

Establecimiento de líneas biosensoras fluorescentes genéticamente codificadas para glucocorticoides en modelos celulares eucarióticos y procarióticos.

Lilián Amparo Dulcey Torres

Trabajo de Grado para Optar al Título de Magíster en Microbiología

Director

José Arturo Gutiérrez Triana

Doctor en Ciencia Naturales

Co-directora

Mayra Alejandra Machuca Pérez

Doctora en Microbiología

Universidad Industrial de Santander

Facultad de Salud

Escuela de Microbiología

Maestría en Microbiología

Bucaramanga

2025

Hay hombres que luchan un día

y son buenos

Hay otros que luchan un año

y son mejores

Hay quienes luchan muchos años

y son muy buenos

Pero hay los que luchan toda la vida

Esos son los imprescindibles

Bertolt Brecht.

Dedicatoria

A Dios:

Por darme la gran oportunidad de seguir estudiando en lo que me apasiona, de explorar este campo de investigación, ampliar mis conocimientos en el área de la microbiología y enamorarme cada vez más de la ciencia y sus particularidades.

A mi familia:

A mi papá, Gilberto Dulcey, por brindarme su apoyo incondicional para avanzar académicamente y crecer tanto a nivel profesional como humano, además de acompañarme con paciencia en este camino hasta alcanzar este logro. A mi mamá, Amparo Torres, por ser mi amiga incondicional, por su amor infinito y por darme ese aliento de apoyo en los momentos más críticos. A mis hermanos, Sergio y Cristian, por animarme, confiar en mis capacidades y recordarme que soy capaz de alcanzar mis metas. A mis sobrinos, Juan Pablo y Alejandro, porque son la luz de mi vida, y verlos felices alegra el alma en los momentos difíciles.

A mi pareja, Johnatan:

Por su paciencia y comprensión. Por compartir conmigo momentos agradables y acompañarme en días difíciles. Por escucharme después de una larga jornada o simplemente estar conmigo en silencio.

A mis nonos:

Porque, aunque llegara tarde a casa, siempre estaban ahí esperando, junto con Tania, mi fiel guardiana.

Agradecimientos

A mi director, José Arturo Gutiérrez, de quien aprendí un gran conocimiento en el área de la biología molecular. Gracias por brindarme la oportunidad de hacer investigación en esta disciplina, por guiarme en el desarrollo de este trabajo y por confiar plenamente en mis capacidades, aportando de manera significativa a mi formación académica.

A la profesora Mayra, por su confianza, dedicación y apoyo constante en mi trabajo de grado, sin los cuales no habría sido posible alcanzar este logro.

A la Universidad Industrial de Santander, a la Escuela de Microbiología y al programa de Maestría en Microbiología, por permitirme desarrollar mi proyecto de investigación, brindarme las herramientas e insumos necesarios para llevarlo a cabo y darme además la oportunidad de crecer profesionalmente al permitirme trabajar como docente y en microbiología clínica durante este proceso.

Al laboratorio de la Dra. Stelia Méndez en Guatiguará, por facilitarme el uso de equipos y por su valioso acompañamiento en el proceso de lisis celular, fundamental para verificar el proceso de inducción de las proteínas quiméricas evaluadas.

A mis compañeros de maestría: Carlos, Daniela, Laura, Nathalia y William, con quienes compartí una parte importante de mi proceso de investigación. Gracias por su apoyo, amistad y por hacer que este camino de aprendizaje fuera aún más significativo, construyendo un vínculo de compañerismo y afecto que siempre llevaré conmigo.

Finalmente, agradezco a todas las personas que, de una u otra manera, contribuyeron a la culminación de este proyecto.

Tabla de Contenido

	Pág.
Introducción	15
1. Marco conceptual	17
1.1 Disruptores endocrinos. Conceptos.....	17
1.2 Sistema endocrino. Generalidades.	20
1.3 Los glucocorticoides.	21
1.4 El receptor de glucocorticoides.....	23
1.5 Disruptores endocrinos involucrados en la activación o represión del receptor de glucocorticoides.	28
1.6 Evaluación y detección de disruptores endocrinos.....	30
1.7 Biosensores.....	34
2. Objetivos	38
2.1 Objetivo General	38
2.2 Objetivos Específicos	38
3. Metodología	39
3.1 Metodología para el objetivo específico 1	39
3.1.1 Línea celular HEK 293T	39
3.1.2 Diseño y construcción del plásmido reportero pRInt y pREpi.....	39
3.1.3 Diseño y construcción de los plásmidos controladores de activación.....	41
3.1.4 Generación de la línea celular HEK 293T-pRInt.	43
3.1.5 Generación del sistema celular reportero semi-estable.	43

3.1.6 Generación del sistema celular reportero transitorio.....	44
3.1.7 Evaluación del potencial biosensor de los sistemas reporteros semi-estable y transitorio.	44
3.1.8 Evaluación de la especificidad del sistema reportero transitorio.	44
3.1.9 Análisis estadísticos.	44
3.2. Metodología para el objetivo específico 2	46
3.2.1 Diseño y construcción de las proteínas quiméricas pGFPintGR y pGFPintER.....	46
3.2.2 Generación de las cepas bacterianas de expresión y ensayos de inducción.....	48
3.2.3 Lisis celular usando método sonicación en las cepas de los constructos pGFPintER y pGFPintGR.....	50
3.2.4 Inducción a diferentes concentraciones de IPTG a 25 °C de los constructos pGFPintER y pGFPintGR.....	51
3.2.5 Análisis estadístico.....	52
4. Resultados	53
4.1 Resultados para el objetivo específico 1.	53
4.1.1 Plásmido reportero pRInt.	53
4.1.2 Selección de la línea celular HEK 293T_pRInt	54
4.1.3 Análisis funcional de los sistemas celulares reporteros	55
4.1.4 Especificidad del sistema reportero transitorio.	61
4.2 Resultados para el objetivo específico 2.	63
4.2.1 Construcción de los plásmidos pGFPI, pGFPintER y pGFPintGR,.....	63
4.2.2 Análisis funcional de los constructos pGFPI, pGFPintER y pGFPintGR.....	63
4.2.3 Evaluación de la localización celular de las proteínas GFPintER y GFPintGR.	68

4.2.4 Inducción a diferentes concentraciones de IPTG a 25°C en cepas de <i>E. coli</i> BL21 con los constructos pGFPintER y pGFPintGR.	69
5. Discusión.....	70
5.1 Biosensor a nivel transcripcional en células eucariota HEK 293T:	70
5.2 Proteína quimérica a nivel traduccional en cepa <i>E.coli</i> BL21:	73
6. Conclusiones.	76
7. Recomendaciones y perspectivas	77
Apéndices	79
Referencias Bibliográficas	98

Lista de Tablas

<i>Tabla 1. Guía y clasificación de pruebas estandarizada para evaluación de EDC.</i>	31
<i>Tabla 2. Criterio del desempeño de los sistemas reporteros transcripcionales</i>	60
<i>Tabla 3. Especificidad del sistema reportero transitorio</i>	62
<i>Tabla 4. Cebadores utilizados para la construcción del plásmido reportero pAAVS1 10xUAS:GFP.</i>	79
<i>Tabla 5. Cebadores utilizados para el inserto que codifica la inteína con ER.</i>	84
<i>Tabla 6. Cebadores utilizados para amplificar LBD -GR del plásmido pCi.</i>	85

Lista de Figuras

<i>Figura 1. Síntesis y secreción de los glucocorticoides en el contexto del eje HPA.</i>	22
<i>Figura 2. Dominios principales generales del GR.</i>	24
<i>Figura 3. Modulación transcripcional génica del GR.</i>	26
<i>Figura 4. Diagrama lineal del plásmido pRInt indicando los genes de recombinación. .</i>	40
<i>Figura 5. Diagrama del plásmido reportero transicional (pREpi).</i>	40
<i>Figura 6. Diagrama lineal del plásmido controlador pCC con sus diferentes componentes</i>	41
<i>Figura 7. Diagrama lineal del plásmido controlador inducido pCi.</i>	42
<i>Figura 8. Diagrama del constructo pGFPI, pGFPintER y pGFPintGR.</i>	47
<i>Figura 9. Caracterización del plásmido pRInt con enzimas de restricciones</i>	53
<i>Figura 10. Evaluación de selección con puromicina en HEK 293T modificado</i> <i>genéticamente con el sistema de CRISPR-CAS9.</i>	55
<i>Figura 11. Evaluación funcional de los sistemas reporteros constitutivos</i>	56
<i>Figura 12. Evaluación funcional del sistema reportero semi-estable inducible.</i>	57
<i>Figura 13. Evaluación funcional del sistema reportero transitorio inducible.</i>	58
<i>Figura 14. Comparación funcional entre los sistemas reporteros inducibles.</i>	59
<i>Figura 15. Evaluación de la especificidad del sistema reportero inducible transitorio. .</i>	62

<i>Figura 16. Expresión de la GFP en función del tiempo de inductor bajo el sistema operón lac.</i>	64
<i>Figura 17. Análisis funcional de las proteínas GFPintER y GFPintGR a 37°C con diferentes concentraciones de hemihidrato de estradiol y dexametasona</i>	65
<i>Figura 18. Verificación de la inducción y procesamiento de las proteínas quiméricas GFPintER y GFPintGR.</i>	67
<i>Figura 19. Localización subcelular de las proteínas GFPintER y pGFPintGR.</i>	68
<i>Figura 20. Evaluación de las proteínas quiméricas pGFPintER y pGFPintGR con diferentes concentraciones de IPTG.</i>	69
<i>Figura 21. Caracterización de los constructos pGFPi, pGFPintER y pGFPintGR mediante digestión con enzimas de restricciones.</i>	91
<i>Figura 22. Expresión y activación de los biosensores pGFPintER y pGFPintGR a 30°C con diferentes concentraciones de hemihidrato de estradiol y dexametasona.</i>	94
<i>Figura 23. Expresión y activación de los biosensores pGFPintER y pGFPintGR posterior al tratamiento con cloruro de calcio.</i>	96

Lista de Apéndices

<i>Apéndice A. Detalles del diseño y construcción del plásmido reportero pRInt y pREpi. .</i>	<i>79</i>
<i>Apéndice B. Transformación bacteriana.</i>	<i>80</i>
<i>Apéndice C. Manipulación de las bacterias E.coli Neb 5-alpha quimicompetente.</i>	<i>80</i>
<i>Apéndice D. Detalle de la transfección del constructo pRInt y selección de la población celular modificada.....</i>	<i>81</i>
<i>Apéndice E. Descripción del procedimiento para la generación del sistema celular reportero semi-estable.....</i>	<i>81</i>
<i>Apéndice F. Descripción detallada para la generación del sistema celular reportero transitorio.....</i>	<i>82</i>
<i>Apéndice G. Descripción de la preparación de las muestras para análisis en citometría de flujo.....</i>	<i>82</i>
<i>Apéndice H. Protocolo para la evaluación de la especificidad del sistema reportero transitorio.....</i>	<i>83</i>
<i>Apéndice I. Protocolo para la construcción de los constructos pGFPI, pGFPIntER y pGFPIntGR.....</i>	<i>83</i>
<i>Apéndice J. Transformación bacteriana en E.coli BL21</i>	<i>86</i>
<i>Apéndice K. Expresión proteica de la GFP mediante la inducción de IPTG como control del vector.</i>	<i>86</i>

<i>Apéndice L. Expresión proteica de las proteínas pGFPintER y pGFPintGR con la inducción IPTG con diferentes concentraciones de dexametasona y estradiol a 30°C de incubación.</i>	<i>87</i>
<i>Apéndice M. Ensayo de permeabilidad utilizando Cloruro de calcio (CaCl₂) en diferentes concentraciones de dexametasona y estradiol.</i>	<i>88</i>
<i>Apéndice N. Verificación de la plataforma de secuenciación del plásmido pRInt.</i>	<i>89</i>
<i>Apéndice O. Verificación de los plásmidos pGFPi, pGFPintER y pGFPintGR por medio de digestión enzimática.</i>	<i>90</i>
<i>Apéndice P. Verificación de la plataforma de secuenciación de los plásmidos pGFPi, pGFPintER y pGFPintGR.</i>	<i>92</i>
<i>Apéndice Q. Fotografía de la inducción a 37°C de las proteínas quiméricas GFPintER y GFPintGR.</i>	<i>92</i>
<i>Apéndice R. Expresión proteica a 30°C de los constructos pGFPintER y pGFPintGR mediante la inducción de IPTG.</i>	<i>93</i>
<i>Apéndice S. Ensayo de permeabilidad con cloruro de calcio (CaCl₂) con los constructos pGFPintER y pGFPintGR inducido por IPTG.</i>	<i>95</i>
<i>Apéndice T. Control de fluorescencia pGFPi después de inducción de 1 mM IPTG a 25°C.</i>	<i>97</i>

Resumen

Título: Establecimiento de líneas biosensoras fluorescentes genéticamente codificadas para glucocorticoides en modelo celular eucarióticos y procarióticos. *

Autor: Lilián A. Dulcey Torres **

Palabras Clave: Disruptores endocrinos, biosensores, receptor de glucocorticoides, dominio de unión a ligando, proteínas quiméricas.

Descripción: En la última década, los disruptores endocrinos (EDC) han emergido como una preocupación crucial para la salud pública debido a su capacidad para alterar la homeostasis hormonal. Estos compuestos interfieren con la síntesis, el metabolismo y la actividad de las hormonas, impactando múltiples ejes, incluyendo los sistemas hipotálamo-hipófisis-tiroides (HPT), gonadal (HPG) y suprarrenal (HPA). Su mecanismo de acción más conocido involucra la unión a receptores nucleares (NR), como el receptor de glucocorticoides (GR). La evaluación de los EDC se ve obstaculizada por la escasez de métodos validados, lo que ha impulsado a organizaciones internacionales a solicitar el desarrollo de nuevas herramientas. En respuesta a esta necesidad, el presente trabajo se centró en la creación de dos biosensores genéticamente modificados: uno a nivel transcripcional y otro a nivel traduccional, ambos diseñados para detectar sustancias con potencial de activación del GR. El biosensor transcripcional, desarrollado en un modelo eucariota, empleó el sistema binario GAL4/UAS con el dominio de unión a ligando (LBD) del GR. Tanto la versión con el gen reportero integrado como la episomal mostraron una respuesta dosis-dependiente positiva a la dexametasona, aunque se observó una diferencia de aproximadamente 30 veces en su rango dinámico. Por otro lado, el biosensor traduccional, basado en un sistema de inteína fusionada al LBD-GR en un modelo bacteriano, logró la producción de las proteínas quiméricas *pGFPintER* y *pGFPintGR* mediante inducción IPTG/operón LacI. Sin embargo, no fue posible determinar la funcionalidad de estos biosensores ni evaluar el desempeño de la inteína RecA fusionada al LBD del GR, debido a problemas persistentes de solubilidad de las proteínas quiméricas.

* Trabajo de Grado

** Facultad de Salud. Escuela de Microbiología. Director: José Arturo Gutiérrez Triana. Doctor en Ciencias Naturales. Codirectora: Mayra Alejandra Machuca Pérez. Doctora en Microbiología

Abstract

Title: Establishment of genetically encoded fluorescent biosensor lines for glucocorticoids in eukaryotic and prokaryotic cell models.^{1*}

Author(s): Lilián A. Dulcey Torres^{2**}

Key Words: Endocrine disruptors, biosensors, glucocorticoid receptor, ligand binding domain, chimeric proteins.

Description:

Over the past decade, endocrine disruptors (EDCs) have emerged as a major public health concern due to their ability to disrupt hormonal homeostasis. These compounds interfere with hormone synthesis, metabolism, and activity, affecting multiple regulatory axes, including the hypothalamic–pituitary–thyroid (HPT), hypothalamic–pituitary–gonadal (HPG), and hypothalamic–pituitary–adrenal (HPA) systems. Their most widely recognized mechanism of action involves binding to nuclear receptors (NRs), such as the glucocorticoid receptor (GR). The evaluation of EDCs is hindered by the scarcity of validated methods, prompting international organizations to call for the development of novel tools. In response, this work focused on the generation of two genetically encoded biosensors: one operating at the transcriptional level and another at the translational level, both designed to detect compounds with GR-activating potential. The transcriptional biosensor, developed in a eukaryotic model, employed the dual GAL4/UAS system incorporating the GR ligand-binding domain (LBD). Both the integrated reporter version and the episomal version exhibited a positive dose-dependent response to dexamethasone, although their dynamic ranges differed by approximately 30-fold. In contrast, the translational biosensor, developed in a bacterial model and based on an intein system fused to the GR-LBD, enabled production of the chimeric proteins *pGFPintER* and *pGFPintGR* via IPTG/LacI operon induction. However, it was not possible to assess the functionality of these biosensors or to evaluate the performance of the RecA intein fused to the GR-LBD, due to persistent solubility issues with the chimeric proteins.

^{1*} Degree Work

^{2**}School of Health. School of Microbiology. Director: José Arturo Gutiérrez Triana. Ph.D in Natural Sciences. Co-director: Mayra Alejandra Machuca Pérez. Ph.D. in Microbiology.

Introducción

En la actualidad, los disruptores endocrinos (EDC) han sido crecientemente reconocidos como sustancias bioactivas de gran relevancia en el ámbito de la salud pública. Estos compuestos químicos poseen la capacidad de interferir con la síntesis, el metabolismo y la actividad hormonal, alterando así la homeostasis endocrina (Stufchen et al. 2025). Los EDC son ubicuos, encontrándose en productos de consumo como plásticos (Bisfenol A - PBA), dispositivos médicos (ftalatos), detergentes, retardantes de llama (éteres de difenilo polibromados), juguetes, cosméticos (parabenos) y pesticidas (alquilfenoles como el nonilfenol) (Monneret C. et al 2017).

La exposición a los EDC ocurre por diversas vías, incluyendo la ingestión de alimentos, polvo y agua, la inhalación de gases y la absorción cutánea. Además, se ha evidenciado que se pueden ser transferidos de madres a fetos a través de la placenta y a lactantes mediante la leche materna (Monneret C. et al 2017).

Diversos estudios epidemiológicos han documentado evidencia sólida que vincula la exposición a los EDC con una amplia variedad de enfermedades. Estos compuestos se han asociado con trastornos del neurodesarrollo, infertilidad y otras disfunciones reproductivas, así como cánceres hormonodependientes, tales como el cáncer de mama y de próstata (Ho et al., 2022). Se estima que los costos económicos atribuibles a la exposición a los EDC ascienden a los \$340 mil millones de dólares en los Estados Unidos y €163 mil millones de euro en la Unión Europea en costos de atención médica y pérdida de productividad (The lancet Diabetes Endocrinology, 2019).

Adicionalmente, los EDC representan una amenaza significativa para el medio ambiente, debido a sus profundas repercusiones eco toxicológicas, tanto en la salud de individuales como en la integridad de los ecosistemas. En el último siglo, aproximadamente 785 especies, incluyendo

desde gasterópodos y crustáceos hasta peces, aves y mamíferos, han desaparecido o se encuentran al borde de la extinción. Esta disminución poblacional, especialmente en especies acuáticas, se ha relacionado con el vertimiento creciente de contaminantes en cuerpos de agua. La acumulación de EDC en sistemas acuáticos plantea una creciente preocupación por su persistencia, bioacumulación y capacidad de alterar funciones endocrinas en múltiples niveles tróficos (Jasrotia et al., 2021) (Browne et al., 2020).

Un aspecto crucial de los EDC es su capacidad para unirse y activar simultáneamente múltiples receptores nucleares, lo que puede generar efectos sinérgicos o aditivos. En particular, el receptor de glucocorticoides (GR) es altamente susceptible a la alteración por la exposición a contaminantes ambientales, cuyos efectos sobre su funcionamiento incluyen: (1) Interferencia en la unión ligando-receptor; (2) Alteración en la translocación nuclear del complejo GR; (3) afectaciones en la unión del receptor del ADN; y (4) cambios en la expresión del propio GR (Zhang et al., 2019).

Las interrupciones en la función del GR pueden, comprometer múltiples procesos fisiológicos esenciales, como la función inmunitaria, el crecimiento y desarrollo, la reproducción, la cognición, la regulación cardiovascular y el metabolismo (Quagliarini et al., 2023).

Las amenazas que plantean los EDC han impulsado el desarrollo de diversos métodos de evaluación, incluyendo ensayos *in vivo* e *in vitro*, así como estudios epidemiológicos. Sin embargo, la identificación de compuestos con potencial disruptor endocrino continúa siendo un reto considerable. Esto se debe a varios factores: la complejidad de los procesos regulados por el sistema endocrino, el retraso temporal entre la exposición química y la manifestación de los efectos, y la variabilidad en las relaciones dosis-respuesta (Browne et al., 2020). Además, algunos

EDC carecen de similitud estructural con las hormonas naturales, pero aun así son capaces de activar receptores hormonales (Fouvet et al. 2024).

En este contexto, el objetivo principal del presente trabajo fue establecer sistemas reporteros biosensores diseñados para detectar compuestos capaces de activar el receptor de glucocorticoides (GR). Estos sistemas se basan en el dominio de unión al ligando del GR y se implementaron para funcionar tanto en modelos celulares eucariotas (línea celular HEK293T) como en modelos procariotas (*Escherichia coli*). Los modelos celulares escogidos constituyen una estrategia instrumental para validar y optimizar el desempeño de estos biosensores. El propósito central es establecer herramientas funcionales, sensibles y versátiles para la detección de compuestos con potencial actividad endocrina sobre el GR, con aplicaciones en estudios toxicológicos, ambientales y de evaluación regulatoria.

1. Marco conceptual

1.1 Disruptores endocrinos. Conceptos

Los disruptores endocrinos (EDC) son compuestos exógenos capaces de alterar la síntesis, secreción, transporte, metabolismo, unión al receptor o eliminación de hormonas, comprometiendo así el funcionamiento del sistema endocrino y la homeostasis del organismo (Lauretta et al., 2019). Estos compuestos provienen de diversas fuentes, incluyendo fuentes naturales como fitoestrógenos, así como una amplia gama de químicos industriales (dioxinas, PCB, alquilfenoles), agrícolas (pesticidas, herbicidas), productos como ftalatos y bisfenol A (BPA), ciertos fármacos (pregnenolona, acetato de fludrocortisona) y metales pesados (Cobalto, cadmio, cobre). Se estima que existen más de 4000 EDC, cuya presencia en el ambiente continúa en aumento (Gaurnotta et al., 2022; Zhang et al., 2019).

Una de las características generales de los EDC es su alta lipofiliidad, lo que facilita su acumulación en el tejido adiposo y prolonga su vida media en el organismo. Esto favorece la bioacumulación a lo largo de la cadena trófica. Además, estos compuestos suelen presentar una baja biodegradabilidad (Arias et al. 2020).

La exposición prolongada a los EDC conlleva efectos adversos significativos para la salud, causado por mecanismos hormonales tanto directos como indirectos. Esta exposición puede darse en las etapas tempranas de la vida, como durante la gestación (a través de la placenta) y la lactancia materna, así como en la adultez, principalmente mediante la ingestión de alimentos, la inhalación o el contacto dérmico. Los mecanismos de acción de los EDC son variados e incluyen respuestas genómicas, que son más lentas y pueden tomar horas, y respuestas no genómicas, que se ocurren en minutos tras la exposición (Ahn y Jeung, 2023). Asimismo, un EDC que resulte inocuo de forma aislada puede generar efectos nocivos al combinarse con otros compuestos, generando efecto de cóctel (Liang et al., 2023).

Los EDC no afectan únicamente a un órgano, sino que interfieren con múltiples ejes hormonales, siendo los principales el eje hipotálamo-pituitario-tiroideo (HPT), el eje hipotálamo-pituitario-gonadal (HPG) y el eje hipotálamo-pituitario-adrenal (HPA) sus principales objetivos. Su mecanismo de acción más documentado es la unión a receptores nucleares endocrinos (NR), actuando como agonista o antagonista. En particular, los EDC pueden unirse y modular diversos receptores hormonales, incluyendo los receptores de andrógenos (AR), estrógenos (ER), receptor de la hormona de tiroides (TR), receptor de glucocorticoides (GR), entre otros (Egalini et al., 2022; Gaurnotta et al., 2022).

La amplia distribución ambiental de los EDC ha llevado a proponer su implicación en el aumento de diversas patologías humanas. Se han asociado en enfermedades como la diabetes,

obesidad, déficits cognitivos, enfermedades neurodegenerativas, pubertad precoz, disfunción tiroidea, enfermedades cardíacas e infertilidad (Pironti et al., 2021; Macedo et al., 2023). También se ha propuesto una posible relación con diversos tipos de cáncer, como los de mama, próstata, tiroides, testículo y útero. No obstante, la evidencia sobre la causalidad directa en la oncogénesis continúa siendo un tema de debate debido a la interacción con otros factores de riesgo y a limitaciones metodológicas de detección en los estudios disponibles (Sharma et al., 2024).

La presencia de compuestos disruptores endocrinos ha sido ampliamente documentada en ecosistemas acuáticos a nivel global, con concentraciones que varían desde ng/L hasta mg/L, dependiendo de su composición química (Pironti et al., 2021). Diversos estudios han demostrado los efectos adversos de los EDC en organismos marinos y de agua dulce, como el pez cebra (*Danio rerio*), medaka (*Oryzias latipes*) y pececillo cabezón (*Pimephales promelas*), así como especies comestibles como las carpas. Estos peces se consideran bioindicadores útiles para evaluar la toxicidad ambiental asociada a la ingestión, absorción, bioacumulación y translocación de EDC (Kar et al., 2021).

Los peces se encuentran entre los organismos que se han visto gravemente afectados por los EDC. Esto se debe a la exposición temprana y continua a los contaminantes presentes en ambientes acuáticos. Su proceso de determinación sexual, influenciado significativamente por factores ambientales, sumado a la alta sensibilidad de sus estadios larvarios, los hacen particularmente vulnerables a los EDC. Varios estudios demuestran que la exposición a EDC reduce los niveles de hormonas reproductivas como la vitelogenina en diversas especies de peces (Arslan et al., 2021). Asimismo, la exposición a EDC en peces se ha asociado con un amplio espectro de efectos adversos que influyen en las deformidades larvarias, menor crecimiento y supervivencia, disfunción inmune, desequilibrio en la proporción de sexos, problemas

reproductivos y alteración de la expresión génica (DeCourten et al., 2020). En particular, compuestos como el triclosán (TCS), el bisfenol A (BPA) y el ftalato de dietilo (DEP) han mostrado efectos inmunotóxicos significativos, alterando las respuestas inmunes y la homeostasis de los peces (Das et al., 2025).

1.2 Sistema endocrino. Generalidades.

El sistema endocrino es fundamental para mantener la homeostasis del organismo, coordinando la actividad celular y armonizando el funcionamiento de los órganos. Los tejidos clave en la producción y albergue de hormonas incluyen el hipotálamo, hipófisis, tiroides, paratiroides, suprarrenales, páncreas, estómago, intestino, ovarios y testículos (Roca et al., 2022; Matamoros). El eje hipotálamo-hipofisario es crucial para la homeostasis, integrando señales hormonales y neuronales y regulando casi todas las funciones corporales. El hipotálamo monitorea entradas y mantiene puntos de ajuste fisiológicos mediante secreción hormonal y coordinación con la hipófisis, a través de mecanismos de retroalimentación e interacciones con otras áreas cerebrales (Sanz-Pastor et al., 2024). Los ejes hipotálamo-hipófisis-órgano diana representan complejos sistemas de interacción directa y retroalimentación entre estos tres componentes (Ahmad et al., 2023).

Los principales ejes hipotálamo-hipofisarios son: Eje *hipotálamo-hipófisis-tiroideo* (HPT), que regula la función tiroidea mediante la liberación hipotalámica de hormona liberadora de tirotropina, la secreción hipofisaria de hormona estimulante de la tiroides, y la producción tiroidea de tiroxina y triyodotironina (Feldt-Rasmussen et al., 2021); el eje *hipotálamo-hipófisis-gónadas* (HPG), controla la función reproductiva a través de la liberación de hormona liberadora de gonadotropinas, la secreción hipofisaria de hormona luteinizante y folículo estimulante, y la consiguiente producción de testosterona en testículos o estrógenos y progesterona en ovarios;

finalmente, el *eje hipotálamo-hipófisis-adrenal (HPA)* desempeña un papel vital en la respuesta al estrés, la regulación metabólica y la modulación del sistema inmunológico (Roca et al., 2022).

1.3 Los glucocorticoides.

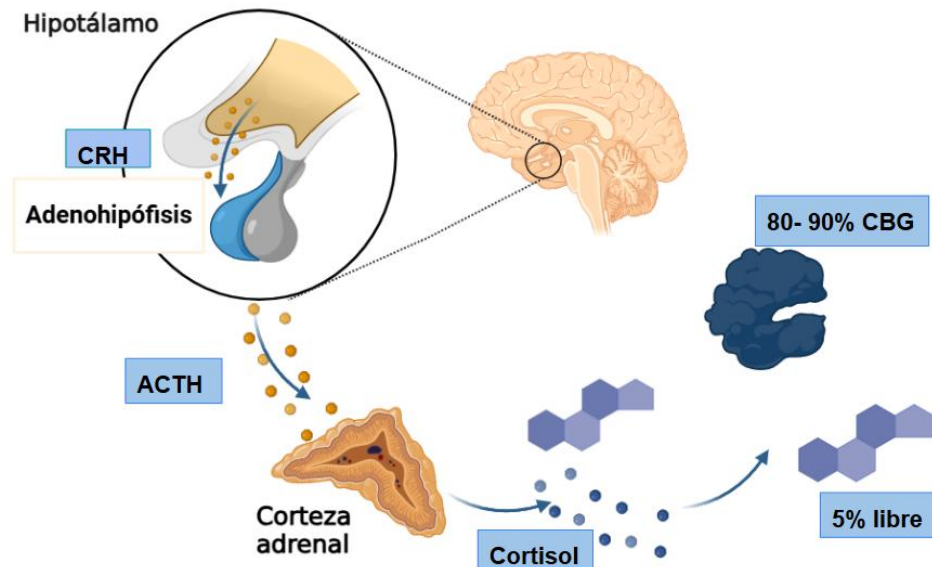
Los glucocorticoides (GC) son hormonas esteroides esenciales en mamíferos, con un papel crucial en diversos procesos fisiológicos como el metabolismo, el equilibrio hídrico, la respuesta inmunitaria, el crecimiento, la función cardiovascular, el estado de ánimo, la cognición, la reproducción y el desarrollo (Timmemans et al., 2019). El cortisol, el principal GC en humanos, se sintetiza en la zona fasciculada de la corteza suprarrenal a partir del colesterol (Lockett et al., 2024).

La síntesis y secreción de GC están regulada por el *eje hipotálamo-hipófisis-adrenal (HPA)*. En situaciones de estrés, el hipotálamo libera la hormona liberadora de corticotropina (CRH), que estimula la hipófisis anterior para secretar hormona adrenocorticotropica (ACTH). Esta, a su vez, induce la síntesis y liberación de GC en la corteza suprarrenal. Los GC ejercen una retroalimentación negativa, inhibiendo la producción de CRH y ACTH (Bhaumik et al., 2023). La actividad del eje HPA presenta un ritmo circadiano, con picos de ACTH y cortisol al despertar, y disminuye hacia la medianoche (ver figura 1) (Galati et al., 2021).

Aproximadamente el 80-90% del cortisol circula en la sangre unido a la globulina transportadora de corticosteroides (CBG) y una porción menor a la albúmina, dejando solo un 5% libre y biológicamente activo (ver figura 1). El cortisol unido a CBG puede liberarse localmente en sitios de inflamación mediante la acción de la elastasa de neutrófilos (Meyer et al., 2017). Además de la regulación central por el eje HPA, la concentración local de los GC activos se modula mediante las enzimas la 11-beta-hidroxiesteroide-deshidrogenasa tipo 1 (11b-HSD1) y tipo 2 (11b-

HSD2). La 11b-HSD1 convierte la cortisona inactiva en cortisol activo, mientras que la 11b-HSD2 inactiva el cortisol a cortisona (Beaupere et al., 2021).

Figura 1. Síntesis y secreción de los glucocorticoides en el contexto del eje HPA.



Nota. Fuente propia.

Los GC modulan la homeostasis metabólica, impactando directamente el metabolismo de lípidos y glucosa. Altos niveles de GC estimulan la lipólisis en el tejido adiposo, aumentando la liberación de ácidos grasos y glicerol, promueven la captación hepática de ácidos grasos y estimulan la gluconeogénesis a partir de aminoácidos y glicerol. En condiciones de hiperinsulinemia, los GC potencian la lipogénesis. También influyen en la ingesta de alimentos mediante reguladores del apetito, lo que puede deteriorar el control homeostático y aumentar el impulso hedónico para comer (Rahimi et al., 2020; Kuckuck et al., 2023).

Tradicionalmente, los GC son conocidos por sus efectos inmunosupresores, que incluyen la represión de la transcripción génica mediante la remodelación de la cromatina, la inhibición de

la señalización de la interleucina-2, la disminución de la expresión de citocinas y reducción de la migración de neutrófilos en los tejidos (Chourpiliadis and Aeddula, 2025). Sin embargo, en determinadas condiciones pueden inducir la expresión de genes proinflamatorios en células específicas. Por ejemplo, se ha descrito que la dexametasona puede aumentar la expresión del inflammasoma NLRP3 y que la activación del receptor de GC puede inducir la exopeptidasa DPP4, contribuyendo a una mayor movilidad de macrófagos (Diaz-Jumines et al., 2021).

En cuanto al mantenimiento óseo, los GC endógenos son necesarios para el desarrollo normal del hueso, favoreciendo la diferenciación de osteoblastos. No obstante, en la vejez, niveles elevados de GC se asocian con efectos adversos, como la reducción la supervivencia de los osteoblastos y osteocitos, disminución de la angiogénesis, e incremento en la apoptosis de células óseas mediante la activación de la caspasa-3 (Ilias et al., 2022).

En relación con los órganos sexuales, las hormonas sexuales modulan la reactividad del eje HPA. En mujeres, el ciclo menstrual y los niveles estrógeno y progesterona pueden influir en la secreción de cortisol. Por ejemplo, estudios muestran que las respuestas de cortisol a estresores psicosociales son más pronunciadas en la fase folicular (bajo estrógeno) que en la fase lútea. Asimismo, el tipo de estrés puede inducir respuestas de cortisol diferenciales, influenciadas por la presencia de hormonas sexuales, como se ha observado en una mayor reactividad del cortisol plasmático en mujeres mayores frente a hombres mayores durante pruebas de simulación de conducción (Kroon et al., 2020; Martínez et al., 2024)

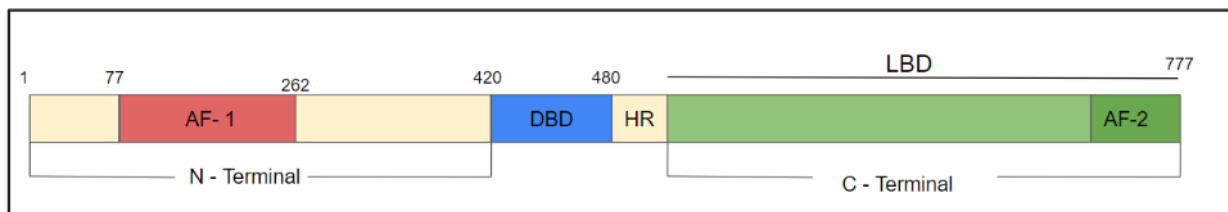
1.4 El receptor de glucocorticoides.

Los GC son hormonas lipofílicas que ingresan a las células por difusión pasiva a través de la membrana plasmática. Una vez en el citoplasma, se unen a su receptor intracelular, el receptor de glucocorticoides (GR). El GR es una proteína de la superfamilia de receptores nucleares

evolutivamente conservada, que en ausencia del ligando reside en el citoplasma unido a las proteínas chaperonas Hsp70 y Hsp9. Tras la unión al cortisol, el complejo GR-ligando se transloca al núcleo, en donde actúa como factor de transcripción dependiente de ligando, modulando la expresión génica, tanto de forma positiva como negativa (Das y Vijayan, 2023; Sacta et al., 2016; Nicolaides et al., 2020).

El GR, codificado por el gen *NR3C1*, consta de tres dominios principales: *el dominio de transactivación N-terminal* (NTD), *el dominio de unión al ADN* (DBD) y *el dominio de unión al ligando* (LBD). La región N-terminal (NTD) contiene el dominio de activación transcripcional AF-1, esencial para la modulación de la expresión génica; el dominio de unión al ADN (DBD) presenta dos dedos de zinc cruciales para la homodimerización y el reconocimiento de secuencias específicas de ADN, y el dominio de unión al ligando (LBD), es una estructura globular con un bolsillo hidrofóbico que acomoda al ligando (Alves et al., 2020). Además del AF1, el GR presenta un AF2 en la región C-terminal. Notablemente, tanto en AF1 como en AF2 han identificado mutaciones que impactan la función moduladora de los GC sobre el sistema inmune (ver figura 2) (Escoter-Torres et al., 2019).

Figura 2. *Dominios principales generales del GR.*



Nota: GR se organiza en tres dominios principales: N-terminal, DBD: dominio de unión al DNA y LBD: dominio de unión de ligando. AF-1 y AF-2 son dominios de transactivación 1 y 2. HR: Región de la bisagra. Fuente propia

En el humano, el gen *NR3C1*, localizado en el cromosoma 5, produce cinco isoformas de GR mediante empalme alternativo: hGR- α , hGR- β , hGR- γ , P y A. La isoforma hGR- α se expresa en la mayoría de los tejidos, incluyendo cerebro, hígado, músculo esquelético y células inmunes, y funciona como un factor de transcripción dependiente de ligando. En contraste, hGR- β , se expresa en menor cantidad, pero es más abundante en células epiteliales e inflamatorias como neutrófilos, eosinófilos y macrófagos; no se une a los agonistas de GC y funciona como un inhibidor dominante de la actividad transcripcional mediada por hGR- α (Mao et al., 2023). Por otro lado, hGR P y A, predominan en células cancerosas y se caracterizan por carecer de porciones del LBD, lo que puede contribuir a la resistencia a los GC en los tratamientos de neoplasias hematológicas. Finalmente, el hGR- γ es una isoforma ampliamente distribuida que puede llegar hasta 9% de los niveles de hGR- α y se distingue por la presencia de un residuo de arginina adicional en la región DBD (Ratman et al., 2013).

Los homodímeros del GR se unen a secuencias específicas de ADN de 15 pares de bases, denominadas *elementos de respuesta a glucocorticoides (GRE)*, ubicadas en las regiones promotoras y potenciadoras de los genes diana (Strickland et al., 2022).

La especificidad transcripcional depende del estado de la cromatina y del reclutamiento de enzimas modificadoras de histonas y ADN. Aunque históricamente se consideraba que la translocación del GR al núcleo era un proceso pasivo tras la unión al ligando, evidencia reciente sugiere que está regulada y requiere proteínas como la histona deacetilasa 6 (HDAC6) (Bartlett et al., 2019).

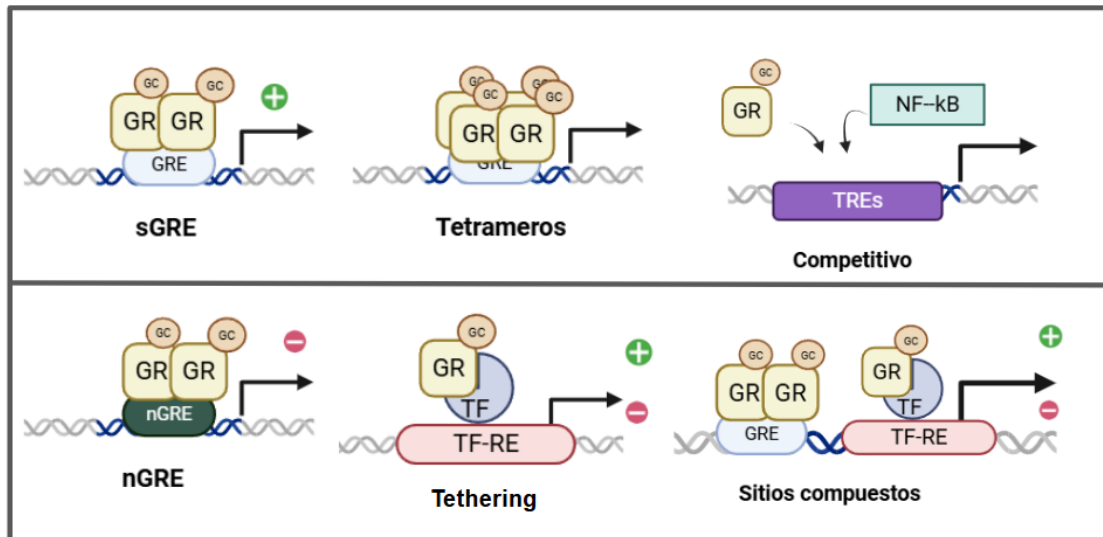
Al unirse a los *GRE*, el GR funciona como un factor de transcripción. Este recluta cofactores primarios como SRC-1 (o también NCOA1), que a su vez coordina la agrupación de coactivadores secundarios como NCOA2, p300, la proteína de unión al elemento sensible a AMPc

(CBP) y pCAF. Estos últimos son cruciales para la remodelación de la cromatina, el reclutamiento del complejo de iniciación transcripcional y la activación de la ARN polimerasa II, facilitando la expresión génica (Pinheiro et al., 2023).

A partir de ahí, el GR modula la transcripción génica mediante diversos mecanismos. Principalmente, los dímeros de GR se unen a los elementos de respuesta a glucocorticoides estándar (sGRE), promoviendo la transcripción de genes diana. En contraste, el GR también puede unirse como monómero a elementos de respuesta a glucocorticoides negativos (nGRE), que son secuencias de repetición invertida que reprimen la transcripción (ver figura 3) (Paragliota et al., 2020).

Además, el GR puede formar tetrámeros o participar en la interacción proteína-proteína (tethering) con otros factores de transcripción (TF), formando un dímero GR-TF que puede inducir o inhibir la expresión génica. Otros mecanismos incluyen la competencia por el reclutamiento de coactivadores, lo que reduce la expresión de genes asociados con otros TF. Asimismo, el GR puede unirse a “sitios compuestos” en el ADN, que combinan GRE y elementos de respuesta de otros TF, interfiriendo con la función de estos últimos (ver figura 3). Si bien la función precisa del GR monomérico ha sido objeto de debate, con evidencia emergente de un papel predominante, otras investigaciones sugieren que su unión a la cromatina es débil, limitando su capacidad para activar o reprimir genes (Pinheiro et al., 2023).

Figura 3. *Modulación transcripcional génica del GR.*



Nota: Varios tipos de modulación transcripcional génica del GR, entre ellas esta **sGRE**, forma de tetrámeros, **nGRE** regulación negativo, forma tethering, donde un GR con otro factor transcripcional (**TF**) para regulación positiva o negativa, también presenta los sitios compuestos y de forma competitivo. **GC:** glucocorticoides. **TF-RE:** elementos de respuesta de factores transcripcionales. Fuente propia.

La acción del GR no se limita a mecanismos genómicos lentos, sino que también incluye efectos no genómicos rápidos, manifestándose en minutos. Estos mecanismos, independientes de la transcripción y síntesis proteica, pueden involucrar: a. La interacción de los GC con un posible GR unido a la membrana (mGR); b. la interacción de los GC con el GR citosólico (cGR) y sus proteínas asociadas; y c. la interacción de GC con las membranas celulares. Estos efectos no genómicos del GR influyen, por ejemplo, en células inmunes, la homeostasis del calcio, la función mitocondrial y la señalización dependiente de mGR (Vettorazzi et al., 2022).

Las modificaciones postraduccionales (PTM) son cruciales para la señalización, estabilidad y las interacciones del hGR- α , incluyendo fosforilación, acetilación, ubiquitinación y sumoilación, con estas últimas tres ocurriendo en residuos de lisina (Hu et al., 2022).

Como fosfoproteína, la actividad transcripcional del GR es modulada por quinasas que fosforilan múltiples sitios, especialmente en su dominio N- terminal (NTD), incluyendo serina S203, S211 y S226 dentro del AF1. La fosforilación afecta la estabilidad de GR y puede inducir cambios conformacionales en el AF1, alterando el reclutamiento de correguladores y la actividad transcripcional de manera específica para cada tejido y promotor (Kumar y Thompson, 2019).

La ubiquitinación del hGR- α ocurre en el sitio PEST (Lisina 426 en ratones, Lisina 419 en humano). Las mutaciones en estos residuos impiden la degradación del receptor por el proteasoma. La sumoilación, que implica la unión covalente de SUMO a hGR- α , regula sus interacciones proteína- proteína y proteína-ADN, así como su localización. Se ha demostrado que la sobreexpresión de SUMO-1 contribuye a la regulación negativa de hGR- α mediana por dexametasona, implicando a la proteasoma. Sin embargo, los sitios de sumoilación específicos en hGR- α aún no han sido identificados (Spies et al., 2021).

1.5 Disruptores endocrinos involucrados en la activación o represión del receptor de glucocorticoides.

Aunque se comprende el funcionamiento del GR y sus mecanismos regulatorios (genómicos y no genómicos), los efectos *in vivo* de muchos EDC sobre la activación del GR siguen siendo poco conocidos. Estudios *in vivo* han demostrado que pesticidas como el diclorodifenildicloroetano (DDT) y el fungicida ziram alteran la transactivación de GR. La coadministración de corticosterona con DDT o con el antagonista del GR, RU-486, redujo la expresión de transcritos comúnmente regulados por GR en el hígado. Además, la exposición crónica a DDT disminuye las poblaciones de linfocitos B y T, respectivamente. El DDT, metolaclor y ziram también redujeron la expresión de *FKBP5* y *PER1*, genes diana del GR, indicando una alteración en la transactivación de GR (Morris et al., 2025).

Los bisfenoles (PB) muestran actividades diversas (agonistas, antagonistas o mixtas) sobre el receptor de estrógeno (ER) y GR. Un estudio específico en la línea celular MDA-kb2 identificó que 15 de 16 bisfenoles eran disruptores de glucocorticoides. Once de ellos (BPA, BPAF, BPAP, BPBP, BPC, BPM, BPP, BPPH, BPS, BPTMC y BPZ) mostraron actividad glucocorticoide, siendo BPP el más potente. Siete bisfenoles (BPA, BPAF, BPB, BPC, BPC2, BPG Y BPZ) exhibieron actividad anti glucocorticoide, destacando BPZ como el antagonista más potente (Chen et al., 2020).

Por otro lado, se demostró que el 3,6- dibromocarbazol afecta la activación del GR, reduciendo la expresión de genes diana como la glucosa- 6- fosfatasa (*G6Pasa*), fosfoenolpiruvato carboxiquinasa (*PEPCK*), sintasa de ácidos grasos (*FAS*) y tirosina aminotransferasa (*TAT*), así como *PEPCK* y *FAS*, enzimas claves en la gluconeogénesis. En ensayos *in vivo* con pez cebrá, este compuesto indujo un desarrollo anormal y alteró neurohormonas del eje HPA, confirmándose su actividad antiglucocorticoide mediante ensayos de gen reportero, con una correlación dosis-respuesta positiva (Zou et al., 2023).

Los metabolitos metilados del arsénico inorgánico (iAs), monometilarsénico (MMA) y dimetilarsénico (DMA), modulan la señalización del GR placentario. El iAs inhibe la activación de GR de manera dosis-dependiente, reduciendo su translocación nuclear y unión al ADN. MMA y DMA también modifican la expresión de ocho genes asociados a la activación del GR. Teniendo en cuenta que el iAs y sus metabolitos pueden atravesar y acumularse en la placenta. Órgano clave en el desarrollo fetal, su papel como disruptor endocrino es de alta relevancia (Meakin et al., 2020).

La Agencia Sueca de Sustancias Químicas (KEMI) ha alertado sobre conservantes con propiedades disruptoras endocrinas, solicitando la evaluación de siete compuestos de uso común. Estudios *in vitro* revelaron que el triclocarbán antagoniza el GR y el receptor de la hormona tiroidea

(TR), mientras que el triclosán mostró actividad antagonista sobre el receptor de aldosterona (AR), el receptor de estrógeno (ER), el GR y el TR (Kenda et al., 2020).

Los metabolitos de plastificantes, como el monobutilftalato (MBP), también afectan la señalización del GR. La co-incubación de MBP con dexametasona incrementó significativamente la actividad de genes reporteros dependientes de glucocorticoides, con un efecto sinérgico dosis-dependiente. Además, se observó un aumento en los niveles de GR nuclear y en la relación GR nuclear/citosólico, sugiriendo una potenciación de la transactivación del GR (Leng et al., 2021)

Los carbazoles polihalogenados (PHCZ), estructuralmente similares a dioxinas, exhibieron potencial antagonista sobre hGR- α en concentraciones bajas, lo que requiere precaución en su evaluación (Yue et al., 2020). Finalmente, los éteres de ftalato (PAE), como el DEHP y DINP, demostraron efectos sinérgicos con dexametasona en la transactivación del GR y en la regulación de genes diana (*PEPCK*, *FAS*, *MKP-1*) en células hepáticas y pulmonares (Leng et al., 2020).

En conjunto, estos hallazgos evidencian que diversos EDC pueden actuar como moduladores positivos o negativos del GR, resaltando la complejidad de sus interacciones y el potencial impacto sobre la salud humana.

1.6 Evaluación y detección de disruptores endocrinos.

Actualmente, la evaluación de EDC enfrenta limitaciones significativas debido a la falta de métodos validados, lo que restringe la investigación a unas pocas vías endocrinas y dificulta la detección de efectos a largo plazo o alteraciones metabólicas. Esta situación se acentúa porque los métodos *in vivo* disponibles se basan predominantemente en vertebrados (Grignard et al., 2022).

La Organización para la Cooperación y el Desarrollo Económicos (OCDE) ha establecido directrices para ensayos *in vitro* que evalúan la afinidad de unión a receptores de estrógeno y andrógenos, la transactivación de estos receptores y la esteroidogénesis. Sin embargo, aunque

existe un marco conceptual y una serie de métodos estandarizados o en desarrollo, aún no se cuenta con una estrategia integral de ensayo para la evaluación de los EDC (Organization for Economic Co-operation and Development, 2020).

La siguiente tabla presenta una guía resumida de pruebas estandarizadas para la evaluación de EDC según el marco de OCDE:

Tabla 1. *Guía y clasificación de pruebas estandarizada para evaluación de EDC.*

Niveles	Descripción	Pruebas
Niveles 1	Datos e información existentes o nuevas que se sospecha de ser EDC	Propiedades físicas y químicas. Todos datos (eco)toxicológicos disponibles de pruebas estandarizadas. Lecturas transversales, QSAR y predicciones <i>in silico</i> o modelo ADME.
Niveles 2	Ensayos <i>in vitro</i> que proporcionan datos sobre mecanismo/vías endocrinas (en mamíferos y no mamíferos)	<u>Ejemplo:</u> Afinidad de unión al receptor de estrógeno (ER), transactivación del ER, detección de estrógenos en levadura, transactivación del receptor de andrógenos, otros ensayos de receptores hormonales según corresponda.
Niveles 3	Ensayos <i>in vivo</i> que proporcionan datos sobre mecanismos/vías endocrinas	<u>Toxicología de mamíferos:</u> Ensayos uterotónicos y ensayo de Hershberger. <u>Toxicología de no mamíferos:</u> ensayos de metamorfosis de anfibios, ensayos de reproducción a corto plazo en peces, ensayos de peces de 21 días, ensayos de señalización tiroidea embrionaria de <i>Xenopus</i> , entre otras.
Niveles 4	Ensayos <i>in vivo</i> donde proporcionan datos sobre efectos adversos en los puntos finales	<u>Toxicología de mamíferos:</u> Estudio de dosis repetidas de 28 días, estudio de dosis repetidas de 90 días, estudio de toxicidad del desarrollo prenatal, neurotoxicidad del desarrollo, entre otras, <u>Toxicología de no mamíferos:</u> Prueba de desarrollo sexual en peces, ensayos de crecimiento y desarrollo de larvas de anfibios, ensayo de reproducción aviar, pruebas de toxicidad en etapas tempranas de la vida de los peces, entre otras.

Niveles 5	Ensayos <i>in vivo</i> proporcionan más datos sobre los efectos adversos desde los puntos finales relevantes para el sistema endocrino hasta en partes más extensas del ciclo de vida del organismo.	<u>Toxicología de mamíferos:</u> Estudio extendido de toxicidad reproductiva de una generación. Estudio de toxicidad reproductiva en dos generaciones. <u>Toxicología de no mamíferos:</u> Prueba de toxicidad del ciclo de vida de los peces, prueba de reproducción ampliada de una generación de pez cebra.
------------------	--	---

Nota: Guía resumida de prueba validadas para detección de EDC, tomada en la (OECD, s.f.; consultado el 7 de agosto de 2025)

Para abordar estas deficiencias, han surgido iniciativas internacionales. El proyecto OBERON busca desarrollar una estrategia de prueba integrada para detectar trastornos metabólicos relacionados con EDC, combinando métodos experimentales (*in vitro e in vivo*), tecnologías ómicas de alto rendimiento, estudios epidemiológicos y biomonitoreo y modelos computacionales. Este proyecto se centra en diez EDC de uso común y relevancia regulatoria, incluyendo sustitutos considerados “más seguros” pero con efectos aún desconocidos (Audouze et al., 2020).

En paralelo, la plataforma PEPPER (creada en 2020) tiene como objetivo estandarizar métodos y validar investigaciones académicas para la aceptación regulatoria. El clúster europeo EURION, una colaboración de ocho proyectos financiados por Horizontes 2020, busca desarrollar métodos de ensayo fiables y armonizados (*in vitro, in vivo e in silico*) para detectar los efectos de los EDC en contextos científicos y regulatorios (PEPPER, s.f.; EURION Cluster, s.f).

Actualmente, la activación *in vitro* del GR se evalúa mediante la prueba de transactivación del GR (GR TA), validada por la OCDE. Este ensayo utiliza células HeLa de adenocarcinoma cervical co-transfectadas con un gen reportero sensible a GC (MMTVLuc-SV-Neo) y un plásmido que expresa el GR humano, midiendo la actividad agonista/antagonista por medio de la luminiscencia (Fouyet et al., 2024).

1.7 Biosensores.

Un biosensor es un dispositivo analítico que integra materiales bioactivos (como enzimas, células, anticuerpos o ácidos nucleicos) con un sensor para detectar la presencia de un analito específico. Sus componentes esenciales incluyen (Chadcha et al., 2022):

- Biorreceptor; entidad biológica que interactúa selectivamente con el analito, generando una señal medible.
- Transductor; convierte la señal biológica en una señal cuantificable.
- Sistema de visualización: muestra o registra el resultado.

Los biosensores se clasifican, según su principio de detección, en biosensores catalíticos (catalizan una reacción bioquímica) y biosensores por afinidad (facilitan la unión de moléculas específicas) (Inshyna. Et. al, 2020; Wang y Lu, 2022). En el campo de la biología sintética, los sistemas biosensores se dividen en sensores celulares y sensores libres de células. Los biosensores basados en células (CBB), utilizan células completas (animales, vegetales o microbianas) como elementos de reconocimiento. Estas células, al mantener sus enzimas y moléculas en un entorno natural, exhiben una actividad y especificidad óptimas que superan a las de los biosensores moleculares. Los CBB reconocen y combinan analitos, utilizando enzimas intracelulares para catalizar procesos metabólicos y generar una señal. Son portátiles, permiten el análisis de

interacciones fármaco-ligando, agentes bioactivos y toxicidad ambiental, lo que los hace ideales para un cribado inicial (Wang y Lu, 2022; Ye et al., 2019).

Las células de mamíferos son altamente valoradas como elementos sensoriales en CBB, lo que permite obtener información funcional relevante sobre eventos de señalización, síntesis de proteínas y tipos de muerte celular. A diferencia de los métodos basados en ácidos nucleicos o inmunoquímicos, estos sistemas reflejan respuestas toxicológicas y fisiológicas más comparables a las humanas. Sin embargo, su cultivo, manipulación y modificación genética resultan más exigentes que en bacterias (Ye et al., 2019; Gupta et al., 2019).

A pesar del potencial de las células eucariotas, la mayoría de los CBB emplean microorganismos como bacterias y levaduras, dada su ubicuidad, rápido crecimiento, bajo costo, facilidad de cultivo y manipulación genética, además de su capacidad para metabolizar una amplia gama de compuestos químicos (Ye et al., 2019). En estos sistemas, suele insertarse un promotor específico que, al activarse por el analito, induce la expresión de un gen reportero, como aquellos que codifican proteínas fluorescentes (Gupta et al., 2019).

Entre las plataformas más versátiles destacan los biosensores fluorescentes codificados genéticamente, que permiten visualizar y cuantificar eventos bioquímicos en células vivas y organismos. Se basan en proteínas quiméricas que combinan una proteína fluorescente con un dominio sensor, cuya conformación -y, por lo tanto, la fluorescencia- cambia en presencia o ausencia de un analito, alterando la fluorescencia cuantificable. Aunque existen biosensores para diversas moléculas y eventos celulares, pocos informan sobre cambios fisicoquímicos del entorno (Cuevas-Velazquez et al., 2021). Entre ellos destacan los biosensores transcripcionales y traduccionales.

Los *biosensores transcripcionales* detectan moléculas específicas mediante la activación de un gen reportero (ej., GFP, LacZ, luciferasa) bajo el control de un promotor inducible. Este promotor se activa cuando la molécula diana se une a un regulador transcripcional, generando una señal proporcional a la concentración del analito. Su rendimiento depende de las propiedades bioquímicas del factor de transcripción sensible al ligando, incluyendo sus afinidades de unión al ligando y al ADN, y su nivel de expresión (Koch et al., 2019; Zhou y Zhang, 2023). Un ejemplo ampliamente utilizado es el sistema GAL4-UAS, que ha sido implementado en *Drosophila*, pez cebra y en mamíferos. GAL4, un factor de transcripción de levadura se une a la secuencia UAS para activar de manera robusta la transcripción de genes, permitiendo expresión génica regulada temporal y espacialmente. Variantes del sistema GAL4, como GAL4-VP16, han sido adaptadas para detectar moléculas pequeñas mediante dominios de unión a ligando estabilizados en *Saccharomyces cerevisiae* (Yamada et al., 2020; Jester et al., 2018).

En los *biosensores traduccionales*, la detección se produce por cambios en el proceso de traducción del ARNm, empleando elementos como riboswitches, aptámeros o regiones UTR (transcritas, pero no traducidas) que regulan directamente la expresión del gen reportero. Un enfoque innovador utiliza inteínas, elementos proteicos móviles que se escinden postraduccionalmente de una proteína precursora mediante un empalme proteico autocatalítico, análogo al “splicing” del ARN sin necesidad de cofactores externos, liberando una proteína funcional (Nanda et al., 2020).

Las inteínas pueden encontrarse en configuraciones de longitud completa (con el dominio de endonucleasa nativo), mini-inteínas (sin endonucleasa) o inteínas divididas (dos polipéptidos separados que se asocian) (Wood et al., 2023).

Un biosensor que ejemplifica este sistema fue reportado Liang et. al. (2011), quienes generaron una cepa de *Escherichia coli* sensible a estrógenos mediante la expresión de la proteína beta-galactosidasa interrumpida por una inteína quimérica, derivada de la VMA de *S. cerevisiae*, en la que el dominio endonucleasa fue reemplazado por el dominio de unión al ligando del receptor de estrógenos. Los autores demostraron que proteína beta-galatosidasa funcional se regeneraba únicamente en presencia del ligando, evidenciando que es posible inducir de forma efectiva el procesamiento de la proteína quimérica y, con ello, permitir su cuantificación (Liang et al., 2011).

Considerando los avances en este campo, se propone la generación de dos biosensores fluorescentes codificados genéticamente para la detección de sustancias con potencial de activación sobre el receptor de glucocorticoides. Específicamente, se desarrolló un biosensor a nivel transcripcional utilizando el sistema GAL4-UAS en células eucariotas HEK 293T. Adicionalmente, se construyó un biosensor a nivel traduccional empleando el sistema de inteína en la cepa bacteriana *Escherichia coli*.

Ante la necesidad de generar nuevas herramientas para la evaluación de EDC, este trabajo de maestría se centró en el desarrollo de dos sistemas reporteros basados en la señalización genómica de los GC mediada por el GR. Estos sistemas fueron diseñados con el objetivo de evaluar su potencial como biosensores para la detección de compuestos con actividad disruptora endocrina que afecten el eje HPA. El primero es un biosensor transcripcional basado en el sistema GAL4-UAS en células eucariotas HEK293T; el segundo, un biosensor traduccional fluorescente utilizando un sistema de inteína en la bacteria *E. coli*.

2. Objetivos

2.1 Objetivo General

Establecer líneas celulares biosensores de glucocorticoides basadas en el dominio de unión de ligando en células eucariotas (HEK293T) usando el sistema GAL4/UAS y en procariontes (*Escherichia coli*) utilizando el sistema de inteínas.

2.2 Objetivos Específicos

Establecer líneas HEK293T modificadas genéticamente con el constructo inducible 10xUAS:EGFP y el constructo constitutivo GAL4-LBD-VP16 para determinar la dinámica transcripcional mediada por los glucocorticoides.

Evaluar una cepa de *E. coli* portadora del sistema Inteína-LBD-GFP y caracterizar su potencial como biosensor fluorescente para glucocorticoides.

3. Metodología

3.1 Metodología para el objetivo específico 1

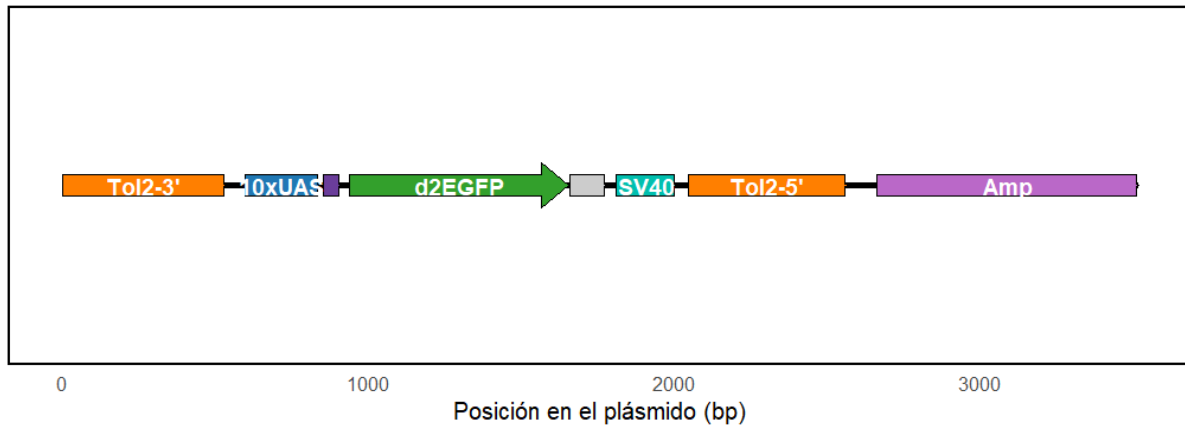
3.1.1 Línea celular HEK 293T

La línea celular adherente utilizada en este estudio corresponde a las HEK 293T. Estas células poseen el antígeno T grande del SV40 (virus 40 vacuolado del simio), lo que facilita la replicación de plásmidos transfectados episomalmente que contienen el sitio de origen de replicación SV40 (Tan, E. *et al* 2021). Las células se incubaron a 37 °C en una atmósfera húmeda con un 5 % de CO₂.

El cultivo celular se realizó en medio RPMI-1640 (LONZA), suplementado con 10 % de suero fetal bovino (GIBCO) y 1 % de un cóctel antimicrobiano compuesto por penicilina, estreptomina y anfotericina B (LONZA). El mantenimiento del cultivo se llevó a cabo cada tres días. Las células transfectadas con el plásmido reportero fueron criopreservadas a -80 °C. Así mismo, se evaluó diariamente el porcentaje de confluencia de las células HEK 293T para garantizar su óptimo crecimiento y viabilidad.

3.1.2 Diseño y construcción del plásmido reportero *pRInt* y *pREpi*.

La generación del constructo reportero *pRInt* se realizó mediante clonación dirigida del casete *10xUAS::GFP*, amplificado a partir del plásmido *pSTM 10xUAS::GFP* previamente obtenido en el grupo de investigación GIEM. El casete se insertó entre los brazos de homología (HA-L y HA-R, figura 4) del locus AAVS1 (por sus siglas en inglés, *Adeno-Associated Virus Integration Site 1*), que se localizan en el intrón 1 del gen *PPP1R12C* (subunidad reguladora 12C

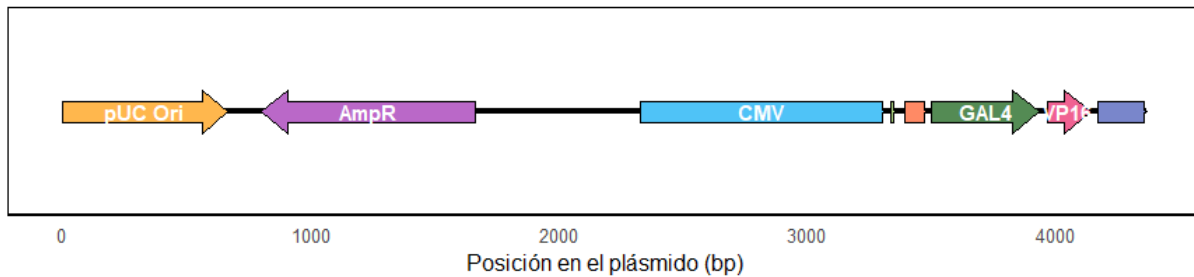


Nota. Se describen los componentes del constructo reportero. **Tol2** (Naranja): Sitio de inserción Tol2. **10xUAS** (Azul): 10 repeticiones de la secuencia *UAS* (*Upstream Activating Sequence*). **EB1** (Amarillo): promotor mínimo EB1. **d2EGFP** (Verde): Proteína fluorescente verde. **MOD** (Blanco): Ornitina descarboxilasa de ratón. **SV40** (Celeste): señal de poli(A) del virus simio 40. **AmpR** (Lila): Gen de resistencia de ampicilina. Fuente propia.

3.1.3 Diseño y construcción de los plásmidos controladores de activación.

Los plásmidos controladores de activación, *pCC* y *pCi*, fueron diseñados previamente por el grupo de investigación basado en los constructos del estudio de Kawakami et al., 2016. El plásmido controlador constitutivo, *pCC*, porta un gen que codifica una proteína constituida por el dominio de unión al ADN (DBD) del factor de transcripción GAL4 fusionado al dominio de transactivación de la proteína VP16, derivado del virus del herpes simple. Este diseño facilita la expresión de los genes cercanos a la secuencia *UAS* (*Upstream Activating Sequence*), reconocida específicamente por GAL4-DBD (figura 6).

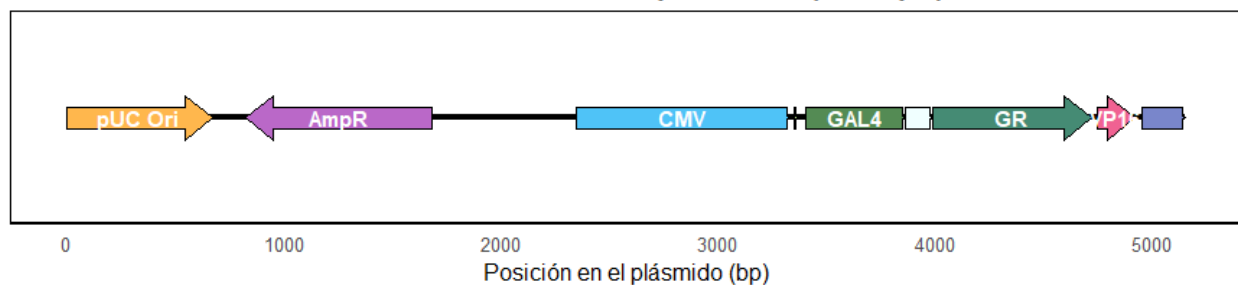
Figura 6. Diagrama lineal del plásmido controlador *pCC* con sus diferentes componentes



Nota. Se describen los componentes del plásmido controlador constitutivo. **VP16** (Rosado): elemento de activación. **3xHA** (Naranja): péptido de etiqueta. **CMV** (Azul): promotor de citomegalovirus humano. **SP6** (verde claro): promotor para ARN polimerasa. **GAL4** (Verde oscuro): Factor de transcripción GAL4 subunidad DBD. **SV40** (Lila): secuencia de poliadenilación. **AmpR** (Morado): gen de resistencia de ampicilina. **pUC Ori** (Amarillo): Sitio de origen de replicación bacteriano. Fuente propio.

El plásmido controlador inducible, *pCi*, es similar al *pCC* (figura 6) pero contiene adicionalmente el dominio de unión al ligando del receptor de glucocorticoides, NR3C1, del pez cebra (*Danio rerio*), entre el DBD del GAL4 y el elemento activador VP16 (figura 7).

Figura 7. Diagrama lineal del plásmido controlador inducido *pCi*.



Nota. Se describen los componentes del plásmido controlador constitutivo. **VP16** (Rosado): elemento de activación. **CMV** (Azul): promotor de citomegalovirus humano. **GAL4** (Verde):

Factor de transcripción GAL4 subunidad DBD. **GR** (Verde oscuro): dominio de unión de ligando del receptor de glucocorticoides. **SV40** (Lila): secuencia de poliadenilación. **AmpR** (Morado): gen de resistencia de ampicilina. **pUC Ori** (Amarillo): Sitio de origen de replicación bacteriano. Fuente propio.

Ambos plásmidos fueron transformados en bacterias *Escherichia coli* NEB 5-alpha (New England Biolabs) quimiocompetentes mediante el método de choque térmico. Posteriormente, se extrajo el ADN plasmídico utilizando el kit ZR Plasmid Miniprep-Classic (Zymo Research), siguiendo las instrucciones del fabricante.

3.1.4 Generación de la línea celular HEK 293T-pRInt.

La línea celular HEK293T portadora del casete reportero 10xUAS::GFP (HEK 293T_pRInt) se generó mediante recombinación homóloga asistida por el sistema CRISPR_Cas. En este sentido, las células HEK 293T fueron co-transfectadas con los plásmidos *pRInt* (ver arriba) y *pXAT2*, que contiene el gen de la nucleasa Cas9 de *Streptococcus pyogenes*, y el casete de expresión constitutiva del ARN guía específico para el intrón 1 del gen *PPP1R12C* humano. Una vez transfectadas, las células fueron seleccionadas en puromicina y subcultivadas en medio con puromicina (ver apéndice D).

3.1.5 Generación del sistema celular reportero semi-estable.

La línea celular HEK 293T_pRInt fue transfectada con los plásmidos controladores *pCC* y *pCi*. Las células resultantes fueron evaluadas en ensayos de activación transcripcional de GFP en diferentes concentraciones de dexametasona (ver apéndice E).

3.1.6 Generación del sistema celular reportero transitorio.

La línea celular HEK 293T fue co-transfectada con el plásmido *pREpi* y el plásmido controlador *pCC* o el plásmido *pCi*. Las células resultantes fueron evaluadas en ensayos de activación transcripcional de GFP en diferentes concentraciones de dexametasona (ver apéndice F). Es importante resaltar que las células no fueron seleccionadas con antibiótico y, por lo tanto, los plásmidos se mantienen de manera episomal y la expresión es transitoria en la población celular.

3.1.7 Evaluación del potencial biosensor de los sistemas reporteros semi-estable y transitorio.

Para evaluar la respuesta dosis-dependiente de los sistemas reporteros generados, las células transfectadas fueron expuestas a distintas concentraciones de dexametasona (0.1 μ M - 100 μ M). La fluorescencia fue medida a las 24 horas posteriores a la exposición mediante citometría de flujo utilizando el equipo Attune NxT Flow Cytometer (Thermo Scientific) (ver apéndice G).

3.1.8 Evaluación de la especificidad del sistema reportero transitorio.

Los ensayos de especificidad se evaluaron por citometría usando el sistema transitorio *pREpi* + *pCC/pCi*, en presencia de los siguientes analitos: dexametasona, levotiroxina y hemihidrato de estradiol (ver apéndice H).

3.1.9 Análisis estadísticos.

Se utilizó el software GraphPad Prism 10 para el análisis estadístico. Para evaluar las diferencias significativas en la relación dosis-respuesta de cada sistema reportero (*pRInt*+ *pCCi* y *pREpi*+*pCCi*), se empleó un análisis de varianza (ANOVA) unidireccional. La comparación de las curvas dosis-respuesta entre ambos sistemas se realizó mediante un Anova bidireccional. Se consideró una diferencia estadísticamente significativa cuando $p < 0.05$.

Para evaluar la especificidad del sistema reportero *pREpi+ pCCi*, se aplicó un ANOVA bidireccional, comparando las respuestas obtenidas para cada analito en dos grupos: células transfectadas con los constructos y células no transfectadas. Los niveles de significancia estadística se establecieron como sigue: ns (no significativo) para $p > 0.05$; * para $0.01 < p < 0.05$; ** para $0.001 < p < 0.01$; y *** para $p < 0.001$. Adicionalmente, se cuantificó la reactividad cruzada (CR%), una propiedad indeseable en biosensores que mide la respuesta errónea a sustancias interferentes (Mata Calidonio y Hamad-Schifferli, 2025). La formula empleada es:

$$CR\% = \frac{(\text{Señal neta promedio del interferente})}{(\text{Señal neta promedio de dexametasona})} \times 100$$

En este análisis, la solución de NaCl al 0.9 % fue utilizada como control negativo, ya que es el vehículo común para los medicamentos evaluados. Una especificidad alta se traduce en un CR% cercano a cero.

Los parámetros de desempeño del biosensor incluyendo sensibilidad, afinidad, rango dinámico, límite de detección y especificidad se determinaron mediante análisis estadístico y ajuste de curvas. Las señales de fluorescencia (unidades relativas de fluorescencia, URF) se expresaron como la media \pm la desviación estándar de tres réplicas técnicas independientes. Las curvas dosis-respuesta se ajustaron a un modelo de unión de un sitio (Michaelis-Menten) o cooperativo (ecuación de Hill) utilizando regresión no lineal por mínimos cuadrados (método de Levenberg-Marquardt) en Python 3.10. Para este caso, donde se asume un receptor simple o monomérico, la relación se expresa como:

$$R = R_{min} + \frac{(R_{max} - R_{min}) * [L]}{(Kd + [L])}$$

Donde R representa la cantidad de ligando unido al receptor, cuantificada por la señal de fluorescencia relativa; R_{max} es la capacidad máxima de unión de receptor (Señal máxima del biosensor); R_{min} es la señal basal sin el analito; [L] es la concentración del ligando; y K_d es la constante de disociación (Concentración de ligando a la cual la mitad de los sitios de unión están ocupado) (Sta et al., 2024).

El rango dinámico se calculó como la relación entre la fluorescencia relativa máxima (URF máxima) y la URF mínima detectable para ambos biosensores. El límite inferior del rango de detección (LOD) se determinó usando la fórmula:

$$LOD = 3 * SD_{blanco} / Sens_{max}$$

Donde *Sens max* es la sensibilidad máxima del biosensor evaluado y SD blanco es la desviación estándar del blanco. El límite superior se fijó en la concentración donde se alcanza el 90% de la señal máxima (0.9*R_{max}). Además, se calculó la sensibilidad máxima, que refleja la eficacia del sensor para detectar cambios mínimos de concentración dentro de su rango funcional (Buchwald, 2020; Buchwald, 2022).

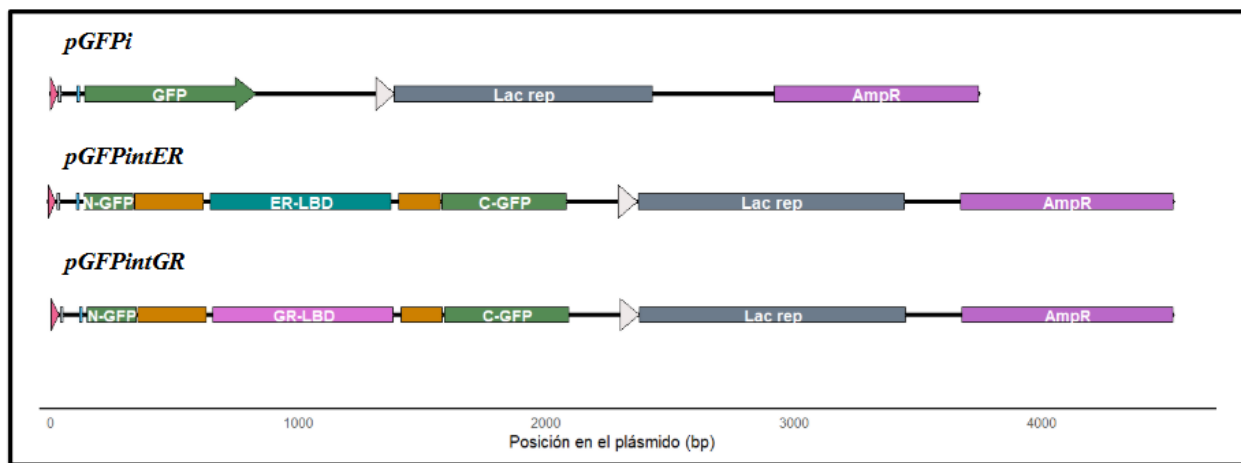
3.2. Metodología para el objetivo específico 2

3.2.1 Diseño y construcción de las proteínas quiméricas pGFPintGR y pGFPintER.

El plásmido portador del gen quimérico *GFPintER* se obtuvo de manera sintética en la compañía MacroGen Inc. (Corea del Sur). Este gen codifica para la proteína verde fluorescente (GFP) interrumpida por una mini-inteína portadora del dominio de unión a estrógenos (LBD_{ER}). Se decidió inicialmente sintetizar este gen ya que la inteína quimérica intER fue previamente caracterizada funcionalmente (Buskirk, A. R et al 2004; Liang et. al. 2012). Posteriormente, el LBD_{ER} fue reemplazado por el LBD_{GR} mediante métodos de clonación estándar. Como control, se

usó el gen de la GFP no interrumpido. Los genes de interés fueron subclonados en un vector inducible, reemplazando el gen de la Taq polimerasa del vector de expresión *pAKTaq* (<https://www.addgene.org/25712/>). Los plásmidos generados se denominaron *pGFPintGR*, *pGFPintER* y *pGFPi* (figura 8). Para más información en detalles de la generación de los plásmidos de las proteínas quimérica, dirigirse al apéndice I.

Figura 8. Diagrama del constructo *pGFPi*, *pGFPintER* y *pGFPintGR*



Nota. A continuación, se describen los componentes de los tres constructos *pGFPi*, *pGFPintER* y *pGFPintGR*. Los tres plásmidos contienen los siguientes componentes de vector: **promotor tac** (Flecha rosada), **lac operador** (verde oliva), **etiqueta de histidina** (al lado del gen GFP o N-GFP), **promotor Lac** (Blanco) y el represor de **Lac** (Gris), también está el gen de **resistencia a la ampicilina** (Morada) para la selección de las colonias transformantes. Para el plásmido *pGFPintER* está compuesto por la proteína quimérica principal **IntER** cuyos dominios se representa de la siguiente manera: **N-GFP** (verde), **N-inteína** (Naranja), dominio de unión de ligando del receptor de estrógeno **ER-LBD** (Azul turquesa), **C-inteína** (Naranja), **C-GFP** (Verde). De igual forma el plásmido *pGFPintGR* está compuesto por la proteína quimérica

principal **IntGR**, del cual contiene los mismos segmentos, pero a diferencia se reemplaza el gen **ER-LBD** por dominio de unión de ligando del receptor de **GR-LBD** (Rosado). Fuente propia.

3.2.2 Generación de las cepas bacterianas de expresión y ensayos de inducción.

La cepa *Escherichia coli* BL21 (New England Biolabs) se empleó para la expresión de las proteínas heterólogas codificadas en los plásmidos *pGPFintER* y *pGFPintGR*. Esta cepa es deficiente en las proteasas OmpT y Ion, lo cual favorece la acumulación de proteínas recombinantes (Lozano Tero, G *et al.*, 2021) (apéndices J).

Las inteínas quiméricas fueron analizadas para determinar su función como biosensores de GC. Para esto, la expresión de las inteínas quiméricas fue inducida mediante el análogo IPTG; posteriormente, las células fueron tratadas con diferentes concentraciones de dexametasona y la fluorescencia fue evaluada cualitativamente en un transiluminador o cuantitativamente por citometría de flujo. Inducidas usando que expresan las proteínas quiméricas fueron inducidas por IPTG mediante la exposición de las células como, es de recordar que estos constructos contienen los elementos regulatorios del operón *lac* que incluyen el promotor con la secuencia operadora (*plac*) y el gen codificante del represor (*lacI*). Este represor inhibe la expresión del biosensor en ausencia de un inductor, pero a la presencia de alolactosa o su análogo no metabolizable, IPTG (isopropil- β -D-1-tiogalactopiranosido), se induce la transcripción del gen de interés (Browning, D *et al.*, 2019. Velazco, S *et al.*, 2021). Con el fin de evaluar la expresión de las proteínas quiméricas, se indujeron cultivos de células *E. coli* BL21 portadoras de los diferentes plásmidos de interés con 1 mM de IPTG.

3.2.2.1 Análisis de la expresión de las proteínas pGFPintER y pGFPintGR con la inducción IPTG con diferentes concentraciones de dexametasona y estradiol a 37°C de incubación. Para evaluar el funcionamiento de los biosensores, se preparó un cultivo primario

inoculando una colonia de cada constructo en 5 mL de caldo LB suplementado con ampicilina e incubando a 37°C durante toda la noche. Posteriormente, se transfirieron 100 µl de este cultivo inicial a 3 ml de caldo LB + ampicilina. La inducción con 1 mM de IPTG se inició al alcanzar una densidad óptima de 0.4 OD₆₀₀. Después de tres horas de expresión de la proteína quimérica a 37°C, se añadieron diferentes concentraciones de dexametasona (Sigma) y estradiol hemihidrato/Dienogest (Abbott).

Para las células BL21_ *pGFPintER*, se dispusieron tres tubos cónicos: Un control negativo sin inducción, un vial con inducción sin estradiol, y un tubo con inducción + 100 µM de estradiol hemihidrato/dienogest. En cuanto a las células BL21_ *pGFPintGR*, se utilizaron seis tubos: Uno como control negativo de inducción y los cinco restantes con inducción mediante 1mM de IPTG y diferentes concentraciones de dexametasona (0, 0.1, 1, 10 y 100 µM). Adicionalmente, se incluyó un vial con la bacteria sin plásmido, dos viales para los controles de inducción (BL21_ *pGFPi*) (Ver apéndices K), y un control de fluorescencia (BL21_ *pShuttle*) referenciada en la base de datos <https://www.addgene.org/67964/>. Para evaluar el funcionamiento de las proteínas quiméricas, las muestras se expusieron a los compuestos en dos momentos: 0 y 24 horas. El análisis del funcionamiento de fluorescencia se llevó a cabo siguiendo el mismo protocolo de cuantificación de la expresión proteica que se implementó para el constructo *pGFPi*. Es de aclarar que todo el procedimiento se realizó a temperatura de incubación a 37°C con agitación a 200 rpm. Se realizó el mismo procedimiento estandarizado para la cuantificación de la expresión proteica del constructo *pGFPi* en la medición del funcionamiento de las proteínas de interés.

Adicionalmente, se verificó la expresión, producción y autoclivaje de las proteínas quiméricas electroforesis en gel de SDS-PAGE al 10%. Para la preparación de las muestras, se tomaron 20 µl del medio de cada cultivo, se centrifugaron a 12.000 g durante 2 minutos y se

descartó el sobrenadante. El precipitado se resuspendió en 50 µl de buffer de Laemmli y se incubó a 95°C durante 5 minutos. La electroforesis se realizó a 100 voltios durante 2 horas. El gel resultante se tiñó con azul de Coomassie con agitación a temperatura ambiente, durante toda la noche, y finalmente se decoloró con solución de decoloración débil (Metanol 5% v/v y ácido acético 10% v/v). La imagen del gel se capturó utilizando el equipo Biorad Chemidoc MP Imaging Systems.

Adicionalmente, se evaluó un ensayo de inducción 30 °C para las proteínas quiméricas con diferentes concentraciones de dexametasona y estradiol (Ver apéndices L), con el fin de observar el funcionamiento de las proteínas.

3.2.3 Lisis celular usando método sonicación en las cepas de los constructos pGFPintER y pGFPintGR.

Para protocolo de lisis celular mediante sonicación comenzó con la inoculación de 1 ml de un cultivo overnight en 200 ml de caldo Lb suplementado con ampicilina. Este procedimiento se replicó para cada uno de los constructos: *pGFPintER* y *pGFPintGR*. Los cultivos resultantes se incubaron a 37°C bajo agitación a 200 rpm hasta que se alcanzó una densidad óptica de 0.4 OD600 nm. En este punto, se indujo la expresión proteica mediante la adición de 1 mM de IPTG, manteniendo la incubación por 11 horas bajo las mismas condiciones de temperatura y agitación, con el propósito de generar una cantidad suficiente de biomasa bacteriana (aproximadamente un gramo de pellet) para la sonicación.

Tras la inducción, los cultivos se centrifugaron a 10.000 g por 10 minutos a 4°C, descartando el sobrenadante y conservando el pellet. El pellet fue resuspendido con el Buffer A (50mM NaH₂PO₄, 300 mM NaCl, 10 mM Imidazol, 1 mM PMSF con pH 8.0) en una proporción aproximada de 1:10 (peso-volumen). La lisis por sonicación se llevó a cabo utilizando un equipo

Ultrasonic Homogenizer Pulse 150 de la marca Benchmark, configurado con 20 segundo en “ON” y 40 segundos en “OFF”, repetidos por 30 ciclos con una amplitud del 35%. Finalmente, las suspensiones sonicadas se centrifugaron a 10.000 g durante 30 minutos a 4°C para la separación del pellet y el sobrenadante, lo que permitió determinar la ubicación subcelular de las proteínas quiméricas.

Para cuantificar la proteína se empleó el método de Bradford. Esto permitió preparar las muestras con una concentración de 5 µg/µl, las cuales fueron cargadas en un gel de SDS-page al 10 % con el objetivo de confirmar expresión y producción de los constructos.

3.2.4 Inducción a diferentes concentraciones de IPTG a 25 °C de los constructos pGFPintER y pGFPintGR.

Para la ejecución de este ensayo, se inició con la inoculación de 100 µl de un cultivo overnight en 10 ml de caldo LB enriquecido con ampicilina. Los cultivos se incubaron a 37°C con agitación constante (200 rpm) hasta una densidad óptima a 600 nm de 0.4. Posteriormente, se dispensaron 150 µl del cultivo en los pozos de una placa de 96. Se designaron secciones para los constructos *pGFPintER* y *pGFPintGR*, evaluando su comportamiento frente a un rango de concentraciones de IPTG (0 mM, 0.001 mM, 0.005 mM, 0.01 mM, 0.05 mM, 0.1 mM y 0.5 mM). Se añadieron controles que incluyen *E.coli* B121 sin plásmido y *E.coli* BL21 con plásmido *pGFPi* (inducida con 1 mM IPTG). Este ensayo se configuró por triplicado para cada condición experimental y del control. La inducción se llevó a cabo a 25°C durante un periodo de 12 horas.

Posteriormente, se agregó 100 µM de dexametasona y 100 µM de hemihidrato de estradiol para los constructos correspondientes. Las muestras se incubaron a 25 °C durante 24 horas.

Finalmente, la lectura de fluorescencia se realizó en el equipo Sinergy H1 marca Biotek, utilizando longitudes de onda de excitación de 475 nm y de emisión de 509 nm.

3.2.5 Análisis estadístico.

Se utilizó el software GraphPad Prism 10 para todos los análisis estadísticos y la generación de gráficos. La expresión proteica de GFP y de las proteínas quiméricas *pGFPintER* y *pGFPintGR*, en función de inducción con 1 mM de IPTG a 37°C y 30°C con diversas concentraciones de dexametasona y estradiol, fueron representadas gráficamente con datos descriptivos.

Para el ensayo de permeabilidad con cloruro de calcio (CaCl_2), las mediaciones de fluorescencia (URF) realizadas con el citómetro de flujo Attune NxT (Invitrogen) se analizaron mediante un Anova unidireccional. Este análisis permitió comparar la señal de fluorescencia de cada grupo de constructo bajo diferentes condiciones: Sin inducción, 0 μM del analito con inducción, y 100 μM del analito con inducción. Cada muestra se procesó por duplicado (Apéndice M).

Asimismo, el ensayo de inducción con diferentes concentraciones de IPTG (25°C) de las cepas con los constructos *pGFPintER* y *pGFPintGR*, en presencia de 100 μM del analito, fue analizando con un Anova unidireccional para comparar la señal fluorescencia (URF) por cada constructo. Los niveles de significancia para todos los análisis fueron definidos como; ns (no significativo) para $p > 0.05$; * para $0.01 < p < 0.05$; ** para $0.001 < p < 0.01$; y *** para $p < 0.001$.

4. Resultados

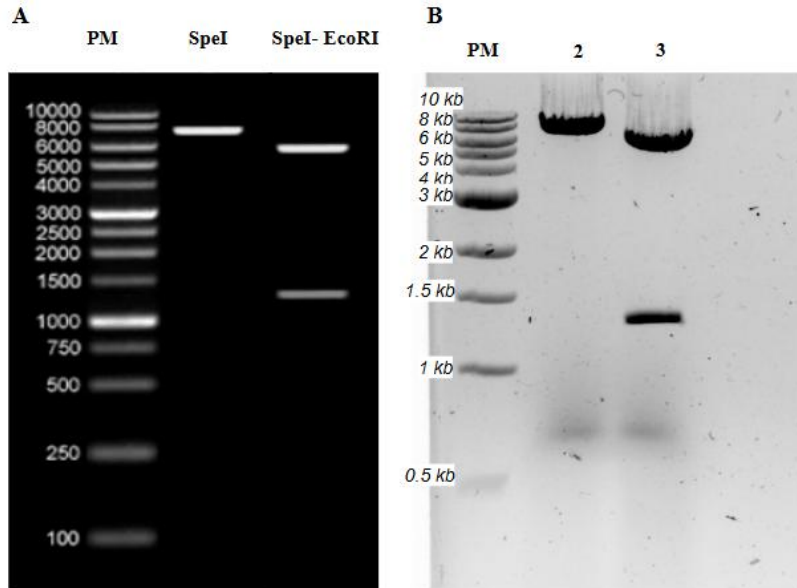
4.1 Resultados para el objetivo específico 1.

4.1.1 Plásmido reportero *pRInt*.

Los plásmidos reporteros diseñados y construidos en el presente trabajo se basan en el casete 10xUAS::GFP_SV40pA.

En el caso del plásmido *pRInt*, el casete fue clonado en el vector pAAVS1, lo que le permitió ser integrado mediante recombinación homóloga, mediada por CRISPR-Cas9, en el sitio 19q13.4 qtr del cromosoma humana (gen *PPP1R12C*, que codifica a una subunidad de la fosfatasa de miosina). Este sitio es ampliamente usado en terapia génica, ya que permite la expresión estable de los transgenes, con una mínima alteración de la función celular (Hayashi et al., 2020). Para confirmar el constructo resultante, se realizaron dos métodos de verificación: Secuenciación por Sanger (Ver apéndices N) y análisis de patrones de cortes enzimáticos, empleando las enzimas SpeI y EcoRI. Los resultados de la electroforesis fueron comparados con los patrones esperados, los cuales fueron visualizados con el SnapGene Viewer y analizados con el software Restriction Analyzer (<https://molbiotools.com/restrictionanalyzer.php>). Los patrones de restricción obtenidos concuerdan plenamente con los esperados, por lo cual se valida el constructo (Figura 9).

Figura 9. *Caracterización del plásmido pRInt con enzimas de restricciones*

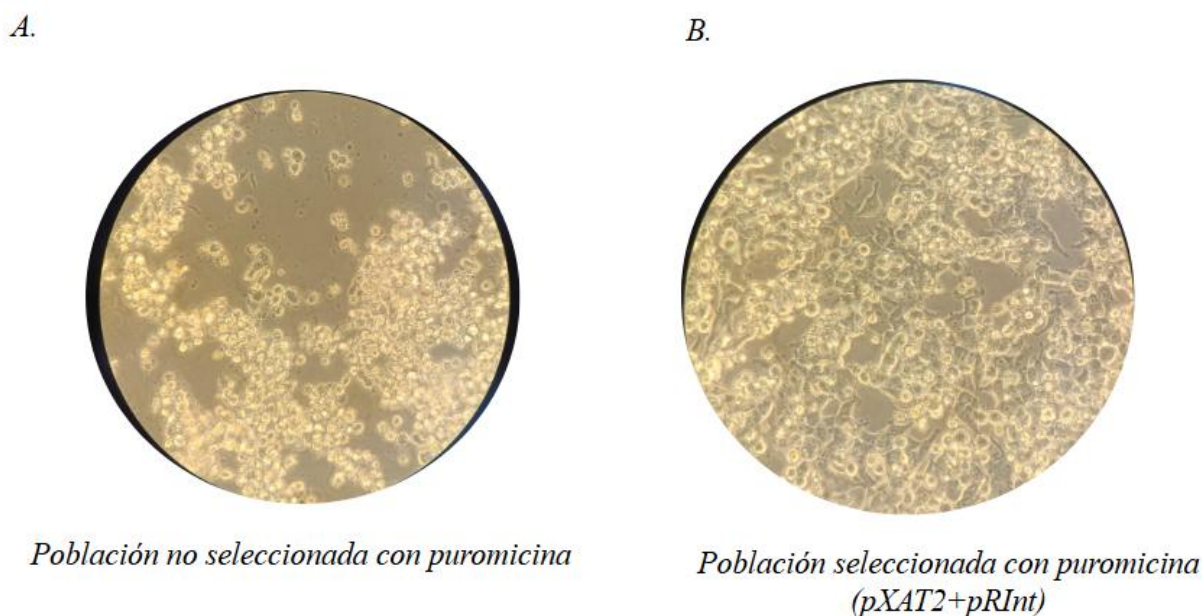


A. Muestra los patrones de corte esperados generados por el analizador del software en línea B. Patrones de ADN obtenidos de la digestión enzimática. En el pozo 2 se observa la linealización del plásmido con la enzima SpeI, por otro lado, el pozo 3 muestra los fragmentos resultantes de la digestión con las enzimas SpeI- EcoRI. PM indica el marcador de peso molecular.

4.1.2 Selección de la línea celular HEK 293T_pRIInt

La línea celular HEK 293T_pRIInt fue seleccionada por su resistencia a la puromicina. La expresión del gen de resistencia a la puromicina es posible gracias a la integración por recombinación homóloga en el locus AAVS1. El casete integrado contiene un sitio aceptor de splicing (SA) que precede el ORF del gen que codifica a la puromicina. Este sitio permite que la maquinaria de splicing celular empalme el gen de puromicina con el primer exón del gen endógeno *PPP1R12C*, situándose así bajo el control del promotor nativo de *PPP1R12C* (Bijlani S. et al. 2022; Bernardi, A et al. 2021). Esta edición genómica se logró mediante la co-transfección del plásmido reportero *pAAVS1-10XUAS::EGFP* junto con el plásmido *pXAT2*, que aporta la nucleasa Cas9 y el ARN guía (ARNg) necesario para la incisión en el locus AAVS1 (Figura 10).

Figura 10. Evaluación de selección con puromicina en HEK 293T modificado genéticamente con el sistema de CRISPR-CAS9



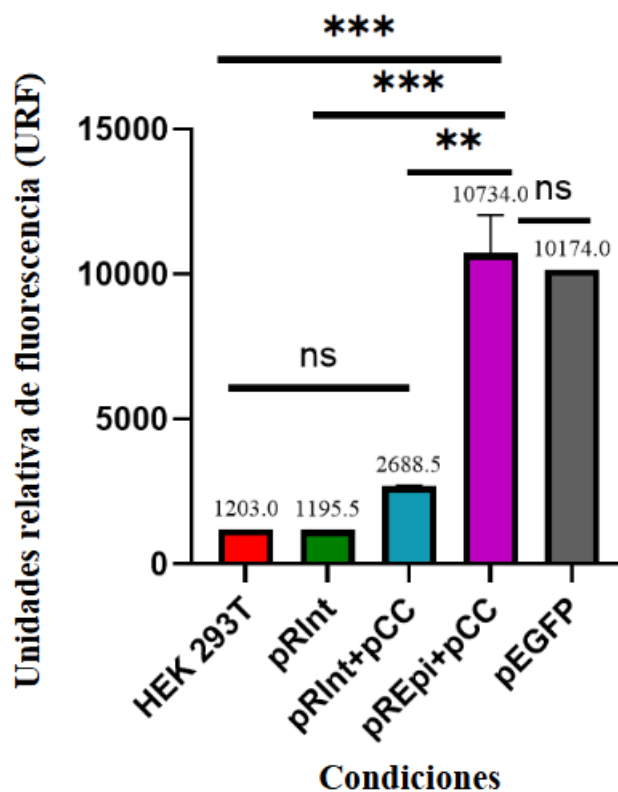
Nota: Las fotografías muestran el efecto del tratamiento con puromicina en dos poblaciones celulares después de siete días post-transfección con lipofectamina. El inciso A corresponde a la población no seleccionada (sin plásmido *pXAT2 + pRInt*) la cual presenta una confluencia celular inferior al 50%. En contraste, la figura B representa la población seleccionada, que se visualiza una confluencia celular aproximadamente en un 90%, lo que demuestra la efectividad de la selección con puromicina para las células modificadas genéticamente.

4.1.3 Análisis funcional de los sistemas celulares reporteros

Los sistemas reporteros, tanto el semi-estable como el transitorio, transfectados con el plásmido *pCC*, presentaron niveles de fluorescencia significativamente mayores a los controles HEK293T y HEK293_pRInt. En particular, se registraron lecturas de 2688.5 URF para el

semiestable y 10,734 URF para el transitorio. La fluorescencia emitida por el sistema transitorio constitutivo fue aproximadamente cuatro veces mayor que la del sistema semi-estable constitutivo (Figura 11). En conjunto, estos resultados indican que los sistemas reporteros constitutivos son funcionales, aunque presentan diferencias notables según el estado del reportero, ya sea integrado en el genoma o mantenido en forma episomal.

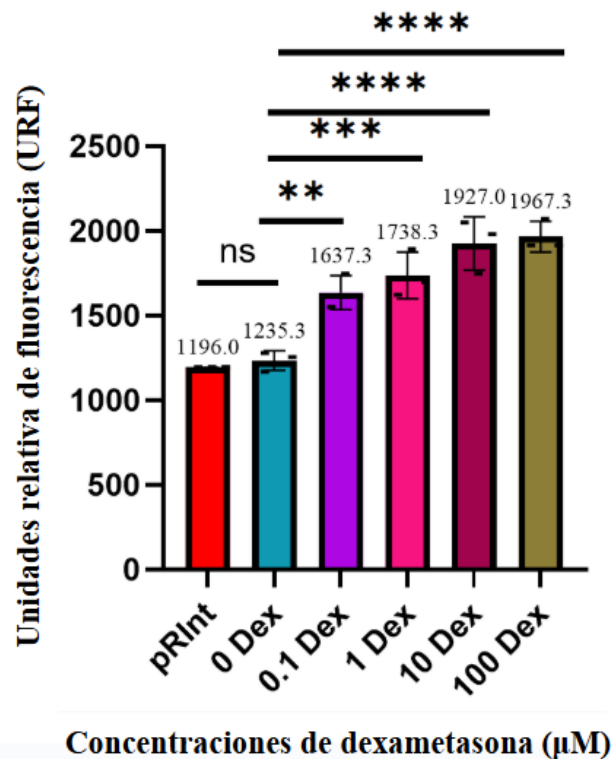
Figura 11. Evaluación funcional de los sistemas reporteros constitutivos



Nota: Se verificó la expresión de fluorescencia de los diferentes controles HEK293T sin transfectar, HEK 239T con el constructo *pRInt*, HEK 293T con el sistema de activación constitutivo *pCC* en el sistema reportero semi-estable y transitorio, y adicionalmente HEK 293T con un plásmido de *pEGFP* constitutivo como control positivo de fluorescencia de la proteína verde fluorescente EGFP.

Por otro lado, se evaluó la respuesta del sistema celular reportero semi-estable transfectado con el plásmido *pCi*. Se observó una respuesta positiva entre la concentración de dexametasona y las unidades relativas de fluorescencia (URF), lo que indica una activación dosis-dependiente del sistema. La ausencia de diferencias significativas en las URF entre la condición de 0 μM de dexametasona y la línea HEK293T_pRInt (sin activador) confirma la baja actividad basal del sistema y su dependencia del inductor. Además, el hecho de que no se registre un incremento sustancial en las URF entre 10 μM y 100 μM sugiere que el sistema alcanza un umbral de saturación, ya sea a nivel del dominio de unión al ligando del receptor o del propio sistema de transcripción inducible (Figura 12).

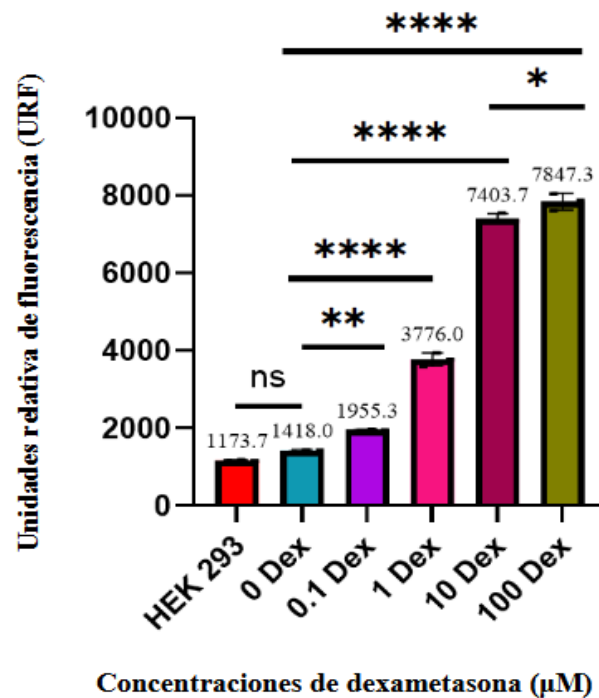
Figura 12. Evaluación funcional del sistema reportero semi-estable inducible.



Nota: El sistema celular semi-estable transfectado con *pCi* presenta un aumento progresivo de la fluorescencia en presencia de la dexametasona, hasta llegar a un valor de saturación de 10 μM . La barra horizontal superior muestra los datos de significancia al comparar la concentración de 0 μM de dexametasona con respecto a las diferentes concentraciones (0.1 μM , 1 μM , 10 μM y 100 μM).

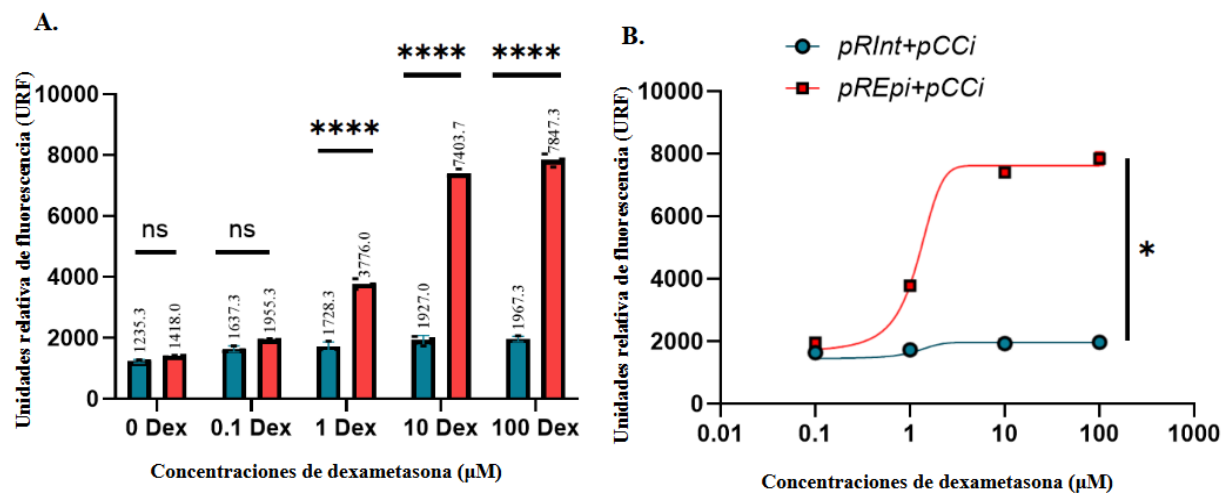
Posteriormente, se evaluó el sistema reportero transitorio transfectado con el plásmido *pCi*. Al igual que el sistema semi-estable, presentó un incremento dosis-dependiente en las unidades relativas de fluorescencia (URF) conforme aumentó la concentración de dexametasona. En particular, mostró una baja actividad basal de 1418.0 URF en ausencia de dexametasona (0 μM), con un incremento progresivo hasta alcanzar un umbral de saturación de 7847.3 URF a 100 μM (Los valores de URF fueron los siguientes: 1418.0 URF a 0 μM , 1955.3 a 0.1 μM , 3776.0 URF a 1 μM tabla, 7403.7 URF a 10 μM y 7847.3 URF a 100 μM , Figura 13).

Figura 13. Evaluación funcional del sistema reportero transitorio inducible.



Al comparar los resultados de los dos sistemas reporteros, es evidente una diferencia significativa en las URF a partir de la concentración 1 μM de dexametasona. Específicamente, el sistema reportero semi-estable mostró un valor de 1728.3 URF, mientras que con el sistema reportero transitorio se registró un valor de 3776.0 URF. Notablemente, si bien ambos sistemas reporteros exhiben un comportamiento dosis-dependiente ante la dexametasona, el rango dinámico del sistema semi-estable es considerablemente menor en comparación con el sistema transitorio (Figura 14).

Figura 14. Comparación funcional entre los sistemas reporteros inducibles.



Nota: (A) Presenta una gráfica de barras que ilustra las diferencias significativas observadas en la respuesta de cada sistema reportero a diversas concentraciones de dexametasona. Complementariamente, en la gráfica (B) muestra una curva dosis-respuesta de tipo sigmoidea, este se exhibe un rango dinámico amplio en la estrategia del *pREpi + pCCi* indicando que el biosensor responde de manera más eficiente, con una activación fuerte y dependiente de la concentración de glucocorticoides, en contraste con el sistema *pRInt + pCCi*.

Adicionalmente se calculó la sensibilidad máxima, límite de detección, rango de detección, constancia de disociación y rango dinámico, la tabla 2 presenta una comparación de los biosensores con gen reportero integrado y no integrado

Tabla 2. Criterio del desempeño de los sistemas reporteros transcripcionales

<i>Parámetros</i>	<i>Valores</i>	
	<i>Reportero semi-estable</i>	<i>Reportero transitorio</i>
<i>Kd (μM)</i>	0.15	0.50
<i>Sensibilidad máxima (URF/μM)</i>	4933.3	13060.0
<i>LOD (μM)</i>	0.034	0.008
<i>Límite superior (μM)</i>	1.5	5.0
<i>Rango de detección (μM)</i>	0.034 – 1.5	0.008 – 5.0
<i>[L] al 10% de Rmax (μM)</i>	0.017	1.35
<i>[L] al 90% de Rmax (μM)</i>	1.35	4.50
<i>Rango dinámico (μM)</i>	0.017-1.35	1.35-4.50

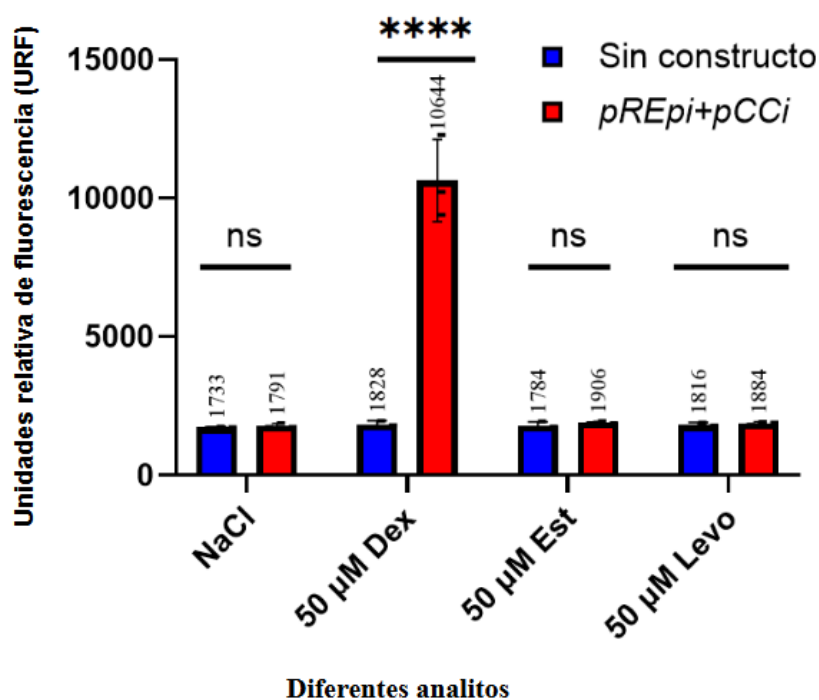
A partir de los datos presentados en la tabla 2, se observa una diferencia notable en el rendimiento del sistema reportero semi-estable y transitorio. El sistema reportero transitorio demuestra una sensibilidad máxima superior (tres veces mayor) en comparación con el sistema reportero semi-estable, lo que indica un mejor desempeño para la detección de bajas concentraciones de glucocorticoides. Adicionalmente, el límite de detección del reportero transitorio es cuatro veces mejor para bajas concentraciones, y presenta un amplio rango de detección de 0.008 a 5.0 μM.

Por otro lado, el sistema reportero semi-estable muestra una mayor afinidad (Kd) por la dexametasona, siendo tres veces más afin que el reportero transitorio (Tabla 2). Esto lo convierte en un indicador superior para concentraciones extremadamente bajas (menor a 0.1 μM), aunque tiende a saturarse rápidamente a concentraciones más altas.

4.1.4 Especificidad del sistema reportero transitorio.

Con el fin de evaluar la especificidad del sistema reportero inducible, se evaluó la respuesta funcional del sistema reportero transitorio transfectado con *pCi* frente a dos clases de compuestos: (A) levotiroxina (agonista del receptor nuclear de la hormona tiroidea, TR) y (B) hemihidrato de estradiol, (agonista del receptor de estrógenos, ER). Como control, se agregaron las moléculas arriba mencionadas a células HEK 293T no modificadas genéticamente (Figura 15).

En esta evaluación se evidencia que el sistema reportero transitorio inducible solo responde a dexametasona. Este hallazgo es crucial, ya que nos indica la especificidad del constructo activador inducible por moléculas que interactúan con el dominio de unión a ligando del receptor de glucocorticoides. La ausencia de activación por parte de los otros analitos evaluados (receptor de hormonas tiroideas y receptor de estrógenos) confirma que no existe interferencia significativa de estas moléculas en el ensayo (Figura 15).

Figura 15. Evaluación de la especificidad del sistema reportero inducible transitorio.

Nota: Se observa la especificidad del sistema reportero transitorio respondiendo exclusivamente a 50 µM de dexametasona. Dex: dexametasona. Est: Hemihidrato de estradiol. Levo: levotiroxina.

Por otro lado, se realizaron los cálculos de porcentaje de la reactividad cruzada de los dos medicamentos (Hemihidrato de estradiol y levotiroxina). Los resultados detallados de la reactividad cruzada se presentan en la tabla 3.

Tabla 3. Especificidad del sistema reportero transitorio

Sustancia	Reactividad cruzada (CR%)
Hemihidrato de estradiol	1.31%
Levotiroxina	1.05%

Los datos obtenidos indican que el sistema reportero transcripcional demuestra una alta especificidad por la dexametasona. Las señales netas observadas para el estradiol y la levotiroxina

fueron mínimas, muy cercanas a las del control negativo, y su reactividad cruzada fue inferior al 2% (Tabla 3). Esto se alinea con el principio de que los receptores biológicos, si bien suelen unirse firmemente a un único ligando natural, tienden algunas veces no distinguir entre múltiples sustancias con estructuras similares (hemihidrato de estradiol), por lo cual puede generar diafonía y transducir señales no deseables. (Xi et al., 2023).

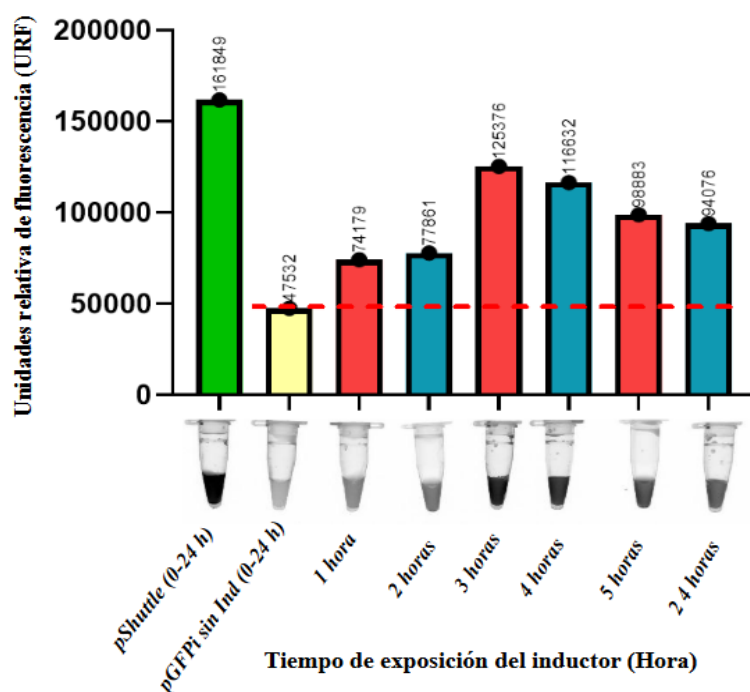
4.2 Resultados para el objetivo específico 2.

4.2.1 Construcción de los plásmidos pGFPI, pGFPintER y pGFPintGR,

Los plásmidos *pGFPI*, *pGFPintER* y *pGFPintGR*, permiten la expresión de los genes de interés (GFP, GFPintER y GFPintGR) de manera inducible por el galactósido IPTG. La figura 8 presenta los mapas lineales de los plásmidos portadores de los genes de interés, los cuales fueron validados por los patrones de digestión obtenidos y mediante secuenciación Sanger (Apéndices O y P).

4.2.2 Análisis funcional de los constructos pGFPI, pGFPintER y pGFPintGR.

Se evaluaron las condiciones óptimas de inducción con IPTG para el gen de interés usando las bacterias *E. coli BL21_pGFPI*. La expresión de la GFP se puede visualizar de manera directa, usando un transiluminador, o evaluando la fluorescencia por citometría de flujo. La inducción de la expresión de la GFP se realizó con 1 mM de IPTG, y se evaluó en diversos puntos de tiempo (0, 1, 2, 3, 4, 5 y 24 horas). Se observó que los máximos niveles de fluorescencia se alcanzaron a las tres horas de exposición al inductor, registrando un valor de 125.376 URF (Figura 16). Posteriormente, disminuyó la señal de fluorescencia, probablemente atribuible al aumento de la densidad óptica del cultivo por el crecimiento bacteriano (Figura 16).

Figura 16. Expresión de la GFP en función del tiempo de inductor bajo el sistema operón *lac*.

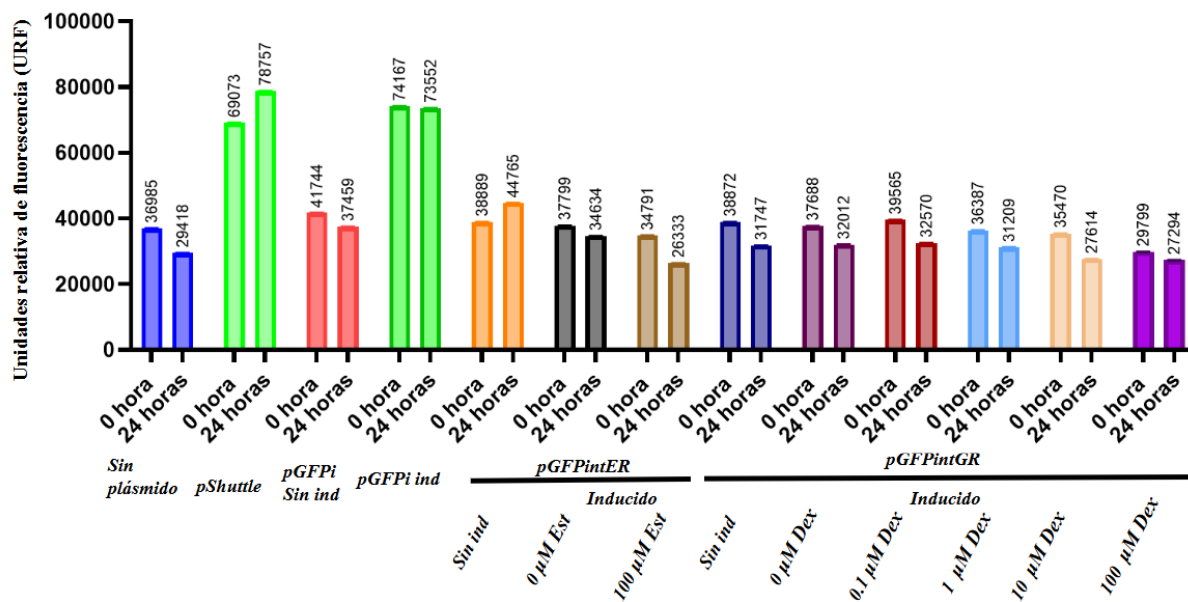
Nota: Se observa un pico de expresión de la GFP a las tres horas de inducción. Asimismo, se corrobora la baja fluorescencia en ausencia del inductor, lo que indica la eficiencia del sistema operón *lac* en la supresión de la expresión. Las señales de fluorescencia se realizaron mediante el transiluminador ChemiDoc™ XRS.

A partir de la optimización de la expresión de la GFP, se procedió a evaluar las proteínas quiméricas *pGFPintER* y *pGFPintGR* a 37 °C. Para ello, se siguió el mismo protocolo de inducción con IPTG previamente establecido, incluyendo la adición de los ligandos específicos para cada LBD. Después de tres horas de incubación con el inductor, se agregaron las diferentes concentraciones de los ligandos.

A las 24 horas de incubación se observó que, en ausencia de inductor y de ligando, los niveles de URF fueron bajos (menor 44765 URF en el caso *E. coli* *Bl21_pGFPintER* y 31747 URF

en *E. coli Bl21_pGFPintGR*), presentando valores similares a la cepa *E. coli Bl21* sin plásmido o sin inductor en *E. coli Bl21_pGFPi* (Figura 17). Sin embargo, no se visualiza un aumento de la fluorescencia proporcional al aumento de la concentración de los respectivos ligandos. Es de recalcar que los controles *E. coli Bl21_pShuttle* y *pGFPi* con el inductor expresaron fluorescencia (78751 URF y 73552 URF en 24 horas), por lo cual se corrobora el funcionamiento del sistema operón *lac* (Figura 17, apéndice Q).

Figura 17. Análisis funcional de las proteínas GFPintER y GFPintGR a 37°C con diferentes concentraciones de hemihidrato de estradiol y dexametasona



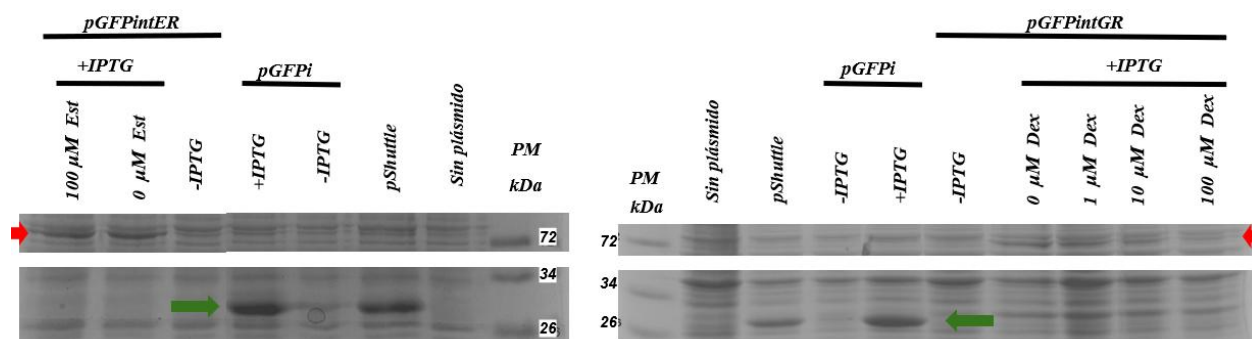
Nota: En la figura se ilustra los diferentes tiempos de exposición del medicamento sobre la actividad de los constructos quiméricos *E. coli_pGFPintER* y *E. coli_pGFPintGR* a 0 y 24 horas. Las mediciones de URF se realizó con el transiluminador ChemiDoc™ XRS. Es de aclarar que se midió la fluorescencia desde el tiempo 0 h después de agregar las diferentes concentraciones de medicamentos, y no por el tiempo 0 h del inductor IPTG.

Los resultados no evidenciaron un aumento en los niveles de URF a las 24 horas. Específicamente, para el constructo *E.coli_pGFPintER*, los valores se mantuvieron estables con la exposición de hemihidrato de estradiol (Est): 38,889 URF a 0 horas y 44,765 URF a 24 horas sin inductor; 37,799 URF a 0 horas y 34,635 URF a 24 horas a 0 μM ; y 34,791 URF a 0 hora y 26,333 URF a 24 horas a 100 μM . De manera similar, los valores de URF para *E.coli_pGFPintGR* no aumentaron de manera proporcional al aumento de la concentración del medicamento (Dexametasona- Dex-), con valores iniciales a 0 horas de 38,872 URF sin inductor, 37,688 URF a 0 μM , 39,565 URF a 0.1 μM , 36,3387 URF a 1 μM , 35,470 URF a 10 μM y 29,799 URF a 100 μM ; y en 24 horas de 37,747 URF sin inductor, 32,012 URF a 0 μM , 32,570 URF a 0.1 μM , 3,209 a 1 μM , 27,614 URF a 10 μM y 27,294 URF a 100 μM , respectivamente.

Teniendo en cuenta que no se observó inducción de la fluorescencia en las inteínas analizadas, y que previamente se había reportado la funcionalidad de la inteína intER en presencia de estrógenos (Liang et. al. 2011), se verificó la producción de las proteínas quiméricas mediante electroforesis en gel de SDS-PAGE al 10%. En este análisis, se observaron las bandas esperadas para las proteínas *GFPintER* y *GFPintGR* (Fechas rojas), con pesos moleculares de 73.7 kDa y 72.1 kDa, respectivamente. Sin embargo, no se observa expresión de la GFP procesada en las muestras tratadas con los respectivos ligandos (Figura 18).

Estos resultados indican que si bien la expresión de las proteínas de interés es inducida por el IPTG, el procesamiento de la inteína no ocurre en presencia del ligando y por lo tanto no se regenera la GFP funcional.

Figura 18. Verificación de la inducción y procesamiento de las proteínas quiméricas GFPintER y GFPintGR.



Nota: En la figura se evidencia la producción de la GFP por medio de los controles (*pShuttle* y *pGFPi* con el inductor) se observa a una altura 26.9 kDa, indicada con la flecha verde. Por otro lado, se puede observar que los constructos *pGFPintER* y *pGFPintGR* sin inductor (-IPTG) no presenta la banda de GFPintER y GFPintGR, lo que verifica la falta del inductor para la generación de la proteína quimérica. No obstante, se visualiza la expresión proteica de los constructos con la inducción en diversas concentraciones (0, 1, 10, 100 μM de dexametasona y 0 y 100 μM de hemihidrato de estradiol) a la altura aproximada de 72 kDa señalada con la flecha roja.

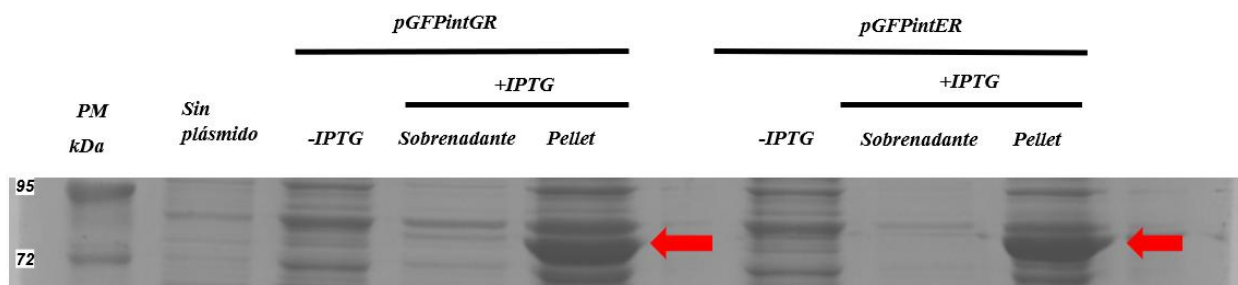
Adicionalmente, se evaluaron diferentes condiciones experimentales para mejorar la funcionalidad de las inteínas. Por ejemplo, se realizó todo el experimento a menor temperatura de incubación (30°C) o se incluyó un paso de permeabilización de la membrana con CaCl₂ para mejorar el ingreso del ligando. Sin embargo, ninguna de estas modificaciones resultó en un aumento significativo de la fluorescencia (ver resultados suplementarios, apéndices R y S).

4.2.3 Evaluación de la localización celular de las proteínas GFPintER y GFPintGR.

Si bien la inducción de las proteínas de interés con IPTG produce las proteínas del tamaño esperado (Figura 18), el procesamiento de las inteínas mediado por el respectivo ligando no se evidencia, ya que no se presenta una banda en el peso esperado para la GFP, ni se produce fluorescencia (Figuras 17, 18 y apéndices Q). Esto puede ser explicado por problemas de plegamiento que afecten la solubilidad de la inteína. Para abordar este problema, se analizó la localización sub-celular de las proteínas de interés expresadas, evaluando la fracción en donde se encuentran después de la lisis celular mediante la técnica de sonicación y centrifugación.

La evidencia obtenida revela que tanto la proteína GFPintER como la GFPintGR se retienen predominantemente en la fracción insoluble (Figura 19) como parte de cuerpos de inclusión. Los cuerpos de inclusión son agregados insolubles, comúnmente ubicados en el citoplasma, y ocasionalmente en el espacio periplásmico (Rosano and Ceccarelli 2014). Este fenómeno ocurre por la sobreexpresión de las proteínas recombinantes, donde el plegamiento incorrecto de estas proteínas (Carrió and Villaverde 2002).

Figura 19. Localización subcelular de las proteínas GFPintER y pGFPintGR.



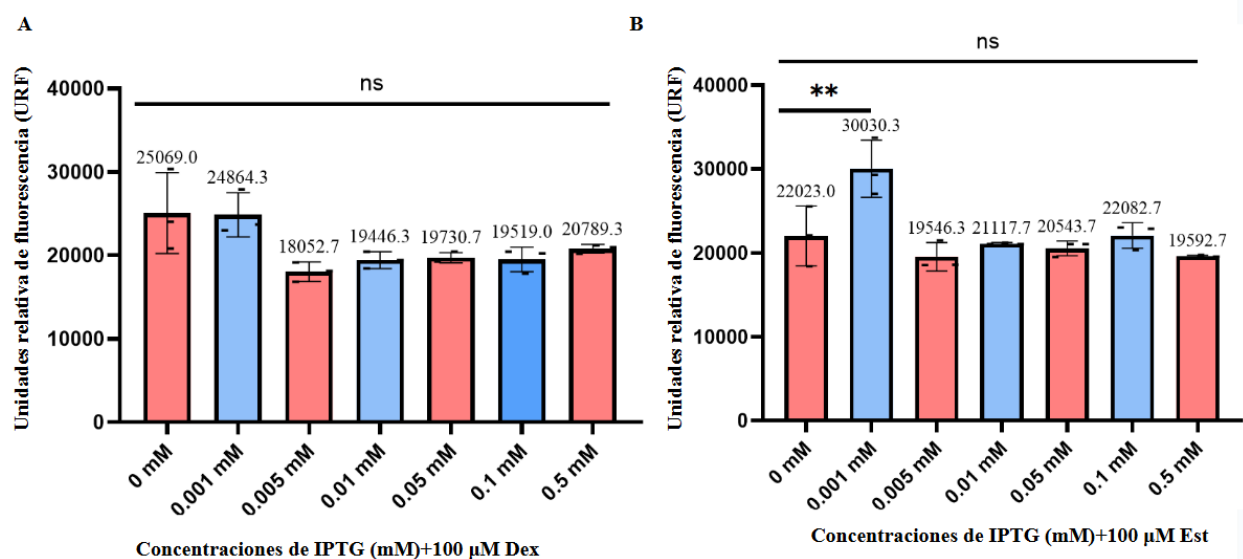
Nota: Esta figura evidencia que las proteínas quiméricas GFPintER y GFPintGR se encuentran localizadas mayoritariamente en la fracción insoluble pellet celular, con el peso correspondiente aproximadamente de 72 kDa indicada con la fecha roja.

4.2.4 Inducción a diferentes concentraciones de IPTG a 25°C en cepas de *E. coli* BL21 con los constructos *pGFPintER* y *pGFPintGR*.

Ante el problema de la solubilidad de las proteínas quiméricas, se realizó un nuevo ensayo induciendo proteínas de interés a diferentes concentraciones de IPTG y realizando la expresión a 25°C de incubación, e incubándolas con su respectivo ligando a una concentración de 100 μ M por 24 horas. Bajo estas condiciones tampoco se observa fluorescencia en ninguno de los tratamientos (Figura 20).

Por consiguiente, y teniendo en cuenta que las inteínas quiméricas estudiadas en este trabajo no son solubles en *E. coli*, no es posible corroborar si realmente son funcionales como biosensores.

Figura 20. Evaluación de las proteínas quiméricas *pGFPintER* y *pGFPintGR* con diferentes concentraciones de IPTG.



Nota: En esta figura se ilustra el ensayo de expresión usando las diferentes concentraciones de IPTG con 100 μM del activador de los biosensores. A. Se evalúa el constructo *pGFPintGR* con 100 μM de dexametasona. B. Se observa funcionamiento del constructo *pGFPintER* con 100 μM hemihidrato de estradiol. La lectura de fluorescencia se realizó en el equipo Sinergy H1 marca Biotek, utilizando longitudes de onda de excitación de 475 nm y de emisión de 509 nm.

En la figura 20A, se observa la evaluación de la proteína quimérica GFPintGR, del cual no presenta diferencias significativas, mientras que la proteína pGFPintER (Figura 20B) con 100 μM de hemihidrato de estradiol se presenta como dato significativo en 0.001 mM con respecto a las otras concentraciones, pero comparando con las unidades relativas del constructo *pGFPi* se comprueba de que no hay fluorescencia (Apéndices T).

5. Discusión

5.1 Biosensor a nivel transcripcional en células eucariota HEK 293T:

Para evaluar el desempeño de un biosensor, es fundamental analizar su especificidad, sensibilidad, rango de detección, rango dinámico y tiempo de respuesta (Zhou y Zhang, 2023). En este estudio, se compararon los sistemas reporteros transcripcionales *semi- estable* y *transitorio* bajo estos criterios, exceptuando el tiempo de respuesta, ya que las mediciones se realizaron 24 horas después de la exposición a diversas concentraciones de dexametasona, debido a consideraciones de costo y disponibilidad de reactivos.

Los sistemas reporteros celulares desarrollados en este estudio usando la línea celular HEK293T se comportan como biosensores específicos de glucocorticoides. Los resultados demuestran que tanto el sistema semi-estable como el transitorio generan una respuesta dosis-

dependiente frente a la dexametasona. Ambos sistemas demostraron ser específicos, ya que no responden a los estrógenos ni a la hormona tiroidea. Sin embargo; el sistema semi-estable es menos sensible que el transitorio, probablemente porque el gen reportero se presenta como una copia integrada en el genoma, mientras que en el transitorio se presenta como múltiples copias mantenidas episodalmente (Lufino et al., 2008).

Considerando la presencia de disruptores endocrinos en ambientes acuáticos, como los ríos en China, donde se han detectado concentración desde 10 ng/mL de triclosán y 20 ng/L de benzofenonas, hasta valores más bajos como 0.01 µg/L (bisfenol A), 0.001 µg/L (17β-estradiol) y 0.3 µg/L (Pironti et al. 2021; Koch et al. 2019), el sistema reportero transitorio evaluado en este trabajo emerge como la opción más indicada. Su alta sensibilidad y amplio rango dinámico son cruciales para cuantificar EDCs ambientales que se encuentren dentro de dicho rango.

Sin embargo, el sistema semi-estable muestra una mayor afinidad por la dexametasona, siendo tres veces más afin que el sistema transitorio. Esta diferencia se atribuye principalmente al número de copias de plásmidos y a la fuerza y selectividad de la unión del ADN por los factores de transcripción, así como a posibles interferencias de componentes celulares (Fouyet et al., 2024).

En el sistema semi-estable, el gen reportero está ubicado en el locus AAVS1, un puerto seguro conocido en estudios con células humanas que minimiza el impacto en genes vecinos y la integridad de las células HEK293T (Bijlani et al., 2022; Yum et al., 2023). Por otra parte, el sistema transitorio, al presentarse en forma plasmídica, posee múltiples copias del gen reportero. Esta característica permite que su activación resulte en una mayor transcripción y, consecuentemente, una elevada producción de GFP dentro de una única célula (Baliga et al. 2025). Estos factores pueden explicar las diferencias observadas en relación con el rango dinámico que presentan los dos sistemas reporteros. En el sistema transitorio, se identificó un rango dinámico más amplio, lo

que le confiere mayor versatilidad para discriminar concentraciones. No obstante, el rango dinámico limitado del sistema reportero semi-estable implica que su señal máxima no se aleja significativamente del ruido basal, lo que implica el uso de equipos más sensibles, como un citómetro, para identificar cambios en la fluorescencia, que no son accesibles para los laboratorios de bajo costo (Rho y Kim, 2017).

El sistema reportero transitorio, al mantenerse de forma episomal, enfrenta el riesgo inherente de pérdida de gen reportero a causa de la división celular sucesiva. Consecuentemente, esto podría llevar a una disminución progresiva de la sensibilidad del biosensor. Además, dado que los constructos de activación como *pCi* ó *pCC* también se encuentran en forma episomal, su estabilidad se vería comprometida por el número de pases celulares, resultando en una pérdida gradual de este material genético y afectando la consistencia de los resultados (Kocho et al., 2019).

Los biosensores transcripcionales, compuestos por dominios de unión a ligando (LBD) y dominio de unión a ADN (DBD), ofrecen alta modularidad para el desarrollo de biosensores quiméricos mediante el intercambio de dominios funcionales (Xi et al., 2023). En este trabajo, constructos *pCi* fueron diseñados con el dominio de unión a ligando del GR del pez cebra, cuya congruencia fisiológica con el GR humano ha sido previamente confirmada en ensayos *in vitro* (Cole et al., 2025). Por lo tanto, el modelo desarrollado en este estudio demuestra una especificidad considerable para sustancias que activan el receptor de glucocorticoides humano.

Al comparar nuestro biosensor con otros sistemas que evalúan el GR, se identifican áreas de mejora. Por ejemplo, Agler *et al.* (2007) desarrollaron un biosensor quimérico de GR basado en GAL4 fusionado al LBD del GR humano recombinante, utilizando un gen reportero de la luciferasa. En dicho sistema, al evaluar con 10 nM de dexametasona (Dex) durante 20 horas, se reportó una relación señal/fondo (S/B) de 9,5 para agonistas y 8 para antagonista. En el mismo

estudio, los autores crearon un biosensor con una región codificante del GR (NM_000176) clonado en un vector pENTR/D-TOPO (Invitrogen Life Technologies) y un gen reportero episomal de YFP en el vector pcDNA3.1. Este biosensor mostró activación a 0,1 μM de Dex, con un K_d de 0,3 nM en tan solo 4 horas de tratamiento, además de permitir la observación de la translocación nuclear *in vivo* (Aglar et al. 2007).

Estas comparaciones sugieren que el presente trabajo se beneficiaría de una evaluación más exhaustiva del biosensor a concentraciones de dexametasona inferiores a 0,1 μM . Adicionalmente, sería valioso determinar el tiempo de respuesta de este biosensor para comprender mejor su dinámica de activación y de translocación nuclear.

5.2 Proteína quimérica a nivel traduccional en cepa *E.coli* BL21:

Las proteínas quiméricas *GFPintER* y *GFPintGR* no presentaron funcionalidad como biosensor de GC. Sin embargo, el presente estudio demostró que la expresión de estas proteínas quiméricas en *E. coli* representa un reto para resolver a futuro.

Aunque la proteína GFP se expresó de manera robusta a 37°C bajo el sistema de inducción IPTG/operón *LacI*, con fluorescencia detectable a las 3 horas (Figura 16), las proteínas *GFPintER* y *GFPintGR* no mostraron activación del dominio de unión a ligando (LBD) del GR ni fluorescencia al ser incubadas con sus analitos (dexametasona y estradiol) a ninguna de las temperaturas probadas (37°C y 30°C).

A pesar de la ausencia de fluorescencia, la producción de las proteínas quiméricas se confirmó mediante geles SDS-PAGE, donde se observaron bandas en el peso teórico calculado. Como estrategia alternativa, se realizó una lisis celular para evaluar la activación de las proteínas *GFPintER* y *GFPintGR* *in vitro*. Esta acción buscaba superar la barrera de la pared de *E. coli* BL21,

que podría estar limitando el transporte transmembrana y la interacción con los analitos (Wang y Lu, 2022). Sin embargo, se encontró que las proteínas quiméricas inducidas se localizaban predominantemente en la fracción no soluble (Figura 19), lo que sugiere problemas de plegamiento y solubilidad, resultado en la formación de cuerpos de inclusión.

Los cuerpos de inclusión (CI) son agregados de macromoléculas, principalmente proteínas, que se forman cuando proteínas foráneas o mutadas no logran un plegamiento o modificación postraduccional adecuados al utilizar un sistema de sobreexpresión. Su formación en *E. coli* es resultado de un desequilibrio entre el plegamiento, la agregación y la degradación de proteínas, influenciado por el metabolismo de la célula huésped, la maquinaria de síntesis y modificación proteica, las propiedades de la proteína diana y las condiciones ambientales. Cuando la tasa de síntesis de proteínas recombinantes excede la capacidad de las chaperonas y la maquinaria de plegamiento celular, las proteínas mal plegadas tienden a agregarse en CI (Bhatwa et al., 2021).

Un factor que contribuye a esta sobreproducción es la fuerte inducción del sistema LacI-IPTG, especialmente cuando se utiliza con promotores como T7, lo que puede llevar a tasa de expresión tan altas que superan la capacidad de plegamiento celular (Laksmi et al., 2023). Una solución potencial es reemplazar estos promotores por sistemas con menor fuerza de expresión, como el sistema promotor PAR (ej. PAR1), que ofrece capacidades de expresión baja, intermedia y alta. El promotor PAR1, en particular, es ideal para la expresión de bajo nivel de proteínas tóxicas y previene la sobreproducción de proteínas quiméricas (Hothersall et al., 2021).

Otras estrategias para abordar los problemas de solubilidad proteica es la coexpresión de chaperonas, como las proteínas de choque térmico (ej., DnaK, DnaJ, GroEL/ES). Estas chaperonas interactúan con las cadenas polipeptídicas nacientes o mal plegadas, promoviendo su correcto plegamiento y aumentando la probabilidad de obtener proteínas solubles. El sistema KJE, por

ejemplo, facilita el plegamiento de proteínas recién sintetizadas y el replegamiento de aquellas desplegadas bajo estrés. Además de las chaperonas, el uso de etiquetas de fusión es otra técnica empleada para mejorar tanto la solubilidad de las proteínas como purificación (Atroshenko et al., 2024; Imamoglu et al., 2020).

Por otra parte, se intentó optimizar las condiciones de inducción con IPTG para la producción correcta de las proteínas quiméricas *pGFPintER* y *pGFPintGR*, empleando diversas concentraciones de IPTG (0.001 mM a 0.5 mM) a 25°C por 24 horas, seguido de la adición de 100 µM de analito, ya que varios reportes confirman que algunas proteínas quiméricas alcanzan mayor solubilidad a bajas concentraciones de IPTG (Rasooli y Hashemi, 2019; Atroshenko et al., 2024). Sin embargo, a pesar de las modificaciones en los protocolos de expresión, no se observó activación del sistema.

Una estrategia adicional para el mejoramiento de la solubilidad de proteínas quiméricas es la modificación de la proteína de interés (Bhatwa et al., 2021). Esto puede lograrse eliminando elementos estructurales que promuevan la formación de cuerpo de inclusión, también fusionando la proteína objetivo a una proteína soluble o etiquetas peptídicas. Por ejemplo, la incorporación de péptidos marcadores, como la etiqueta HA (derivada de la hemaglutinina), que permite exponer residuos de tirosina, haciendo esta estrategia aplicable a diversas proteínas (Montanari et al., 2018).

También se puede adicionar compuestos que inducen estrés osmótico al medio de cultivo en inducción. Por ejemplo, el sorbitol ha demostrado facilitar la expresión de proteínas diana en su forma soluble al desencadenar estrés osmótico y estimular la síntesis o captación de osmolitos (Rosano et al., 2014). Un caso ilustrativo es la sobreexpresión de *srlD* en una cepa *E. coli* modificada, que mejora la utilización del sorbitol como única fuente de carbono. Al cultivar esta cepa modificada en un medio suplementado exclusivamente con sorbitol, se observa un aumento

de 3,6 veces en la tasa de crecimiento específico y una producción significativamente mayor de proteína recombinante en comparación con la cepa silvestre (Das y Mahalik, 2025).

Otro aspecto para considerar es el diseño de los plásmidos, del cual se debe controlar el número de copias. Plásmidos con un alto número de copias (aproximadamente 100 copias/célula) a menudo resultan en una elevada tasa de expresión de proteínas heterólogas, lo que puede sobrecargar la maquinaria de plegamiento celular y, consecuentemente, promover la agregación proteica en cuerpos de inclusión. En contraste, el uso de plásmidos con un número de copias bajo (entre 0 y 50 copias/célula) es más ventajoso para la producción de proteínas solubles (Bhatwa et al., 2021).

Por lo anterior, la optimización de la expresión de proteínas recombinantes debe abordarse de manera individualizada para cada proteína de interés. La eficacia de las diversas estrategias- incluyendo la selección del vector, la cepa huésped, las condiciones de cultivos y los parámetros de inducción varía considerablemente en función de la proteína objetivo.

6. Conclusiones.

En el presente estudio se desarrollaron dos tipos de sistemas reporteros: Un sistema transcripcional, generado en la línea celular humana HEK293T en formatos semi-estable y transitorio; y un sistema traduccional, generado en la bacteria *Escherichia coli*. Los análisis funcionales permiten concluir lo siguiente:

El sistema reportero transcripcional en células HEK293T, tanto en su versión semi-estable como transitoria, mostró funcionalidad como biosensor específico de glucocorticoides (GC). En ambos casos se observó una correlación positiva significativa entre la concentración de

dexametasona y las unidades relativas de fluorescencia (URF), aunque con diferencias notables en rango dinámico, sensibilidad y rango de detección (Figura 16 y Tabla 5).

El biosensor semi-estable, aunque con un rango dinámico limitado (0.034–1.5 μM de dexametasona) y una sensibilización máxima de 4933.3 URF/ μM (según el citómetro utilizado), presentó una alta afinidad ($K_d = 0.15 \mu\text{M}$). Esta característica lo convierte en una herramienta idónea para la detección de concentraciones extremadamente bajas de glucocorticoides (0.001–0.1 μM).

El biosensor transitorio exhibió un rango dinámico considerablemente más amplio (0.008–5.0 μM), lo que lo hace más adecuado para aplicaciones fisiológicas, en las que las concentraciones de glucocorticoides pueden variar dentro de un espectro más amplio.

El sistema transcripcional demostró además una alta especificidad, con reactividad cruzada inferior al 2% frente a compuestos como el hemihidrato de estradiol y la levotiroxina, lo que confirma su elevada selectividad.

En contraste, el sistema reportero traduccional no evidenció funcionalidad como biosensor de GC. Los análisis mostraron que las proteínas quiméricas GFPintER y GFPintGR presentaron problemas de plegamiento, localizándose mayoritariamente en la fracción insoluble, lo que sugiere la formación de cuerpos de inclusión.

7. Recomendaciones y perspectivas

Aunque los biosensores transcripcionales desarrollados en este estudio mostraron una correlación positiva dosis-respuesta con la dexametasona y fueron evaluados bajo diversos criterios, se recomienda investigar la relación entre el tiempo de respuesta y la concentración de

dexametasona. Este análisis permitirá una comparación más detallada con otros biosensores en términos de sus procesos transcripcionales y de translocación.

Es fundamental llevar a cabo un ensayo de dosis-respuesta de dexametasona a concentraciones por debajo de 0.1 μM . Esto no solo solidifica la comprensión de la sensibilidad de ambos biosensores, sino que también permitirá determinar con mayor precisión el límite mínimo de detección, especialmente para el sistema reportero semi-estable.

Finalmente, se sugiere explorar la activación de GR con otros glucocorticoides sintéticos comunes como prednisona, triamcinolona, betametasona, beclometasona y fluticasona. Asimismo, para corroborar aún más la especificidad de los biosensores transcripcionales generados en este estudio, es esencial realizar ensayos de interferencia con otras sustancias diferentes a las presentada en el estudio.

Por otro lado, el desarrollo de los biosensores traduccionales bacterianos *pGFPintER* y *pGFPintGR* se vio limitado por la incapacidad de producir las proteínas quiméricas de forma soluble, lo que sugiere la formación de cuerpos de inclusión. Por lo tanto, es importante realizar nuevamente la estandarización del proceso de producción, abordando cada proteína de interés de manera individual.

Esta estandarización debe incluir, de forma independiente, las siguientes estrategias para mejorar la solubilidad: Modificación de la proteína objetivo, mediante la fusión con fragmentos de proteínas solubles o etiquetas péptidas, la expresión de chaperonas, la optimización del sistema de inducción, la adición de aditivos que induzca al estrés osmótico al microorganismo usado, cambio de cepa huésped y el control del número de copias del plásmido.

Además de las estrategias previamente mencionadas para optimizar la producción de proteínas recombinantes, un aspecto crucial a considerar para futuras investigaciones es la verificación de la integridad y funcionalidad de las proteínas quiméricas mediante Western blot.

Se recomienda el uso de anticuerpos específicos dirigidos contra la exteína (GFP) o la inteína (*RecA inteína*). Esta técnica no solo confirmará la producción de la proteína objetivo en su tamaño esperado, sino que, si se realiza un Western blot dirigido a los fragmentos N y C terminales libre de la GFP, podría proporcionar información invaluable sobre la ocurrencia del autosplicing de la inteína y la reconstrucción completa de la GFP. Esto es esencial para asegurar que el biosensor está funcionando correctamente a nivel postraducciona

Apéndices

Apéndice A. Detalles del diseño y construcción del plásmido reportero *pRInt* y *pREpi*.

En cuanto al vector, se realizó una digestión preparativa enzimática utilizando las enzimas de restricción SpeI y SalI (New England Biolabs). Paralelamente, el inserto de interés fue amplificado mediante PCR utilizando cebadores Tol2_3_fwd y Tol2_5_rev_SpeI (**ver tabla 4**), diseñados con sitios de corte para las enzimas XhoI y SpeI. Se purificaron tanto el vector como el inserto mediante perlas magnéticas con etanol al 80%. Posteriormente, se llevó a cabo la ligación de los amplicones con el vector plasmídico pAAVS1 utilizando la enzima T4 DNA ligasa. El plásmido reportero obtenido, denominado *pRInt*, fue caracterizado mediante análisis de restricción y por secuenciación Sanger (GENCELL, Bogotá).

Tabla 4. *Cebadores utilizados para la construcción del plásmido reportero pAAVS1 10xUAS:GFP.*

Nombre	Secuencia 5'-3'	Temperatura de melting	Número de bases
Tol2_3_fwd	AGAGAGGCTGCAAATAGCAGGAAAC	62.8 °C	25
Tol2_5_rev_SpeI	TTAACTTTACTAGTCACAGCACCTTGACCTGGAAATTAG	64.5 °C	39

Apéndice B. Transformación bacteriana.

Las transformaciones bacterianas se llevaron a cabo utilizando la cepa *E. coli* NEB 5-alpha (New England Biolabs) quimiocompetentes, mediante el método de choque térmico. Los plásmidos correspondientes tanto al constructo reportero como a los controladores contienen un gen de resistencia a la ampicilina, lo que permitió la selección de colonias transformadas con este antibiótico. Las bacterias transformadas se sembraron en medios sólidos de agar Luria-Bertani (LB) o agar MacConkey suplementados con ampicilina a una concentración de 100 µg/mL. Posteriormente, se realizó la extracción de los plásmidos, cuya integridad fue verificada mediante electroforesis en geles de agarosa al 1 %. El ADN se cuantificó utilizando el espectrofotómetro Nanodrop One (Thermo Scientific).

Apéndice C. Manipulación de las bacterias *E. coli* Neb 5-alpha quimicompetente.

Las bacterias utilizadas en este proyecto se clasifican como de riesgo biológico nivel I, lo que permite su manipulación en los mesones de trabajo del laboratorio bajo condiciones de esterilidad. La cepa *E. coli* NEB 5-alpha se creció a 37 °C en una incubadora de atmósfera y se mantuvo, máximo por dos semanas, a 4 °C. Los medios de cultivo empleados, como el caldo Luria-Bertani (LB) con o sin antibiótico (ampicilina a una concentración de 100 µg/mL), fueron tratados con una solución de hipoclorito de sodio a 5.000 ppm antes de su eliminación, siguiendo el

protocolo de manejo de residuos peligrosos. Finalmente, los materiales reutilizables, como las cajas de Petri, fueron entregados al laboratorio de microbiología para su autoclave mediante presión térmica y posterior disposición segura.

Apéndice D. Detalle de la transfección del constructo *pRInt* y selección de la población celular modificada.

Mediante la técnica de lipofección, utilizando el kit Lipofectamine™ 3000 Transfection Reagent (Invitrogen) y siguiendo estrictamente las instrucciones del fabricante. Para el procedimiento, se sembraron 300.000 células por cada pozo en una placa de 24 pozos, las cuales fueron transfectadas con 500 ng del plásmido *pRInt* y 500 ng del plásmido pXAT2. Este último codifica una versión modificada de la enzima Cas9 y un ARN guía específico del locus AAVS1 (Bijlani S., *et al* 2022).

Las células fueron cultivadas en medio RPMI suplementado con un 10 % de suero fetal bovino (SFB) y 1.5 µg/mL de puromicina para la selección de células transfectadas. Tras una semana de incubación en presencia del antibiótico, no se observó evidencia de toxicidad celular en las condiciones descritas.

Apéndice E. Descripción del procedimiento para la generación del sistema celular reportero semi-estable.

Al tener la célula HEK 293T genéticamente modificadas con el casete *pRInt*, fueron transfectadas nuevamente mediante la técnica de lipofección utilizando el kit Lipofectamine™ 3000 (Invitrogen). Para este procedimiento, se sembraron 300.000 células por pozo en placas de 24 pozos, las cuales fueron transfectadas de manera transitoria con 500 ng de los plásmidos *pCC*

y *pCi*. Las células modificadas y transfectadas con el constructo controlador fueron incubadas durante 48 horas a 37 °C en una atmósfera húmeda con un 5 % de CO₂. Posteriormente, se retiró el complejo de lipofectamina/ADN y se reemplazó por medio RPMI suplementado con un 10 % de suero fetal bovino (SFB), al cual se añadieron diferentes concentraciones de dexametasona para los análisis posteriores.

Apéndice F. Descripción detallada para la generación del sistema celular reportero transitorio.

Para este procedimiento, se sembraron 300.000 células por pozo en placas de 24 pozos, y se realizó la cotransfección de los plásmidos en las combinaciones *pREpi* + *pCC* y *pREpi* + *pCi*. En cada caso, se empleó una concentración de 500 ng de cada plásmido para la cotransfección. Las células cotransfectadas se incubaron durante 48 horas a 37 °C en una atmósfera húmeda con un 5 % de CO₂. Posteriormente, se retiró el complejo lipofectamina/ADN, y el medio de cultivo fue reemplazado por RPMI suplementado con un 10 % de suero fetal bovino (SFB) y diferentes concentraciones de dexametasona para los análisis posteriores.

Apéndice G. Descripción de la preparación de las muestras para análisis en citometría de flujo.

Para la medición de la fluorescencia, las células fueron preparadas retirando la lipofectamina tras 48 horas de exposición a los plásmidos controladores *pCC* y *pCi*, junto con el constructo reportero no integrado. Posteriormente, se resuspendieron en medio RPMI suplementado con 10% de suero fetal bovino (SFB). Las distintas concentraciones de dexametasona fueron preparadas en NaCl al 0.9% p/v como vehículo, diluido en agua de calidad para biología molecular. A partir de una solución madre de dexametasona fosfato (4 mg/mL), se realizaron alícuotas de las concentraciones requeridas.

Finalmente, tras 24 horas de exposición a la dexametasona, las células fueron recolectadas y lavadas con 1 mL de PBS 1X para su análisis por citometría de flujo.

Apéndice H. *Protocolo para la evaluación de la especificidad del sistema reportero transitorio.*

Con el fin de evaluar la especificidad del sistema reportero transitorio, se realizó una transfección transitoria de los plásmidos reporteros *pREpi* y los controladores *pCC* y *pCI*. Se sembraron 150,000 células/pozos en placas de 24 pozos. Para la cotransfección, se utilizaron 2 µg de ADN plasmídico, manteniendo una proporción de 1:3 de ADN: FUGENE 4K transfection reagent (Promega). La mezcla de transfección se preparó en un volumen final de 100 µl con medio Opti MEM y se distribuyó equitativamente en cuatro pozos.

Las células cotransfectadas se incubaron durante 48 horas a 37°C en una atmósfera humidificada con 5% de CO₂, en 450 µl de medio MEM suplementado con L-glutamina y 10% de SFB por pozo. Transcurridos los dos días, el medio que contenía el complejo ADN/FUGEN 4k fue retirado. Posteriormente, se añadió a cada pozo 490 µl de medio MEM suplementado con L-glutamina y 10% de SFB, junto con 10 µl de una concentración de 50 µM de los analitos (dexametasona, levotiroxina y hemihidrato de estradiol), diluido en NaCl al 0.9% p/v. Como blanco del ensayo, se añadió 10 µl únicamente NaCl al 0.9% p/v. Las muestras se incubaron durante 24 horas bajo las condiciones estándar de cultivo de las células HEK 293T. Finalmente, la señal de fluorescencia de cada pozo se midió por triplicado utilizando en el citómetro de flujo.

Apéndice I. *Protocolo para la construcción de los constructos pGFPI, pGFPIntER y pGFPIntGR.*

Diseño del plásmido de control de fluorescencia GFP con el promotor lacI. A partir del constructo *pAKTaq*, se realizó un corte enzimático para retirar el gen que codifica para Taq. Este proceso se llevó a cabo utilizando EcoRI y XbaI, adquiridas de la casa comercial New England Biolabs. A la vez, mediante PCR, se amplificó el gen de interés de la GFP a partir de un plásmido de nuestra autoría que contenía los mismos sitios de restricciones. Posteriormente, los fragmentos obtenidos (vector e inserto) se purificaron utilizando el kit Monarch PCR & DNA cleanup de la compañía New England Biolabs. Finalmente, se realizó la ligación de los fragmentos empleando la enzima T4 DNA ligasa, obteniendo así el constructo denominado *pGFPi* (Figura 8).

Elaboración de la proteína quimérica pGFPintER. Mediante PCR convencional, se amplificó la región codificante de la inteína con el dominio de unión de ligando del receptor de ER (IntER). Para esta amplificación, se utilizaron los primers pMGamp_fwd y pMGamp_rev (tabla 5), los cuales contenían los cortes enzimáticos de las enzimas BamHI y XbaI, este PCR convencional se realizó con la enzima Q5 High fidelity DNA polymerase de la casa comercial New England Biolabs. Posteriormente, se realizó digestión enzimática con la enzima DpnI para eliminar el plásmido molde, finalmente se purificó el amplicón con Monarch PCR & DNA cleanup.

Tabla 5. Cebadores utilizados para el inserto que codifica la inteína con ER.

Nombre	Secuencia 5'-3'	Temperatura de melting	Número de bases
pMGamp_fwd	GACGGCCAGTGAATTACTTGAAGG	68°C	24
pMGamp_rev	TTGTGTGGAATTGTGAGCGGATAAC	67 °C	25

Paralelamente, se realizó digestión enzimática preparativa al plásmido *pGFPi* y del amplicón tratado utilizando las enzimas de restricciones BamHI y XbaI. Ambos fragmentos

digeridos fueron corridos en gel de agarosa al 1% para posteriormente purificarlo con el Monarch Spin DNA Gel Extraction kit de la compañía New England Biolabs. Finalmente, se realizó la ligación de estos fragmentos con el uso de la enzima T4 DNA ligasa, adquirida de la casa comercial New England Biolabs. Este plásmido obtenido fue denominado *pGFPintER* (Figura 8), adicionalmente fue caracterizado mediante patrones de corte de restricciones y secuenciación por Sanger.

Elaboración de la proteína quimérica pGFPintGR. Una vez obtenido el plásmido *pGFPintER*, se continuó con la construcción del plásmido *pGFPintGR* mediante clonación estándar. Para ello, se amplificó la región codificante del dominio de unión a ligando (LBD) del receptor de glucocorticoides presente en el plásmido *pCi*. Esta amplificación se llevó a cabo mediante PCR convencional, empleando la enzima Q5 High fidelity DNA polymerase y los oligonucleótidos *zflBD_fwd_AgeI2* y *zflBD_rev_SpeI2*, cada uno a una concentración de 10 uM (Tabla 6).

Tabla 6. Cebadores utilizados para amplificar LBD -GR del plásmido *pCi*.

Nombre	Secuencia 5'-3'	Temperatura de melting	Número de bases
<i>zflBD_fwd_AgeI2</i>	AAAGTGTAATACCGGTCCGGGAGGATCTGGCACT ATGCTATCACTACTAAAGGCCATTG	81°C	59
<i>zflBD_rev_SpeI2</i>	ACATTAATTGACTAGTGGATGCTCCACTACCGCCG TGAAAGAGCAGCGGTTTAACACTCCCATC	82°C	64

Tras la obtención de los amplificados, se realizó una digestión enzimática con la enzima DnpI por una hora a 37°C, con el objetivo de eliminar el plásmido molde. Posteriormente, los amplicones resultantes se purificaron utilizando el kit Monarch PCR & DNA cleanup. A continuación, se efectuó la digestión enzimática con las enzimas de restricciones AgeI y SpeI. En

paralelo, el plásmido *pGFPintER* fue sometido a digestión con las mismas enzimas, generando así los extremos cohesivos necesarios para la posterior ligación con el inserto de interés.

Finalmente, se corrió en un gel de agarosa al 1% para extraer los fragmentos necesarios para la ligación con la enzima T4 DNA ligase, y transformar en *E. coli* *Neb 5- alpha*. A partir de ahí, se obtuvo el plásmido *pGFPintGR* (ver figura 8). Para confirmar la secuencia del constructo generado se realizó caracterización mediante patrones de corte enzimático y secuenciación por Sanger.

Apéndice J. Transformación bacteriana en *E. coli* BL21

La transformación de *E. coli* BL21 se realizó con 5 ng/ μ L de cada plásmido (*pGFPi*, *pGFPintER* y *pGFPintGR*) en 50 μ l de células tratadas químicamente, seguido de un choque térmico a 42°C durante 30 segundos y recuperación en medio LB ante del plaqueo. Finalmente, se seleccionaron colonias transformantes para la inducción.

Apéndice K. Expresión proteica de la GFP mediante la inducción de IPTG como control del vector.

Para este ensayo, se preparó un cultivo primario inoculando una colonia *E. coli* BL21 con el constructo *pGFPi* en 5 ml de caldo LB suplementado con ampicilina (amp) en una concentración de 100 μ g/ml, incubando durante toda la noche a 37°C con agitación a 200 rpm. Al día siguiente, se transfirieron 100 μ l del cultivo overnight (ON) en 3 ml de caldo LB + amp y se incubó bajo las mismas condiciones durante dos horas, cuando la densidad óptima alcanzará los 0.4 OD600. Con el fin de estandarizar el tiempo de expresión de la proteína GFP inducida con 1 mM de IPTG proveniente de la empresa SIGMA-ALDRICH, se utilizaron 7 tubos de 15 ml. Estos tubos se

designaron para un control negativo (sin inducción) y para mediciones a 1, 2, 3, 4, 5 y 24 horas post-inducción, manteniendo la incubación a 37° C con agitación a 200 rpm.

Para la medición de fluorescencia, las muestras se centrifugaron a 3000 rpm durante 1 minuto al finalizar cada tiempo de expresión de proteína. Tras descartar el sobrenadante, se tomaron 50 µl del precipitado y se transfirieron a un tubo de 0.2 ml. Posteriormente se cuantificó utilizando el equipo Biorad Chemidoc MP imaging Systems, configurado en modo Custom AM UV, visualizando las muestras en el transiluminador con luz azul.

Apéndice L. Expresión proteica de las proteínas pGFPintER y pGFPintGR con la inducción IPTG con diferentes concentraciones de dexametasona y estradiol a 30°C de incubación.

Se llevó a cabo un ensayo de inducción a 30°C, iniciando con un cultivo primario de cada constructo en 5 ml de caldo LB + ampicilina a 37°C durante la noche. Posteriormente, se transfirió 1 ml a 20 ml del mismo medio y se incubó a 37°C con agitación. Al alcanzar una OD600 de 0.4, se indujo con 1 mM de IPTG en los viales designados y se incubó a 30°C con agitación para estudiar la expresión proteica a esta temperatura. Después de tres horas, se añadieron las diferentes concentraciones de estradiol hemihidrato/dienogest y dexametasona, y se midió la fluorescencia a 24 horas.

Para el biosensor *pGFPintER*, se utilizaron cinco viales, se incluyeron: un control negativo (sin inducción) y tratamientos con inducción y concentraciones de estradiol de 0, 1, 10 y 100 µM. De igual forma, el biosensor *pGFPintGR*, se emplearon seis viales, se incluyeron: un control negativo de inducción y tratamientos con inducción y diferentes concentraciones de dexametasona 0, 0.1, 1, 10 y 100 µM. Además, se incluyeron controles adicionales: *pGFPi* (con y sin IPTG),

pShuttle (control de fluorescencia) y *E. coli* BL21 sin plásmido. Para la evaluación del funcionamiento de los biosensores se realizó mediante el mismo procedimiento utilizado para cuantificar la expresión proteica del constructo *pGFPI*.

Finalmente, se verificó la expresión, producción y el posible autoclivaje de los biosensores marcados con GFP a 30°C, utilizando electroforesis en gel de SDS-PAGE al 10%. Se siguieron los mismos protocolos para la preparación de muestras, la corrida del gel, la tinción, decoloración y la obtención de la imagen, tal como se describió previamente.

Apéndice M. *Ensayo de permeabilidad utilizando Cloruro de calcio (CaCl₂) en diferentes concentraciones de dexametasona y estradiol.*

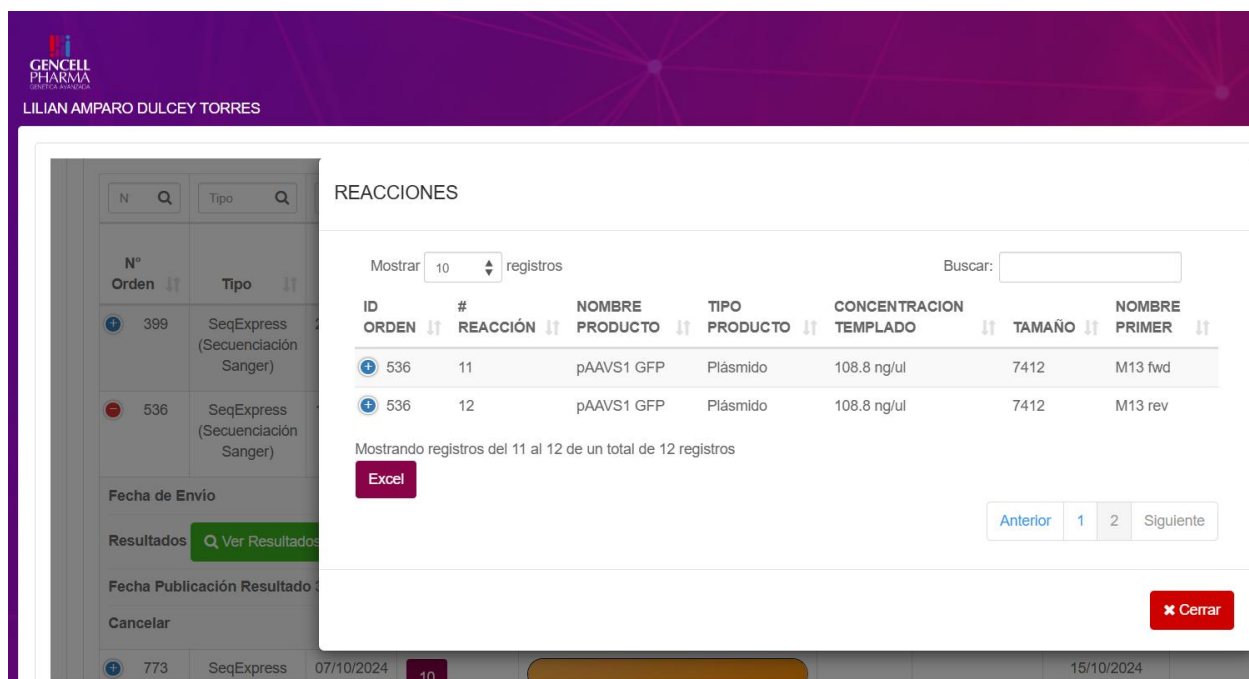
Se efectuó un ensayo de permeabilidad con cloruro de calcio al 100 mM. Inicialmente, se inoculó una colonia de cada constructo en 5 ml de caldo LB con ampicilina a 37°C durante toda la noche. A partir del cultivo primario, se transfirieron 100 µl al 3 ml de caldo LB suplementado con ampicilina, incubando a 37°C con agitación 200 rpm. Al alcanzar la densidad de óptima 0.4 OD₆₀₀, se indujo la expresión en los tubos designados con 1 mM de IPTG y se incubó a 37°C con agitación durante 3 horas.

Posteriormente, se realizaron lavado con cloruro de calcio 100 mM frío en cada vial. Este proceso consistió en centrifugar a 4000 rpm por 10 minutos a 4°C, descartar el sobrenadante y repetir el lavado. Finalmente, el pellet celular se resuspendió en buffer PBS 1x y se agregaron las siguientes concentraciones: 100 µM de dexametasona y 10 µM estradiol hemihidrato/dienogest. La respuesta de los biosensores se midió en dos momentos (0 y 24 horas), manteniendo los tubos

a 37° C sin agitación. Para determinar el funcionamiento del biosensor se aplicó el mismo método de cuantificación de la expresión proteica que se empleó previamente para el constructo *pGFPi*.

Adicionalmente, se verificó la expresión proteica y el posible autoclivaje de los biosensores acoplados GFP mediante electroforesis en gel de SDS-PAGE al 10%. Además, se corroboró la fluorescencia utilizando citometría de flujo con el equipo Attune NxT invitrogen.

Apéndice N. Verificación de la plataforma de secuenciación del plásmido *pRInt*.



The screenshot displays a web-based interface for managing laboratory reactions. At the top left, the logo for GENCELL PHARMA is visible, along with the name LILIAN AMPARO DULCEY TORRES. The main content area is titled "REACCIONES" and features a search bar and a "Mostrar" dropdown set to "10 registros". Below this is a table with the following data:

ID	#	NOMBRE PRODUCTO	TIPO PRODUCTO	CONCENTRACION TEMPLADO	TAMAÑO	NOMBRE PRIMER
536	11	pAAVS1 GFP	Plásmido	108.8 ng/ul	7412	M13 fwd
536	12	pAAVS1 GFP	Plásmido	108.8 ng/ul	7412	M13 rev

Below the table, it indicates "Mostrando registros del 11 al 12 de un total de 12 registros". There are buttons for "Excel", "Anterior", "1", "2", "Siguiete", and "Cerrar". The interface also shows a sidebar with filters for "Nº Orden", "Tipo", "Fecha de Envío", "Resultados", "Fecha Publicación Resultado", and "Cancelar".

GENCELL PHARMA
LILIAN AMPARO DULCEY TORRES

N° Tipo

N°	Tipo
399	SeqExpress (Secuenciación Sanger)
536	SeqExpress (Secuenciación Sanger)

Fecha de Envío

Resultados

Fecha Publicación Resultado

REACCIONES

Mostrar 10 registros

ID ORDEN	# REACCIÓN	NOMBRE PRODUCTO	TIPO PRODUCTO	CONCENTRACION TEMPLADO	TAMAÑO
399	1	pAAVS1-10XUAS:GFP	Plásmido	116.6	7412
399	2	pAAVS1-10XUAS:GFP	Plásmido	116.6	7412
399	3	pAAVS1-10XUAS:GFP	Plásmido	116.6	7412
399	4	pAAVS1-10XUAS:GFP	Plásmido	116.6	7412

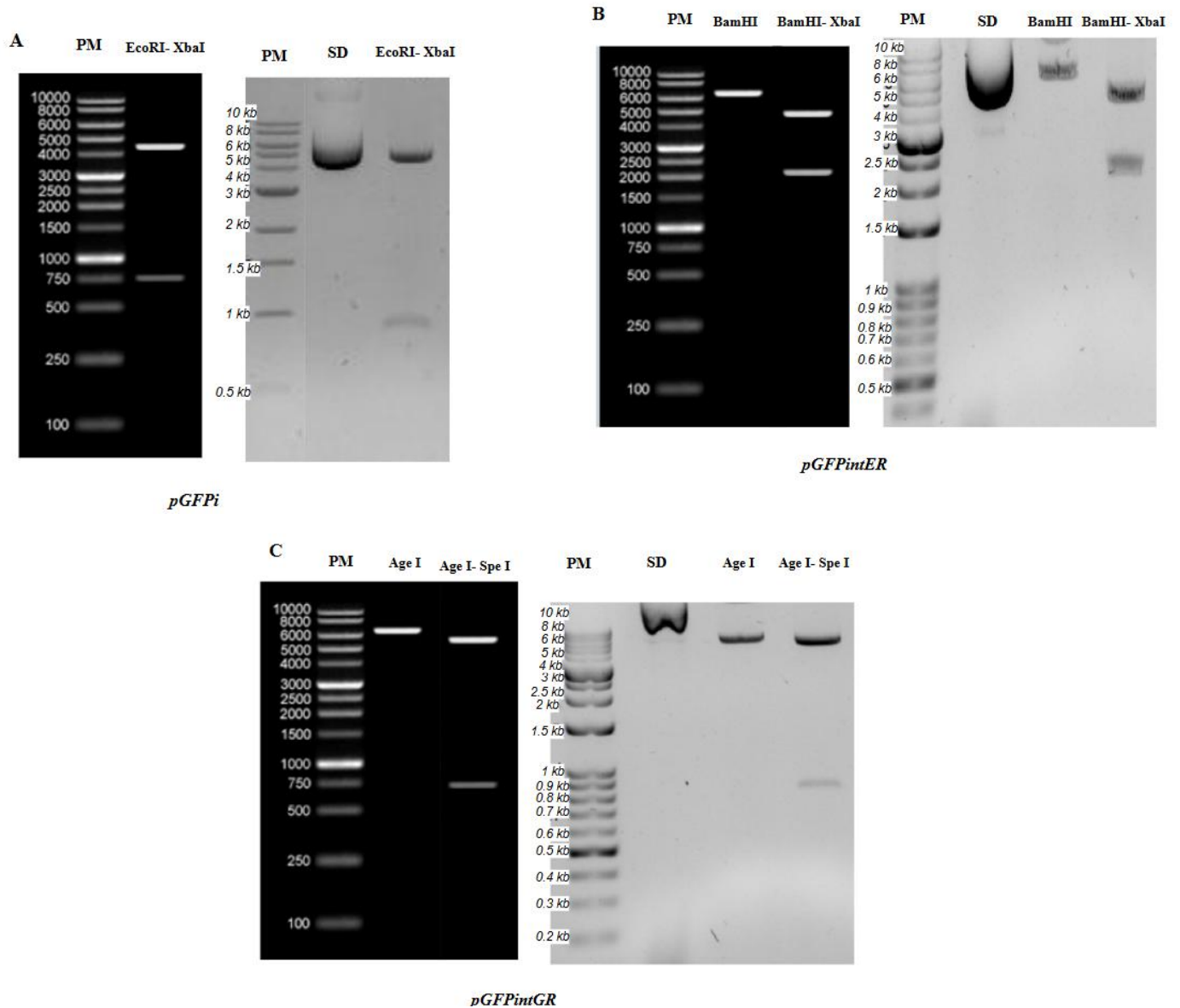
Apéndice O. Verificación de los plásmidos *pGFPI*, *pGFPintER* y *pGFPintGR* por medio de digestión enzimática.

Específicamente, para el constructo *pGFPI*, se analizó los patrones de digestión enzimática generados por las enzimas EcoRI y XbaI. Estas enzimas cortan el gen GFP completamente, resultando en un fragmento de 750 pb, por lo cual se confirma en el gel de electroforesis (Figura 21 A).

En el caso del plásmido *pGFPintER*, se utilizó las enzimas de restricción Xba I y Bam HI, con el fin de escindir el en cassette de la proteína quimérica intER, del cual se obtuvo un peso molecular de 2019 pb (Figura 21 B). Finalmente, para la verificación del constructo *pGFPintGR* se empleó las enzimas Age I y Spe I, estas enzimas se seleccionó ya que cortaba específicamente el fragmento LBD-GR, lo que resulta en un peso molecular de 775 pb, lo que se evidencia en la electroforesis (Figura 21 C). En todos los casos, los resultados obtenidos fueron comparados con los patrones de cortes esperados, visualizados mediante el software SnapGene Viewer y

corroborados con la herramienta de licencia libre Restriction Analyzer <https://molbiotools.com/restrictionanalyzer.php>.

Figura 21. Caracterización de los constructos *pGFPI*, *pGFPintER* y *pGFPintGR* mediante digestión con enzimas de restricción.



Nota: Esta figura muestra la caracterización de los plásmidos *pGFPI*, *pGFPintER* y *pGFPintGR* con sus respectivos enzimas de restricción. Del lado derecho de cada panel (A, B y C) presenta los

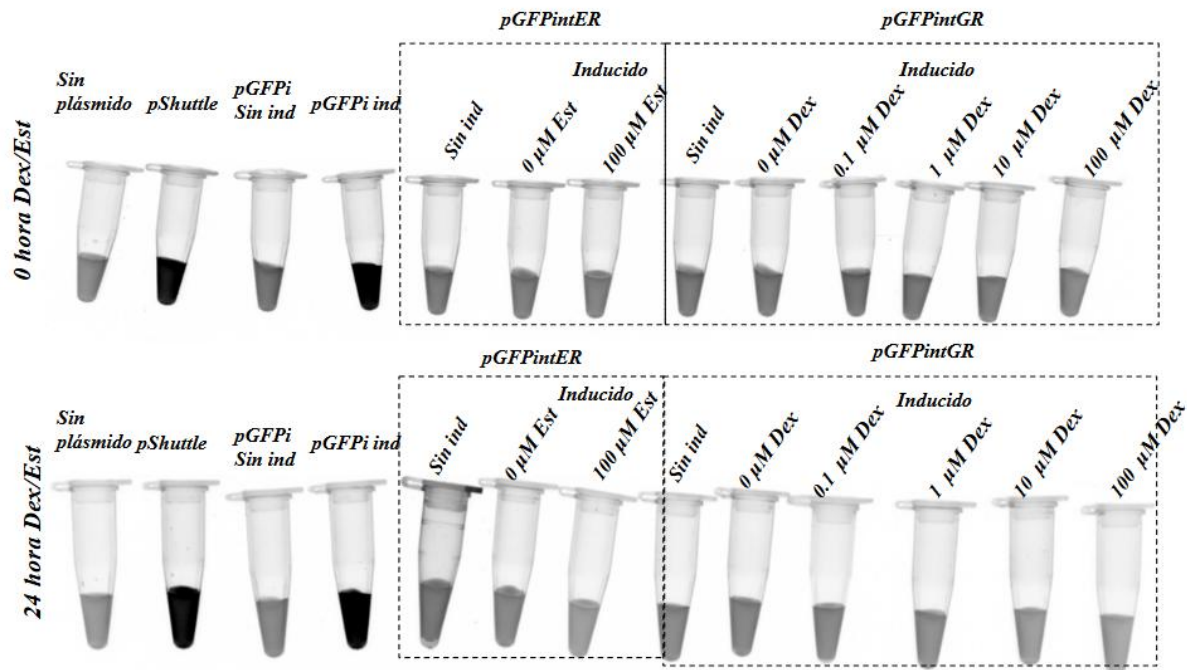
patrones de cortes predichos para los plásmidos evaluados. El lado izquierdo, por su parte, visualiza los resultados de los cortes experimentales para cada plásmido con sus respectivas endonucleasas de restricción. A. Se evidencia el corte enzimático del plásmido *pGFPi*, que resultó en dos fragmentos de 4536 pb y 750 pb. B. Se observa el corte enzimático del plásmido *pGFPintER*, este presenta dos cortes con tamaño de 4542 pb y 2019 pb. C. Se visualiza los cortes enzimáticos del constructo *pGFPintGR*, produciendo fragmentos a alturas de 5778 pb y 774 pb. PM: marcador del peso molecular, SD: plásmido sin digerir.

Apéndice P. Verificación de la plataforma de secuenciación de los plásmidos *pGFPi*, *pGFPintER* y *pGFPintGR*.

GENCELL PHARMA
LILIAN AMPARO DULCEY TORRES

ID ORDEN	# REACCIÓN	NOMBRE PRODUCTO	TIPO PRODUCTO	CONCENTRACION TEMPLADO	TAMAÑO	NOMBRE PRIMER
536	1	pLAC-ER	Plásmido	53.6 ng/ul	6561	M13 fwd
536	2	pLAC-ER	Plásmido	53.6 ng/ul	6561	M13 rev
536	3	pLAC-ER	Plásmido	53.6 ng/ul	6561	MtuNiseq_f
536	4	PLAC-ER	Plásmido	53.6 ng/ul	6561	MtuCiseq_r
536	5	PLAC-ER	Plásmido	53.6 ng/ul	6561	GFPcseq_r
536	6	pLAC-GR	Plásmido	50 ng/ul	6578	M13 fwd
536	7	pLAC-GR	Plásmido	50 ng/ul	6578	M13 rev
536	8	pLAC-GR	Plásmido	50 ng/ul	6578	MtuNiseq_f
536	9	pLAC-GR	Plásmido	50 ng/ul	6578	MtuCiseq_r
536	10	pLAC-GR	Plásmido	50 ng/ul	6578	GFPcseq_r

Apéndice Q. Fotografía de la inducción a 37°C de las proteínas quiméricas *GFPintER* y *GFPintGR*.



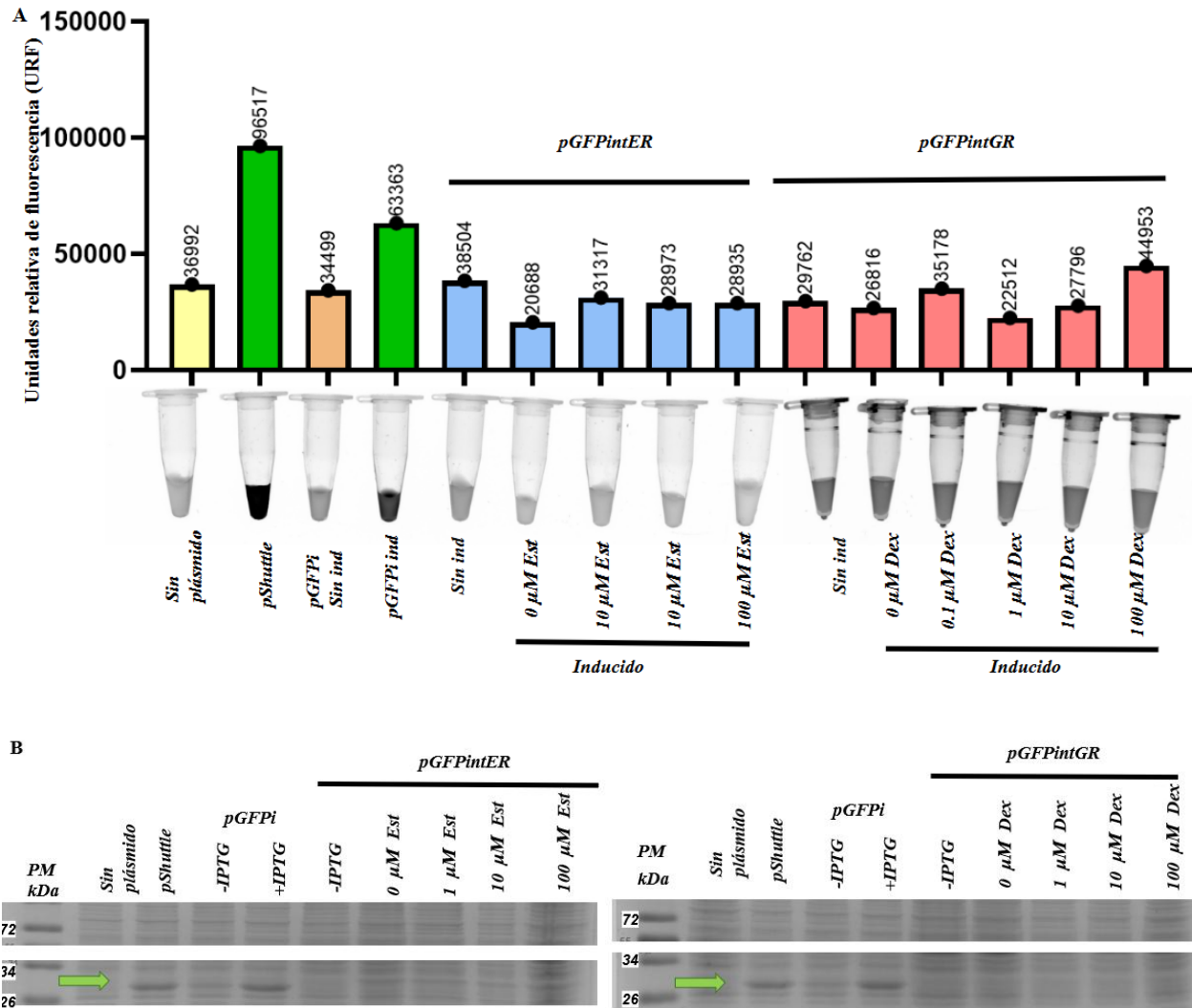
Apéndice R. Expresión proteica a 30°C de los constructos *pGFPintER* y *pGFPintGR* mediante la inducción de IPTG.

Dados los resultados previos, se repitió el ensayo de inducción y activación de las proteínas quiméricas, pero esta vez se modificó la temperatura de inducción a 30°C durante 24 horas de exposición a los medicamentos seleccionados. Se observó que, a temperatura de incubación, los niveles de fluorescencia de los controles *pShuttle* y *pGFPi* inducido no se vieron afectados. Sin embargo, los constructos *pGFPintER* y *pGFPintGR* no se evidenció respuesta dosis-dependiente a las diferentes concentraciones de dexametasona o hemihidrato de estradiol (Figura 22 A).

De manera similar, se verificó la producción de las proteínas quiméricas mediante electroforesis en gel de SDS-PAGE al 10%. Aunque la GFP en los controles fue visible en su peso molecular esperado, no se observó claramente la producción de las proteínas quiméricas en el gel.

Esto sugiere que la inducción de dichas proteínas no fue eficiente, lo que explica la ausencia de fluorescencia después de 24 horas de exposición a los medicamentos (Figura 22 B).

Figura 22. Expresión y activación de los biosensores *pGFPintER* y *pGFPintGR* a 30°C con diferentes concentraciones de hemihidrato de estradiol y dexametasona.



Nota: En la figura A se ilustra los valores URF para cada muestra, la toma de lectura se realizó en el equipo de Chemidoc™ XRS. Se observa que solo los controles (*pShuttle* y *pGFPi*) exhiben niveles elevados de fluorescencia. Por otro lado, en la figura B muestra la producción de GFP en

los controles, pero no se aprecia claramente la generación de las proteínas quiméricas en las distintas dosis de los medicamentos (Dex: dexametasona, Est: Hemihidrato de estradiol).

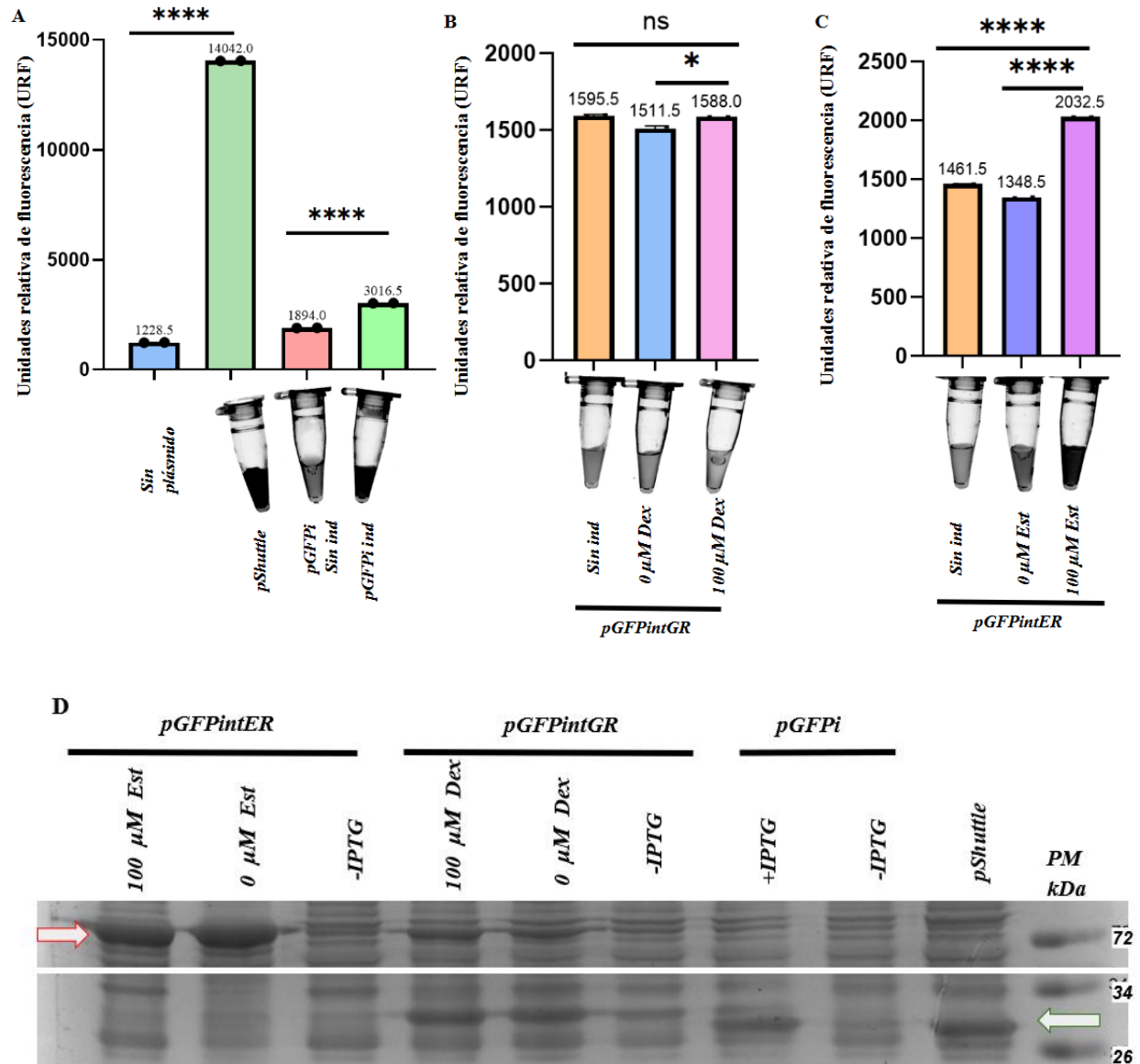
Apéndice S. Ensayo de permeabilidad con cloruro de calcio ($CaCl_2$) con los constructos *pGFPintER* y *pGFPintGR* inducido por IPTG.

Tras realizar la inducción y activación de las proteínas quiméricas a 30 °C, se propuso un tratamiento de lavado celular que incluyó el uso de cloruro de calcio 100 mM a bajas temperaturas (4°C). Este procedimiento se implementó con el fin de mejorar la permeabilidad de la membrana, neutralizando la repulsión electrostática que podría generarse por la interacción de los medicamentos con las proteínas de membrana (Lim et al. 2015).

En este caso, se observó la activación de la proteína quimérica *pGFPintER* con 100 μM de hemihidrato de estradiol, registrando 2032.5 URF (Figura 23B). Este resultado sugiere que el sistema de inteína propuesto es funcional. Sin embargo, el constructo quimérico *pGFPintGR* no mostró activación con su analito (100 μM de dexametasona) (Figura 23 C).

Posteriormente, se verificó nuevamente la reconstitución de la proteína GFP en los constructos quiméricos mediante electroforesis SDS-PAGE al 10%. A pesar de la fluorescencia observada en la proteína quimérica *pGFPintER* con 100 μM de hemihidrato de estradiol, no se evidenció la liberación de la proteína reportera. No obstante, este análisis confirmó que el tratamiento con cloruro de calcio 100 mM no afectó la inducción de las proteínas *pGFPintGR* y *pGFPintER*.

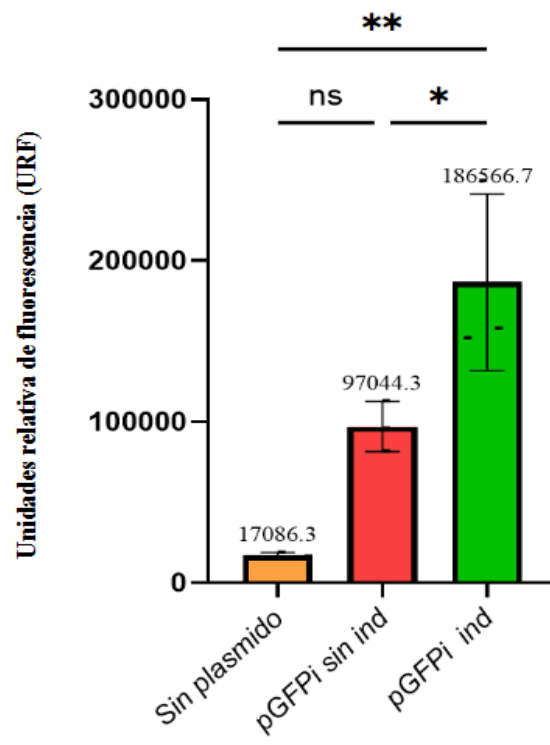
Figura 23. Expresión y activación de los biosensores *pGFPintER* y *pGFPintGR* posterior al tratamiento con cloruro de calcio.



Nota: En la figura A presenta los controles experimentales, donde se observa la fluorescencia de los plásmidos *pshuttle* y *pGFPI*. Por su parte, la figura B y C ilustran la expresión de los constructos *pGFPintGR* y *pGFPintER* en condiciones no inducida (Sin ind) y tras la inducción con IPTG en presencia de concentraciones de 0 y 100 μ M de los medicamentos. Finalmente, la figura D

evidencia la producción de las proteínas quiméricas (indicadas con una flecha roja) y la GFP de los controles (señaladas con una flecha verde).

Apéndice T. Control de fluorescencia pGFPi después de inducción de 1 mM IPTG a 25°C.



Referencias Bibliográficas

Ahmad, I., Jena, I., & Priyadarshi, A. (2023). *Mathematical modelling of hypothalamus-pituitary-adrenal axis dynamics: A review, a novel approach, and future*. arXiv <https://doi.org/10.1016/j.fct.2023.114048>.

Ahn, C., & Jeung, E.-B. (2023). Endocrine-Disrupting Chemicals and Disease Endpoints. *International Journal of Molecular Sciences*, 24(6), 5342.

Alves, N. R. C., Pecci, A., & Alvarez, L. D. (2020). Structural Insights into the Ligand Binding Domain of the Glucocorticoid Receptor: A Molecular Dynamics Study. *Journal of chemical information and modeling*, 60(2), 794–804.

Arias, M. P., Castro-Feijóo, L., Conde, J. B., & Rodríguez, P. C. (2020). Una revisión sobre los disruptores endocrinos y su posible impacto sobre la salud de los humanos. *Rev Esp. Endocrinol Pediatr*, 11(2), 33-53.

Arslan, P., Özeren, S., & Dikmen, B. (2021). The Effects of Endocrine Disruptors on Fish...

Atroshenko, D. L., Sergeev, E. P., Golovina, D. I., & Pometun, A. A. (2024). Additivities for Soluble Recombinant Protein Expression in Cytoplasm of *Escherichia coli*. *Fermentation*, 10(3), 120.

Audouze, K., Sarigiannis, D., Alonso-Magdalena, P., Brochot, C., Casas, M., Vrijheid, M., Babin, P., Karakitsios, S., Coumoul, X., & Barouki, R. (2020). Integrative Strategy of Testing Systems for Identification of Endocrine Disruptors Inducing Metabolic Disorders—An Introduction to the OBERON Project. *International Journal of Molecular Sciences*, 21. <https://doi.org/10.3390/ijms21082988>.

Baliga, U. K., Gurunian, A., Nogales, A., Martinez-Sobrido, L., & Dean, D. A. (2025). Electroporation- and Liposome-Mediated Co-Transfection of Single and Multiple Plasmids. *Pharmaceutics*, 17(7), 905. <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics17070905>

Bartlett, A. A., Lapp, H. E., & Hunter, R. G. (2019). Epigenetic Mechanisms of the Glucocorticoid Receptor. *Trends in endocrinology and metabolism: TEM*, 30(11), 807–818. <https://doi.org/10.1016/j.tem.2019.07.003>

Beaupere, C., Liboz, A., Fève, B., Blondeau, B., & Guillemain, G. (2021). Molecular Mechanisms of Glucocorticoid-Induced Insulin Resistance. *International journal of molecular sciences*, 22(2), 623. <https://doi.org/10.3390/ijms22020623>

Bernardi, A., Gobelli, D., Serna, J., Nawrocka, P., March-Rosselló, G., Orduña, A., Kozłowski, P., Simarro, M., & de la Fuente, M. A. (2021). Novel fluorescent-based reporter cell line engineered for monitoring homologous recombination events. *PloS one*, 16(4), e0237413.

Bhatwa, A., Wang, W., Hassan, Y. I., Abraham, N., Li, X. Z., & Zhou, T. (2021). Challenges Associated With the Formation of Recombinant Protein Inclusion Bodies in *Escherichia coli* and Strategies to Address Them for Industrial Applications. *Frontiers in bioengineering and biotechnology*, 9, 630551.

Bhaumik, S., Lockett, J., Cuffe, J., & Clifton, V. L. (2023). Glucocorticoids and Their Receptor Isoforms: Roles in Female Reproduction, Pregnancy, and Foetal Development. *Biology*, 12(8), 1104. <https://doi.org/10.3390/biology12081104>

Bijlani, S., Pang, K. M., Sivanandam, V., Singh, A., & Chatterjee, S. (2022). The Role of Recombinant AAV in Precise Genome Editing. *Frontiers in genome editing*, 3, 799722. <https://doi.org/10.3389/fged.2021.799722>

Browne, P., Van Der Wal, L., & Gourmelon, A. (2020). OECD approaches and considerations for regulatory evaluation of endocrine disruptors. *Molecular and cellular endocrinology*, 504, 110675. <https://doi.org/10.1016/j.mce.2019.110675>

Browning, D. F., Godfrey, R. E., Richards, K. L., Robinson, C., & Busby, S. J. W. (2019). Exploitation of the *Escherichia coli* lac operon promoter for controlled recombinant protein production. *Biochemical Society transactions*, 47(2), 755–763. <https://doi.org/10.1042/BST20190059>

Buchwald P. (2020). A single unified model for fitting simple to complex receptor response data. *Scientific reports*, 10(1), 13386. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-70220-w>

Buchwald P. (2022). Quantification of receptor binding from response data obtained at different receptor levels: a simple individual sigmoid fitting and a unified SABRE approach. *Scientific reports*, 12(1), 18833. <https://doi.org/10.1038/s41598-022-23588-w>

Buskirk, A. R., Ong, Y. C., Gartner, Z. J., & Liu, D. R. (2004). Directed evolution of ligand dependence: small-molecule-activated protein splicing. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 101(29), 10505–10510. <https://doi.org/10.1073/pnas.0402762101>

Carrió, M. M., & Villaverde, A. (2002). Construction and deconstruction of bacterial inclusion bodies. *Journal of biotechnology*, 96(1), 3–12. [https://doi.org/10.1016/s0168-1656\(02\)00032-9](https://doi.org/10.1016/s0168-1656(02)00032-9)

Chadha, U., Bhardwaj, P., Agarwal, R., Rawat, P., Agarwal, R., Gupta, I., Panjwani, M., Singh, S., Ahuja, C., Selvaraj, S., Banavoth, M., & Sonar, P. (2022). Recent progress and growth in biosensors technology: A critical review. *Journal of Industrial and Engineering Chemistry*. <https://doi.org/10.1016/j.jiec.2022.02.010>.

Chen, Q., Zhou, C., Shi, W., Wang, X., Xia, P., Song, M., Liu, J., Zhu, H., Zhang, X., Wei, S., & Yu, H. (2020). Mechanistic in silico modeling of bisphenols to predict estrogen and glucocorticoid disrupting potentials.. *The Science of the total environment*, 728, 138854 .
<https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.138854>.

Chourpiliadis C, Aeddula NR. Fisiología, Glucocorticoides. [Actualizado el 17 de julio de 2023]. En: StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; enero de 2025. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK560897/>

Cole, A. R., Blackwell, B. R., Cavallin, J. E., Collins, J. E., Kittelson, A. R., Shmaitelly, Y. M., Langan, L. M., Villeneuve, D. L., & Brooks, B. W. (2025). Comparative glucocorticoid receptor agonism: In silico, in vitro, and in vivo and identification of potential biomarkers for synthetic glucocorticoid exposure. *Environmental toxicology and chemistry*, vgae041. Advance online publication. <https://doi.org/10.1093/etojnl/vgae041>

Cuevas-Velazquez, C. L., Velloso, T., Guadalupe, K., Schmidt, H. B., Yu, F., Moses, D., Brophy, J. A. N., Cosio-Acosta, D., Das, A., Wang, L., Jones, A. M., Covarrubias, A. A., Sukenik, S., & Dinneny, J. R. (2021). Intrinsically disordered protein biosensor tracks the physical-chemical effects of osmotic stress on cells. *Nature communications*, 12(1), 5438.
<https://doi.org/10.1038/s41467-021-25736-8>

Das, C., & Vijayan, M. (2023). Cortisol Rapidly Facilitates Glucocorticoid Receptor Translocation to the Plasma Membrane in Primary Trout Hepatocytes. *Biology*, 12.
<https://doi.org/10.3390/biology12020311>.

Das, D., & Mahalik, S. (2024). Engineering Escherichia coli to metabolize sorbitol as the sole carbon source for synthesis of recombinant L-Asparaginase-II. *Preparative Biochemistry & Biotechnology*, 55, 567 - 576. <https://doi.org/10.1080/10826068.2024.2440425>.

DeCourten, B., DeCourten, B., DeCourten, B., Forbes, J., Roark, H., Burns, N., Major, K., White, J., Li, J., Mehinto, A., Connon, R., & Brander, S. (2020). Multigenerational and transgenerational effects of environmentally relevant concentrations of endocrine disruptors in an estuarine fish model. *Environmental science & technology*. <https://doi.org/10.1021/acs.est.0c02892>.

Diaz-Jimenez, D., Kolb, J. P., & Cidlowski, J. A. (2021). Glucocorticoids as Regulators of Macrophage-Mediated Tissue Homeostasis. *Frontiers in immunology*, 12, 669891. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2021.669891>

EURION Cluster. (s. f.). Cluster Overview. EURION – European Cluster to Improve Identification of Endocrine Disruptors. <https://eurion-cluster.eu/about/cluster-overview/>

Egalini, F., Marinelli, L., Rossi, M., Motta, G., Prencipe, N., Giaccherino, R., Pagano, L., Grottoli, S., & Giordano, R. (2022). Endocrine disrupting chemicals: effects on pituitary, thyroid and adrenal glands. *Endocrine*, 78, 395 - 405. <https://doi.org/10.1007/s12020-022-03076-x>.

Escoter-Torres, L., Caratti, G., Mechtidou, A., Tuckermann, J., Uhlenhaut, N. H., & Vettorazzi, S. (2019). Fighting the fire: mechanisms of inflammatory gene regulation by the glucocorticoid receptor. *Frontiers in immunology*, 10, 1859.

Feldt-Rasmussen, U., Effraimidis, G., & Klose, M. (2021). The hypothalamus-pituitary-thyroid (HPT)-axis and its role in physiology and pathophysiology of other hypothalamus-pituitary functions. *Molecular and cellular endocrinology*, 525, 111173. <https://doi.org/10.1016/j.mce.2021.111173>

Fouyet, S., Ferger, M. C., Leproux, P., Rat, P., & Dutot, M. (2024). Advancing Endocrine Disruptors via In Vitro Evaluation: Recognizing the Significance of the Organization for Economic Co-Operation and Development and United States Environmental Protection Agency Guidelines,

Embracing New Assessment Methods, and the Urgent Need for a Comprehensive Battery of Tests. *Toxics*, 12(3), 183. <https://doi.org/10.3390/toxics12030183>

Galati, A., Brown, E. S., Bove, R., Vaidya, A., & Gelfand, J. (2021). Glucocorticoids for therapeutic immunosuppression: Clinical pearls for the practicing neurologist. *Journal of the neurological sciences*, 430, 120004. <https://doi.org/10.1016/j.jns.2021.120004>

Grignard, E., De Jesus, K., & Hubert, P. (2022). Regulatory Testing for Endocrine Disruptors; Need for Validated Methods and Integrated Approaches. *Frontiers in Toxicology*, 3. <https://doi.org/10.3389/ftox.2021.821736>.

Guarnotta, V., Amodei, R., Frasca, F., Aversa, A., & Giordano, C. (2022). Impact of Chemical Endocrine Disruptors and Hormone Modulators on the Endocrine System. *International journal of molecular sciences*, 23(10), 5710. <https://doi.org/10.3390/ijms23105710>

Gupta, N., Renugopalakrishnan, V., Liepmann, D., Paulmurugan, R., & Malhotra, B. D. (2019). Cell-based biosensors: Recent trends, challenges and future perspectives. *Biosensors & Bioelectronics*, 141, Article 111435. <https://doi.org/10.1016/j.bios.2019.111435>

Hayashi, H., Kubo, Y., Izumida, M., & Matsuyama, T. (2020). Efficient viral delivery of Cas9 into human safe harbor. *Scientific reports*, 10(1), 21474. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-78450-8>

Ho, V., Pelland-St-Pierre, L., Gravel, S., Bouchard, M. F., Verner, M. A., & Labrèche, F. (2022). Endocrine disruptors: Challenges and future directions in epidemiologic research. *Environmental research*, 204(Pt A), 111969. <https://doi.org/10.1016/j.envres.2021.111969>

Hothersall, J., Godfrey, R. E., Fanitsios, C., Overton, T. W., Busby, S. J. W., & Browning, D. F. (2021). The PAR promoter expression system: Modified lac promoters for controlled

recombinant protein production in *Escherichia coli*. *New biotechnology*, 64, 1–8.
<https://doi.org/10.1016/j.nbt.2021.05.001>

Hu, Y., Jiang, Y., Zhang, Z., Wang, J., Zhang, B., Gong, L., Ji, L., Pu, Z., Yang, X., Zou, J., & Yin, Y. (2022). Oncogenic Activity of Glucocorticoid Receptor β Is Controlled by Ubiquitination-Dependent Interaction with USP49 in Glioblastoma Cells. *Molecular cancer research : MCR*, 20(1), 92–101. <https://doi.org/10.1158/1541-7786.MCR-20-1068>

Ilias, I., Milionis, C., & Zoumakis, E. (2022). An Overview of Glucocorticoid-Induced Osteoporosis. In K. R. Feingold (Eds.) et. al., *Endotext*. MDText.com, Inc.

Imamoglu, R., Balchin, D., Hayer-Hartl, M., & Hartl, F. U. (2020). Bacterial Hsp70 resolves misfolded states and accelerates productive folding of a multi-domain protein. *Nature communications*, 11(1), 365. <https://doi.org/10.1038/s41467-019-14245-4>

Inshyna, N. M., Chorna, I. V., Primova, L. O., Hrebenyk, L. I., & Khyzhnia, Y. V. (2020). Biosensors: Design, classification and application. **Journal of Nano- and Electronic Physics**, 12(3), Article 03033. [https://doi.org/10.21272/jnep.12\(3\).03033](https://doi.org/10.21272/jnep.12(3).03033)

Jasrotia, R., Langer, S. & Dhar, M. Endocrine Disrupting Chemicals in Aquatic Ecosystem: An Emerging Threat to Wildlife and Human Health. *Proc Zool Soc* 74, 634–647 (2021).
<https://doi.org/10.1007/s12595-021-00410-5>

Jester, B. W., Tinberg, C. E., Rich, M. S., Baker, D., & Fields, S. (2018). Engineered Biosensors from Dimeric Ligand-Binding Domains. *ACS synthetic biology*, 7(10), 2457–2467.
<https://doi.org/10.1021/acssynbio.8b00242>

Jácome Roca, A., Ardila Ardila, E., & Casas Figueroa, L. A. (2022). *Fisiología endocrina* (1.^a ed.). Editorial El Manual Moderno.

Kar, S., Sangem, P., Anusha, N., & Senthilkumaran, B. (2021). Endocrine disruptors in teleosts: Evaluating environmental risks and biomarkers. *Aquaculture and Fisheries*, 6(1), 1-26.

Kawakami, K., Asakawa, K., Hibi, M., Itoh, M., Muto, A., & Wada, H. (2016). Gal4 Driver Transgenic Zebrafish: Powerful Tools to Study Developmental Biology, Organogenesis, and Neuroscience. *Advances in genetics*, 95, 65–87. <https://doi.org/10.1016/bs.adgen.2016.04.002>

Kenda, M., Kuželícki, K., Iida, M., Kojima, H., & Dolenc, M. (2020). Triclocarban, Triclosan, Bromochlorophene, Chlorophene, and Climbazole Effects on Nuclear Receptors: An in Silico and in Vitro Study. *Environmental Health Perspectives*, 128. <https://doi.org/10.1289/EHP6596>.

Koch, M., Pandi, A., Borkowski, O., Batista, A. C., & Faulon, J.-L. (2019). Custom-made transcriptional biosensors for metabolic engineering. *Current Opinion in Biotechnology*, 59, 78–84. <https://doi.org/10.1016/j.copbio.2019.02.016>

Kroon, J., Pereira, A. M., & Meijer, O. C. (2020). Glucocorticoid sexual dimorphism in metabolism: dissecting the role of sex hormones. *Trends in Endocrinology & Metabolism*, 31(5), 357-367.

Kuckuck, S., van der Valk, E. S., Scheurink, A. J. W., van der Voorn, B., Iyer, A. M., Visser, J. A., Delhanty, P. J. D., van den Berg, S. A. A., & van Rossum, E. F. C. (2023). Glucocorticoids, stress and eating: The mediating role of appetite-regulating hormones. *Obesity reviews : an official journal of the International Association for the Study of Obesity*, 24(3), e13539. <https://doi.org/10.1111/obr.13539>

Kumar, R., & Thompson, E. (2019). Role of Phosphorylation in the Modulation of the Glucocorticoid Receptor's Intrinsically Disordered Domain. *Biomolecules*, 9. <https://doi.org/10.3390/biom9030095>.

Laksmi, F. A., Nuryana, I., Vivid, C., & Hadi, M. I. (2023). Autoinduction expression of Bst DNA polymerase using lac operon-controlled expression systems in *Escherichia coli*. IOP Conference Series. Earth and Environmental Science, 1255(1), 12050. <https://doi.org/10.1088/1755-1315/1255/1/012050>

Lauretta, R., Sansone, A., Sansone, M., Romanelli, F., & Appetecchia, M. (2019). Endocrine Disrupting Chemicals: Effects on Endocrine Glands. *Frontiers in endocrinology*, 10, 178. <https://doi.org/10.3389/fendo.2019.00178>

Leng, Y., Sun, Y., Huang, W., Lv, C., Cui, J., Li, T., & Wang, Y. (2020). Phthalate esters and dexamethasone synergistically activate glucocorticoid receptor. *Journal of environmental science and health. Part A, Toxic/hazardous substances & environmental engineering*, 55(14), 1581–1588. <https://doi.org/10.1080/10934529.2020.1826775>

Leng, Y., Ren, L., Niu, S., Zhang, T., & Zhang, J. (2021). In vitro and in silico investigations of endocrine disruption induced by metabolites of plasticizers through glucocorticoid receptor. *Food and chemical toxicology : an international journal published for the British Industrial Biological Research Association*, 155, 112413. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2021.112413>

Liang, Y., Gong, Y., Jiang, Q., Yu, Y., & Zhang, J. (2023). Environmental endocrine disruptors and pregnane X receptor action: A review.. *Food and chemical toxicology : an international journal published for the British Industrial Biological Research Association*, 113976. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2023.113976>.

Liang R, Zhou J, Liu J 2011. Construction of a Bacterial Assay for Estrogen Detection Based on an Estrogen-Sensitive Intein. *Appl Environ Microbiol* 77:. <https://doi.org/10.1128/AEM.02336-10>

Lim, G., Lum, D., Ng, B., & Sam, C. (2015). Differential Transformation Efficiencies Observed for pUC 19 and pBR 322 in *E. coli* May Be Related to Calcium Chloride Concentration

Lockett, J., Inder, W. J., & Clifton, V. L. (2024). The Glucocorticoid Receptor: Isoforms, Functions, and Contribution to Glucocorticoid Sensitivity. *Endocrine reviews*, 45(4), 593–624.

<https://doi.org/10.1210/endrev/bnae008>

Lozano Terol, G., Gallego-Jara, J., Sola Martínez, R. A., Martínez Vivancos, A., Cánovas Díaz, M., & de Diego Puente, T. (2021). Impact of the Expression System on Recombinant Protein Production in *Escherichia coli* BL21. *Frontiers in microbiology*, 12, 682001.

<https://doi.org/10.3389/fmicb.2021.682001>

Lufino, M. M., Edser, P. A., & Wade-Martins, R. (2008). Advances in high-capacity extrachromosomal vector technology: episomal maintenance, vector delivery, and transgene expression. *Molecular therapy : the journal of the American Society of Gene Therapy*, 16(9), 1525–1538.

<https://doi.org/10.1038/mt.2008.156>

Macedo, S., Teixeira, E., Gaspar, T. B., Boaventura, P., Soares, M. A., Miranda-Alves, L., & Soares, P. (2023). Endocrine-disrupting chemicals and endocrine neoplasia: A forty-year systematic review. *Environmental research*, 218, 114869.

<https://doi.org/10.1016/j.envres.2022.114869>

Malik, S., Singh, J., Goyat, R., Saharan, Y., Chaudhry, V., Umar, A., Ibrahim, A., Akbar, S., Ameen, S., & Baskoutas, S. (2023). Nanomaterials-based biosensor and their applications: A review. *Heliyon*, 9. <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2023.e19929>.

Mao, L., Wei, W., & Chen, J. (2023). Biased regulation of glucocorticoid receptors signaling. *Biomedicine & pharmacotherapy = Biomedecine & pharmacotherapie*, 165, 115145.

<https://doi.org/10.1016/j.biopha.2023.115145>

Martinez, G. J., Appleton, M., Kipp, Z. A., Loria, A. S., Min, B., & Hinds Jr, T. D. (2024). Glucocorticoids, their uses, sexual dimorphisms, and diseases: new concepts, mechanisms, and discoveries. *Physiological reviews*, 104(1), 473-532.

Mata Calidonio, J., & Hamad-Schifferli, K. (2025). Redefining antibody cross-reactivity as an advantage for sensing and diagnostics. *Trends in Biotechnology (Regular Ed.)*.

Matamoros, R. Principios básicos del sistema endocrino. *Fundamentos de fisiología y endocrinología reproductiva en animales domésticos*, 11.

Meakin, C., Szilagyi, J., Avula, V., & Fry, R. (2020). Inorganic arsenic and its methylated metabolites as endocrine disruptors in the placenta: Mechanisms underpinning glucocorticoid receptor (GR) pathway perturbations.. *Toxicology and applied pharmacology*, 115305 .
<https://doi.org/10.1016/j.taap.2020.115305>.

Meyer, E. J., Nenke, M. A., Lewis, J. G., & Torpy, D. J. (2017). Corticosteroid-binding globulin: acute and chronic inflammation. *Expert Review of Endocrinology & Metabolism*, 12(4), 241–251. <https://doi.org/10.1080/17446651.2017.1332991>

Monneret C. (2017). What is an endocrine disruptor?. *Comptes rendus biologies*, 340(9-10), 403–405. <https://doi.org/10.1016/j.crv.2017.07.004>

Montanari, E., Gennari, A., Pelliccia, M., Manzi, L., Donno, R., Oldham, N. J., MacDonald, A., & Tirelli, N. (2018). Tyrosinase-Mediated Bioconjugation. A Versatile Approach to Chimeric Macromolecules. *Bioconjugate chemistry*, 29(8), 2550–2560.
<https://doi.org/10.1021/acs.bioconjchem.8b00227>

Morris, M., Pascoe, J., & Busada, J. (2025). In vitro to in vivo evidence for chemical disruption of glucocorticoid receptor signaling. *bioRxiv*.
<https://doi.org/10.1101/2025.03.07.642104>.

Nanda, A., Nasker, S., Mehra, A., Panda, S., & Nayak, S. (2020). Inteins in Science: Evolution to Application. *Microorganisms*, 8. <https://doi.org/10.3390/microorganisms8122004>.

Naresh, V., & Lee, N. (2021). A Review on Biosensors and Recent Development of Nanostructured Materials-Enabled Biosensors. *Sensors* (Basel, Switzerland), 21. <https://doi.org/10.3390/s21041109>.

Nicolaides, N. C., Chrousos, G., & Kino, T. (2020). Glucocorticoid receptor. *Endotext* [Internet].

Organisation for Economic Co-operation and Development. (2020, 12 de noviembre). OECD work related to endocrine disrupters. OECD Web Archive.

OECD. (s. f.). *Endocrine disrupters*. OECD. Recuperado el 7 de agosto de 2025, de <https://www.oecd.org/en/topics/sub-issues/testing-of-chemicals/endocrine-disrupters.html>

Our mission – L’association Pepper. (s. f.). L’association Pepper. <https://ed-pepper.eu/en/our-mission/>

Paragliola, R., Costella, A., Corsello, A., Urbani, A., & Concolino, P. (2020). A Novel Pathogenic Variant in the N-Terminal Domain of the Glucocorticoid Receptor, Causing Glucocorticoid Resistance. *Molecular Diagnosis & Therapy*, 24, 473 - 485. <https://doi.org/10.1007/s40291-020-00480-9>.

Pinheiro, E. D. S., Preto, A. M., Petrucci, T. V. B., Dos Santos, L. S., & Glezer, I. (2023). Phase-separation: a possible new layer for transcriptional regulation by glucocorticoid receptor. *Frontiers in endocrinology*, 14, 1160238. <https://doi.org/10.3389/fendo.2023.1160238>

Pironti, C., Ricciardi, M., Proto, A., Bianco, P. M., Montano, L., & Motta, O. (2021). Endocrine-Disrupting Compounds: An Overview on Their Occurrence in the Aquatic Environment and Human Exposure. *Water*, 13(10), 1347. <https://doi.org/10.3390/w13101347>

Quagliarini, F., Makris, K., Friano, M. E., & Uhlenhaut, N. H. (2023). EJE Prize 2023: genes on steroids-genomic control of hepatic metabolism by the glucocorticoid receptor. *European journal of endocrinology*, 188(5), R111–R130. <https://doi.org/10.1093/ejendo/lvad048>

Rahimi, L., Rajpal, A., & Ismail-Beigi, F. (2020). Glucocorticoid-Induced Fatty Liver Disease. *Diabetes, Metabolic Syndrome and Obesity*, 13, 1133–1145. <https://doi.org/10.2147/DMSO.S247379>

Rasooli, F., & Hashemi, A. (2019). Efficient expression of EpEX in the cytoplasm of *Escherichia coli* using thioredoxin fusion protein. *Research in pharmaceutical sciences*, 14(6), 554–565. <https://doi.org/10.4103/1735-5362.272564>

Ratman, D., Vanden Berghe, W., Dejager, L., Libert, C., Tavernier, J., Beck, I. M., & De Bosscher, K. (2013). How glucocorticoid receptors modulate the activity of other transcription factors: a scope beyond tethering. *Molecular and cellular endocrinology*, 380(1-2), 41–54. . <https://doi.org/10.1016/j.mce.2012.12.014>

Rho, D., & Kim, S. (2017). Low-cost optical cavity based sensor with a large dynamic range. *Optics express*, 25(10), 11244–11253. <https://doi.org/10.1364/OE.25.011244>

Rosano, G. L., & Ceccarelli, E. A. (2014). Recombinant protein expression in *Escherichia coli*: advances and challenges. *Frontiers in microbiology*, 5, 172. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2014.00172>

Sacta, M. A., Chinenov, Y., & Rogatsky, I. (2016). Glucocorticoid Signaling: An Update from a Genomic Perspective. *Annual review of physiology*, 78, 155–180. <https://doi.org/10.1146/annurev-physiol-021115-105323>

Sanz-Pastor, A. G., Gómez-Gordo, M., Guerra, A. L., & González-Albarrán, O. (2024). Eje hipotálamo-hipofisario: Regulación neurohormonal, implicaciones patológicas, pruebas

funcionales hipofisarias, indicaciones e interpretación. *Medicine*, 13(3), <https://doi.org/10.1146/annurev-physiol-021115-105323>

Spies, L. L., Verhoog, N. J. D., & Louw, A. (2021). Acquired Glucocorticoid Resistance Due to Homologous Glucocorticoid Receptor Downregulation: A Modern Look at an Age-Old Problem. *Cells*, 10(10), 2529. <https://doi.org/10.3390/cells10102529>

Sta, L., Adamer, M., & Molina-Par'is, C. (2022). Algebraic Study of Receptor-Ligand Systems: A Dose-Response Analysis. *SIAM J. Appl. Math.*, 84, S105-S150. <https://doi.org/10.1137/22m1506262>.

Strickland, B. A., Ansari, S. A., Dantoft, W., & Uhlenhaut, N. H. (2022). How to tame your genes: mechanisms of inflammatory gene repression by glucocorticoids. *FEBS letters*, 596(20), 2596–2616. <https://doi.org/10.1002/1873-3468.14409>

Stüfchen, I., Schweizer, J. R. O. L., Völter, F., Nowak, E., Braun, L., Kocabiyik, J., Mederos Y Schnitzler, M., Williams, T. A., Kunz, S., Bidlingmaier, M., & Reincke, M. (2025). The impact of endocrine disrupting chemicals on adrenal corticosteroids - A systematic review of epidemiological studies. *Environmental research*, 276, 121438. <https://doi.org/10.1016/j.envres.2025.121438>

Tan, E., Chin, C. S. H., Lim, Z. F. S., & Ng, S. K. (2021). HEK293 Cell Line as a Platform to Produce Recombinant Proteins and Viral Vectors. *Frontiers in bioengineering and biotechnology*, 9, 796991. <https://doi.org/10.3389/fbioe.2021.796991>

The Lancet Diabetes Endocrinology (2019). EDCs: regulation still lagging behind evidence. *The lancet. Diabetes & endocrinology*, 7(5), 325. [https://doi.org/10.1016/S2213-8587\(19\)30114-7](https://doi.org/10.1016/S2213-8587(19)30114-7)

Timmermans, S., Souffriau, J., & Libert, C. (2019). A General Introduction to Glucocorticoid Biology. *Frontiers in immunology*, 10, 1545.

<https://doi.org/10.3389/fimmu.2019.01545>

Unión Internacional de Química Pura y Aplicada. (2025). Límite de detección. En *Compendio de Terminología Química de la IUPAC (5.ª ed., versión en línea 5.0.0)*.

<https://doi.org/10.3389/fimmu.2019.01545>

Velazco, S., Kambo, D., Yu, K., Saha, A., Beckman, E., Mysore, N., & Cauwenberghs, G. (2021). Modeling Gene Expression: Lac operon. *Annual International Conference of the IEEE Engineering in Medicine and Biology Society. IEEE Engineering in Medicine and Biology Society. Annual International Conference*, 2021, 1086–1091.

<https://doi.org/10.1109/EMBC46164.2021.9630940>

Vettorazzi, S., Nalbantoglu, D., Gebhardt, J. C. M., & Tuckermann, J. (2022). A guide to changing paradigms of glucocorticoid receptor function—a model system for genome regulation and physiology. *The FEBS journal*, 289(19), 5718–5743. <https://doi.org/10.1111/febs.16100>

Wang, T., & Lu, Y. (2022). Advances, Challenges and Future Trends of Cell-Free Transcription-Translation Biosensors. *Biosensors*, 12(5), 318.

<https://doi.org/10.3390/bios12050318>

Wood, D., Belfort, M., & Lennon, C. (2023). Inteins—mechanism of protein splicing, emerging regulatory roles, and applications in protein engineering. *Frontiers in Microbiology*, 14.

<https://doi.org/10.3389/fmicb.2023.1305848>.

Xi, C., Diao, J., & Moon, T. (2023). Advances in ligand-specific biosensing for structurally similar molecules. *Cell systems*, 14 12, 1024-1043 . <https://doi.org/10.1016/j.cels.2023.10.009>.

Ye, Y., Guo, H., & Sun, X. (2019). Recent progress on cell-based biosensors for analysis of food safety and quality control. *Biosensors & Bioelectronics*, 126, 389–404.

<https://doi.org/10.1016/j.bios.2018.10.039>

Yue, S., Zhang, T., Shen, Q., Song, Q., Ji, C., Chen, Y., Mao, M., Kong, Y., Chen, D., Liu, J., Sun, Z., & Zhao, M. (2020). Assessment of endocrine-disrupting effects of emerging polyhalogenated carbazoles (PHCZs): In vitro, in silico, and in vivo evidence. *Environment international*, 140, 105729. <https://doi.org/10.1016/j.envint.2020.105729>

Zhang, J., Yang, Y., Liu, W., Schlenk, D., & Liu, J. (2019). Glucocorticoid and mineralocorticoid receptors and corticosteroid homeostasis are potential targets for endocrine-disrupting chemicals. *Environment international*, 133(Pt A), 105133.

<https://doi.org/10.1016/j.envint.2019.105133>

Zhou, G. J., & Zhang, F. (2023). Applications and Tuning Strategies for Transcription Factor-Based Metabolite Biosensors. *Biosensors*, 13(4), 428.

<https://doi.org/10.3390/bios13040428>

Zou, H., Yu, J., Li, Z., Liu, Y., Wang, T., Li, T., Lv, C., & Zhang, J. (2023). In vitro, in vivo, and in silico evaluation of the glucocorticoid receptor antagonist activity of 3,6-dibromocarbazole. *Food and chemical toxicology : an international journal published for the British Industrial Biological Research Association*, 114048 .

<https://doi.org/10.1016/j.fct.2023.114048>.

