA por sus siglas en inglés (Nucleic acid sequence-based amplification) es extremadamente sensible y ha sido utilizada previamente para otras herramientas diagnósticas (Cordray y Richards-Kortum, 2012). Esta amplificación comienza con una transcripción reversa del ARN objetivo mediada por un cebador específico creando un dúplex de ARN-ADN. Posteriormente una ARNasa H degrada el templado de ARN permitiendo la unión de un cebador de "avance normal" que contiene el promotor T7 iniciando así la elongación de una hebra complementaria para terminar con una doble hebra de ADN. Después, la transcripción mediada por T7 del templado de ADN crea copias de la secuencia de ARN objetivo. Todos estos nuevos ARNs objetivo pueden ser detectados por sensores de interruptor de pie y también servir como material para nuevos ciclos de amplificación (Pardee et al., 2016).

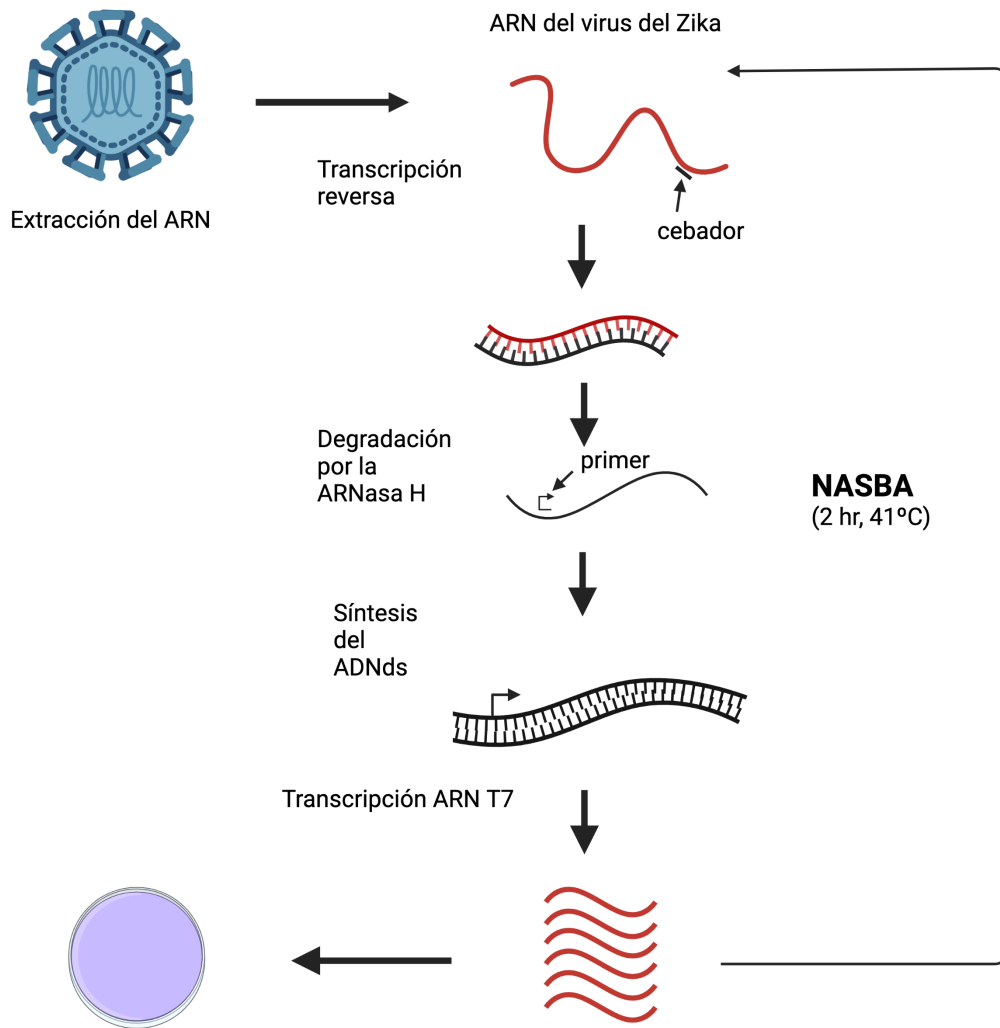


Figura 14. Método de amplificación de ácidos nucleicos NASBA de ARN viral para su detección con un sensor tipo toehold (Pardee et al., 2016).

Las concentraciones de ARN viral en pruebas de pacientes infectados con Zika se encuentran alrededor de 365 fM en orina y 4.9 fM en saliva y suero (Barzon et al., 2016, Pardee et al., 2014). El sensor desarrollado unido a la amplificación isotérmica permite una detección desde los 3 fM de ARN desencadenante. Además, probó ser específico para la secuencia del virus del Zika descartando secuencias similares a la de éste, como la del virus del Dengue al ser comparables sus resultados a los de un control negativo (Fig. 15). Estos resultados lo vuelven una plataforma viable para la detección clínica del virus del Zika.

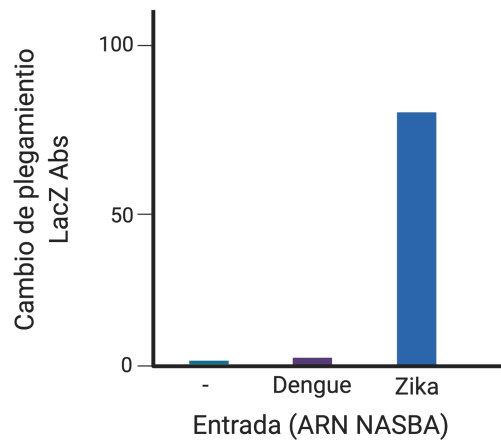


Figura 15. Detección del virus del Zika y virus del Dengue utilizando el biosensor de interruptor de pie aunado a la amplificación isotérmica de ácidos nucleicos NASBA (Pardee et al., 2016).

Con el conocimiento previo de que los sistemas libres de células pueden ser liofilizados en tubos para su almacenaje y transporte, en el 2014 Pardee y colaboradores reportaron una nueva tecnología para soportar y transportar circuitos genéticos con base en un SLC que posteriormente se utilizó para la detección del virus del Zika. Para ello, copias del ADN codificante para los respectivos ribointerruptores y un SLC capaz de expresarlas fueron aplicados a discos de 2 mm de papel filtro y posteriormente liofilizadas. Para poder analizar si una muestra contiene el ARN viral, basta con rehidratar los discos de papel con la muestra y agua y esperar a la señal colorimétrica como se ejemplifica en la figura 16 (Pardee et al., 2014). Lo anteriormente mencionado permite la extracción de estos ribo-interruptores de los laboratorios de investigación, de una forma estéril y segura, para ser distribuidos y almacenados a temperatura ambiente, brindando una solución a los retos para el diagnóstico de este virus en comunidades de difícil acceso (Pardee et al., 2016).

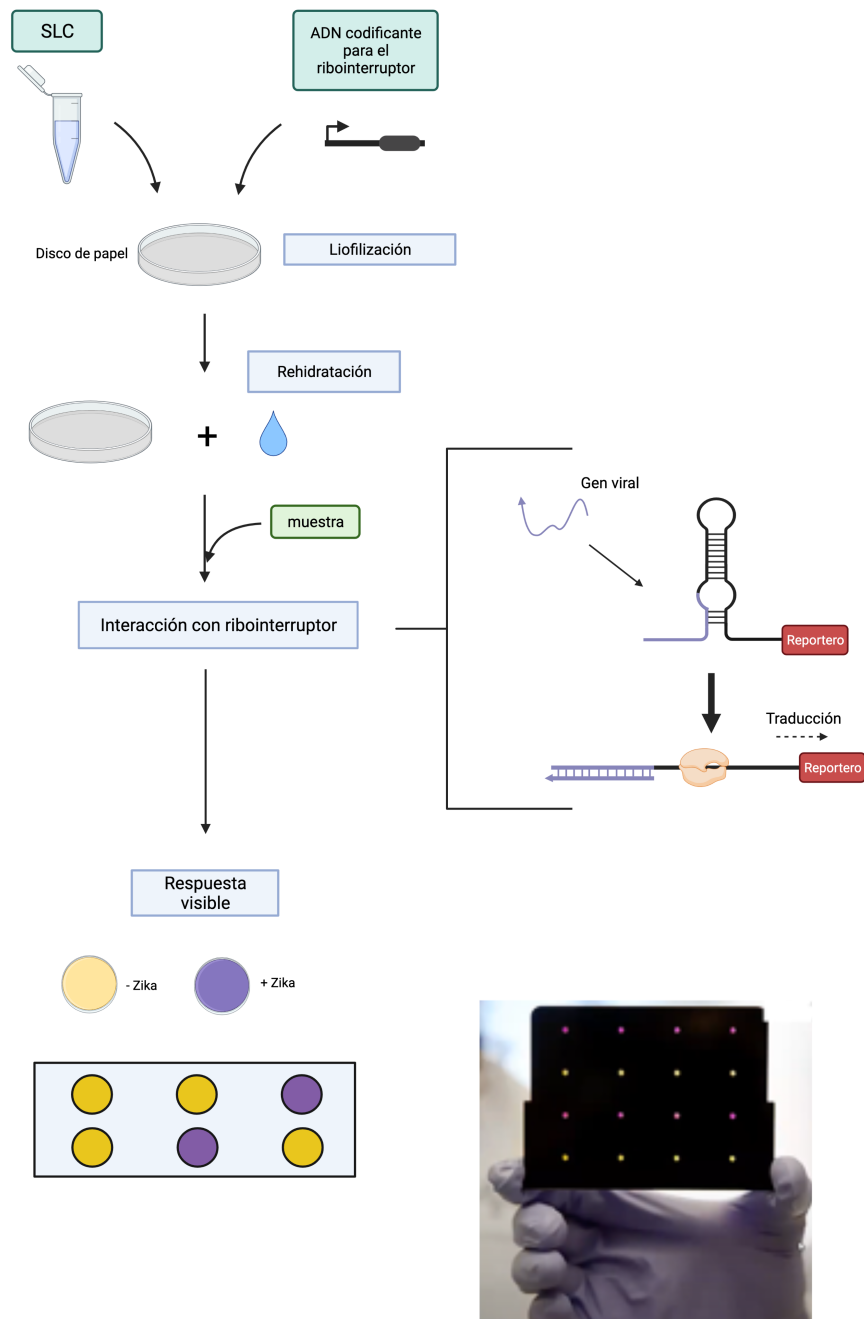
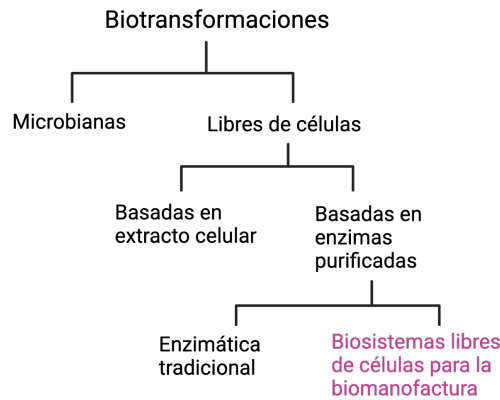


Figura 16. Metodología de detección del virus del Zika utilizando un SLC soportado en un disco de papel para su fácil transporte.

4.3. Ingeniería de metabolitos

La mayoría de las biotransformaciones actuales se consiguen mediante el uso de fermentación microbiana. Varios microorganismos han sido manipulados y optimizados genéticamente para la mejora en la síntesis de biocombustibles y demás sustancias químicas. Sin embargo, estos sistemas sufren una falta de concordancia entre los objetivos de ingeniería y los objetivos celulares ya que, al ser organismos vivos los que realizan las biotransformaciones, una considerable cantidad de sustrato y energía son utilizados para el crecimiento celular y el autoreplicación (Lu, 2017, Rollin et al., 2013). Igualmente, aún en las bacterias más simples, el metabolismo celular es difícil de controlar, ya que al alterar algunas de las vías metabólicas para mejorar la síntesis de un producto se puede afectar negativamente al resto de la célula. Asimismo, el producto deseado puede ser tóxico para el microorganismo provocando su muerte. Todo lo previamente descrito constituye el mayor obstáculo para lograr una producción a gran escala que sea competitiva en costos de biocombustibles y sustancias bioquímicas utilizando microorganismos (Zhang et al., 2015). Por esta razón separar la proliferación celular de la producción de metabolitos puede ser una gran ventaja (Lu, 2017).

Los SLC en la biología sintética surgen como una opción para lograr diferentes biotransformaciones sin preocuparse por el crecimiento celular, el metabolismo complicado y la obtención de productos secundarios no deseados por lo que se presentan como una alternativa a la fermentación (Zhang et al., 2015). Este tipo de sistemas presentan ventajas en la biomanufactura como una tasa de síntesis rápida, el buen control de la dirección de la reacción y la tolerancia a sustancias y productos tóxicos (Zawada et al., 2011). Al conservar en los SLC únicamente las enzimas relacionadas con la producción de la molécula objetivo, se ofrece el control de las vías metabólicas para la máxima eficiencia de conversión. Para las biotransformaciones estos sistemas pueden basarse en extractos celulares o en proteínas purificadas (sistemas PURE) y lo que diferencia a las biotransformaciones utilizando un SLC de las biotransformaciones tradicionales con el uso de enzimas es que los SLC se definen como biosistemas *in vitro* compuestos de más de tres enzimas en un mismo recipiente para la producción industrial.



Un ejemplo de esto lo podemos encontrar en la producción de biohidrógeno a partir azúcares renovables de bajo costo. Esta es una excelente opción para la producción de este gas ya que no se emplean combustibles fósiles y a que la emisión de gases de efecto invernadero es casi nula. En un estudio realizado por Myung et al. se diseñó una vía compuesta de 15 enzimas para la conversión de sacarosa, glucosa o fructosa y agua a hidrógeno sin el uso del costoso ATP (Myung et al., 2014). Utilizando esta vía enzimática demostró producir hidrógeno al 96.7 % del rendimiento máximo teórico (Myung et al., 2014). En el caso de la producción de alcoholes, Guterl et al., reportaron una novedosa estrategia utilizando un SLC para la obtención de etanol e isobutanol a partir de glucosa. Este tipo de alcoholes, son excelentes plataformas moleculares para la producción sustentable de combustibles y demás productos químicos. Sin embargo, su producción actual con base en la fermentación realizada por microorganismos está limitada por diversos aspectos. Por ejemplo, la baja tolerancia de estos microorganismos al producto final. Una concentración alrededor del 1-2% (v/v) de isobutanol puede ser tóxica para células de levadura, reduciendo la tasa de crecimiento del microorganismo. Otro aspecto limitante para la producción basada en células completas es la baja tolerancia a los cambios de temperatura y la dificultad para introducir un flujo alto del sustrato al metabolismo de la célula. Además, la presencia inherente de múltiples vías metabólicas celulares deriva en el uso de sustrato para vías de reacción no productivas. La estrategia diseñada basada en SLC utiliza una reacción glucolítica en cascada compuesta de sólo 4 reacciones catalizadas por enzimas requiriendo de una sola coenzima (NAD⁺). La selección de enzimas para esta reacción en cascada en un SLC se basó en su estabilidad y selectividad. También, al ser un sistema abierto por naturaleza, se pudieron utilizar enzimas de organismos termófilos. Este tipo de sistemas pueden funcionar bajo condiciones a las cuales en un sistema celular común la

producción microbiana habría cesado. El uso de esta biotransformación en un SLC puede extenderse para la producción de una gran variedad de moléculas relevantes para la industria con altos rendimientos y una fácil recuperación al final de la producción (Guterl et al., 2012).

En resumen, aunque diferentes estrategias para la ingeniería de metabolitos se han desarrollado y probado en células para el incremento en la producción de sustancias, numerosos estudios indican que el aumentar el rendimiento teórico de conversión para una biotransformación en una célula es una tarea poco posible. Por esta razón los SLCs al no necesitar de un crecimiento celular comienzan a ofrecer la posibilidad de diseñar e integrar vías metabólicas sintéticas para la producción de sustancias y por lo tanto aspirar a rendimientos máximos mayores para el mejoramiento de la producción bioindustrial (Lu, 2017).

4.4 Uso de SLC para crear células artificiales

Una célula artificial es una cápsula membranal diseñada para albergar materiales biológicamente activos que en conjunto desempeñen funciones específicas. Para la construcción de una célula artificial existen dos enfoques diferentes: de “arriba hacia abajo” (top-down) y de “abajo hacia arriba” (bottom-up). El enfoque top-down se enfoca en la construcción de una célula “mínima” reduciendo y simplificando el genoma de una célula natural. Sin embargo, este enfoque resulta caro, tardado y difícil de escalar. En contraste, el enfoque bottom-up pretende crear una célula ensamblando una serie de componentes no bióticos, o sea desde un SLC (Xu et al., 2016). La construcción de una célula artificial se puede conseguir con el acoplamiento de tres elementos básicos. El primero es una membrana semipermeable estable que encapsule los constituyentes de la célula protegiéndolos de ser dañados por el ambiente externo y al mismo tiempo permita el intercambio selectivo de materia y energía. También, es necesaria la presencia de una molécula que albergue la información genética ya sea de ADN o ARN y finalmente un sistema metabólico que provea de energía a las células, y les confiera la capacidad de auto mantenerse, auto renovarse y auto procesar de información (Xu et al., 2016).

Las aplicaciones de estos sistemas son variadas. Entre ellas se encuentran el estudio de procesos celulares y el desarrollo de nuevas herramientas biotecnológicas para aplicaciones médicas, ambientales, industriales y de investigación (Xu et al., 2016). La síntesis *in vitro* de dos proteínas diferentes en regiones de vesículas definidas se ha logrado haciendo uso de células artificiales creando una compartimentalización en el interior de

éstas la cual permite tener diferentes regiones dedicadas a diferentes procesos biológicos (Elani et al., 2015). Otra aplicación tremendamente importante representa una innovación para la biomedicina ya que se propone que células artificiales hechas de SLC se puedan diseñar para sintetizar y entregar drogas medicinales a sitios específicos en respuesta a un estímulo (Lu, 2017).

4.5 Otras aplicaciones de los SLCs

Además de las descritas anteriormente, los SLCs se han utilizado, por ejemplo, para la incorporación de aminoácidos no proteínicos a proteínas, lo cual no es tan sencillo en un sistema de expresión *in vivo*. Reemplazar alguno de los 20 aminoácidos estándar con aminoácidos no proteínicos en una proteína le puede conferir de nuevas propiedades fisicoquímicas y nuevas funciones biológicas (Gao et al., 2019).

La producción de partículas tipo virus VLPs ha sido otra reciente aplicación de los SLCs. Estas partículas de 25 a 100 nm son complejos auto ensamblados de una o más proteínas estructurales. Estos complejos estructuralmente parecidos a los virus provocan una respuesta inmunogénica pero ya que no contienen el material genético pueden ser utilizados como vacunas seguras (Jennings & Bachmann, 2008). Además, debido a su estructura “hueca” son candidatos para la entrega de fármacos y agentes terapéuticos. La dificultad en la producción recombinante de los VLPs se deriva de las inconsistencias estructurales y de composición al escalar la producción por lo que plataformas con base en SLCs se han desarrollado exitosamente para facilitar la construcción de los VLPs (Bundy et al., 2008).

Un área importante de la biología sintética para el estudio del comportamiento celular es la construcción de redes genéticas sintéticas las cuales tienen una amplia variedad de aplicaciones biológicas y médicas. En la naturaleza, el control del comportamiento celular está codificado en estas redes genéticas las cuales toman señales internas y externas y a través de un flujo de información, en forma de la expresión de genes, provocan un comportamiento final. El proceso de construcción sintética de estas redes para su estudio se puede generalizar como un proceso cíclico de “diseño, construcción y prueba” donde las etapas de diseño de las secuencias de ADN que codifican a las partes regulatorias y la incorporación de estas secuencias en constructos de expresión han tenido un desarrollo rápido en los últimos años. Sin embargo, en la etapa de la “prueba”, el lento proceso de incorporar el ADN a las células y la falta de consistencia en la expresión de los genes, debido a los límites propios de las células, hacen que este último paso tome varios días lo

cual entorpece el ciclo. Los SLCs ofrecen una alternativa para permitir la caracterización de las redes genéticas de una manera rápida y simple por lo que se puede probar un repertorio más amplio de constructos en menor tiempo (Takahashi et al., 2015).

5 CONCLUSIONES

Con base en la investigación realizada acerca de las últimas aplicaciones que ha tenido la tecnología de sistemas libres de células, ésta se puede describir como una plataforma emergente para la biología sintética y la biotecnología capaz de complementar o en ocasiones sustituir procesos que en el pasado se realizaban únicamente en sistemas *in vivo*. La tolerancia, estabilidad y habilidad para producir proteínas en cortos periodos de tiempo hacen a los SLC una alternativa viable para la síntesis de estos bioproductos. Por otro lado, además de permitir la obtención de moléculas como elementos regulatorios génicos, proteínas y enzimas, estos sistemas contribuyen a la mejora del diseño de sistemas biológicos como vías metabólicas y de regulación génica, así como en niveles extracelulares para la construcción de células sintéticas o el estudio de la comunicación celular. También, la posibilidad de mantener a los SLCs almacenados en su forma liofilizada hasta por 1 año demuestra su gran estabilidad y practicidad para su transporte. En la actualidad existe un interés en la optimización de parámetros involucrados en la expresión para extender el alcance de esta plataforma, como lo son el uso de codones dependiendo el extracto celular a utilizar, la selección y concentración de plásmidos, y los mismos reactivos que componen el SLC.

Por otra parte, a pesar de que se estudia el uso de nuevas fuentes del extracto celular diferentes a *E. coli* para expandir las aplicaciones de la herramienta, los extractos de *E. coli* siguen siendo la opción más utilizada y prácticamente los únicos capaces de producir proteínas en rendimientos comparables con los procesos en células completas.

Si bien este tipo de sistemas presentan un alto nivel de control, gracias a su naturaleza de sistema abierto, también presentan dificultades propias como la falta de homeostasis, la cual provoca una ultra sensibilidad de las reacciones libres de células a variaciones en las condiciones del entorno. Igualmente, se requiere trabajo adicional para validar la posibilidad de medición de constantes de velocidad biofísicas necesarias en un entorno fisicoquímico similar al de dentro de una célula.

En cuestión de las aplicaciones mencionadas, tanto para los biosensores como para la biomanufactura, ha habido un gran progreso en los últimos años. No obstante, se deben realizar estudios adicionales que demuestren la producción de sensores y proteínas

terapéutica en grandes volúmenes. Tiempos de reacción más largos (como días o semanas en lugar de horas) beneficiaría a la bioproducción utilizando este tipo de sistemas y ayudaría al estudio para mejorar el metabolismo dentro de ellos. Para esto, se tiene que considerar la estabilidad de los templados circulares de ADN durante periodos largos de tiempo, entre otros criterios. En relación con esta herramienta, se sabe que existen variaciones en los lisados celulares de un lote a otro, lo cual limita la predicción de los resultados entre repeticiones de un experimento. El poder garantizar una consistencia entre lotes en su composición, que se extienda hasta el rendimiento de la proteína a obtener es un punto clave. Por otra parte, debido a la importancia de las modificaciones postraduccionales que se necesitan comúnmente en varios bioterapéuticos, es necesario conocer a detalle la biosíntesis de éstas para llevar a cabo ingeniería en los sistemas y poder generar estos productos. Mientras los métodos para la expresión génica en sistemas libres de células se vuelvan más sencillos y menos caros, su rango de aplicación continuará aumentando dramáticamente, especialmente para la obtención de bioproductos en donde los sistemas tradicionales presenten complicaciones. En el caso de la bioproducción a escala industrial, debido a los altos costos que aún tienen los componentes de un sistema libre de células, es probable que se continúe optando por los sistemas celulares tradicionales. No obstante, esta situación podría cambiar pronto con el desarrollo de herramientas que disminuyan los costos y extiendan los tiempos de reacción. Lo anterior daría pauta a que, en poco tiempo, la decisión de usar un sistema celular o un sistema libre de células sea más difícil de tomar. Hoy en día sin duda alguna la combinación de los sistemas celulares y libres de células es una excelente forma para explorar nuevas posibilidades de obtención de bioproductos de interés global.

6 REFERENCIAS

1. Arolas, J. L., Aviles, F. X., Chang, J. Y., & Ventura, S. (2006). Folding of small disulfide-rich proteins: clarifying the puzzle. *Trends in biochemical sciences*, 31(5), 292–301. <https://doi.org/10.1016/j.tibs.2006.03.005>
2. Bayburt, T. H., & Sligar, S. G. (2010). Membrane protein assembly into Nanodiscs. *FEBS letters*, 584(9), 1721–1727. <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2009.10.024>
3. Barzon, L., Pacenti, M., Berto, A., Sinigaglia, A., Franchin, E., Lavezzo, E., Brugnaro, P., & Palù, G. (2016). Isolation of infectious Zika virus from saliva and prolonged viral RNA shedding in a traveller returning from the Dominican Republic to Italy, January 2016. *Euro surveillance : bulletin Europeen sur les maladies transmissibles = European communicable disease bulletin*, 21(10), 30159.
4. <https://doi.org/10.2807/1560-7917.ES.2016.21.10.30159>
5. Biondi, Ricardo M. (1996). *Aislamiento, purificación y caracterización de la nucleósido difosfato quinasa del hongo patógeno Candida albicans : Comparación con otras especies.* (info:eu-repo/semantics/doctoralThesis). Universidad de Buenos Aires. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Disponible en el Repositorio Digital Institucional de la Universidad de Buenos Aires. http://hdl.handle.net/20.500.12110/tesis_n2812_Biondi
6. Breaker R. R. (2012). Riboswitches and the RNA world. *Cold Spring Harbor perspectives in biology*, 4(2), a003566. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a003566>
7. Bundy, B. C., Franciszkowicz, M. J., & Swartz, J. R. (2008). Escherichia coli-based cell-free synthesis of virus-like particles. *Biotechnology and bioengineering*, 100(1), 28–37. <https://doi.org/10.1002/bit.21716>
8. Campos, R., Cirne-Santos, C., Meira, G. L., Santos, L. L., de Meneses, M. D., Friedrich, J., Jansen, S., Ribeiro, M. S., da Cruz, I. C., Schmidt-Chanasit, J., & Ferreira, D. F. (2016). Prolonged detection of Zika virus RNA in urine samples during the ongoing Zika virus epidemic in Brazil. *Journal of clinical virology : the official publication of the Pan American Society for Clinical Virology*, 77, 69–70. <https://doi.org/10.1016/j.jcv.2016.02.009>
9. Carlson, E. D., Gan, R., Hodgman, C. E., & Jewett, M. C. (2012). Cell-free protein synthesis: applications come of age. *Biotechnology advances*, 30(5), 1185–1194. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2011.09.016>
10. Carraher, C., Nazmi, A. R., Newcomb, R. D., & Kralicek, A. (2013). Recombinant expression, detergent solubilisation and purification of insect odorant receptor subunits. *Protein expression and purification*, 90(2), 160–169. <https://doi.org/10.1016/j.pep.2013.06.002>
11. Caschera, F., & Noireaux, V. (2014). Synthesis of 2.3 mg/ml of protein with an all Escherichia coli cell-free transcription-translation system. *Biochimie*, 99, 162–168. <https://doi.org/10.1016/j.biochi.2013.11.025>
12. Chang, H. C., Kaiser, C. M., Hartl, F. U., & Barral, J. M. (2005). De novo folding of GFP fusion proteins: high efficiency in eukaryotes but not in bacteria. *Journal of molecular biology*, 353(2), 397–409. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2005.08.052>
13. Chong S. (2014). Overview of cell-free protein synthesis: historic landmarks, commercial systems, and expanding applications. *Current protocols in molecular biology*, 108, 16.30.1–16.30.11. <https://doi.org/10.1002/0471142727.mb1630s108>

14. Cordray, M. S., & Richards-Kortum, R. R. (2012). Emerging nucleic acid-based tests for point-of-care detection of malaria. *The American journal of tropical medicine and hygiene*, 87(2), 223–230. <https://doi.org/10.4269/ajtmh.2012.11-0685>
15. Cotter, P. D., Ross, R. P., & Hill, C. (2013). Bacteriocins - a viable alternative to antibiotics?. *Nature reviews. Microbiology*, 11(2), 95–105. <https://doi.org/10.1038/nrmicro2937>
16. de Paz, H. D., Brotons, P., & Muñoz-Almagro, C. (2014). Molecular isothermal techniques for combating infectious diseases: towards low-cost point-of-care diagnostics. *Expert review of molecular diagnostics*, 14(7), 827–843. <https://doi.org/10.1586/14737159.2014.940319>
17. Eichmiller, J. J., Best, S. E., & Sorensen, P. W. (2016). Effects of Temperature and Trophic State on Degradation of Environmental DNA in Lake Water. *Environmental science & technology*, 50(4), 1859–1867. <https://doi.org/10.1021/acs.est.5b05672>
18. Elani, Y., Law, R. V., & Ces, O. (2015). Protein synthesis in artificial cells: using compartmentalisation for spatial organisation in vesicle bioreactors. *Physical chemistry chemical physics : PCCP*, 17(24), 15534–15537. <https://doi.org/10.1039/c4cp05933f>
19. Ezure, T., Suzuki, T., Shikata, M., Ito, M., & Ando, E. (2010). A cell-free protein synthesis system from insect cells. *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)*, 607, 31–42. https://doi.org/10.1007/978-1-60327-331-2_4
20. Fitzgerald, B., Boyle, C., & Honein, M. A. (2018). Birth Defects Potentially Related to Zika Virus Infection During Pregnancy in the United States. *JAMA*, 319(12), 1195–1196. <https://doi.org/10.1001/jama.2018.0126>
21. Gao, W., Cho, E., Liu, Y., & Lu, Y. (2019). Advances and Challenges in Cell-Free Incorporation of Unnatural Amino Acids Into Proteins. *Frontiers in pharmacology*, 10, 611. <https://doi.org/10.3389/fphar.2019.00611>
22. Goerke, A. R., & Swartz, J. R. (2008). Development of cell-free protein synthesis platforms for disulfide bonded proteins. *Biotechnology and bioengineering*, 99(2), 351–367. <https://doi.org/10.1002/bit.21567>
23. Green, A. A., Silver, P. A., Collins, J. J., & Yin, P. (2014). Toehold switches: de-novo-designed regulators of gene expression. *Cell*, 159(4), 925–939. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2014.10.002>
24. Gregorio, N. E., Levine, M. Z., & Oza, J. P. (2019). A User's Guide to Cell-Free Protein Synthesis. *Methods and protocols*, 2(1), 24. <https://doi.org/10.3390/mps2010024>
25. Guterl, J. K., Garbe, D., Carsten, J., Steffler, F., Sommer, B., Reißer, S., Philipp, A., Haack, M., Rühmann, B., Koltermann, A., Kettling, U., Brück, T., & Sieber, V. (2012). Cell-free metabolic engineering: production of chemicals by minimized reaction cascades. *ChemSusChem*, 5(11), 2165–2172. <https://doi.org/10.1002/cssc.201200365>
26. Hansen, M. M., Ventosa Rosquelles, M., Yelleswarapu, M., Maas, R. J., van Vugt-Jonker, A. J., Heus, H. A., & Huck, W. T. (2016). Protein Synthesis in Coupled and Uncoupled Cell-Free Prokaryotic Gene Expression Systems. *ACS synthetic biology*, 5(12), 1433–1440. <https://doi.org/10.1021/acssynbio.6b00010>
27. Harper, A. P., Finger, B. J., & Green, M. P. (2020). Chronic Atrazine Exposure Beginning Prenatally Impacts Liver Function and Sperm Concentration With Multi-

- Generational Consequences in Mice. *Frontiers in endocrinology*, 11, 580124.
<https://doi.org/10.3389/fendo.2020.580124>
28. Hayes, T. B., Khoury, V., Narayan, A., Nazir, M., Park, A., Brown, T., Adame, L., Chan, E., Buchholz, D., Stueve, T., & Gallipeau, S. (2010). Atrazine induces complete feminization and chemical castration in male African clawed frogs (*Xenopus laevis*). *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 107(10), 4612–4617. <https://doi.org/10.1073/pnas.0909519107>
29. Henrich, E., Hein, C., Dötsch, V., & Bernhard, F. (2015). Membrane protein production in *Escherichia coli* cell-free lysates. *FEBS letters*, 589(15), 1713–1722. <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2015.04.045>
30. Hodgman, C. E., & Jewett, M. C. (2012). Cell-free synthetic biology: thinking outside the cell. *Metabolic engineering*, 14(3), 261–269. <https://doi.org/10.1016/j.ymben.2011.09.002>
31. Hua, A., Gueuné, H., Cregut, M., Thouand, G., & Durand, M. J. (2015). Development of a bacterial bioassay for atrazine and cyanuric acid detection. *Frontiers in microbiology*, 6, 211. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2015.00211>
32. IDEXX Colilert kit disponible en <https://www.idexx.com/en/water/water-products-services/colilert/>
33. Ipsen Bioharm (2020). Novel production process for a highly potent recombinant protein using doggybone DNA (dbDNA) vector and cell free expression technology
34. Jaroentomeechai, T., Stark, J.C., Natarajan, A. *et al.* (2018) Single-pot glycoprotein biosynthesis using a cell-free transcription-translation system enriched with glycosylation machinery. *Nat Commun* 9, 2686. <https://doi.org/10.1038/s41467-018-05110-x>
35. Jennings, G. T., & Bachmann, M. F. (2008). The coming of age of virus-like particle vaccines. *Biological chemistry*, 389(5), 521–536. <https://doi.org/10.1515/bc.2008.064>
36. Jensen, H.M., Eng, T., Chubukov, V. *et al.* (2017). Improving membrane protein expression and function using genomic edits. *Sci Rep* 7, 13030. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-12901-7>
37. Jewett, M. C., & Swartz, J. R. (2004). Mimicking the *Escherichia coli* cytoplasmic environment activates long-lived and efficient cell-free protein synthesis. *Biotechnology and bioengineering*, 86(1), 19–26. <https://doi.org/10.1002/bit.20026>
38. Jiang, Y. S., Bhadra, S., Li, B., Wu, Y. R., Milligan, J. N., & Ellington, A. D. (2015). Robust strand exchange reactions for the sequence-specific, real-time detection of nucleic acid amplicons. *Analytical chemistry*, 87(6), 3314–3320. <https://doi.org/10.1021/ac504387c>
39. Jiang, Y. S., Riedel, T. E., Popoola, J. A., Morrow, B. R., Cai, S., Ellington, A. D., & Bhadra, S. (2018). Portable platform for rapid in-field identification of human fecal pollution in water. *Water research*, 131, 186–195. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2017.12.023>
40. Jin, X., & Hong, S. H. (2018). Cell-free protein synthesis for producing “difficult-to-express” proteins. *Biochemical Engineering Journal*, 138, 156-164. <https://doi.org/10.1016/j.bej.2018.07.013>
41. Jin, X., Kightlinger, W., & Hong, S. H. (2019). Optimizing Cell-Free Protein Synthesis for Increased Yield and Activity of Colicins. *Methods and Protocols*, 2(2), 28. <https://doi.org/10.3390/mps2020028>

42. Jung, J.K., Alam, K.K., Verosloff, M.S. *et al.* Cell-free biosensors for rapid detection of water contaminants. *Nat Biotechnol* **38**, 1451–1459 (2020).
<https://doi.org/10.1038/s41587-020-0571-7>
43. Junge, F., Haberstock, S., Roos, C., Stefer, S., Proverbio, D., Dötsch, V., & Bernhard, F. (2011). Advances in cell-free protein synthesis for the functional and structural analysis of membrane proteins. *New biotechnology*, *28*(3), 262–271.
<https://doi.org/10.1016/j.nbt.2010.07.002>
44. Kang, S. H., Oh, T. J., Kim, R. G., Kang, T. J., Hwang, S. H., Lee, E. Y., & Choi, C. Y. (2000). An efficient cell-free protein synthesis system using periplasmic phosphatase-removed S30 extract. *Journal of microbiological methods*, *43*(2), 91–96.
[https://doi.org/10.1016/s0167-7012\(00\)00206-2](https://doi.org/10.1016/s0167-7012(00)00206-2)
45. Kigawa, T., Yamaguchi-Nunokawa, E., Kodama, K., Matsuda, T., Yabuki, T., Matsuda, N., Ishitani, R., Nureki, O., & Yokoyama, S. (2002). Selenomethionine incorporation into a protein by cell-free synthesis. *Journal of structural and functional genomics*, *2*(1), 29–35. <https://doi.org/10.1023/a:1013203532303>
46. 188. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-0290\(1999\)66:3<180::AID-BIT6>3.0.CO;2-S](https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-0290(1999)66:3<180::AID-BIT6>3.0.CO;2-S)
47. Kim, D. M., & Swartz, J. R. (2004). Efficient production of a bioactive, multiple disulfide-bonded protein using modified extracts of *Escherichia coli*. *Biotechnology and bioengineering*, *85*(2), 122–129. <https://doi.org/10.1002/bit.10865>
48. Kim, H.-C., Kim, T.-W., & Kim, D.-M. (2011). *Prolonged production of proteins in a cell-free protein synthesis system using polymeric carbohydrates as an energy source. Process Biochemistry*, *46*(6), 1366–1369. doi:10.1016/j.procbio.2011.03.008
49. Kim, J., Copeland, C. E., Seki, K., Vögeli, B., & Kwon, Y. C. (2020). Tuning the Cell-Free Protein Synthesis System for Biomanufacturing of Monomeric Human Filaggrin. *Frontiers in bioengineering and biotechnology*, *8*, 590341.
<https://doi.org/10.3389/fbioe.2020.590341>
50. Kim, R. G., & Choi, C. Y. (2001). Expression-independent consumption of substrates in cell-free expression system from *Escherichia coli*. *Journal of biotechnology*, *84*(1), 27–32. [https://doi.org/10.1016/s0168-1656\(00\)00326-6](https://doi.org/10.1016/s0168-1656(00)00326-6)
51. Kim, Y., Sohn, D., & Tan, W. (2008). Molecular beacons in biomedical detection and clinical diagnosis. *International journal of clinical and experimental pathology*, *1*(2), 105–116.
52. Koyama, K., Wakabayashi, K., Masutani, M., Koizumi, K., Watanabe, M., Yamazaki, S., Kono, T., Miki, K., & Sugimura, T. (1996). Presence in *Pieris rapae* of cytotoxic activity against human carcinoma cells. *Japanese journal of cancer research : Gann*, *87*(12), 1259–1262. <https://doi.org/10.1111/j.1349-7006.1996.tb03141.x>
53. Levine, M. Z., Gregorio, N. E., Jewett, M. C., Watts, K. R., & Oza, J. P. (2019). *Escherichia coli*-Based Cell-Free Protein Synthesis: Protocols for a robust, flexible, and accessible platform technology. *Journal of visualized experiments : JoVE*, (144), 10.3791/58882. <https://doi.org/10.3791/58882>
54. Liu, D. V., Zawada, J. F., & Swartz, J. R. (2005). Streamlining *Escherichia coli* S30 extract preparation for economical cell-free protein synthesis. *Biotechnology progress*, *21*(2), 460–465. <https://doi.org/10.1021/bp049789y>

55. Liu, X., Silverman, A. D., Alam, K. K., Iverson, E., Lucks, J. B., Jewett, M. C., & Raman, S. (2019). *Design of a transcriptional biosensor for the portable, on-demand detection of cyanuric acid*. *ACS Synthetic Biology*. doi:10.1021/acssynbio.9b00348
56. Lu, Y. (2017). *Cell-free synthetic biology: Engineering in an open world*. *Synthetic and Systems Biotechnology*, 2(1), 23–27. doi:10.1016/j.synbio.2017.02.003
57. Madin, K., Sawasaki, T., Ogasawara, T., & Endo, Y. (2000). A highly efficient and robust cell-free protein synthesis system prepared from wheat embryos: plants apparently contain a suicide system directed at ribosomes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United State of America*, 97(2), 559–564. <https://doi.org/10.1073/pnas.97.2.559>
58. Martin, R. W., Majewska, N. I., Chen, C. X., Albanetti, T. E., Jimenez, R., Schmelzer, A. E., Jewett, M. C., & Roy, V. (2017). Development of a CHO-Based Cell-Free Platform for Synthesis of Active Monoclonal Antibodies. *ACS synthetic biology*, 6(7), 1370–1379. <https://doi.org/10.1021/acssynbio.7b00001>
59. Mathieu, K., Javed, W., Vallet, S., Lesterlin, C., Candusso, M. P., Ding, F., Xu, X. N., Ebel, C., Jault, J. M., & Orelle, C. (2019). Functionality of membrane proteins overexpressed and purified from *E. coli* is highly dependent upon the strain. *Scientific reports*, 9(1), 2654. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-39382-0>
60. Matthies, D., Habersock, S., Joos, F., Dötsch, V., Vonck, J., Bernhard, F., & Meier, T. (2011). Cell-free expression and assembly of ATP synthase. *Journal of molecular biology*, 413(3), 593–603. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2011.08.055>
61. Meenakshi, & Maheshwari, R. C. (2006). Fluoride in drinking water and its removal. *Journal of hazardous materials*, 137(1), 456–463. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2006.02.024>
62. Melinek, Beatrice & Colant, Noelle & Stamatis, Christos & Lennon, Christopher & Farid, Suzanne & Polizzi, Karen & Carver, Mark & Bracewell, Daniel. (2020). *Toward a Roadmap for Cell-Free Synthesis in Bioprocessing*. BioProcess International.
63. Michel-Reydellet, N., Calhoun, K., & Swartz, J. (2004). Amino acid stabilization for cell-free protein synthesis by modification of the *Escherichia coli* genome. *Metabolic engineering*, 6(3), 197–203. <https://doi.org/10.1016/j.ymben.2004.01.003>
64. Michel-Reydellet, N., Woodrow, K., & Swartz, J. (2005). Increasing PCR fragment stability and protein yields in a cell-free system with genetically modified *Escherichia coli* extracts. *Journal of molecular microbiology and biotechnology*, 9(1), 26–34. <https://doi.org/10.1159/000088143>
65. Myung, S., Rollin, J., You, C., Sun, F., Chandrayan, S., Adams, M. W. W., & Zhang, Y.-H. P. (2014). *In vitro metabolic engineering of hydrogen production at theoretical yield from sucrose*. *Metabolic Engineering*, 24, 70–77. doi:10.1016/j.ymben.2014.05.006
66. Nirenberg, M. W., & Matthaei, J. H. (1961). The dependence of cell-free protein synthesis in *E. coli* upon naturally occurring or synthetic polyribonucleotides. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 47(10), 1588–1602. <https://doi.org/10.1073/pnas.47.10.1588>
67. Notomista, E., Cafaro, V., Fusiello, R., Bracale, A., D'Alessio, G., & Di Donato, A. (1999). Effective expression and purification of recombinant onconase, an antitumor protein. *FEBS letters*, 463(3), 211–215. [https://doi.org/10.1016/s0014-5793\(99\)01623-3](https://doi.org/10.1016/s0014-5793(99)01623-3)

68. Organización Mundial de la Salud (2006). Guías para la calidad del agua potable Volumen 1 pp 106-107, 128-129, 157. Disponible en: https://www.who.int/water_sanitation_health/dwq/gdwq3_es_full_lowres.pdf
69. Orth, J. H., Schorch, B., Boundy, S., French-Constant, R., Kubick, S., & Aktories, K. (2011). Cell-free synthesis and characterization of a novel cytotoxic pierisin-like protein from the cabbage butterfly *Pieris rapae*. *Toxicon : official journal of the International Society on Toxinology*, *57*(2), 199–207. <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2010.11.011>
70. Pardee, K., Green, A. A., Ferrante, T., Cameron, D. E., DaleyKeyser, A., Yin, P., & Collins, J. J. (2014). *Paper-Based Synthetic Gene Networks*. *Cell*, *159*(4), 940–954. doi:10.1016/j.cell.2014.10.004
71. Pardee, K., Green, A. A., Takahashi, M. K., Braff, D., Lambert, G., Lee, J. W., Ferrante, T., Ma, D., Donghia, N., Fan, M., Daringer, N. M., Bosch, I., Dudley, D. M., O'Connor, D. H., Gehrke, L., & Collins, J. J. (2016). Rapid, Low-Cost Detection of Zika Virus Using Programmable Biomolecular Components. *Cell*, *165*(5), 1255–1266. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2016.04.059>
72. Pillai, J., Mathew, K., Gibbs, R. & Ho, G. E. (1999). H₂S paper strip method—A bacteriological test for faecal coliforms in drinking water at various temperatures. *Water Sci. Technol.* **40**, 85–90. [https://doi.org/10.1016/S0273-1223\(99\)00434-5](https://doi.org/10.1016/S0273-1223(99)00434-5)
73. Proverbio, D., Roos, C., Beyermann, M., Orbán, E., Dötsch, V., & Bernhard, F. (2013). Functional properties of cell-free expressed human endothelin A and endothelin B receptors in artificial membrane environments. *Biochimica et biophysica acta*, *1828*(9), 2182–2192. <https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2013.05.031>
74. Rodrigues, T. B., Mishra, S. K., Sridharan, K., Barnes, E. R., Alyokhin, A., Tuttle, R., Kokulapalan, W., Garby, D., Skizim, N. J., Tang, Y. W., Manley, B., Aulisa, L., Flannagan, R. D., Cobb, C., & Narva, K. E. (2021). First Sprayable Double-Stranded RNA-Based Biopesticide Product Targets *Proteasome* Subunit Beta Type-5 in Colorado Potato Beetle (*Leptinotarsa decemlineata*). *Frontiers in plant science*, *12*, 728652. <https://doi.org/10.3389/fpls.2021.728652>
75. Rogers, J. K., Guzman, C. D., Taylor, N. D., Raman, S., Anderson, K., & Church, G. M. (2015). *Synthetic biosensors for precise gene control and real-time monitoring of metabolites*. *Nucleic Acids Research*, *43*(15), 7648–7660. doi:10.1093/nar/gkv616
76. Rohr, J. R., & McCoy, K. A. (2010). A qualitative meta-analysis reveals consistent effects of atrazine on freshwater fish and amphibians. *Environmental health perspectives*, *118*(1), 20–32. <https://doi.org/10.1289/ehp.0901164>
77. Rollin, J. A., Tam, T. K., & Zhang, Y.-H. P. (2013). *New biotechnology paradigm: cell-free biosystems for biomanufacturing*. *Green Chemistry*, *15*(7), 1708. doi:10.1039/c3gc40625c
78. Sachse, R., Dondapati, S. K., Fenz, S. F., Schmidt, T., & Kubick, S. (2014). Membrane protein synthesis in cell-free systems: from bio-mimetic systems to bio-membranes. *FEBS letters*, *588*(17), 2774–2781. <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2014.06.007>
79. Sachse, R., Wüstenhagen, D., Šamalíková, M., Gerrits, M., Bier, F. F., & Kubick, S. (2012). *Synthesis of membrane proteins in eukaryotic cell-free systems*. *Engineering in Life Sciences*, *13*(1), 39–48. doi:10.1002/elsc.201100235

80. Saibil H. (2013). Chaperone machines for protein folding, unfolding and disaggregation. *Nature reviews. Molecular cell biology*, 14(10), 630–642. <https://doi.org/10.1038/nrm3658>
81. Salehi, A. S., Smith, M. T., Bennett, A. M., Williams, J. B., Pitt, W. G., & Bundy, B. C. (2016). Cell-free protein synthesis of a cytotoxic cancer therapeutic: Onconase production and a just-add-water cell-free system. *Biotechnology journal*, 11(2), 274–281. <https://doi.org/10.1002/biot.201500237>
82. Schoborg, J. A., Hershewe, J. M., Stark, J. C., Kightlinger, W., Kath, J. E., Jaroentomeechai, T., Natarajan, A., DeLisa, M. P., & Jewett, M. C. (2018). A cell-free platform for rapid synthesis and testing of active oligosaccharyltransferases. *Biotechnology and bioengineering*, 115(3), 739–750. <https://doi.org/10.1002/bit.26502>
83. Shimizu, Y., Inoue, A., Tomari, Y. *et al.* Cell-free translation reconstituted with purified components. *Nat Biotechnol* **19**, 751–755 (2001). <https://doi.org/10.1038/90802>
84. Shimizu, Y., Kanamori, T., & Ueda, T. (2005). Protein synthesis by pure translation systems. *Methods (San Diego, Calif.)*, 36(3), 299–304. <https://doi.org/10.1016/j.ymeth.2005.04.006>
85. Shimizu, Y., & Ueda, T. (2010). PURE technology. *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)*, 607, 11–21. https://doi.org/10.1007/978-1-60327-331-2_2
86. Sigma Aldrich (2021). ALiCE[®] Cell Free Protein Expression Kit. https://www.sigmaaldrich.com/MX/es/product/sigma/al0103000?gclid=EAlaIqobChMlluPeo8-o9QIVpzytBh0i3gMSEAAAYAiAAEgJKvvd_BwE
87. Silverman, A. D., Akova, U., Alam, K. K., Jewett, M. C., & Lucks, J. B. (2020). Design and Optimization of a Cell-Free Atrazine Biosensor. *ACS synthetic biology*, 9(3), 671–677. <https://doi.org/10.1021/acssynbio.9b00388>
88. Silverman, A.D., Karim, A.S. & Jewett, M.C. Cell-free gene expression: an expanded repertoire of applications. *Nat Rev Genet* **21**, 151–170 (2020). <https://doi.org/10.1038/s41576-019-0186-3>
89. Silverman, A. D., Kelley-Loughnane, N., Lucks, J. B., & Jewett, M. C. (2019). Deconstructing Cell-Free Extract Preparation for in Vitro Activation of Transcriptional Genetic Circuitry. *ACS synthetic biology*, 8(2), 403–414. <https://doi.org/10.1021/acssynbio.8b00430>
90. Spadiut, O., Capone, S., Krainer, F., Glieder, A., & Herwig, C. (2014). Microbials for the production of monoclonal antibodies and antibody fragments. *Trends in biotechnology*, 32(1), 54–60. <https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2013.10.002>
91. Stech, M., Hust, M., Schulze, C., Dübel, S., & Kubick, S. (2014). Cell-free eukaryotic systems for the production, engineering, and modification of scFv antibody fragments. *Engineering in life sciences*, 14(4), 387–398. <https://doi.org/10.1002/elsc.201400036>
92. Stech, M., & Kubick, S. (2015). Cell-Free Synthesis Meets Antibody Production: A Review. *Antibodies*, 4(1), 12–33. doi:10.3390/antib4010012
93. Swartz J. (2006). Developing cell-free biology for industrial applications. *Journal of industrial microbiology & biotechnology*, 33(7), 476–485. <https://doi.org/10.1007/s10295-006-0127-y>

94. Takahashi, M. K., Hayes, C. A., Chappell, J., Sun, Z. Z., Murray, R. M., Noireaux, V., & Lucks, J. B. (2015). Characterizing and prototyping genetic networks with cell-free transcription-translation reactions. *Methods (San Diego, Calif.)*, *86*, 60–72. <https://doi.org/10.1016/j.ymeth.2015.05.020>
95. Takahashi, M.K., Tan, X., Dy, A.J. *et al.* A low-cost paper-based synthetic biology platform for analyzing gut microbiota and host biomarkers. *Nat Commun* **9**, 3347 (2018). <https://doi.org/10.1038/s41467-018-05864-4>
96. Takai, K., Sawasaki, T., & Endo, Y. (2010). Practical cell-free protein synthesis system using purified wheat embryos. *Nature protocols*, *5*(2), 227–238. <https://doi.org/10.1038/nprot.2009.207>
97. Tarui, H., Murata, M., Tani, I., Imanishi, S., Nishikawa, S., & Hara, T. (2001). Establishment and characterization of cell-free translation/glycosylation in insect cell (*Spodoptera frugiperda* 21) extract prepared with high pressure treatment. *Applied microbiology and biotechnology*, *55*(4), 446–453. <https://doi.org/10.1007/s002530000534>
98. Tegler, L., Corin, K., Hillger, J. *et al.* (2015). Cell-free expression, purification and ligand-binding analysis of *Drosophila melanogaster* olfactory receptors DmOR67a, DmOR85b and DmORCO. *Sci Rep* **5**, 7867. <https://doi.org/10.1038/srep07867>
99. Thavarajah W, Silverman AD, Verosloff MS *et al* (2019) Point-of-use detection of environmental fluoride via a cell-free riboswitch-based biosensor. *ACS Synth Biol* *9*:10–18. <https://doi.org/10.1021/acssynbio.9b00347>
100. Thavarajah W, Silverman AD, Verosloff MS *et al* (2019) Point-of-use detection of environmental fluoride via a cell-free riboswitch-based biosensor. *ACS Synth Biol* *9*:10–18. <https://doi.org/10.1021/acssynbio.9b00347>
101. Thavarajah, W., Verosloff, M.S., Jung, J.K. *et al.* (2020) A primer on emerging field-deployable synthetic biology tools for global water quality monitoring. *npj Clean Water* **3**, 18. <https://doi.org/10.1038/s41545-020-0064-8>
102. Thoring, L., Dondapati, S. K., Stech, M., Wüstenhagen, D. A., & Kubick, S. (2017). High-yield production of "difficult-to-express" proteins in a continuous exchange cell-free system based on CHO cell lysates. *Scientific reports*, *7*(1), 11710. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-12188-8>
103. Tsuboi, T., Takeo, S., Arumugam, T. U., Otsuki, H., & Torii, M. (2010). The wheat germ cell-free protein synthesis system: a key tool for novel malaria vaccine candidate discovery. *Acta tropica*, *114*(3), 171–176. <https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2009.10.024>
104. Voyvodic, P.L., Pandi, A., Koch, M. *et al.* (2019). Plug-and-play metabolic transducers expand the chemical detection space of cell-free biosensors. *Nat Commun* **10**, 1697. <https://doi.org/10.1038/s41467-019-09722-9>
105. Watters, K. E., Strobel, E. J., Yu, A. M., Lis, J. T., & Lucks, J. B. (2016). Cotranscriptional folding of a riboswitch at nucleotide resolution. *Nature structural & molecular biology*, *23*(12), 1124–1131. <https://doi.org/10.1038/nsmb.3316>
106. Xu, C., Hu, S., & Chen, X. (2016). Artificial cells: from basic science to applications. *Materials today (Kidlington, England)*, *19*(9), 516–532. <https://doi.org/10.1016/j.mattod.2016.02.020>

107. Yin, G., & Swartz, J. R. (2004). Enhancing multiple disulfide bonded protein folding in a cell-free system. *Biotechnology and bioengineering*, 86(2), 188–195.
<https://doi.org/10.1002/bit.10827>
108. Zawada, J. F., Yin, G., Steiner, A. R., Yang, J., Naresh, A., Roy, S. M., Gold, D. S., Heinsohn, H. G., & Murray, C. J. (2011). Microscale to manufacturing scale-up of cell-free cytokine production--a new approach for shortening protein production development timelines. *Biotechnology and bioengineering*, 108(7), 1570–1578.
<https://doi.org/10.1002/bit.23103>
109. Zhang, D. Y., & Seelig, G. (2011). Dynamic DNA nanotechnology using strand-displacement reactions. *Nature chemistry*, 3(2), 103–113.
<https://doi.org/10.1038/nchem.957>
110. Zhang Y. H. (2015). Production of biofuels and biochemicals by in vitro synthetic biosystems: Opportunities and challenges. *Biotechnology advances*, 33(7), 1467–1483.
<https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2014.10.009>
111. Zhao, Y., Chen, F., Li, Q., Wang, L., & Fan, C. (2015). Isothermal Amplification of Nucleic Acids. *Chemical reviews*, 115(22), 12491–12545.
<https://doi.org/10.1021/acs.chemrev.5b004>

*Las imágenes incluidas en este trabajo fueron creadas en BioRender.com