



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA  
DE MÉXICO

---



---

## FACULTAD DE CIENCIAS

Definición de caracterización en Biología Sintética y  
propuesta de una metodología estándar para la  
caracterización de biopartes.

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

**Bióloga**

P R E S E N T A:

**Ileana de la Fuente Colmenares**



**DIRECTOR DE TESIS:**  
**Dra. Claudia Andrea Segal Kischinevzky**  
**2013**



Universidad Nacional  
Autónoma de México



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

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

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

## Hoja de datos del Jurado.

1. Datos del alumno  
De la Fuente  
Colmenares  
Ileana  
55 42 64 58 19  
Universidad Nacional Autónoma de México  
Facultad de Ciencias  
Biología  
407075896
2. Datos del Tutor  
Dra.  
Claudia Andrea  
Segal  
Kischinevzky
3. Datos del Sinodal 1  
Dr.  
Pablo  
Padilla  
Longoria
4. Datos del Sinodal 2  
Dra.  
María Soledad  
Funes  
Argüello
5. Datos del Sinodal 3  
Biól.  
Jesús  
Pérez  
Juárez
6. Sinodal 4  
Lic. en Mat.  
Luis de Jesús  
Martínez  
Lomelí
7. Datos del trabajo escrito  
Definición de caracterización en Biología Sintética y propuesta de una metodología estándar para la caracterización de biopartes  
132 p.  
2013

*A Osvaldo y Francisco Ilán*

## Agradecimientos

A mi esposo Fco. Osvaldo Morales Vilchis por haberme brindado todo el apoyo y cariño necesarios para cumplir mis metas.

A mis padres, Felipe Adrián de la Fuente Reyes y Elsa Claudia Colmenares Grunberger por su apoyo incondicional y las enseñanzas de vida que me llevaron a elegir la carrera de Biología y a mis hermanas, Fernanda, María y Luciana por estar siempre conmigo.

A mis abuelas, Alicia Reyes y Mónica Grunberger por estar siempre pendientes y apoyarme incondicionalmente a lo largo de mi vida académica y a mi abuelo Octavio Colmenares, que en paz descansa, y su esposa Martha Alicia Valdés por ser un gran ejemplo a seguir.

A mis suegros Francisco Morales y Martha Ruth Vilchis, a quienes considero parte de mi familia, por hacer posible este trabajo de tesis.

A mi tío Octavio Colmenares, quien me introdujo al mundo de la Biología desde temprana edad, cuando me regaló mi primer microscopio compuesto. También agradezco a sus hermanos Mónica, José Manuel, Leilah y Aime por ser parte importante en mi vida.

A mis tíos Jorge, Raúl y Alejandro, que en paz descansen; por todo el apoyo y ayuda que siempre me han brindado.

A todos mis amigos, compañeros y colegas con quienes he disfrutado, discutido y aprendido a lo largo de estos años.

A la Universidad Nacional Autónoma de México y a la Facultad de Ciencias, por constituir mi segundo hogar y brindarme la infraestructura necesaria para mi formación como Bióloga.

A la Dra. Claudia Segal Kischinevzky, por todo su apoyo a lo largo del desarrollo de este trabajo de tesis y sus valiosos consejos académicos y al laboratorio de Biología Molecular y Genómica, de la Facultad de Ciencias, por acogerme como tesista.

Al Dr. Pablo Padilla Longoria, por introducirme al mundo de la Biología Sintética y por el enriquecimiento de este trabajo con sus comentarios.

A la Dra. Soledad Funnes Argueyo por sus valiosos comentarios sobre este trabajo y por la buena disposición que siempre demostró hacia las investigaciones relacionadas con Biología Sintética.

A Luis Martínez y Jesús Pérez, por sus consejos y su apoyo para culminar este trabajo de investigación.

A la M.C. Fabiola Ramírez Corona, quien me brindó la enseñanza de las técnicas de laboratorio de biología molecular necesarias para el desarrollo de esta investigación.

Al Dr. Arturo Carlos Il Becerra Bracho, al Dr. Francisco Hernández Quiroz y a Elías Samra Hassan, por sus clases en el taller de Biología Sintética.

A Cristian Delgado, por sus consejos para el desarrollo y enriquecimiento de este trabajo, así como su amistad incondicional y su entusiasmo por la Biología Sintética.

A Ricardo Mungía Díaz por permitirme ser parte del proyecto del biosensor de  $\text{CO}_2$  y por aportar toda la información necesaria sobre el tema para enriquecer este trabajo.

Al Dr. Manuel Uribe Alcocer por su enseñanza en los temas principales de genética y su apoyo para culminar mi licenciatura en Biología.

## 1 ABREVIATURAS.

**CRP.** Proteína C reactiva.

**cAMP.** Adenosín monofosfato cíclico.

**RBS.** Sitio de Unión al Ribosoma por sus siglas en inglés (Risosome binding site).

**CAD.** Diseño asistido por ordenador por sus siglas en inglés (computer-aided design).

**DNA.** Ácido desoxiribonucleico

**RNA.** Ácido ribonucleico

**ATP.** Adenín trifosfato

**RT-PCR.** Reacción en cadena de la polimerasa con transcriptasa reversa

**GFP.** Proteína verde fluorescente por sus siglas en inglés

**YFP.** Proteína amarilla fluorescente por sus siglas en inglés

**CFP.** Proteína cian fluorescente por sus siglas en inglés

**mCherry.** Proteína roja fluorescente monomérica.

**RFP.** Proteína rojo fluorescente por sus siglas en inglés

**SDS-PAGE.** Electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecilsulfato sódico por sus siglas en inglés (sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis).

**PCR.** Reacción en cadena de la polimerasa por sus siglas en inglés (Polymerase chain reaction).

**ELISA.** Ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas por sus siglas en inglés (Enzyme-linked immunosorbent assay).

**K<sub>M</sub>.** Constante de Michaelis Menten.

**K<sub>CAT</sub>.** Constante de proporcionalidad.

**PoPS.** Polimerasas por segundo

**RPUS.** Unidades relativas del promotor.

**RFUS.** Unidades relativas de fluorescencia.

**RLUS.** Unidades relativas de luminiscencia.

**RBUS.** Unidades relativas de unión al ribosoma.

**IGEM.** Competencia internacional de máquinas genéticamente modificadas por sus siglas en inglés (International genetically engineered machine contest).

# Índice

<b>1. RESUMEN</b> .....	<b>11</b>
<b>2. JUSTIFICACIÓN</b> .....	<b>13</b>
<b>3. INTRODUCCIÓN</b> .....	<b>15</b>
<b>3.1 Antecedentes</b> .....	<b>15</b>
3.1.1 La Biología Sintética en México.....	16
3.1.2 Biosensor de dióxido de carbono en <i>Escherichia coli</i> .....	17
<b>3.2 Estandarización, desacoplamiento y abstracción en la Biología</b> .....	<b>18</b>
3.2.1 Estandarización.....	18
Sistemas estándar de composición física de biopartes.....	19
3.2.2 Desacoplamiento.....	24
3.2.3 Abstracción.....	25
Jerarquización en los sistemas biológicos.....	26
<b>3.3 Componentes biológicos</b> .....	<b>28</b>
3.3.1 Biopartes.....	28
3.3.2 Dispositivos genéticos.....	29
Figura 5. Se muestran dos esquemas: 1. Ejemplo de un dispositivo sencillo compuesto por un promotor, un sitio de unión al ribosoma (RBS) y un gen. 2. Dos dispositivos interactuando: el dispositivo A responde a la presencia del “químico a1” expresando el gen “A2”, cuyo producto se une al promotor “B1” del dispositivo B induciendo la transcripción del gen “B2”.....	30
Tipos de dispositivos genéticos.....	30
1) <i>Sistemas de control no transcripcional</i> .....	30
2) <i>Sistemas de control transcripcional</i> .....	31
3) <i>Sistemas de interacción proteína-ligando y proteína-proteína</i> .....	31
3.3.3 Módulos genéticos.....	32
Tipos de módulos genéticos.....	34
<b>1) Redes de regulación transcripcional:</b> .....	34
a) Cascadas transcripcionales:.....	34
b) Motivos de anticipación:.....	34
c) Motivos de retroalimentación:.....	35
<b>2) Rutas de señalización mediadas por proteínas:</b> .....	35
<b>3) Redes metabólicas sintéticas:</b> .....	36
Expectativas.....	36
Contexto celular y la conexión de módulos genéticos.....	37
3.3.4 Sistemas biológicos.....	39
<b>3.4 Registro de Partes Biológicas Estándar (<i>Registry of Estándar Biological Parts</i>)</b> .....	<b>39</b>
<b>3.4 OpenWetware (OWW)</b> .....	<b>40</b>



<b>3.6 Caracterización en Biología Sintética.</b>	<b>41</b>
3.6.1 Hojas de datos.	42
3.6.2 Avances en la caracterización de biopartes, dispositivos, módulos y sistemas biológicos sintéticos.	45
<b>4. OBJETIVOS.</b>	<b>50</b>
<b>5. MATERIAL Y MÉTODOS.</b>	<b>51</b>
5.1 Proceso de Investigación.	51
5.2 Búsqueda de una definición de caracterización en Biología Sintética.	51
5.2.1 Encuesta sobre caracterización.	51
5.3 Revisión de metodologías.	52
5.4 Obtención del porcentaje de caracterización por año.	53
5.5 Selección de los equipos IGEM a comparar.	53
5.6 Categorías elegidas.	54
1. Medalla obtenida.	54
2. Tipo de caracterización.	54
3. Chasis y cepas utilizadas.	54
4. Tipos de biopartes y dispositivos.	55
Biopartes.	55
Dispositivos.	56
5. Proteínas reporteras.	56
6. Metodologías utilizadas.	56
8. Tipo de medida utilizada.	59
9. Características medidas.	59
10. Unidades de medición.	60
11. Protocolos y páginas de caracterización disponibles en Wiki.	61
12. Condiciones de medición.	61
<b>6 RESULTADOS.</b>	<b>62</b>
<b>6.1 Definición de caracterización en Biología Sintética.</b>	<b>62</b>
6.1.1 Pregunta 1. ¿Qué es caracterización?	62
6.1.2 Pregunta 2. ¿Es importante la caracterización en Biología Sintética?	63
6.1.3 Pregunta 3. ¿Compartes tus protocolos de caracterización en la Wiki del IGEM?	64
6.1.4 Pregunta 4. ¿Qué es lo que normalmente haces con los datos obtenidos en la caracterización de biopartes?	65
6.2 Tendencias de la caracterización de biopartes en el IGEM a través de los años.	66
6.3 Tipo de medalla obtenida.	67
<b>6.4 Tipo de caracterización.</b>	<b>68</b>
<b>6.5 Chasis.</b>	<b>70</b>
6.5.1 Cepas de <i>E. coli</i> .	71

<b>6.6 Tipo de biopartes y dispositivos.....</b>	<b>74</b>
6.6.1 Biopartes.....	74
6.6.2 Dispositivos .....	76
<b>6.7 Proteínas reporteras.....</b>	<b>78</b>
<b>6.8 Metodologías.....</b>	<b>80</b>
6.8.1. Caracterización básica de biopartes. ....	85
6.8.2 Caracterización de promotores y biopartes asociadas.....	87
6.8.3 Caracterización de secuencias codificantes y biopartes asociadas.....	89
<b>6.9 Equipo de laboratorio.....</b>	<b>91</b>
6.9.1 Equipo de laboratorio utilizado en ensayos de fluorescencia.....	93
6.9.2 Equipo de laboratorio utilizado en espectrometría.....	95
6.9.3 Equipo de laboratorio utilizado en cromatografía.....	95
6.9.4 Equipo de laboratorio utilizado en microscopía .....	96
<b>6.10 Tipo de medida, características medidas y unidades de medición .....</b>	<b>98</b>
6.10.1 Tipo de medida.....	98
6.10.2 Características medidas.....	99
6.10.3 Unidades de medición .....	103
6.10.3.1 Unidades absolutas.....	103
6.10.3.2 Unidades relativas.....	104
6.10.4 Tabla resumen de características con mayor uso y tabla generalizada sobre caracterización.....	106
<b>6.11 Protocolos y páginas de caracterización disponibles en las wikis del IGEM.....</b>	<b>107</b>
Uso de <i>OpenWetware</i> .....	110
<b>6.12 Condiciones de medición.....</b>	<b>110</b>
<b>7 DISCUSIÓN.....</b>	<b>111</b>
<b>7.6 Definición de caracterización en Biología Sintética.....</b>	<b>111</b>
<b>7.7 Elementos principales en el diseño de protocolos de caracterización.....</b>	<b>112</b>
<b>7.8 Caracterización en la Facultad de Ciencias, UNAM.....</b>	<b>115</b>
<b>7.9 Caracterización cuantitativa del biosensor de CO<sub>2</sub> del equipo Ciencias_UNAM, 2012. 116</b>	<b>116</b>
<b>7.10 Importancia de la caracterización en el establecimiento de la Biología Sintética como una ciencia formal, perspectivas.....</b>	<b>118</b>
<b>8 CONCLUSIONES.....</b>	<b>120</b>

<b>9</b>	<b>PERSPECTIVAS .....</b>	<b>121</b>
<b>10</b>	<b>ANEXO .....</b>	<b>122</b>
<b>10.6</b>	<b>Glosario .....</b>	<b>122</b>
<b>10.7</b>	<b>Apéndice.....</b>	<b>124</b>
<b>11</b>	<b>REFERENCIAS.....</b>	<b>130</b>
<b>11.1</b>	<b>Bibliográficas.....</b>	<b>130</b>
<b>11.2</b>	<b>Referencias Web. ....</b>	<b>131</b>

## 1 Resumen

La Biología Sintética estudia sistemas de genes utilizando tres principios básicos: la estandarización, la abstracción y el desacoplamiento. Establecer las bases de estandarización en el uso de sistemas biológicos sintéticos implica la caracterización de sus componentes. Para lograr esta tarea han surgido varias aproximaciones entre las que destacan el desarrollo de estándares de composición física, la generación del kit de caracterización, el establecimiento de promotores de referencia, entre otras. Sin embargo, todavía hay mucho trabajo por hacer para lograr una amplia adopción de protocolos estandarizados y unidades de medición capaces de ser comparables entre experimentos.

La presente tesis es el resultado de un análisis de protocolos y métodos utilizados en Biología Sintética para la caracterización de biopartes y dispositivos genéticos, así como una revisión sobre la definición de caracterización en esta disciplina. Se eligió la comunidad IGEM como población a estudiar considerándola una muestra representativa de los grupos de investigación en Biología Sintética a nivel mundial. La comparación de métodos y protocolos se hizo revisando la información contenida en la página Wiki oficial del concurso de cada equipo desde el año 2008 hasta el 2011.

De manera adicional, se propuso la caracterización cuantitativa paso por paso del biosensor de CO<sub>2</sub> diseñado por el equipo IGEM Ciencias\_UNAM perteneciente a la Facultad de Ciencias y se analizaron los componentes principales que debe tener un laboratorio de Biología Sintética para poder llevar a cabo protocolos de caracterización cuantitativa.

Se encontró que la metodología más utilizada es la de lecturas de fluorescencia, utilizando multilectores de placas, citómetros de flujo, fluorímetros o microscopios de fluorescencia. Por medio de estos aparatos es posible determinar el desempeño de una bioparte correlacionando la tasa de síntesis de la proteína reportera con la actividad transcripcional, la cual refleja el desempeño cuantitativo de la bioparte a prueba. Para que una caracterización sea robusta hay que diseñar experimentos que permitan la medición simultánea de varias muestras, cada una con ligeras variaciones en las condiciones experimentales.

Debido a la variada naturaleza de las biopartes existentes, no se puede esperar utilizar un solo protocolo estándar; en su lugar, se espera el surgimiento de ciertos estándares sobre cada tipo de bioparte así como el establecimiento de las unidades de medición estándar, las condiciones similares y los parámetros mínimos requeridos para una caracterización integral que culmine en la generación de hojas de datos de fácil interpretación. Si se logra cumplir con todos estos requerimientos, será posible el diseño de dispositivos sintéticos cada vez más complejos, menos costosos y más eficientes, lo cual llevará a la Biología Sintética a un siguiente nivel de formalización como ciencia aplicada.

## 2 Justificación.

La Biología Sintética se enfoca en estudiar sistemas de genes y sus productos, en lugar de hacerlo sobre genes individuales como ocurre en la biotecnología convencional. Su meta principal es diseñar y construir sistemas biológicos no existentes en la naturaleza. Para cumplirla, es necesario abordar a los organismos desde un punto de vista ingenieril, para lo cual se pueden usar acercamientos que otras ramas de la ingeniería han utilizado, como son la abstracción, estandarización y desacoplamiento (Helman et al, 2007; Andrianatoandro et al, 2006).

El establecimiento de estándares ha sido fundamental para manejar la complejidad en muchos campos de la ingeniería, ya que permite a los ingenieros diseñar y construir sistemas mediante la combinación de partes de un modo confiable, es decir, con la certeza de que funcionarán tal y como fue previsto. Sin embargo, en sistemas vivos tales como bacterias, levaduras, células vegetales, entre otros, establecer estándares en cuanto a metodologías y protocolos experimentales no ha resultado tan sencillo, debido a su enorme complejidad (Kelly et al, 2009). La mayoría de los protocolos y métodos para la producción de organismos recombinantes son caros, poco fiables, muy particulares y conllevan un proceso de investigación *ad hoc* no aplicable a otros sistemas. Los problemas son entonces métodos incomparables, resultados con variaciones enormes provocadas por cambios mínimos en las condiciones de medición, falta de unidades de medición establecidas, entre otros (Kelly et al, 2009).

El sistema de estandarización que ha ganado mayor aceptación es el de biopartes (*BioBricks*), propuesto por Knight en el año 2003, siendo éste solamente un estándar a nivel de composición física. En un futuro, se pretende lograr no solo una estandarización física sino funcional, mediante la cual el comportamiento de

las partes, tanto aisladas como dentro de un sistema, pueda ser más predecible (Shetty et al, 2008; Kelly, 2009).

Para lograr una estandarización a nivel funcional, es necesario el establecimiento de protocolos de caracterización que sirvan como base para generar descripciones cuantitativas confiables, en forma de hojas de datos, para que las biopartes creadas en los distintos laboratorios puedan ser interoperables. Sin embargo, hacer mediciones *in vivo* confiables y comparables entre sí ha resultado un gran desafío. Actualmente, la mayoría de las biopartes que están disponibles aún no han sido caracterizadas. Por ejemplo, en el año 2009, de los 500 promotores transcripcionales disponibles en el Registro de Partes ([www.partsregistry.org](http://www.partsregistry.org)), menos de 50 habían sido caracterizados; además, los métodos de caracterización entre ellos son distintos y los datos resultantes son incomparables. Si bien no se puede esperar lograr una caracterización total de las biopartes a utilizar en sistemas vivos, se pueden hacer acercamientos para lograr una mayor predicción y confiabilidad en el diseño de dichos sistemas (Canton et al, 2008; Kelly et al, 2009).

La adopción de un método de caracterización en particular implica una comparación entre métodos distintos, en cuanto a ventajas y desventajas de cada protocolo, herramientas de medición y unidades de medida utilizada en cada uno. Algunas de las cuestiones a tomar en cuenta son: equipo disponible en el laboratorio, coeficiente de variación entre los resultados, la capacidad de comparación de los mismos entre laboratorios, entre otras (Kelly et al, 2009).

En México se han propuesto varios métodos para la caracterización de dispositivos genéticos, principalmente las investigaciones llevadas a cabo en el LANGEBIO, CINVESTAV en Irapuato, Gto., coordinados por investigadores como Alexander de Luna (<http://www.langebiolcinvestav.mx/?pag=103>); sin embargo, aún hay mucho trabajo por hacer en cuanto a la estandarización de protocolos, así como la amplia adopción de su uso entre los laboratorios del país, por lo que la implementación de éstos significaría un importante avance para la Biología Sintética a nivel nacional.

### 3 Introducción.

En esta sección se incluyen los antecedentes contextuales, conceptuales y metodológicos que corresponden al marco teórico de este trabajo, los cuales consisten en una breve recapitulación histórica de la Biología Sintética y de los trabajos de Biología Sintética hechos en México; las bases teóricas sobre estandarización, desacoplamiento y abstracción en la Biología, así como la información de plataformas web importantes para esta disciplina, que son el Registro de Partes y el OpenWetware; por último se mencionan los avances y enfoques actuales en caracterización de biopartes (Andrianatoandro et al, 2006; Arkin, 2008; Canton et al, 2008; Castro, 2011; Endy, 2005; Yeh y Lim, 2007; Kelly et al, 2009; Porcar et al, 2011)

#### 3.1 Antecedentes.

El descubrimiento de mecanismos que asemejan compuertas lógicas en la regulación genética en los años 60 del siglo XX, con el modelo del *operón lac* y los primeros logros en la ingeniería genética en los años 70, como el desarrollo de la tecnología del DNA recombinante, abrieron paso a una nueva era en la biología experimental (Andrianaotandro et al, 2006), en la cual la manipulación genética de los organismos se ha convertido, hasta cierto punto, en un proceso rutinario. Ya en 1978 Szybalski y Skalka hablaban de una nueva era de “Biología Sintética”, en donde no solo se podrían describir y analizar los genes existentes en la naturaleza, sino también construir y evaluar nuevos arreglos genéticos. Sin embargo, poco más de 30 años después, la Biología se encuentra lejos de completar dicha meta, ya que los procesos de investigación en ingeniería genética y biotecnología siguen siendo costosos, poco confiables y *ad hoc* (Endy, 2005).

Durante las últimas décadas varias líneas de investigación en sistemas biológicos han culminado en la aparición de un nuevo campo, conocido como “Biología Sintética”. Si la Biología Sintética es un campo totalmente nuevo o no es una cuestión debatible, pero sus metas, que son aprender a construir y modificar con



precisión y confiabilidad sistemas autorganizables que recapitulen funciones biológicas y al mismo tiempo muestren nuevas funciones, son indudablemente novedosas. Enfocarse en metas y aplicaciones específicas dentro del contexto de sistemas constituidos por varios genes y sus productos, en lugar de solamente tomar en cuenta genes individuales, es una característica que distingue a la Biología Sintética de la biología convencional (Yeh y Lim, 2007).

A finales de los años 90 del siglo XX, en Estados Unidos de América surgieron intentos de establecer estándares tanto para la composición física de biopartes, como para su clonación; sin embargo, ninguna de éstas logró una amplia aceptación. En 2003, Knight propuso el método de *Biobricks*, para establecer un estándar en el ensamble de biopartes, fragmentos de DNA con una función definida, siendo esto sólo a un nivel de composición física. Así, con Drew Endy y otros colaboradores, fundaron el Registro de Partes Biológicas Estándar (Registry of Standar Biological Parts) como un esfuerzo para construir dispositivos genéticos con mayor facilidad (Shetty et al, 2008). El método de *BioBricks* ha sido adoptado por varios grupos de investigación, y su uso se expande cada vez más; por ejemplo, anualmente cientos de estudiantes desarrollan y utilizan biopartes estándar para diseñar sistemas por sí mismos, como parte del IGEM. En los últimos años se ha promovido la caracterización de biopartes propuestas en la competencia, al grado de constituir un requerimiento para obtener las medallas de oro y plata ([www.igem.org](http://www.igem.org)).

El Estándar de *BioBricks* representa una estandarización parcial, pues la meta para el futuro de la Biología Sintética es lograrla no solo a nivel físico, sino también funcional, mediante la cual el comportamiento de las partes, tanto aisladas como formando un sistema, pueda ser más predecible (Kelly et al, 2009).

### **3.1.1 La Biología Sintética en México.**

En México, los trabajos de investigación en Biología Sintética publicados son pocos (Calvillo, 2011; Castro, 2011; Juárez, 2012; Robles, 2012) sin embargo, el desarrollo de esta disciplina se puede observar en los proyectos de los equipos

mexicanos que han participado en el IGEM desde el año 2006 hasta la fecha (Castro, 2011).

México y Colombia fueron los primeros países latinoamericanos en participar en la competencia IGEM en el 2006, abriendo paso a más países a lo largo de los años tales como Brasil, Panamá, Argentina, Chile, entre otros; los cuales han ido en aumento, al grado de que en el año 2012 se realizó una versión regional latinoamericana del IGEM, en Bogotá, Colombia, con la participación de trece equipos. En el caso particular de México, el número de equipos participantes se ha incrementado de un equipo en el año 2006 a seis en el 2012 ([www.igem.org](http://www.igem.org)).

Tanto el número de grupos de investigación como el número de artículos científicos dedicados a la Biología Sintética en México crece de forma lenta pero constante; puede esperar que esto cambie a medida que se formen más investigadores que trabajen en el campo (Castro, 2011).

### **3.1.2 Biosensor de dióxido de carbono en *Escherichia coli*.**

En el año 2012, el grupo mexicano de Biología Sintética que conformó el equipo “Ciencias-UNAM” en el concurso IGEM, diseñó un sistema que pretende medir indirectamente concentraciones de dióxido de carbono atmosférico mediante el reconocimiento de los compuestos formados por la disociación del CO<sub>2</sub> en el agua mediada por la enzima anhidrasa carbónica, que se encuentra naturalmente en *E. coli*.

Este sistema consistió en dos módulos: un convertidor de señal y un generador de señal de salida. El convertidor de señal estaba constituido por un promotor de actividad media, un sitio de unión al ribosoma (RBS), la secuencia sAC que codifica la adenilato ciclasa soluble y un terminador. La parte generadora de salida estaba conformada por el promotor pCaif (inducible por el complejo formado entre la proteína CRP, nativa de *E. coli*, y el cAMP), un RBS, la secuencia que codifica para la proteína verde fluorescente (GFP) y un doble terminador. El sistema fue diseñado para trabajar de la siguiente manera: cuando el CO<sub>2</sub> se difunde en el agua, la anhidrasa carbónica genera aniones HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> y cationes H<sup>+</sup>. A medida que las moléculas de HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> se acumulan dentro de la bacteria, la proteína sAC es activada y comienza a producir adenosín monofosfato cíclico (cAMP), el cual se

une con la proteína CRP para formar el complejo que activa al promotor pCaif induciendo la expresión de la GFP.

Para el diseño de este sistema se obtuvo la secuencia sAC del nemátodo *Brugia malayi* con una longitud de 854 pb, las demás secuencias fueron obtenidas del catálogo del Registro de Partes ([www.partsregistry.org](http://www.partsregistry.org)). La funcionalidad del sistema fue corroborada parcialmente mediante una prueba cualitativa de microscopía fluorescente (<http://2012.igem.org/Team:Ciencias-UNAM/Parts>).

### **3.2 Estandarización, desacoplamiento y abstracción en la Biología.**

En la actualidad, existen principalmente cuatro retos que limitan la bioingeniería: 1) la incapacidad de manejar la complejidad biológica; 2) los tediosos y poco fiables métodos para caracterizar y construir sistemas biológicos sintéticos; 3) las variaciones físicas aparentemente espontáneas de la conducta de dichos sistemas y 4) la evolución. Los pioneros en Biología Sintética, entre ellos, Drew Endy y Thomas Knight, han sugerido que un punto de inicio para resolver estos problemas es considerar algunas de las lecciones pasadas que han servido a otras disciplinas ingenieriles cuando emergieron de las ciencias naturales. Las tres ideas del pasado de la ingeniería que han sido aceptadas como las más relevantes para su aplicación en Biología son la estandarización, el desacoplamiento y la abstracción (Endy, 2005).

#### **3.2.1 Estandarización.**

La estandarización es fundamental para el establecimiento de reglas y especificaciones requeridas en una disciplina; también sirve para simplificar los métodos utilizados y para unificarlos de modo que puedan ser utilizados por un amplio número de grupos de investigación. En la Biología se han establecido un número importante de estándares alrededor del “dogma central”, que definen las operaciones centrales de la mayoría de los sistemas biológicos naturales. Como ejemplos representativos se pueden mencionar los estándares que existen para la descripción de datos de secuencias de DNA, de microarreglos y de cristalografía de proteínas, así como la nomenclatura de las enzimas, algunos modelos de

biología de sistemas y las actividades de restricción de las endonucleasas. Sin embargo, la Ingeniería Genética todavía debe desarrollarse de un modo más formal mediante el uso de estándares ampliamente adoptados para la mayoría de las funciones biológicas básicas. Esto implicaría una disminución considerable en los costos, el tiempo y los recursos necesarios para hacer investigaciones en Biología Sintética, además de que permitiría la interoperatividad de los dispositivos ya creados para su uso combinado en nuevos sistemas (Endy, 2005).

Se puede hablar de dos niveles de estandarización: la de composición física y la funcional. La primera equivale al modo en que los dispositivos genéticos se acoplan o unen unos con otros físicamente; la segunda implica el conocimiento cuantitativo del funcionamiento de los dispositivos, mediante la definición, descripción y caracterización de las partes biológicas básicas y las condiciones estándares para su funcionamiento, para el establecimiento de sus límites, compatibilidad, confiabilidad y la predictibilidad de su conducta (Kelly et al, 2009).

Actualmente las tendencias en cuanto a estandarización funcional han sido enfocadas hacia la construcción de biopartes estandarizadas e intercambiables entre sí, para facilitar la construcción de circuitos y redes de regulación genética sintéticas. Gracias a las investigaciones sobre la estandarización de biopartes se cuenta con una librería creciente de partes y módulos que han sido caracterizados cualitativa y cuantitativamente en varios contextos celulares, gracias a esto, la ampliación hacia el diseño y prueba de sistemas ha comenzado (Purnick y Weiss, 2009).

### **Sistemas estándar de composición física de biopartes.**

En Biología Sintética se ha logrado establecer una estandarización a nivel físico por medio de varios sistemas de ensamble y clonación de biopartes, usando plásmidos como vectores. A la fecha, se han desarrollado ocho sistemas estándar de ensamble, todos basados en el primero de éstos, diseñado por Thomas Knight en el año 2003

[http://openwetware.org/wiki/The\\_BioBricks\\_Foundation:BBFRFC10](http://openwetware.org/wiki/The_BioBricks_Foundation:BBFRFC10)), el cual se conoce como el RFC10, el ensamble original o el “estándar de Knight”. La mayoría de las biopartes que se encuentran en el Registro de Partes Estandarizadas están diseñadas bajo el ensamble original, debido a que es el que tiene mayor experiencia de uso ([www.partsregistry.org](http://www.partsregistry.org)), por lo tanto, todas las partes que usen cualquiera de estos sistemas se nombran BioBricks.

Hasta el año 2009, los diferentes sistemas estándar de composición se denominaban según su autor de manera que plásmidos y partes genéticas modificadas se identificaban con el nombre de su creador, acercamiento que ha sido muy común en biología molecular. Sin embargo, esta costumbre provoca una denominación ambigua, por lo cual pueden surgir dudas acerca de qué sistema estándar de composición se trata, o inclusive un mismo sistema puede tener varios nombres. Para resolver estos problemas, la Fundación *de BioBricks Request for Comments* (BBF RFC) propuso una convención de denominación para cada sistema de composición, conocida como la BBF RFC 29 (Tabla 1). En esta convención, cada sistema estándar de composición debe ser denominado de acuerdo al número de la BBF RFC que le fue asignado. Además, todos los sistemas estándar deben estar documentados como un BBF RFC, para poder ser codificados en formatos legibles en computadora usados en el Registro de Partes y otras herramientas CAD (Shetty y Rettberg, 2009).

**Tabla 1. Estándares de composición física (o estándares de ensamble) propuestos hasta el año 2009, Se incluye el nombre convencional, su autor y el nuevo nombre según la BBF RFC 29 (tomado de Shetty y Rettberg, 2009).**

BBF RFC 29	Assembly standard nomenclature		
<i>Current name(s)</i>	<i>Authors</i>	<i>Reference</i>	<i>New name</i>
BioBrick standard Assembly Standard 1	Tom Knight	[3]	Assembly standard 10
Silver standard BioFusion standard	Ira Phillips & Pamela Silver	[4]	Assembly standard 23
Berkeley standard BBb standard BamHI/BglII standard	J. Chris Anderson <i>et al.</i>	[5]	Assembly standard 21
Freiburg standard	Kristian Mueller <i>et al.</i>	[5]	Assembly standard 25
AarI cloning standard Lim standard	Sergio Peisajovich <i>et al.</i>	[6]	Assembly standard 28
BB-2 standard	Tom Knight	[7]	Assembly standard 12

Estos sistemas de composición, también conocidos como estándares de ensamble, permiten construir sistemas biológicos modularmente, al estandarizar las uniones entre sus diferentes componentes. Para hacer esto, hacen uso de una combinación específica de enzimas de restricción que permiten unir genes de un modo iterativo y además, aprovechan la síntesis de genes para eliminar y añadir sitios de restricción (Castro, 2011).

El estándar original, RFC10, define secuencias cortas de nucleótidos que deben flanquear las partes genéticas y los sitios de reconocimiento de endonucleasas que no deben ocurrir dentro de las biopartes. Como se aprecia en la figura 1, las biopartes están flanqueadas por sitios de restricción que forman un prefijo y un sufijo: en el extremo 5' están los sitios de restricción de las endonucleasas *EcoRI* y *XbaI*; en el extremo 3' se encuentran los de *SpeI* y *PstI*. De manera adicional se han añadido bases entre los sitios de restricción para evitar la metilación accidental, que afecta la actividad de las enzimas (Shetty y Rettberg, 2009; Castro, 2011).

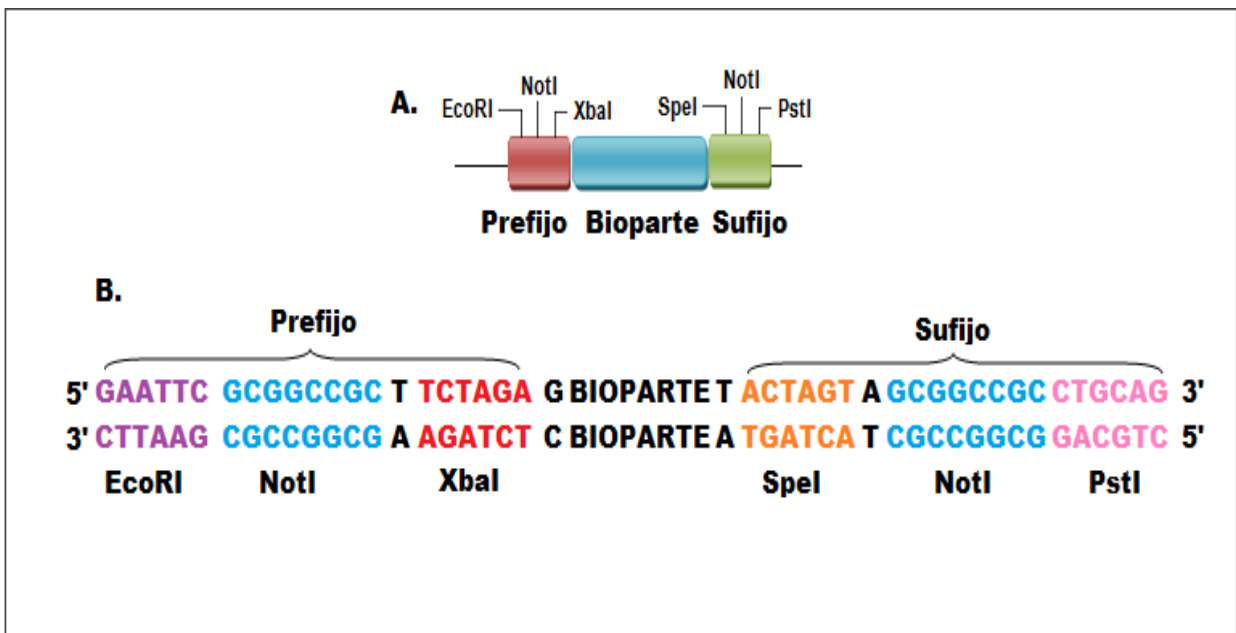
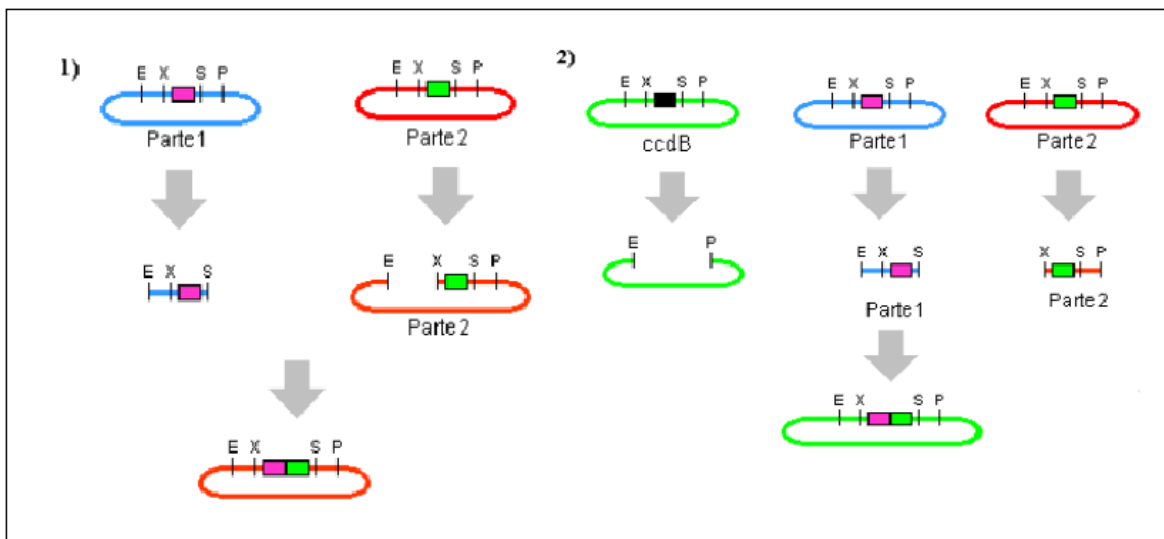


Figura 1. La ubicación de los sitios de restricción dentro de un prefijo y sufijo en una bioparte utilizando el sistema estándar de *BioBricks* RFC10 mostrado en dos esquemas diferentes (A y B).

El ensamble completo implica el corte, con enzimas de restricción, de las biopartes específicas desde los plásmidos de interés, la preparación del plásmido vector, la ligación de las biopartes a éste con la sucesiva transformación en una cepa de células competentes y la corroboración del proceso mediante electroforesis. En este sistema se toma en cuenta la posibilidad de automatizar el proceso de ensamble (usando robots), es por eso que todas las enzimas de restricción usadas funcionan a la misma temperatura y con el mismo amortiguador y su actividad puede inhibirse con un choque térmico. Para corroborar la transformación y ligación, además de la electroforesis, existe el método de tres antibióticos, en donde se realiza una selección positiva eliminando la posibilidad de tener colonias que no hayan adquirido las biopartes de interés (Figura 2). Posteriormente se desarrolló un plásmido vector que contiene un gen que codifica la toxina *ccdB* (proteína que se une a la girasa de *E. coli* para evitar la transcripción), generando una selección negativa adicional contra las bacterias que no contengan las biopartes deseadas (Castro, 2011; Purnick y Weiss, 2009).



**Figura 2. Esquema donde se compara 1) El ensamblaje estándar y 2) El ensamblaje de tres antibióticos (tomada de Castro, 2011).**

La ventaja principal del ensamblaje estándar de *BioBricks* es que permite unir cualquier número de secuencias de DNA manteniendo los mismos sitios de restricción, siendo una construcción no seriada, por lo que se pueden realizar varios ensambles simultáneamente. Así, el resultado de cualquier ensamble de

dos biopartes es en sí una bioparte que puede ser combinada con cualquier otra bioparte (Castro, 2011; Shetty et al, 2009).

Sin embargo, este sistema también tiene una desventaja: al fusionar dos biopartes se genera una cicatriz de marca que produce un desplazamiento en el marco de lectura y un codón de terminación "TAG", inhabilitando la fusión de marcadores a una proteína o la fusión de dos o más proteínas. Para superar este problema, se han desarrollado nuevos métodos de ensamble estándar compatibles con el RFC10, evitando así tener que rehacer la librería de partes basada en el primero. Con esta visión, desde la implementación del sistema estándar de Knight, se ha evitado el uso de ciertas enzimas de restricción (por ejemplo, *PvuII*, *XhoI*, *AvrII*, *NheI* y *SapI*) eliminándolas de todas las biopartes con el fin de reservar estos sitios para futuros sistemas estandarizados (Castro, 2011; Shetty et al, 2009).

Los demás sistemas de composición estándar son variaciones del "ensamble original" (RFC 10), con cambios que añaden o eliminan algunos pares de bases, para permitir el ensamble adecuado en fase de dominios proteicos, de proteínas de fusión, de tres partes simultáneamente en un vector o para tipos de células específicas como son las levaduras o células de mamífero (*MammoBlocks*; [www.partsregistry.org](http://www.partsregistry.org)).

A continuación se presenta una breve descripción de cada uno de los sistemas estándar de composición variantes del original:

- Estándar de composición 12: conocido como BB-2, desarrollado por Tom Knight, cambia las posiciones de los sitios de restricción, sustituyendo la enzima *XbaI* por *NheI*; su cicatriz de marca se traduce en una unión de dos aminoácidos (Ala-Ser), apropiados para unir dominios proteicos y es compatible con el RFC10.
- Estándar de composición 15: desarrollado por Julie Norville para el ensamble de proteínas de fusión. Son biopartes denominadas "sitios de bioandamio" (*bioscaffold sites*), las cuales pueden ser ensambladas como BioBricks normales pero tienen la ventaja de permitir la creación de proteínas de fusión, la inserción de biopartes de la librería dentro de BioBricks compuestos y la remoción de la cicatriz de marca producida por el ensamble.



- Estándar de composición 21: conocido como estándar de ensamble BglBrick, desarrollado por investigadores de la Universidad de California Berkeley, se basa en el ensamble iterativo con las enzimas *BamHI* y *BglII*.
- Estándar de composición 23: conocida como el “estándar de Silver” para el ensamble de dominios proteicos, se basa en el acortamiento de una base del sufijo y del prefijo de tal modo que la cicatriz de marca *SpeI-XbaI* es de solamente seis pares de bases, por lo que los dominios proteicos pueden ser ensamblados en fase sin problema. Esto resulta en la inclusión de la unión Thr-Arg entre los dominios proteicos.
- Estándar de composición 25: Extensión del RFC10, desarrollado por el equipo del IGEM Freiburg 2007, que permite el ensamble en fase de dominios proteicos. En este sistema se añaden dos sitios de restricción dentro del prefijo y sufijo del ensamble original (*NgoMVI* y *AgeI*) que resultan en extremos compatibles para su unión a dominios proteicos, ya que la cicatriz codifica para los aminoácidos Ala-Gly o Thr-Gly, los cuales son adecuados para la unión. Para este sistema se puede usar la misma estrategia de clonación original.
- Estándar de composición 28: conocido como el estándar Lim o sistema de clonación *AarI*, es una técnica optimizada para clonar tres partes en un vector de manera simultánea. La mayoría de las biopartes construidas con este estándar funcionan en levaduras.
- Estándar de composición 65: desarrollado por los equipos del IGEM MIT 2010 y 2011, es un sistema para el ensamble de promotores, genes y vectores de expresión de mamíferos, conocidos como “MammoBlocks” ([www.partsregistry.org](http://www.partsregistry.org)).

Para mayor información sobre cada uno de los sistemas de composición estándar, se puede ingresar a la página web del Registro de Partes ([www.partsregistry.org](http://www.partsregistry.org)), en la sección de Catálogo.

### 3.2.2 Desacoplamiento.

El desacoplamiento parte de la idea de que resulta muy útil separar un problema complicado en pequeños problemas sencillos para su solución independiente, de manera que se logre solucionar el problema completo la producir así un todo funcional. Si bien esta perspectiva reduccionista puede no ser aplicada del todo en la Biología, ya que la unión de las partes no siempre genera el “todo” debido a la

vasta complejidad inherente a los sistemas biológicos, se pueden llevar a cabo acercamientos que la implementen de un modo benéfico, dentro del contexto de la estandarización previamente mencionado, para su uso en Biología Sintética. Así, un biólogo sintético puede desarrollar una célula que sirva de chasis y proveedora de suministros energéticos estándar, con tasas conocidas de producción de nucleótidos, aminoácidos y otros recursos para cualquier sistema biológico sintético introducido en ella, independientemente de los detalles del sistema.

El tipo de desacoplamiento más simple e inmediato es el que se diseña desde la fabricación, en este caso, desde la síntesis de DNA, lo cual es posible gracias al reciente y continuo desarrollo de las tecnologías para la síntesis de grandes cantidades de DNA (Endy, 2005).

Para que el desacoplamiento de los sistemas biológicos resulte del modo que ha resultado en otros campos de la Ingeniería, se asume la relación “un gen, una función”, por lo que es importante tomar en cuenta que deben escogerse genes con una única función, es decir, marcos abiertos de lectura que codifiquen para una sola proteína funcional (Gerstein et al, 2007).

### **3.2.3 Abstracción.**

Los sistemas biológicos de la naturaleza parecen ser muy complejos; cabe mencionar que aún no se conocen los mecanismos que regulan el comportamiento celular en su totalidad y que las “excepciones a la regla” abundan. Por lo tanto, es comprensible preguntarse si acaso es posible la construcción de sistemas biológicos sintéticos que se comporten como es esperado.

Una de las herramientas más útiles y poderosas para manejar la complejidad, sea del grado que sea, es la abstracción. Por medio de la abstracción se logran aislar los componentes fundamentales de un sistema para poder predecir su conducta y determinar su confiabilidad mediante la modelación matemática de sus interacciones.

Se han propuesto dos formas de abstracción importantes para la ingeniería genética. La primera es el establecimiento de una jerarquía abstracta para delimitar los niveles de complejidad en los sistemas biológicos, como se discutirá

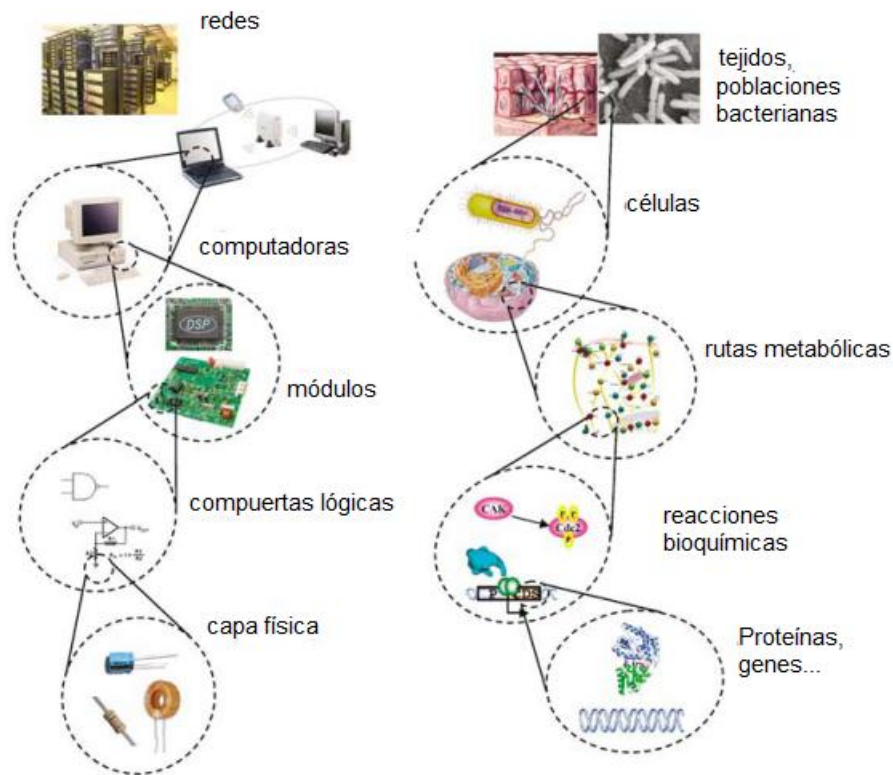
posteriormente. Esta jerarquía debe permitir el intercambio de información limitada entre niveles, así como permitir a los individuos que la usen trabajar a cualquier nivel de complejidad sin tener que conocer los detalles de los otros niveles.

La segunda forma de abstracción implica el rediseño de las partes y dispositivos biológicos para que resulten más simples de modelar y fácil de combinar unos con otros. Esto significa que las biopartes “naturales”, que es el modo en que se encuentran en los seres vivos, deben ser optimizadas para cumplir con ciertos estándares, como por ejemplo uniones parte-parte comunes, convirtiéndolas en “biopartes estandarizadas”. Este refinamiento de las biopartes naturales para producir biopartes estandarizadas puede resultar similar a la selección negativa en contra de las interacciones moleculares que son promiscuas y deletéreas dentro de tipos celulares específicos que ocurre en la naturaleza (Endy, 2005).

### **Jerarquización en los sistemas biológicos.**

Para lograr establecer a la Biología como una ciencia formal, es necesario adaptar algunos criterios y métodos utilizados en otros campos de la Ingeniería, como la estandarización, la abstracción y el desacoplamiento; para esto, se deben tomar en cuenta las características inherentes de los dispositivos y módulos biológicos, tales como las variaciones provocadas por la expresión genética, mutaciones, muerte celular, ambientes extracelulares cambiantes e interacciones con el contexto celular, entre otros. Ciertamente, manejar la complejidad que esto implica es desafiante, pero no imposible. Un acercamiento para lograrlo es conceptualizar una jerarquía para la Biología Sintética, a modo de analogía con la Ingeniería Computacional, en donde las partes se van uniendo para formar dispositivos más complejos de niveles superiores, hasta formar un sistema. El diseño de una nueva conducta ocurre en la cima de la jerarquía, pero se implementa desde abajo; así, algunos autores proponen la siguiente jerarquía, ilustrada en la figura 3: en la base están el DNA, el RNA, las proteínas y los metabolitos, análogos a la capa física de transistores, capacitores y resistores en computación. El siguiente nivel, constituido por los dispositivos, comprende las reacciones bioquímicas que

regulan el flujo de información y manipulan los procesos físicos, equivalente a las puertas lógicas que llevan a cabo cálculos en una computadora. Después sigue el nivel modular, en donde se utiliza una librería diversa de dispositivos biológicos para ensamblar complejas rutas que funcionan como circuitos integrados. La conexión de estos módulos entre sí y su integración dentro de células hospederas, permite extender o modificar la conducta celular en un modo programable. Aunque células independientes pueden llevar a cabo tareas de varios grados de complejidad, es posible desempeñar tareas coordinadas más sofisticadas cuando se utilizan poblaciones de células, como en el caso de las redes computacionales en donde un grupo de computadoras trabaja en conjunto (Andrianantoandro et al, 2006).



**Figura 3. Una posible jerarquía para la Biología Sintética está inspirada en la ingeniería computacional (tomada de Andrianantoandro et al, 2006).**

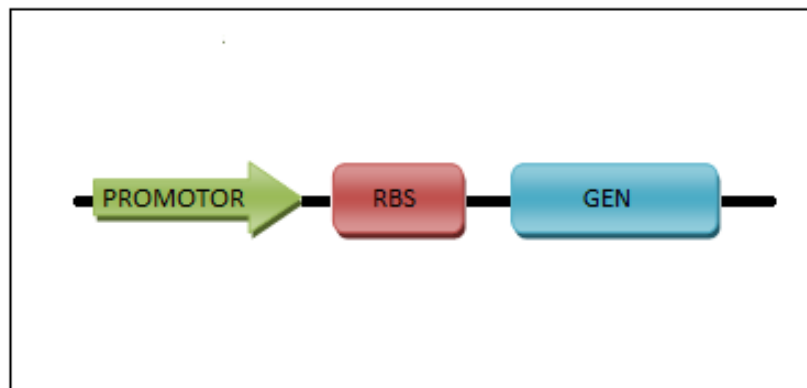
Para que esta jerarquía pueda funcionar, es necesario que se logren estandarizar, caracterizar y modelar adecuadamente los componentes fundamentales de los sistemas biológicos, para poder entender cómo el funcionamiento de un módulo, o

inclusive de todo un sistema biológico, se deriva de la función de cada una de sus partes. Con estos conocimientos, se podrán establecer las *reglas de composición* necesarias para construir módulos a partir de dispositivos y sistemas a partir de módulos (Purnick y Weiss, 2009).

### 3.3 Componentes biológicos.

#### 3.3.1 Biopartes.

El componente biológico más simple usado en Biología Sintética, es la “parte” o también llamada “bioparte”. Una bioparte es una secuencia de DNA específica que codifica cierta información y como resultado, lleva a cabo una función definida. Así, un promotor de la expresión genética tiene una función reguladora, un sitio de unión al ribosoma tiene la función de dirigir la traducción proteica o un marco abierto de lectura que codifica para una proteína en particular. Cada uno de estos elementos, codificados por una secuencia específica, constituye una bioparte (Helman et al, 2007). En la figura 4 se ejemplifican tres tipos de biopartes.



**Figura 4. Tres biopartes diferentes (un promotor, un sitio de unión al ribosoma (RBS) y un gen) ensambladas en un dispositivo.**

Se puede diferenciar entre dos tipos de biopartes: las llamadas “naturales”, que son secuencias que no han sido modificadas y por lo tanto son iguales a las que se encuentran en la naturaleza; y las biopartes “estandarizadas”, que son aquellas que han sido manipuladas para cumplir con un diseño específico y requerimientos operativos definidos. Los requerimientos de mayor interés son aquellos que tienen una composición física y funcional confiable, tales como los sitios de restricción (Helman et al, 2007).

La Ingeniería Genética actual depende en mayor parte del diseño, construcción y uso de DNA modificado, por lo que en este nivel de complejidad se toman en cuenta las biopartes cuyas actividades están directamente codificadas por DNA, o por medio de moléculas cuya estructura primaria está directamente derivada de éste, como el RNA y las proteínas. Es por esto que otras clases de biomoléculas, como los oligosacáridos, metabolitos o pequeñas moléculas, no son consideradas dentro del marco teórico aquí descrito (Helman et al, 2007).

La lista de funciones codificadas por biopartes individuales es ilimitada, entre ellas se pueden mencionar la regulación de la expresión genética (mediante promotores o *enhancers*); diferentes enzimas para la catálisis de un millar de reacciones químicas en los organismos; señales de localización (segmentos cortos de aminoácidos añadidos a proteínas como etiquetas), entre otros (Helman et al, 2007).

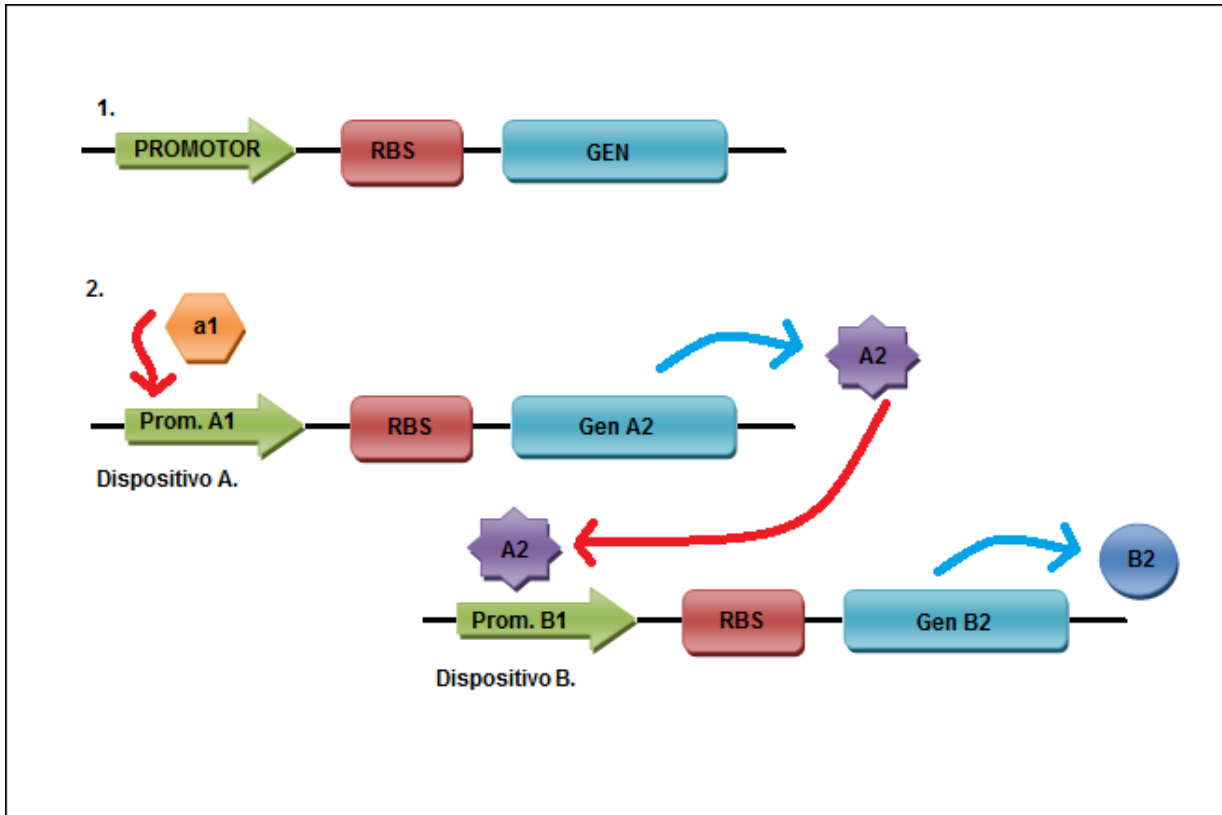
### **3.3.2 Dispositivos genéticos.**

La noción de un dispositivo es una abstracción basada en procesos físicos que permiten la descomposición de sistemas en partes funcionales básicas. Para los biólogos sintéticos, las unidades básicas de diseño son las biopartes, las cuales representan funciones biológicas (Andrianantoandro et al, 2006).

Los dispositivos biológicos representan conjuntos de una o más reacciones bioquímicas, incluyendo transcripción, traducción, fosforilación de proteínas, regulación alostérica, unión ligando-receptor y reacciones enzimáticas. La diversidad bioquímica que hay entre los diferentes dispositivos provoca ventajas y desventajas para cada uno de estos ya que las funciones celulares de un dispositivo están condicionadas por el sustrato y las reacciones bioquímicas escogidas. Tipos particulares de dispositivos pueden resultar más apropiados para actividades biológicas y escalas de tiempo específicas. Esta diversidad hace difícil integrar y sincronizar varios dispositivos, pero al mismo tiempo, permite la construcción de sistemas complejos con funciones variadas.

Hay dos opciones al trabajar con dispositivos genéticos: se pueden usar los existentes en la naturaleza, sin alteraciones (como un factor de transcripción y su

promotor para regular un gen), o se pueden construir dispositivos a partir de reactantes bioquímicos modificados (Andrianantoandro et al, 2006). En la figura 5 se ejemplifica un dispositivo sencillo formado por tres biopartes y dos dispositivos interactuando entre sí.



**Figura 5.** Se muestran dos esquemas: 1. Ejemplo de un dispositivo sencillo compuesto por un promotor, un sitio de unión al ribosoma (RBS) y un gen. 2. Dos dispositivos interactuando: el dispositivo A responde a la presencia del “químico a1” expresando el gen “A2”, cuyo producto se une al promotor “B1” del dispositivo B induciendo la transcripción del gen “B2”.

### Tipos de dispositivos genéticos.

Se distinguen tres tipos de dispositivos genéticos: 1) los sistemas de control no transcripcional; 2) los sistemas de control transcripcional y 3) los sistemas de interacción proteína-ligando y proteína-proteína.

#### 1) Sistemas de control no transcripcional.

Consisten en RNAs no codificantes que pueden activar o silenciar la expresión genética mediante la regulación de eventos de traducción.

Funcionan del siguiente modo: el transcrito de un gen blanco contiene una secuencia de RNA artificial *río arriba* que es complementaria a su sitio de unión al ribosoma (RBS), éste forma una estructura en forma de *tallo-asa* en la región RBS, inhibiendo así la traducción del gen blanco mediante represión en *cis*.

### 2) *Sistemas de control transcripcional.*

Son secuencias de nucleótidos que determinan directamente la especificidad y la eficiencia de las interacciones, por lo cual son relativamente flexibles, fáciles de construir y de conectar unos con otros; por ejemplo, basta con colocar el promotor de un dispositivo en frente del gen que codifica para un represor o activador de otro. Además tienen otras propiedades útiles, incluyendo la amplificación de señal, control combinatorio llevado a cabo por múltiples factores de transcripción y control de múltiples blancos *río abajo*. En este tipo de dispositivos, los cambios en la salida son lentos, debido a que el proceso de expresión genética ocurre en una escala de minutos y consumen una gran cantidad de recursos celulares durante su función, ya que para lograr cambios detectables en la salida se requieren varios eventos de síntesis de las proteínas involucradas.

### 3) *Sistemas de interacción proteína-ligando y proteína-proteína.*

Estos dispositivos han sido modificados específicamente para llevar a cabo nuevas interacciones entre ligandos o proteínas que naturalmente no se reconocen entre sí. Se han desarrollado varios acercamientos para lograr estas modificaciones específicas: se ha hecho recombinación modular para crear mecanismos de compuertas alostéricas; otros investigadores crearon interruptores o *switches* proteicos mediante la inserción de dominios alostéricos en enzimas existentes; inserción aleatoria de dominios seguida de evolución dirigida para producir enzimas híbridas; mutagénesis guiada por química computacional y algoritmos de reconocimiento geométrico para modelar sitios de unión y así conferir actividad alterada, seguida por refinamiento mediante evolución dirigida, por mencionar algunos.

Para poder construir dispositivos de interacciones proteicas, las proteínas involucradas deben estar bien caracterizadas para determinar qué cambios,



deleciones y reemplazos de dominios pueden ocurrir, ya que su estructura tridimensional juega un papel primordial en la naturaleza de sus interacciones con otras proteínas.

Este último tipo de dispositivos no son fáciles de emparar con otros; al hacerlo, hay que validar que ocurre la transferencia de información entre dispositivos. Sin embargo ofrecen importantes ventajas de diseño: debido a que las reacciones enzimáticas y de unión ligando-proteína ocurren en escalas de tiempo de milisegundos, los cambios en la salida son muy rápidos; es posible amplificar las señales (a través del reciclaje de cinasas u otras enzimas) y consumen pequeñas cantidades de recursos celulares, ya que se lleva a cabo una mínima cantidad de síntesis de proteínas para producir una señal de salida cuando se usan proteínas que pueden pasar por eventos de interacción repetidos, con múltiples parejas (Andrianantoandro et al, 2006).

### **3.3.3 Módulos genéticos.**

Un módulo es un conjunto compartimentado de dispositivos con funciones interconectadas que llevan a cabo tareas complejas. En una célula, un módulo equivale a una ruta metabólica específica o a una ruta de transducción de señales.

Un módulo sencillo puede verse como un motivo de red o patrón recurrente, mientras que un módulo complejo puede estar constituido por muchos motivos y no necesariamente ocurrir frecuentemente.

La mayoría de los dispositivos se derivan de sistemas que existen naturalmente. Al tratar de construir módulos a partir de estos dispositivos, los biólogos sintéticos se encuentran con un problema importante que lo dificulta: la evolución ha optimizado estos dispositivos para que trabajen dentro de su contexto natural, por lo que puede que no funcionen si son conectados unos con otros en un contexto artificial; en concreto, los dos principales problemas a afrontar son la sincronización de la cinética enzimática y la optimización de las reacciones ocurridas en un ambiente nuevo. Para superar estos problemas, normalmente se cambian las características del dispositivo, para adecuarlo y producir así las funciones lógicas deseadas cuando dos o más dispositivos son sincronizados.

Recientemente, se han implementado estrategias como el rediseño racional basado en modelación matemática y evolución dirigida sobre los dispositivos para poder unirlos y que funcionen juntos correctamente (Andrianantoandro et al, 2006).

Los módulos sintéticos son más comprensibles, cuantitativamente, que los módulos naturales, ya que poseen límites bien definidos y puntos de conexión con otros módulos, por lo que son fáciles de aislar de los demás procesos celulares; es más sencillo removerlos, alterarlos o reemplazarlos. Además, se pueden programar con funciones más allá de las disponibles en la naturaleza (Andrianantoandro et al, 2006). En la figura 6 se muestra un ejemplo de un módulo

gen

ético

o

con

stitu

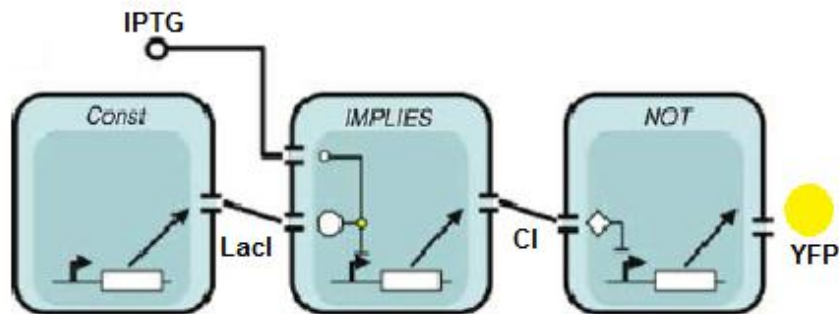
ido

por

tres

disp

ositivos.



**Figura 6. Ejemplo de un módulo genético: un Inversor transcripcional constituido por tres dispositivos: uno de expresión constitutiva (Const), IMPLIES y un inversor (NOT). LacI es la señal de salida del dispositivo constitutivo, ésta molécula junto con el IPTG son las señales de entrada para el dispositivo IMPLIES; CI es la señal**

de salida de IMPLIES y la señal de entrada para el dispositivo NOT , el cual tiene a la proteína amarilla fluorescente (YFP) como señal de salida (Tomado de Andrianatoandro et al, 2006).

### **Tipos de módulos genéticos.**

Los principales prototipos de módulos se distinguen en tres categorías: 1) redes de regulación transcripcional, 2) rutas de señalización mediadas por proteínas y 3) redes metabólicas sintéticas.

#### **1) Redes de regulación transcripcional:**

Incluyen cascadas transcripcionales y motivos de anticipación y de retroalimentación (tanto negativa como positiva). Constituyen el tipo de módulos más implementado y por lo tanto mejor caracterizado hasta la fecha.

##### a) Cascadas transcripcionales:

En estado de equilibrio, la señal de salida es monotónica con respecto a la señal de entrada. Bajo ciertas condiciones, la sensibilidad de la cascada a un estímulo aumenta cuando incrementan los pasos que la constituyen. El retraso (*delay*) de la respuesta, también tiene una correlación directa con la longitud de la cascada. Este retraso puede usarse para conocer el orden temporal de los eventos que la constituyen y también puede atenuar el ruido que pudiera provocar la expresión genética (Hooshangi et al, 2005; Andrianantoandro et al, 2006).

Un ejemplo de una cascada transcripcional sintética es una serie concatenada de inversores transcripcionales genéticos.

##### b) Motivos de anticipación:

Consisten de dos factores de transcripción, cada uno de los cuales regula al otro y ambos a su vez regulan un gen blanco. Esta configuración permite pasar de una respuesta transitoria no monotónica a un estímulo escalonado. Hay dos tipos de módulos de anticipación: los coherentes y los incoherentes.

En los módulos de anticipación coherentes las rutas de regulación, tanto directa como indirecta, responden del mismo modo que la señal de entrada (*input*), retrasando la respuesta cuando el estímulo se amplifica. Por el contrario, en los módulos de anticipación que son incoherentes, estas rutas de regulación

responden de modo opuesto que la señal de entrada, acelerando la respuesta cuando el estímulo se amplifica.

### c) Motivos de retroalimentación:

Este tipo de regulación se usa para generar un estado y funciones de memoria o para las dinámicas generadas internamente. Hay dos tipos de módulos que usan motivos de retroalimentación: los que trabajan con ciclos de retroalimentación positiva y los que lo hacen con ciclos de retroalimentación negativa.

Los de retroalimentación positiva pueden generar una biestabilidad en el sistema, mientras que los de retroalimentación negativa producen oscilaciones.

Los motivos de retroalimentación positiva, también llamados interruptores de palanca o "*toggle switch*", son redes genéticas biestables, es decir, con dos estados: encendido y apagado o gen 1 y gen 2. Este tipo de redes mantiene un estado inclusive cuando cesa el estímulo de entrada. Por ejemplo, un metabolito transitorio o una variación de temperatura, cambia al interruptor para que exprese un gen en lugar del otro, o viceversa (Andrianantoandro et al, 2006).

Los motivos de retroalimentación negativa son aquellos que responden de manera opuesta a la señal de entrada cuando se llega a un umbral de saturación. De este modo, al aumentar la señal de entrada hasta el umbral se reduce la señal de salida para reestablecer el equilibrio interno del módulo ([http://www.biology-online.org/dictionary/Negative\\_feedback](http://www.biology-online.org/dictionary/Negative_feedback)). Se conocen como osciladores porque son módulos que cambian entre dos o más estados, ya que cuando se llega al estado de saturación automáticamente se tiende al estado de equilibrio.

## **2) Rutas de señalización mediadas por proteínas:**

Este tipo de módulos biológicos sintéticos se diseñan y crean mediante la modificación y ensamble de los dispositivos de transducción de señales. El desarrollo de este tipo de módulos llevará a la aparición de rutas sintéticas de transducción de señales que puedan crear módulos con nuevas señales de entrada y de salida (*inputs* y *outputs*). Actualmente este tipo de módulos se encuentran poco desarrollados ya que utilizan una variedad de motivos de red

mayor que los módulos de regulación transcripcional, pero procesan cambios celulares y ambientales rápidamente y tienen un gran potencial para su uso en sistemas sintéticos.

### **3) Redes metabólicas sintéticas:**

Los ejemplos existentes de redes metabólicas sintéticas utilizan elementos de control transcripcional y traduccional para regular la expresión de enzimas que sintetizan y rompen metabolitos. En este tipo de sistemas, la concentración de un metabolito actúa como un estímulo de entrada para otro elemento de control.

El trasplante exitoso de al menos una ruta metabólica completa de una especie a otra (o incluso de un dominio a otro), junto con la modificación de enzimas involucradas, lleva a la producción de metabolitos sintéticos que tienen un uso potencial en industrias como la alimentaria y farmacéutica (Andrianantoandro et al, 2006).

Al diseñar una red metabólica se debe tomar en cuenta que para su funcionamiento es necesaria la presencia de los precursores metabólicos adecuados, por lo que a veces resulta útil incluir otras enzimas o rutas metabólicas que sintetizan los precursores para los metabolitos requeridos.

Además de la producción de metabolitos sintéticos, se pueden generar circuitos genéticos compuestos de redes metabólicas conectadas a proteínas reguladoras y elementos de control transcripcional, inclusive se pueden incorporar motivos complejos, como una red oscilatoria (Andrianantoandro et al, 2006).

### **Expectativas.**

Las investigaciones futuras probablemente se centrarán en la integración de estos motivos básicos para formar módulos complejos con funciones interesantes de alto nivel como contadores, sumadores, integradores de múltiples señales, entre otros. La conexión apropiada de los diversos tipos de módulos explicados antes puede extender sus funciones, logrando procedimientos más confiables, puntos de conexión definidos con el contexto celular para así generar células bien diseñadas (Andrianantoandro et al, 2006).

### **Contexto celular y la conexión de módulos genéticos.**

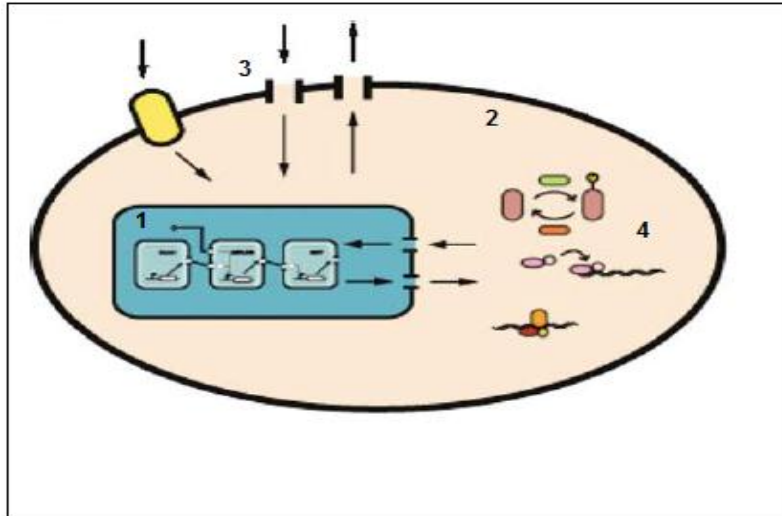
El funcionamiento adecuado de un módulo genético dentro de una célula no solo depende de los dispositivos que lo componen y sus conexiones, también es de suma importancia el contexto celular en el que opera.

El contexto celular incluye a los procesos bioquímicos generales, tales como el metabolismo de DNA y RNA, la disponibilidad de aminoácidos, los niveles de ATP, la síntesis de proteínas, el ciclo y la división celular y procesos específicos como rutas de señalización endógenas (Andrianantoandro et al, 2006).

El mismo circuito genético puede tener diferentes conductas en células hospederas ligeramente distintas; esto es porque los dispositivos sintéticos pueden interferir en mayor o menor grado en los procesos endógenos.

La integración y función de un módulo sintético dentro de una célula hospedera puede afectar fundamentalmente sus procesos, alterando por lo tanto el contexto celular, lo que altera al mismo tiempo la conducta de dicho módulo como se aprecia en la figura 7.

Debido a esta relación entre los módulos sintéticos y su contexto celular, cualquier fluctuación en los procesos de la célula hospedera es transmitida al módulo, afectando su señal de salida y viceversa (Andrianantoandro et al, 2006; Voigt, 2006). Esto repercute directamente en la caracterización de los dispositivos y módulos: las mediciones determinadas en una célula hospedera no necesariamente serán iguales a las que son hechas en otra.



**Figura 7.** “Los módulos operan dentro de un contexto celular y por lo tanto lo modifican”. Se muestra el módulo ejemplificado previamente (1) dentro de una célula hospedera (2), las interacciones de éstos con el medio extracelular (3) y los procesos endógenos que constituyen el contexto celular (4) (Tomado de Andrianatoandro et al, 2006).

Así, es necesario contar con una manera cuantitativa de codificar o señalar el contexto necesario (*context dependence*) para un módulo específico y componer funcionalmente el contexto necesario para múltiples módulos.

Las aproximaciones como el rediseño racional, evolución dirigida y la modelación matemática usadas en el ensamble de dispositivos, pueden servir de manera similar en la tarea de sincronizar los módulos con el contexto celular de una célula hospedera (Andrianantoandro et al, 2006).

La inserción de algunos módulos puede resultar sencilla, pero otros implicarán mayor dificultad y requerirán una modificación mayor de la célula hospedera para lograr una compatibilidad óptima. La adición de múltiples módulos a la vez, con este método, resultaría sumamente difícil. En este sentido hay una comparación con la ingeniería de software, que es útil para entender este problema: la inserción de módulos sintéticos en una célula hospedera es como añadir software extraño a un sistema operativo, cada nuevo programa con su propio “parche”. La adición de demasiados programas lleva usualmente a la inestabilidad del sistema. Por ello, algunos investigadores proponen otra estrategia: construir un nuevo sistema operativo, es decir, crear un organismo nuevo mediante la síntesis de su genoma

que constituiría un "chasis estándar" tanto para el diseño de sistemas biológicos sintéticos como para su caracterización, aunque esto aún no ha sido posible (Andrianantoandro et al, 2006; Porcar et al, 2011).

### **3.3.4 Sistemas biológicos.**

Algunos autores consideran a los módulos como sistemas; en este trabajo se considerará como sistema biológico sintético a aquel en el que están involucrados dos o más módulos sintéticos, ya sea dentro de una célula hospedera o en los sistemas libres de células (*cell-free system*).

## **3.4 Registro de Partes Biológicas Estándar (*Registry of Estándar Biological Parts*).**

El Registro de Partes consiste en la librería principal de biopartes disponibles en la comunidad de Biología Sintética internacional, en la que se incluyen a los estudiantes y laboratorios académicos participantes en el IGEM. Fue fundada en el 2003 en el Instituto Tecnológico de Massachusetts (MIT) como un esfuerzo de la comunidad para lograr facilitar la bioingeniería.

Esta colección de biopartes está basada en el principio de "tomar un poco, dar un poco" para poder construir entre todos sus participantes una gran base de datos actualizada, mejorada y eficaz para hacer Biología Sintética. La información está disponible para cualquier alumno o integrante de un laboratorio registrado en el IGEM.

En el Registro de Partes se puede encontrar toda la información necesaria para diseñar y desarrollar un sistema biológico sintético desde sus partes.

Tiene cuatro secciones principales: el catálogo de partes y dispositivos; la sección de ayuda; la sección de grupos y usuarios y la sección de repositorios de DNA.

La sección de los repositorios de DNA es una base de datos que tiene toda la información referente al almacenamiento físico de las biopartes, como secuencias de DNA en plásmidos dentro de células. Una misma parte funcional puede



encontrarse disponible en varias cepas bacterianas, distintos plásmidos y debido a las distintas técnicas de ensamble posibles, puede que existan partes con la misma función pero distintas cicatrices de marca entre sus componentes, es decir, con distinta secuencia pero misma función.

Es importante destacar que el Registro de Partes Biológicas Estándar es una página que se actualiza constantemente. Sobre todo en los últimos tres años se ha hecho un gran esfuerzo por tratar de incluir la mayor cantidad de biopartes caracterizadas y funcionalidad reportada ([www.partsregistry.org](http://www.partsregistry.org)).

### **3.4 OpenWetware (OWW).**

Con el slogan "comparte tu ciencia", *OpenWetware* es una *Wiki* que ha sido desarrollada con la meta de compartir información, los "*know-how*" y el conocimiento entre investigadores y laboratorios alrededor del mundo que trabajan en biología, específicamente bioingeniería. De este modo los integrantes de la llamada "comunidad OWW" pueden organizar su información en línea y colaborar con otros investigadores o laboratorios de un modo fácil y eficaz. Este conjunto de páginas tiene libre acceso, solamente se requiere una cuenta para poder editar los contenidos y usar aplicaciones.

Está dividida en cuatro secciones principales: laboratorios y grupos; cursos; protocolos y blogs. Además tiene una barra de menús vertical donde hay herramientas de navegación, investigación, búsqueda, "caja de herramientas" y una lista de los autores contribuyentes más importantes del sitio.

Las principales ventajas del *OpenWetware* son la disponibilidad de protocolos, materiales (información necesaria para la preparación de medios de cultivo, soluciones amortiguadoras, antibióticos, así como las especificaciones para enzimas, reporteros, proteínas fluorescentes, detergentes y otros químicos necesarios para la implementación adecuada de los protocolos descritos en el OWW), guías para la investigación (tipo de equipo necesario para un laboratorio, las cepas bacterianas a usar, vectores de clonación, estadísticas, revistas científicas, información sobre organismos como *E. coli*, ligas a páginas útiles, ayuda para la búsqueda de información, tutoriales y blogs) y la bitácora virtual.

Para una rama de la biología interdisciplinaria como lo es la Biología Sintética, el OWW constituye uno de los principales medios para hacer posible su desarrollo, ya que permite que investigadores con distintas formaciones y especialidades trabajen en conjunto ([www.openwetware.org](http://www.openwetware.org)).

### **3.6 Caracterización en Biología Sintética.**

Caracterizar, según la Real Academia de la Lengua Española es “determinar los atributos peculiares de algo, de modo que claramente se distinga de los demás”. Ahondando en esta definición, se puede decir que caracterizar, en Biología Sintética, es determinar las características funcionales y de composición de una construcción genética. Se puede hablar de dos etapas de caracterización: la cualitativa y la cuantitativa.

Las características funcionales más usuales a determinar en la caracterización de una bioparte en Biología Sintética son: las interfaces constituidas por los *inputs*, señales de entrada, y los *outputs*, señales de salida y el contexto necesarios para la operación correcta de la parte a caracterizar; la función de transferencia; la compatibilidad con otras partes o dispositivos; el estado de equilibrio del sistema y la conducta dinámica. Las características de composición que se reportan son: número o clave de identificación de la parte o dispositivo y la descripción de las partes físicas que componen al dispositivo (su secuencia; Canton et al, 2008). Idealmente, estas características se reportarían en unidades de medición estándar, sin importar el método de medición usado, para su comparación en otros laboratorios.

El IGEM, junto con el Registro de Partes, consideran cinco características fundamentales que deben ser medidas y reportadas para tener una caracterización adecuada: rendimiento estático, rendimiento dinámico, compatibilidad, confiabilidad y demanda de recursos ([http://igem.org/Videos/Measuring\\_Parts,2012](http://igem.org/Videos/Measuring_Parts,2012)) definidos en la tabla 2.

**Tabla 2. Definición de las características sugeridas por el IGEM y el Registro de Partes, que son el rendimiento estático, el dinámico, compatibilidad, confiabilidad y demanda de recursos (Tomado de Canton et al, 2008).**

<b>Característica</b>	<b>Definición.</b>
<b>Rendimiento estático</b>	Describe la relación entre el <i>input</i> y el <i>output</i> en estado estacionario. Se toma como estado estacionario el minuto 60 después de la inducción del dispositivo. La cantidad de inductor se mantiene constante.
<b>Rendimiento dinámico</b>	Describe la respuesta del dispositivo ante un incremento periódico de inductor desde el tiempo 0 hasta un intervalo determinado de <i>n</i> minutos.
<b>Compatibilidad</b>	Una lista de organismos, vectores y dispositivos biológicos en donde se sabe que el dispositivo funciona cualitativamente.
<b>Confiabilidad</b>	Define la estabilidad funcional del dispositivo a través de varias generaciones.
<b>Demanda de recursos</b>	Es la cantidad de recursos que necesita el dispositivo de la célula hospedera para funcionar. Para la actividad transcripcional se reporta como la cantidad de nucleótidos requeridos por célula por segundo y se obtiene como una función de la longitud del transcrito proteico producido por el <i>output</i> .

### 3.6.1 Hojas de datos.

Las descripciones cuantitativas que resultan de la caracterización de un dispositivo, en este caso una bioparte, se pueden integrar en una hoja de datos, por medio de la cual los futuros usuarios pueden determinar rápidamente si la conducta del dispositivo cumplirá o no con los requerimientos de un sistema deseado (Canton et al, 2008; Arkin, 2008).

Una hoja de datos puede definirse como la descripción física y funcional de un dispositivo (Arkin, 2008). Las características que idealmente se reportarían en una hoja de datos son: primero, una definición de la función y las interfaces del dispositivo (entradas y salidas), así como un número de identificación y descripción de las partes físicas que lo integran; segundo, el contexto en que

opera; y tercero, características medidas que describen la conducta cuantitativa del dispositivo. Otras características cruciales son la función de transferencia (*transfer function*), que detalla la relación estática entre las entradas y las salidas del dispositivo, y permite la predicción de la conducta de equilibrio en dispositivos compuestos y la conducta dinámica, que indica el tiempo de respuesta del dispositivo. Además es importante reportar la compatibilidad del dispositivo con otros dispositivos o en condiciones de operación distintas. La confiabilidad, o el tiempo esperado para que falle el dispositivo, es relevante para usos con escalas de tiempo relativamente largas, también es importante incluir una descripción de los recursos consumidos. En la figura 8 se muestra el ejemplo de una hoja de datos.

Como cada caracterización depende principalmente de la naturaleza de la bioparte o del dispositivo, la información contenida en las hojas de datos variará según los parámetros obtenidos para cada tipo de interacciones, así para sistemas de comunicación celular como *quorum* sensing se incluyen las curvas de estado estable y dinámico con varios tipos de moléculas inductoras, la homogeneidad de inducción a nivel poblacional, efectos de la inducción en la tasa de crecimiento, etcétera; para uniones de dominios proteicos con DNA se sugiere la estructura cristalina del dominio, su estabilidad en diferentes hospederos, constantes de unión para distintas secuencias de DNA, etcétera; o para bacterias con fines terapéuticos es útil incluir parámetros como la tasa de sobrevivencia en diferentes hospederos, curvas de dosis-eficiencia, tasa de mutación, entre otros (Arkin, 2008).

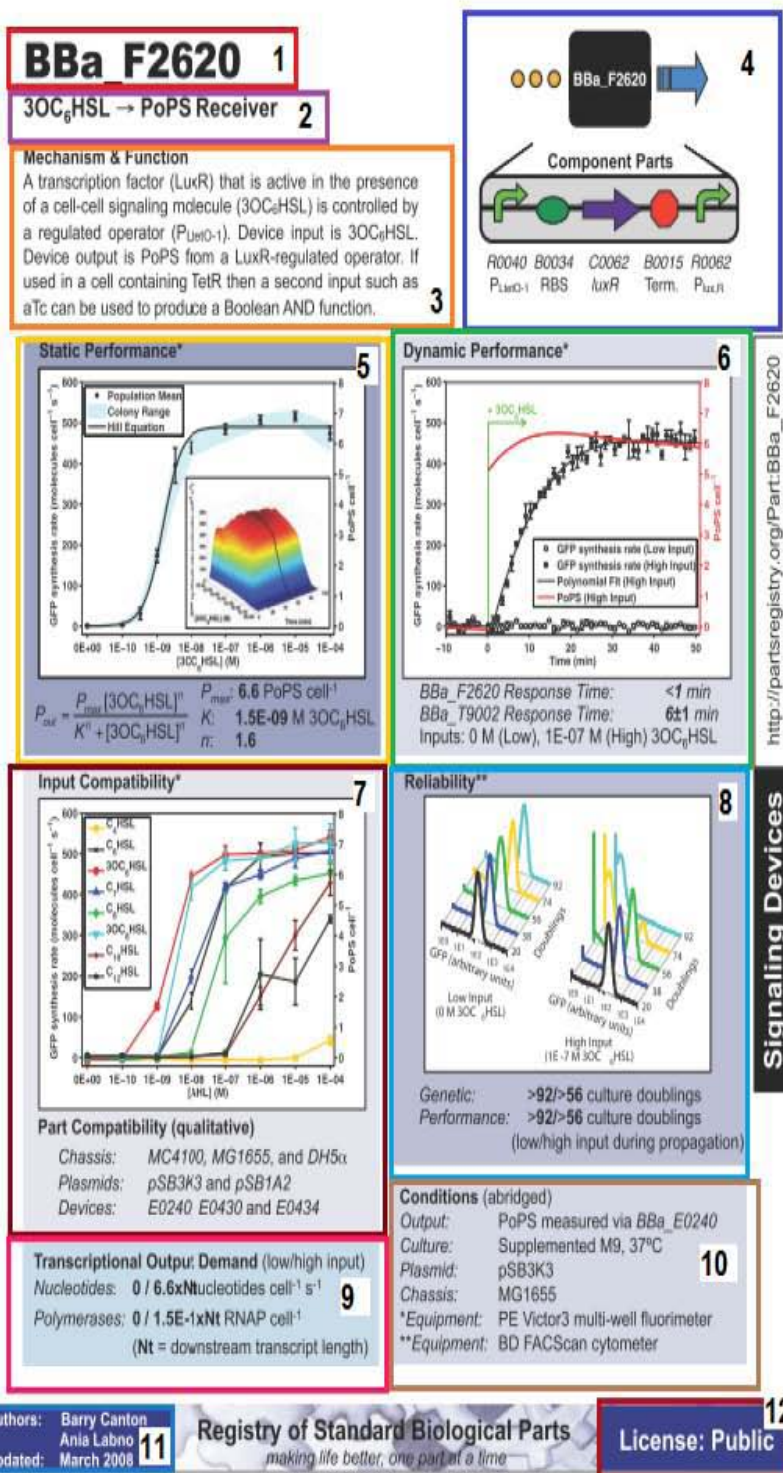


Figura 8. Ejemplo de una hoja de datos en donde se pueden notar las siguientes especificaciones:

1. Número de identificación
2. Interfases (señales de entrada y de salida)
3. Descripción de su función
4. Descripción física (componentes)
5. Rendimiento estático
6. Rendimiento dinámico
7. Compatibilidad
8. Confiabilidad
9. Demanda de recursos
10. Condiciones de medición
11. Autores
12. Licencia de uso.

(Canton et al, 2008).

Authors: Barry Canton  
 Ania Labno  
 Updated: March 2008

Registry of Standard Biological Parts  
 making life better, one part at a time

License: Public

### **3.6.2 Avances en la caracterización de biopartes, dispositivos, módulos y sistemas biológicos sintéticos.**

Hoy en día existen más preguntas que respuestas sobre la caracterización de biopartes y dispositivos genéticos. Si bien se han establecido las bases para llevar a cabo esta tarea, aún no se ha descrito un procedimiento estándar para consolidarla, principalmente por las especificaciones y diferencias entre cada tipo de bioparte, dispositivo o sistema. En todo caso se puede esperar que surjan varios protocolos estándar para la caracterización de cada tipo de componente biológico.

La caracterización de las biopartes existentes es una tarea que ha tenido un mayor impulso en los últimos años, ya que constituye uno de los pasos limitantes en la Biología Sintética para la construcción de nuevos sistemas biológicos que funcionen como es esperado, esto mediante la estandarización de sus componentes y el conocimiento de sus características funcionales más relevantes. Es por esto que la búsqueda de uno o varios métodos estandarizados para caracterizar los componentes biológicos sintéticos creados y por crear, constituye una de las principales ramas de investigación actual dentro de la Biología Sintética. Algunas de las investigaciones para el establecimiento del marco teórico y de técnicas para lograr una caracterización simple y estandarizada se realizan por laboratorios como el del departamento de Bioingeniería de la Universidad de Stanford, California, dirigido por Drew Endy con investigadores como Jennifer Braff y Caitlin Conboy

([http://openwetware.org/wiki/Parts\\_characterization/](http://openwetware.org/wiki/Parts_characterization/), 2011).

El paradigma principal de las técnicas de caracterización recae en la medición de los niveles de DNA, RNA y proteínas asociados con una bioparte, tanto a nivel poblacional como a nivel de células individuales. Para registrar niveles de DNA se usan mediciones de número de copias de un plásmido; para el RNA se están

usando experimentos de tipo “*Northern Blot*” y RT-PCR y para niveles de proteínas inmunodecoraciones cuantitativas tipo “*Western Blot*”, multilectores de placas y citometría de flujo utilizando proteínas fluorescentes

([http://openwetware.org/wiki/Parts\\_characterization/Measurement\\_techniques,2011](http://openwetware.org/wiki/Parts_characterization/Measurement_techniques,2011)).

Actualmente, el método más común para probar biopartes es el uso de ensayos de fluorescencia. Ejemplos de protocolos de este tipo se pueden encontrar en la página del OWW del laboratorio de Endy, de la Universidad de Stanford, California ([http://partsregistry.org/Characterization\\_of\\_Parts](http://partsregistry.org/Characterization_of_Parts)).

Para reportar los resultados en estos protocolos, específicamente en la caracterización de promotores, han surgido dos tipos de acercamientos de medición: la actividad absoluta y la actividad relativa de un promotor. Ambas utilizan una construcción en donde los promotores a probar están unidos a un gen que codifica a una proteína fluorescente como reportera de la actividad, por eso se mide mediante ensayos de fluorescencia, en donde la síntesis de GFP se toma como una medida indirecta de la actividad de un promotor. La “actividad de un promotor” es considerada una de las mejores propiedades a medir en una caracterización, ésta se define como la tasa de iniciación de la transcripción y ya que la función de un promotor es iniciar la transcripción, por consenso general se considera que su actividad es el mejor indicador del funcionamiento de este tipo de bioparte.

La actividad absoluta de un promotor se define como el número de moléculas de RNA polimerasas que pasan por el último par de bases del promotor y continúan a lo largo del DNA como un complejo de elongación. La unidad genérica de la actividad de un promotor se conoce como “polimerasas por segundo” (*PoPS*).

La actividad relativa de un promotor es el coeficiente de la actividad absoluta de un promotor prueba, relativo a la actividad absoluta de un promotor de referencia estándar. Es decir, se compara qué tanta actividad tiene un promotor con relación a la de un promotor de referencia, cuya actividad se considera como 1 RPU. RPU es la unidad genérica de este tipo de medición y significa unidades relativas de promotor (*relative promoter units*). Existe un debate sobre cuál de los dos

acercamientos es mejor, pues mientras las unidades absolutas reportan resultados cuantitativos más específicos, las relativas tienen menores fluctuaciones o variaciones en un amplio rango de condiciones (Kelly et al, 2009).

Los modelos matemáticos más comúnmente utilizados para describir el comportamiento de los dispositivos caracterizados están basados en dinámicas transcripcionales sencillas que se comportan de acuerdo a la ley de acción de masas, en donde se supone que la velocidad de reacción es proporcional a las masas activas de las sustancias reaccionantes. Entonces, la actividad transcripcional se comporta como se describe en la función de Hill, al mostrar una curva sigmoidea en donde la afinidad de la RNA polimerasa incrementa en relación lineal con la cantidad de inductor hasta llegar a un umbral de saturación, como se observa en la figura 9. En estos casos, se formula un modelo y posteriormente, con base en los datos experimentales, se ajustan los parámetros utilizando mínimos cuadrados (Apéndice; Canton et al, 2008).

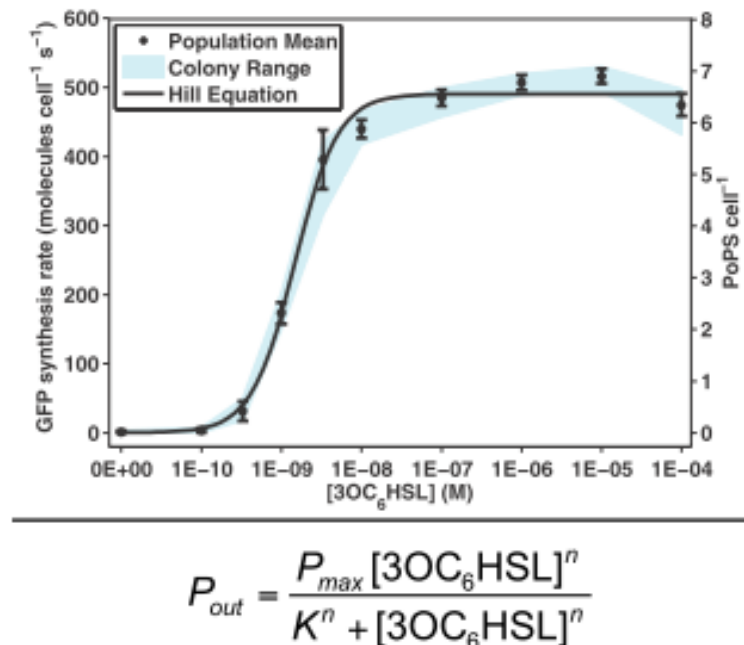


Figura 9. Ecuación de Hill aplicada a modelar la actividad transcripcional del dispositivo de comunicación celular *BBa\_F2620* que describe el rendimiento estático del mismo, en donde se asume que la cantidad de inductor permanece constante a través de un tiempo determinado (tomado de Canton et al, 2008).



Este tipo de caracterización está basado en mediciones indirectas, en donde se obtiene el valor de la actividad transcripcional al correlacionar la tasa de síntesis o la concentración de proteína reportera obtenida en un tiempo determinado con la concentración de mRNA, así como las tasas de degradación de ambas moléculas (mRNA y moléculas de proteína reportera) y la tasa de maduración de la proteína reportera utilizando un modelo de ecuaciones diferenciales ordinarias (EDO) que se describe detalladamente en el Apéndice. En este caso se asume una relación lineal entre la tasa de síntesis de la proteína reportera y la cantidad de RNA polimerasa que ha transcrito la secuencia por segundo (*PoPS*) generada por la señal de salida (Canton et al, 2008).

Sin embargo, redes de regulación genética más complejas, en donde intervienen dos o más factores de transcripción, no se comportan de esta manera, por lo que para estos casos es necesario desarrollar un modelo matemático distinto, que permita cierta confiabilidad en las mediciones para formular caracterizaciones robustas que describan adecuadamente la operatividad de las redes y los dispositivos sintéticos dentro de un sistema.

Como se mencionó previamente, para el año 2009, de 500 promotores transcripcionales inscritos en el Registro de Partes, menos de 50 habían sido caracterizados. Para afrontar esta situación, desde el año 2010, los organizadores del IGEM dieron prioridad a la caracterización de al menos una de las partes usadas por cada equipo como requisito para ganar una medalla (de plata u oro). También han hecho énfasis en la caracterización de partes existentes en el Registro de Partes y del mejoramiento de las partes no funcionales. Ambos esfuerzos comenzaron en el año 2008 pero no fue hasta el año 2010 que les dio mayor peso (<http://2011.igem.org/Judging>). Para promover una caracterización sencilla y fácilmente comparable entre los distintos laboratorios que participan en la competencia, en el año 2009 Jason Kelly y otros colaboradores, desarrollaron un kit de caracterización que se basa en usar un promotor de referencia estándar. Además del kit de caracterización, se han desarrollado dos ejemplos de hojas de datos en donde se muestran las características más importantes para la caracterización adecuada de un dispositivo; entre ellas está el número de

identificación, la secuencia codificante, el esquema funcional, las entradas y salidas y el consumo de recursos

(Canton et al, 2008; [http://igem.org/Sample\\_Data\\_Page](http://igem.org/Sample_Data_Page)).

Gracias a todos estos esfuerzos se ha logrado aumentar considerablemente el número de partes funcionales caracterizadas disponibles en el Registro de Partes. Aunque aún no hay cifras específicas, se puede notar que cada vez son más las partes con información funcional reportada (Kelly et al, 2009). Si bien ya se logra una mayor confiabilidad en los sistemas biológicos sintéticos construidos para el IGEM, aún hay mucho trabajo por hacer en cuanto a la búsqueda de técnicas estándar para la caracterización de biopartes.

## 4 Objetivos.

- Esclarecer la definición de caracterización en la Biología Sintética.
- Determinar cuáles son los elementos principales en el diseño de protocolos de caracterización.
- Encontrar el método de caracterización que mejor se ajuste a las necesidades y posibilidades del grupo de Biología Sintética de la Facultad de Ciencias de la UNAM para su pronta implementación.
- Proponer paso a paso la caracterización del biosensor de CO<sub>2</sub> del equipo Ciencias\_UNAM.
- Determinar el papel de la caracterización en el establecimiento de la Biología Sintética como una ciencia formal.

## **5 Material y métodos.**

En esta sección se especifican los materiales y los métodos que conforman el proceso de investigación de la presente tesis para la obtención de los resultados.

### **5.1 Proceso de Investigación.**

La presente tesis es el resultado de un análisis de protocolos y metodologías utilizadas en Biología Sintética para la caracterización de biopartes y dispositivos genéticos, así como una encuesta para conocer la noción general sobre la definición de caracterización en la comunidad.

Para poder definir la problemática que existe alrededor de la caracterización estandarizada se realizó una búsqueda bibliográfica de los antecedentes contextuales, conceptuales y metodológicos del tema. Se eligió la comunidad IGEM como población a estudiar considerándola una muestra representativa de los grupos de investigación en Biología Sintética a nivel mundial. Para comparar las metodologías utilizadas por los distintos equipos IGEM, se revisó la información contenida en la página Wiki oficial del concurso de cada equipo desde el año 2008 hasta el 2011.

### **5.2 Búsqueda de una definición de caracterización en Biología Sintética.**

#### **5.2.1 Encuesta sobre caracterización.**

Para investigar la noción que existe entre la comunidad de investigadores y estudiantes relacionados con la Biología Sintética sobre la definición de caracterización y su importancia en esta disciplina, se realizó una encuesta relacionada con el tema utilizando la página [surveymonkey.com](http://surveymonkey.com). Los encuestados fueron tanto estudiantes como instructores participantes en el IGEM 2012; se logró encuestar a 48 personas ( $n = 48$ ).

La encuesta consistió en cuatro preguntas:

- 1) ¿Qué es caracterización?;
- 2) ¿Es importante la caracterización en Biología Sintética?;

- 3) ¿Compartes tus protocolos de caracterización en la Wiki del IGEM? Y
- 4) ¿Qué es lo que normalmente haces con los datos obtenidos en la caracterización de biopartes?

Para la primera pregunta se plantearon cinco posibles respuestas:

- 1) Medir y reportar las señales de entrada y salida de una bioparte.
- 2) Probar el desempeño de una parte.
- 3) La descripción de una parte.
- 4) Describir una bioparte desde su composición física hasta su desempeño cuantitativo y sus requerimientos operacionales.
- 5) Otra. En esta opción los encuestados tenían la oportunidad de escribir su propia definición si ninguna de las anteriores les satisfacía en su totalidad.

La segunda y la tercera pregunta solo tenían dos posibles respuestas: si y no. Y la tercera pregunta contó con tres posibles repuestas:

- 1) Mandarlos al Registro de Partes.
- 2) Poner los datos en la sección de Resultados en la Wiki del *IGEM*.
- 3) Poner los parámetros resultantes en un modelo.

Los datos fueron capturados en Microsoft Excel 2010 en tablas que indican la frecuencia de cada respuesta. Posteriormente se obtuvieron las gráficas de barras correspondientes para cada pregunta.

### **5.3 Revisión de metodologías.**

Para comparar las distintas metodologías utilizadas en la caracterización de biopartes se definió la población a estudiar como los equipos IGEM desde el año 2008 hasta el 2011. Esto se hizo porque fue a partir del 2008 que los criterios de evaluación sugerían la caracterización de al menos una bioparte. El criterio de inclusión para el estudio fue la caracterización de al menos una bioparte, reflejada en la obtención de medalla de plata o de oro; el criterio de exclusión fue la falta de caracterización, reflejada en la ausencia de medalla u obtención de medalla de bronce. Por último, el criterio de eliminación fue la presencia de medalla de plata pero falta de caracterización.

Con base en lo anterior, se seleccionaron 241 equipos para la comparación de metodologías. Hubo excepciones en donde equipos ganadores del premio “mejor medida experimental” obtuvieron medalla de bronce, estos casos no se incluyeron en el análisis de bases de datos pero se tomaron en cuenta para la conclusión.

#### **5.4 Obtención del porcentaje de caracterización por año.**

Se hizo un conteo sobre el número de equipos participantes en cada competencia IGEM desde el año 2008 hasta el 2011. Después se contaron los equipos que caracterizaron al menos una bioparte por año. Se restó el número de equipos que caracterizaron al total de participantes para obtener el número de equipos con falta de caracterización. Se obtuvieron los porcentajes de cada población (los que caracterizaron contra los que no) y se hizo una gráfica de pastel con los datos resultantes.

#### **5.5 Selección de los equipos IGEM a comparar.**

A fin de delimitar la búsqueda de protocolos, se establecieron doce criterios de comparación:

- Medalla obtenida
- Tipo de caracterización
- Chasis y cepas utilizadas
- Proteínas reporteras
- Tipo de biopartes y dispositivos
- Metodologías utilizadas
- Equipo y aparatos de laboratorio necesarios
- Tipo de medida utilizada
- Características medidas
- Unidades de medición
- Protocolos y páginas de caracterización disponibles en Wiki
- Condiciones de medición

Es importante mencionar que algunos equipos IGEM caracterizaron más de una bioparte y/o utilizaron más de un método de caracterización. Además no todos los equipos especificaron cada una de las categorías establecidas, por lo que se tomaron distintos números de muestra (n) para cada categoría.

Los datos obtenidos fueron acomodados en tablas de frecuencia separadas por categoría y se contó el número de veces que fue utilizada cada categoría para obtener la frecuencia absoluta de su uso, así como las tendencias de caracterización a lo largo de los 4 años que corresponden al estudio.

## **5.6 Categorías elegidas.**

### **1. Medalla obtenida.**

Esta categoría se seleccionó para observar si existía una relación entre el tipo de medalla obtenida y la caracterización de biopartes. Debido a la previa selección de los equipos IGEM para este estudio, esta categoría consistió en dos clases: plata y oro. Se tomó una  $n = 241$ .

### **2. Tipo de caracterización.**

El tipo de caracterización fue clasificada en tres clases: cualitativa, cuantitativa o ambas. La caracterización cualitativa consiste en la verificación de la composición física de una bioparte y la aplicación de una prueba cualitativa para probar si funciona o no. La caracterización cuantitativa consiste en la descripción del desempeño de la bioparte y sus requerimientos operacionales en unidades de medida dadas. Para esta categoría se tomó una  $n = 241$ .

### **3. Chasis y cepas utilizadas.**

El tipo de chasis fue dividido en las siguientes clases:

- *Escherichia coli*
- *Bacillus subtilis*
- *Saccharomyces cerevisiae*
- *Caenorhabditis elegans*
- *Arabidopsis thaliana*
- Mamífero
- Otro
- Sistemas libres de células (*cell free system*)

En la clase “otro” se agruparon los organismos propuestos como chasis con muy poca frecuencia de uso.

Para esta categoría se tomó una  $n = 294$ . Para el caso exclusivo del uso de *Escherichia coli* se analizó el tipo de cepas utilizadas, en donde se seleccionaron 12 cepas y una treceava clase “sin especificar” para los equipos que no especificaron qué cepa utilizaron. En esta subcategoría se tomó una  $n = 218$ .

Se enlistan las 12 cepas seleccionadas:

- |                                  |                    |
|----------------------------------|--------------------|
| 1. <i>DH5<math>\alpha</math></i> | 7. <i>K 12</i>     |
| 2. <i>BL21</i>                   | 8. <i>BW</i>       |
| 3. <i>Top 10</i>                 | 9. <i>DH10b</i>    |
| 4. <i>JM109</i>                  | 10. <i>JW</i>      |
| 5. <i>MG 1655</i>                | 11. <i>Origami</i> |
| 6. <i>XL1</i>                    | 12. <i>YB</i>      |

#### 4. Tipos de biopartes y dispositivos.

Se dividió esta categoría en dos subcategorías: biopartes y dispositivos.

##### **Biopartes.**

Se tomaron en cuenta los tipos de biopartes más utilizadas que se enlistaban en el catálogo del Registro de Partes ([www.partsregistry.org](http://www.partsregistry.org)) en el año 2011 que son los siguientes:

- Promotor
- Secuencia codificante
- Compuesta (combinaciones de dos o más biopartes)
- Plásmido
- DNA
- RNA
- RBS
- Chasis

Se obtuvo la frecuencia absoluta de cada tipo de bioparte. Para esta subcategoría se usó una  $n = 455$ .



## **Dispositivos.**

Se incluyeron cinco clases de dispositivos: Generador de proteínas, reportero, regulador, medición y señalización. Tomando una  $n = 126$ , se obtuvo la frecuencia absoluta de cada clase de dispositivo por año y total.

### **5. Proteínas reporteras.**

Se analizó el tipo de proteínas reporteras utilizadas en la caracterización, seleccionando ocho clases enlistadas abajo. Para esta categoría se tomó una  $n = 316$ .

- GFP
- RFP
- Ninguna
- YFP
- Luciferasa
- CFP
- Otra
- mCherry

Dentro de la clase “otra” se incluyen reporteros no convencionales como los betacarotenos y el licopeno.

### **6. Metodologías utilizadas.**

Primero se hizo un análisis general de los tipos de metodologías utilizadas para caracterizar biopartes. De este análisis se seleccionaron los métodos más utilizados (con mayor frecuencia de uso) y se hizo una tabla general. Para lograr una comparación colectiva, se agruparon bajo el mismo nombre las técnicas de microscopía, espectrometría y cromatografía y se crearon tablas para especificar el tipo de técnica utilizada en total, tomando los cuatro años del estudio. A continuación se enlistan los tipos de metodologías utilizados para la tabla general de metodologías:

- |                              |                          |
|------------------------------|--------------------------|
| • Fluorescencia (lectura de) | • Crecimiento selectivo  |
| • Absorbancia                | • Descripción fenotípica |
| • Microscopía                | • Cromatografía          |
| • Actividad enzimática       | • SDS-PAGE               |

- Luminiscencia (lectura de)
- PCR
- Expresión de proteínas
- Secuenciación
- Espectrometría
- *Western blot*
- Ensayo de cuantificación de proteínas
- Electroforesis
- Fluorescencia (observación)
- PCR en tiempo real
- ELISA
- Otros inmunoensayos (incluye técnicas de inmunofluorescencia o técnicas de reconocimiento de etiquetas inmunoactivas)
- Quimiotaxis por gradiente
- Microfluidos
- *Gel Shift Assays*

Posteriormente se agrupó en tres grandes grupos: 1) Metodologías utilizadas en la caracterización básica; 2) Metodologías utilizadas para la caracterización de promotores y biopartes asociadas y 3) Metodologías utilizadas para la caracterización de secuencias codificantes y biopartes asociadas. En esta categoría se tomó una  $n = 919$ .

Dentro de estos tres grupos se engloban todos los tipos de biopartes, considerados de la siguiente manera en cada grupo:

- 1) Chasis, cepa, plásmido, prueba cualitativa y verificación de secuencia de cualquier bioparte.
- 2) Promotor, RNA, DNA, RBS, compuesta, reguladora, reportera, señalización.
- 3) Secuencia codificante, unidad traductora, generador de proteínas.

## 7. Equipo y aparatos de laboratorio necesarios.

A partir de la tabla general de metodologías creada previamente, se seleccionaron los aparatos de laboratorio utilizados en cada tipo de metodología. Se tomó una n igual a la categoría anterior. A continuación se muestran los distintos aparatos y equipo de laboratorio que fueron considerados:

- Multilector de placas
- Microscopio fluorescente
- Espectrofotómetro
- Citómetro de flujo
- Termociclador
- Microscopio óptico
- Microscopio confocal
- Cromatógrafo de gases
- Cromatógrafo líquido de alta presión
- Fluorímetro
- Espectrofluorímetro
- Lámpara UV
- Termociclador en tiempo real
- Microscopio electrónico de transmisión
- Espectrómetro de masas
- Chip de microfluidos
- Luminómetro
- Placa cromatográfica
- Columna cromatográfica
- Espectrómetro de Dicroísmo circular
- Microscopio invertido

Al igual que en la categoría de metodología, se crearon tablas separadas para especificar el tipo de microscopio, espectrofotómetro y cromatógrafo utilizados.

### **8. Tipo de medida utilizada.**

Para el análisis del tipo de medida, características medidas y unidades de medición, se tomaron en cuenta las siguientes metodologías, por ser consideradas las más relevantes: absorbancia, actividad enzimática, crecimiento selectivo, electroforesis, fluorescencia (tanto lectura como observación), luminiscencia (lectura), microscopía, PCR, PCR en tiempo real y secuenciación.

El tipo de medida se dividió en tres: absoluta, relativa y ninguna. Las medidas absolutas son aquellas que establecen de forma completa el valor de una medida; las medidas relativas definen su valor en relación con otra medida, es un acercamiento, como el que se hace en ciencias de la computación ([http://www.librosweb.es/css/capitulo3/unidades\\_de\\_medida.html](http://www.librosweb.es/css/capitulo3/unidades_de_medida.html)). En la clase “ninguna” entra la microscopía, en donde la caracterización es cualitativa, ya que solamente se obtiene una imagen que indica si el dispositivo genético funciona o no, por lo que no se utilizan unidades de medición. Para esta categoría se tomó una  $n = 535$ . Se obtuvo la frecuencia de uso de cada tipo de medida por año y por total y sus porcentajes.

### **9. Características medidas.**

Usando la misma  $n$  que en la categoría anterior, se seleccionaron 17 características según su frecuencia de uso, de mayor a menor. A continuación se enlistan estas características:

- Expresión de proteínas reporteras
- Fase de crecimiento
- Verificación de secuencia
- Tasa de expresión genética
- Actividad relativa del promotor

- Curva de crecimiento
- Tasa de expresión genética/ curva de crecimiento
- Cinética enzimática
  - Tasa de sobrevivencia
  - Tasa de inducción
  - Fluorescencia por célula
  - Actividad del promotor
  - Fuerza de RBS
  - Cantidad de RNA
  - Tasa de inhibición
  - Tasa de degradación de proteína reportera
  - Concentración de proteína

### 10. Unidades de medición.

A partir de la clasificación del tipo de medida, se seleccionaron las medidas absolutas y relativas con mayor frecuencia de uso, que fueron las siguientes:

Absolutas.

- Densidad óptica a 600nm (DO)
- Pares de bases (pb)
- Unidades de formación de colonia (CFUs)
- Densidad óptica a lo largo del tiempo (DO/t)
- Polimerasas por segundo (PoPS)
- Células/ mL
- Moléculas de GFP

Relativas.

- Unidades arbitrarias
- Unidades relativas de promotor (RPU)
- Unidades relativas de luminiscencia (RLUs)
- Unidades relativas de fluorescencia (RFUs)
- Unidades Miller
- Unidades relativas de fluorescencia a lo largo del tiempo (RFUs/ t)
- Unidades relativas de unión ribosomal (RBUs)
- Unidades relativas de fluorescencia entre densidad óptica (RFUs/ DO)
- Unidades relativas de fluorescencia entre densidad óptica a lo largo del tiempo (RFUs/ DO / t)
- Unidades arbitrarias entre tiempo (unidades arbitrarias)/ t

Para esta categoría se tomó una  $n$  igual a las dos categorías anteriores, esto es  $n = 535$ .

### **11. Protocolos y páginas de caracterización disponibles en Wiki.**

Se hizo una revisión de las páginas Wiki oficiales de cada equipo del IGEM por año, buscando la disponibilidad de protocolos de caracterización y de páginas o secciones específicas para explicar la caracterización de partes; en estas se incluyen las llamadas “páginas Data”, con el fin de determinar qué tan estandarizados y reproducibles eran los proyectos. En esta categoría se tomó una  $n = 241$ . Se tomaron en cuenta dos variables: si y no, si para los que contaban con protocolos disponibles o páginas de caracterización, y no para los que no contaban con ellas. Se obtuvieron los porcentajes en cada caso.

Asimismo, se buscó el número de equipos que utilizaban la plataforma *OpenWetware* para compartir y publicar sus protocolos y bitácoras de laboratorio.

### **12. Condiciones de medición.**

Las condiciones de medición utilizadas en caracterización dependen principalmente del tipo de chasis y de la naturaleza de la bioparte a caracterizar (si el organismo es aeróbico, anaeróbico, halófilo, termófilo o si la bioparte confiere resistencia a la temperatura, a un rango de pH, codifica a metabolitos que se inhiben por alguna condición específica, entre otros). En esta categoría no se realizaron tablas ni gráficas ya que las condiciones de medición se dan por sentado y la mayoría de equipos no las mencionan; sin embargo, pueden ser asumidas a partir del organismo utilizado y de las características a medir (cambios de temperatura, pH, tipo de medio de cultivo, etcétera). En cuanto a los antibióticos y plásmidos, se consideraron los estándares del IGEM.

## 6 Resultados.

En esta sección se muestran los resultados obtenidos con una breve descripción.

### 6.1 Definición de caracterización en Biología Sintética.

#### 6.1.1 Pregunta 1. ¿Qué es caracterización?

Posibles respuestas:

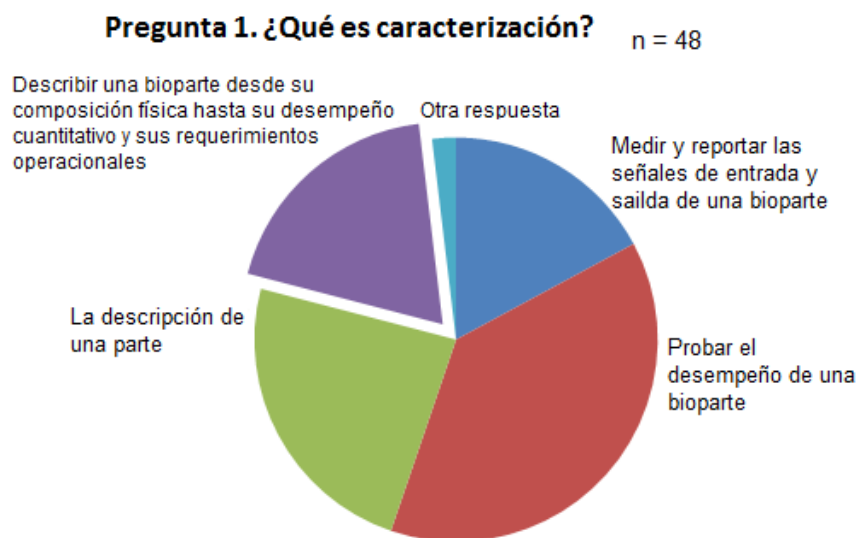
1. Medir y reportar las señales de entrada y salida de una bioparte.
2. Probar el desempeño de una parte
3. La descripción de una parte
4. Describir una bioparte desde su composición física hasta su desempeño cuantitativo y sus requerimientos operacionales.

Otras: 5. La medición de parámetros cinéticos como  $K_M$  y  $K_{cat}$ .

5. No existen palabras exactas para definir caracterización, también depende de la naturaleza de la parte.

**Tabla 3. Frecuencia de respuestas a la pregunta 1.**

PREGUNTA 1.	
RESPUESTA	FRECUENCIA
1	18
2	40
3	25
4	20
5	2



**Figura 10. Gráfica de frecuencia de respuestas a la pregunta 1.**

La tabla 3 y la figura 10 sobre las respuestas a la pregunta número uno muestran que, en general, la comunidad de Biología Sintética sabe que caracterizar implica la prueba de las biopartes y su desempeño; sin embargo, solo unos pocos distinguen las características específicas medibles, tales como las señales de entrada y de salida o parámetros de cinética enzimática. Esto puede deberse a que no todos los integrantes de los equipos IGEM están directamente implicados en la caracterización de sus biopartes o a la ambigüedad de la definición. Es importante señalar que, aunque se ha delimitado bastante la definición de caracterización, no es posible estandarizarla del todo, ya que las pruebas para cada bioparte dependen de su naturaleza.

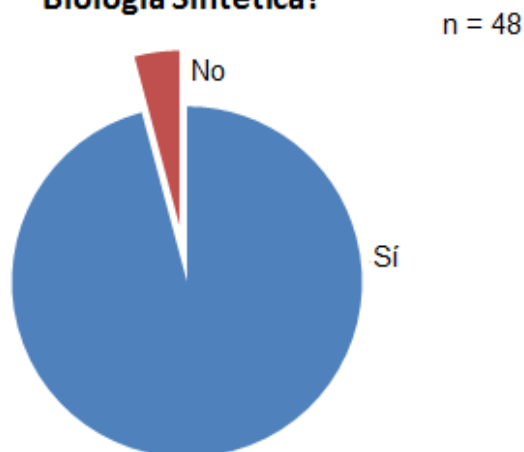
#### 6.1.2 Pregunta 2. ¿Es importante la caracterización en Biología Sintética?

Posibles respuestas: sí o no.

**Tabla 4. Frecuencia de respuestas a la pregunta 2.**

PREGUNTA 2.	
RESPUESTA	FRECUENCIA
Sí	46
No	2

#### Pregunta 2. ¿Es importante la caracterización en Biología Sintética?



**Figura 11. Gráfica de frecuencia de respuestas a la pregunta 2.**



En la tabla 4 y la figura 11 sobre las respuestas a la pregunta número dos se puede observar que la importancia de la caracterización en la Biología Sintética es obvia para la mayoría de los involucrados, ya que para poder considerar una bioparte como funcional debe probarse su desempeño mediante la caracterización.

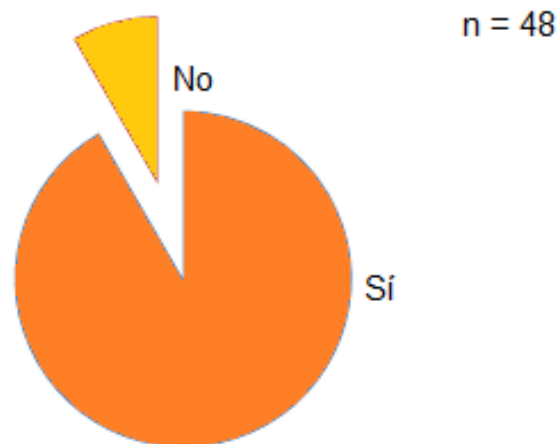
### 6.1.3 Pregunta 3. ¿Compartes tus protocolos de caracterización en la Wiki del IGEM?

Posibles respuestas: sí o no.

**Tabla 5. Frecuencia de respuestas a la pregunta 3.**

PREGUNTA 3	
RESPUESTA	FRECUENCIA
Sí	44
No	4

### Pregunta 3. ¿Compartes tus protocolos de caracterización en la Wiki del IGEM?



**Figura 12. Gráfica de frecuencia de respuestas a la pregunta 3.**

La pregunta número tres aborda un tema importante para la estandarización de los métodos de caracterización entre laboratorios, ya que al compartir protocolos los experimentos se pueden reproducir para corroborar mediciones. Se observa en la tabla 5 y la figura 12 que la mayoría de los encuestados sí comparte sus

protocolos de caracterización, lo que señala un avance hacia la caracterización estandarizada y compartida.

#### 6.1.4 Pregunta 4. ¿Qué es lo que normalmente haces con los datos obtenidos en la caracterización de biopartes?

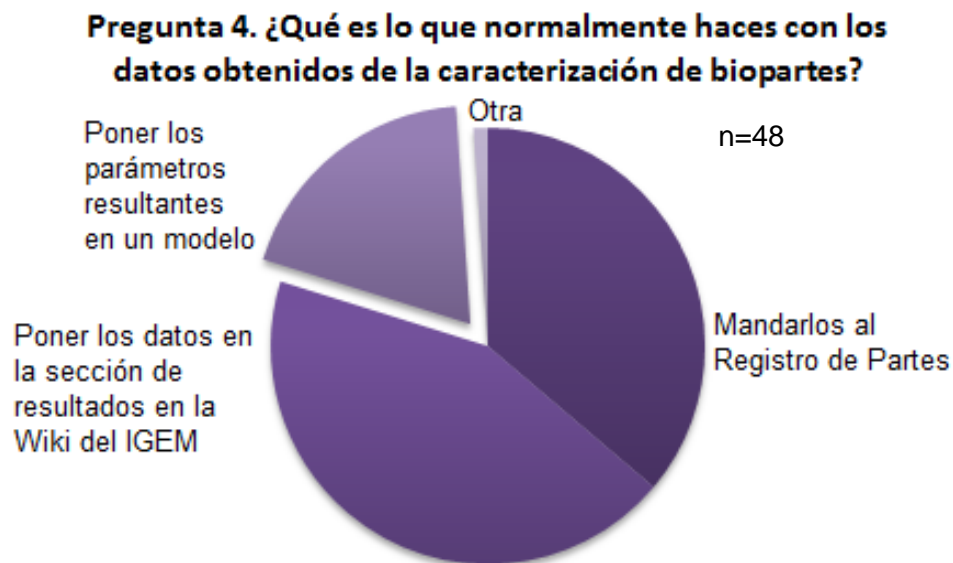
Posibles respuestas.

1. Mandarlos al Registro de Partes.
2. Poner los datos en la sección de resultados en la Wiki del IGEM.
3. Poner los parámetros resultantes en un modelo.

Otra: 4. Son pocos los casos en donde se obtienen mediciones adecuadas para incorporarlas en un modelo.

**Tabla 6. Frecuencia de respuestas a la pregunta 4.**

PREGUNTA 4.	
RESPUESTA	FRECUENCIA
1	34
2	41
3	18



**Figura 13. Gráfica de frecuencia de respuesta pregunta 4.**

En la tabla 6 y la figura 13 sobre las respuestas a la pregunta número cuatro se puede observar que lo más usual es la publicación de resultados por medio de la página Wiki, en segundo lugar está el Registro de Partes, que es un requisito para la documentación de biopartes en el IGEM para el enriquecimiento de la base de

datos y la simplificación de su uso. Se puede notar que es menor la cantidad de datos que son utilizados en modelación, se presume que esto es debido a que las mediciones obtenidas en la caracterización no son adecuadas para los modelos; probablemente debido a la falta de un diseño experimental que tome en cuenta el uso de los datos en la modelación para poder predecir conductas de los dispositivos diseñados, reflejado en la correcta elección de parámetros a medir y unidades de medida a utilizar.

## **6.2 Tendencias de la caracterización de biopartes en el IGEM a través de los años.**

Se muestra la tabla 7 sobre el porcentaje de equipos participantes en el IGEM que caracterizaron biopartes contra el porcentaje de los equipos que no caracterizaron desde el año 2008 hasta el 2011. Abajo se ilustran los datos de la tabla 7 en las figuras 14 y 15. Se observa una tendencia creciente, lo que refleja el impulso que se le ha dado a la caracterización a través de los años para lograr dispositivos sintéticos más confiables y eficientes.

**Tabla 7. Ausencia y presencia de caracterización en el IGEM desde el año 2008 hasta el 2011.**

Año	% caracterizados	% sin caracterizar	n
2008	32.14	67.86	27
2009	51.35	48.65	57
2010	57	43	73
2011	51.53	48.47	84

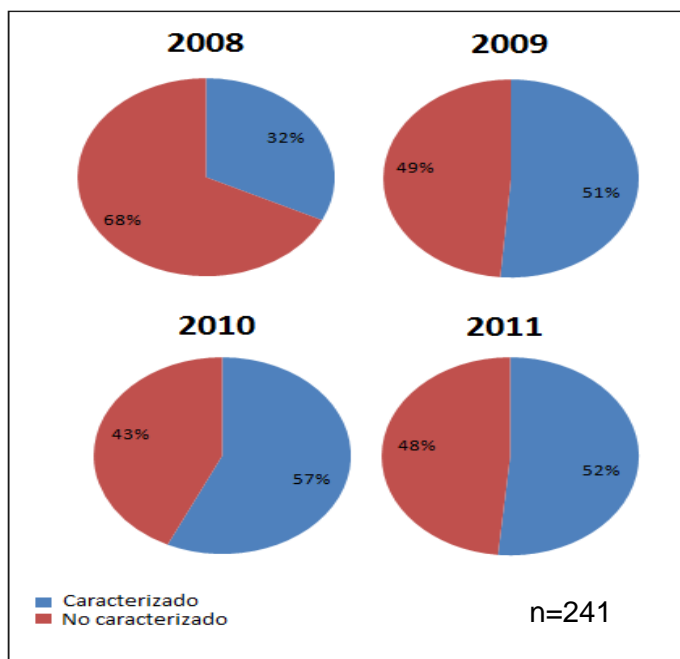


Figura 14. Gráfica sobre la ausencia y presencia de caracterización en equipos IGEM, desde el año 2008 hasta el 2011, se muestra el porcentaje de caracterizado en azul y el de no caracterizado en rojo.

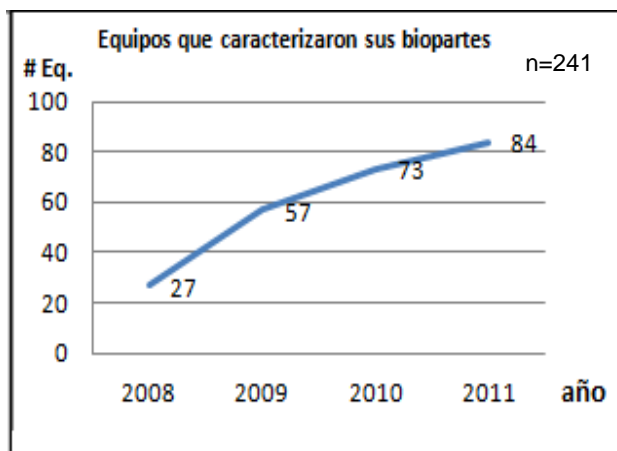


Figura 15. Número de equipos que caracterizaron biopartes por año desde 2008 hasta 2011.

### 6.3 Tipo de medalla obtenida.

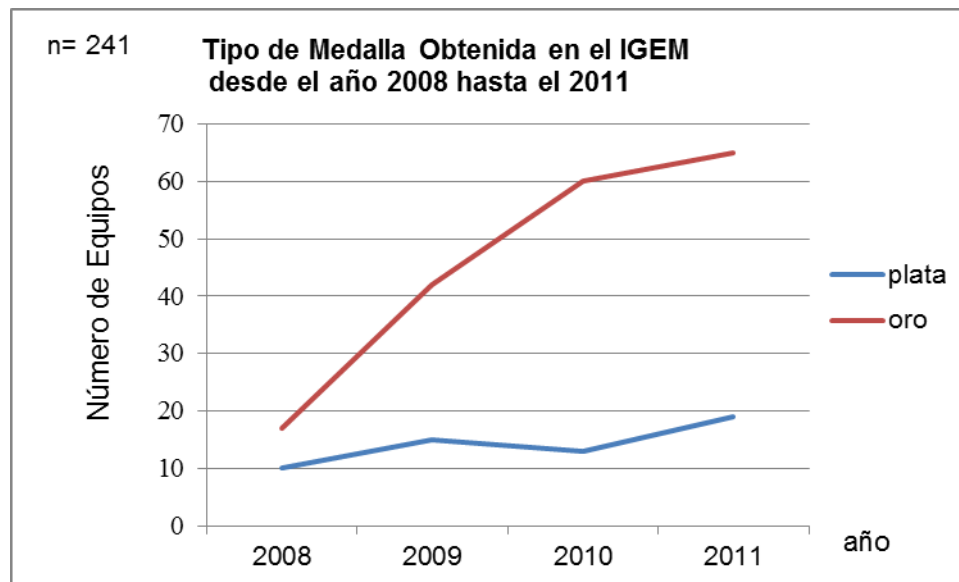
Con base en los criterios de evaluación del IGEM vigentes desde el 2008 se buscó la relación entre los equipos que caracterizaron biopartes con las medallas obtenidas por cada uno. Se encontró que generalmente los equipos con medalla de plata caracterizaron cualitativamente, mientras que los que obtuvieron medalla

de oro utilizaron métodos de caracterización cuantitativa o bien, cualitativa y cuantitativa.

En la tabla 8 y la figura 16 se muestra una tendencia al aumento de las medallas de oro, mientras que las medallas de plata se mantienen en una menor cantidad con respecto a las primeras.

**Tabla 8. Frecuencia de medallas de oro y plata obtenidas en el IGEM, desde el año 2008 hasta el 2011.**

Tipo de medalla	2008	2009	2010	2011	total
Plata	10	15	13	19	57
Oro	17	42	60	65	184



**Figura 16. Gráfica sobre la frecuencia de medallas de oro y plata obtenidas en el IGEM, desde el año 2008 hasta el 2011. En azul se muestran las medallas de plata, en rojo las de oro.**

#### **6.4 Tipo de caracterización.**

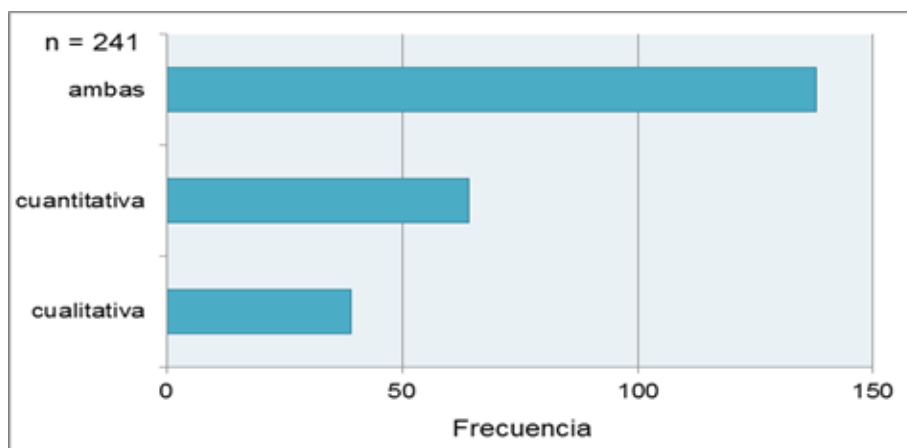
Tomando en cuenta el tipo de mediciones obtenidas, se dividió la caracterización en dos tipos: cualitativa y cuantitativa. La caracterización cualitativa es la mínima descripción que una bioparte debería tener. Consiste en la verificación de la composición física de la parte (secuencia genética) mediante secuenciación, gel de electroforesis o amplificación con PCR y en la realización de una prueba cualitativa de su rendimiento, es decir, si funciona o no. La caracterización cuantitativa consiste en la detallada descripción del rendimiento de la bioparte y

sus requerimientos operacionales mediante la medición de sus señales de entrada y de salida en una unidad de medida dada.

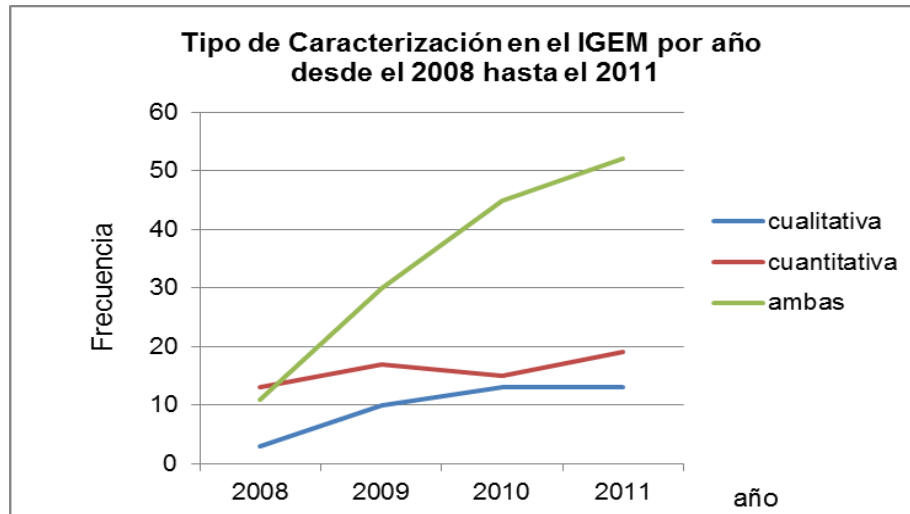
Se encontró que de los 240 equipos revisados, 39 llevaron a cabo caracterización cualitativa, 64 cuantitativa y 137 usaron ambos tipos de caracterización (tabla 9; figura 17). El tipo de caracterización está directamente relacionado con la infraestructura del laboratorio en donde se realizan las mediciones. Según los resultados obtenidos se muestra que la mayor parte de los equipos IGEM analizados cuentan con una infraestructura que permite tanto la caracterización cualitativa como la cuantitativa. En la figura 18 se puede notar que a través de los años se observa una tendencia creciente al uso de ambos tipos de caracterización simultáneamente, ya que al tener la infraestructura es relativamente sencillo; también se observa que del 2009 al 2010 disminuyó la caracterización cuantitativa y aumentó la cualitativa, mientras que del 2010 al 2011 sucedió lo contrario.

**Tabla 9. Frecuencia del tipo de caracterización por año y total.**

Tipo de caracterización	FECUENCIA				
	2008	2009	2010	2011	TOTAL
Cualitativa	3	10	13	13	39
Cuantitativa	13	17	15	19	64
Ambas	11	30	44	52	137
Total por año	27	57	72	84	240



**Figura 17. Gráfica sobre el tipo de caracterización realizada en el IGEM desde el año 2008 hasta el 2011.**



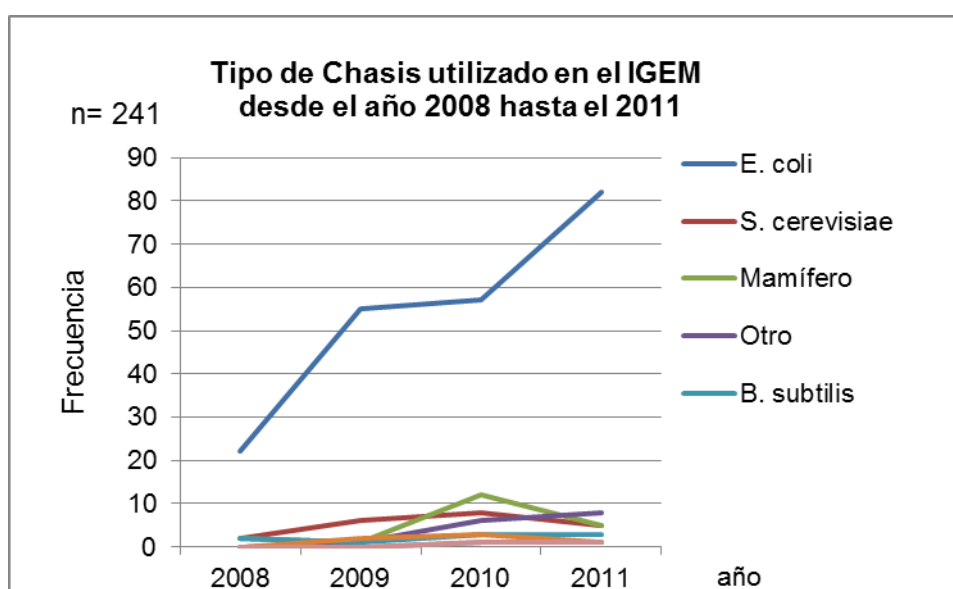
**Figura 18.** Gráfica sobre los tipos de caracterización a través de los años desde el 2008 hasta el 2011. En azul se muestra la curva de la caracterización cualitativa, en rojo la de la cuantitativa y en verde los equipos que caracterizaron con ambos métodos.

### 6.5 Chasis.

En cuanto al tipo de chasis utilizado, esto es, el organismo hospedero para la inserción de los dispositivos genéticos a caracterizar, se encontró que la mayor parte de equipos utilizan *E. coli*. El segundo tipo de organismo más utilizado en el IGEM es *S. cerevisiae* y el tercero son células de mamífero, en donde se incluyen líneas celulares como células HeLa o células T293 (tabla 10; figura 19). Claramente se aprecia que en el IGEM se mantiene a *E. coli* como chasis principal en cuanto a estandarización, debido a que es un organismo bastante conocido y caracterizado; sin embargo, a través de los años se han ido introduciendo otros organismos modelo en pequeñas proporciones, como lo son *B. subtilis*, *A. thaliana* o *C. elegans*, así como la tendencia de no usar chasis en los sistemas libres de células (*cell free system*). En la figura 19 se observa que desde el 2009 ha aumentado el uso y propuesta de otros organismos como chasis, siendo en general algas; esto último indica la búsqueda de diversificación en el uso de organismos hospederos en Biología Sintética para poder así expandir e innovar el diseño y construcción de dispositivos sintéticos.

**Tabla 10. Frecuencia del tipo de chasis por año y total.**

Chasis	FRECUENCIA				
	2008	2009	2010	2011	TOTAL
<i>E. coli</i>	22	55	57	82	216
<i>S. cerevisiae</i>	2	6	8	5	21
Mamíferos	2	1	12	5	20
Otro	0	1	6	8	15
<i>B. subtilis</i>	2	1	3	3	9
Sistemas libres de células	0	2	3	1	6
<i>A. thaliana</i>	0	0	1	1	2
<i>C. elegans</i>	0	0	1	1	2



**Figura 19. Diferentes tipos de chasis utilizados en el IGEM, desde el año 2008 hasta el 2011 que son *Escherichia coli*, *Saccharomyces cerevisiae*, mamífero, otro, *B. subtilis* y sistemas libres de células.**

### 6.5.1 Cepas de *E. coli*.

La mayoría de los equipos que utilizaron *E. coli* no especificaron la cepa con la que trabajaron. De los que sí lo hicieron, destacan cinco cepas, en orden descendente en cuanto a frecuencia: DH5 $\alpha$ , BL21, Top 10, JM109 y MG 1655 (tabla 11; figura 20).

En la figura 21 se puede observar que a lo largo de los años, la cepa DH5 $\alpha$  se ha consolidado como la más utilizada para la caracterización de biopartes, esto debido a que es una cepa de clonación con alta eficiencia de transformación y tiene varias características que la hacen muy útil para métodos de recombinación



y mantenimiento de DNA, como la presencia de endonucleasas y exonucleasas mutantes para evitar la degradación del DNA insertado. La segunda cepa más utilizada es la BL21, ya que es una cepa de expresión muy eficiente para el uso en secuencias codificantes debido a la ausencia de proteasas, lo que maximiza la obtención de productos genéticos. Se nota también que desde el 2010 ha aumentado la especificación por parte de los equipos sobre las cepas utilizadas en sus experimentos, lo que hace notar la tendencia a una mejor documentación de proyectos IGEM.

**Tabla 11. Frecuencia de tipo de cepas en *E. coli* por año y total.**

Cepas de <i>E. coli</i>	FRECUENCIA				
	2008	2009	2010	2011	TOTAL
Sin especificar	7	37	61	40	146
DH5 $\alpha$	3	2	8	12	25
BL21	2	5	4	10	21
Top 10	4	4	2	6	16
JM109	2	0	1	4	7
MG 1655	1	0	2	4	7
XL1	2	2	1	0	5
K 12	1	1	0	2	4
BW	0	0	0	4	4
DH10b	0	0	1	1	2
JW	1	1	0	0	2
Origami	0	1	0	1	2
YB	0	2	0	0	2

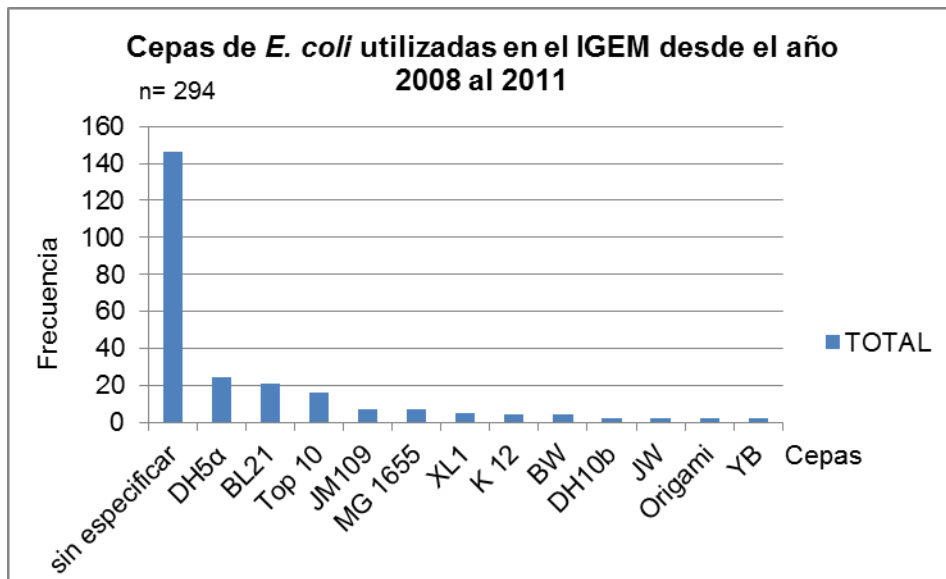


Figura 20. Gráfica sobre la frecuencia de los tipos de cepas de *E. coli* utilizadas en el IGEM, desde el año 2008 hasta el 2011 que son DH5 α, BL21, Top 10, JM 109, MG 1655, XL1, K 12, BW, DH10B, JW, Origami, YB y la categoría “sin especificar” para los equipos que no especificaron la cepa utilizada.

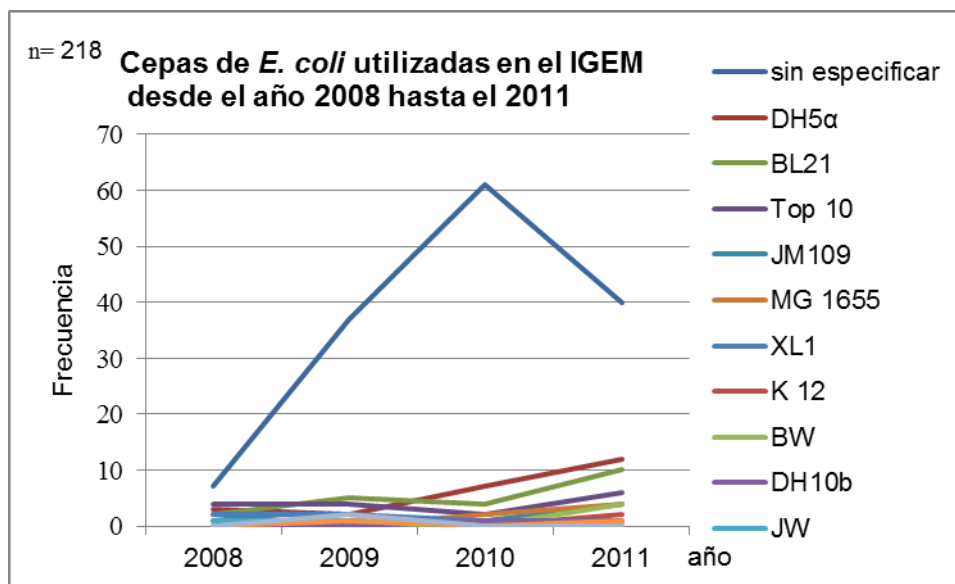


Figura 21. Gráfica sobre la frecuencia de los tipos de cepas utilizadas en el IGEM por año, desde el 2008 hasta el 2009 (sin especificar, DH5 α, BL21, Top 10, JM 109, MG 1655, XL1, K 12, BW, DH10B y JW).

## **6.6 Tipo de biopartes y dispositivos.**

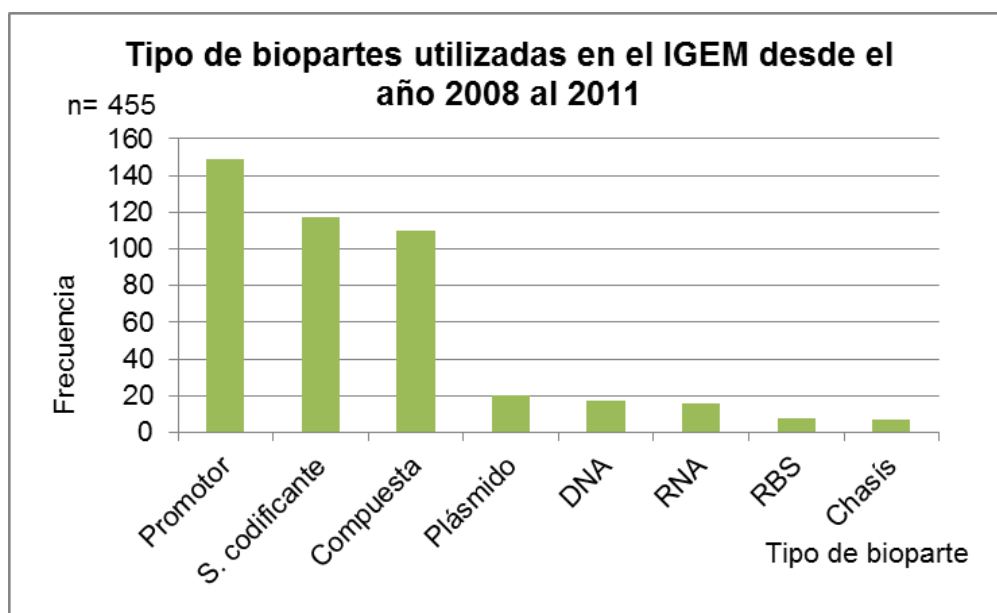
Se analizó el tipo de bioparte o dispositivo caracterizado y se encontró que la mayoría de las partes caracterizadas por equipos del IGEM son promotores y secuencias codificantes (tabla 12; figura 22); los dispositivos más comúnmente caracterizados están relacionados con estos tipos de partes, siendo los generadores de proteínas y los reporteros los dos principales dispositivos con mayor número de caracterizaciones realizadas (ftabla 13; figura 24). Esto se debe en parte a la facilidad de su caracterización, en el caso de los promotores, en donde por medio de ensayos de fluorescencia es posible cuantificar la expresión genética a lo largo del tiempo, logrando un buen estimado del desempeño conductual de las biopartes y dispositivos.

### **6.6.1 Biopartes**

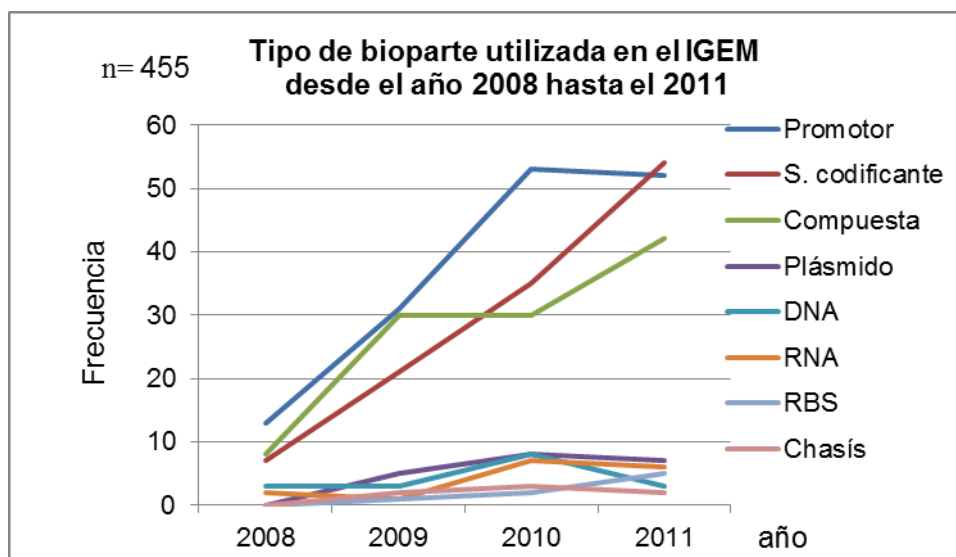
En la figura 23 se puede observar que desde el año 2008 hasta el 2010, los promotores eran el tipo de bioparte más caracterizado; paralelamente, las secuencias codificantes han aumentado desde el año 2008 y sobrepasaron por número a los promotores en el 2011. Se observa también que en tercer lugar están las partes compuestas, las cuales generalmente están constituidas por uno o varios promotores y secuencias codificantes. Este tipo de biopartes son las más utilizadas debido a sus implicaciones en la producción de productos de utilidad para varias industrias, ya que el uso de promotores para la regulación de la expresión genética es una de las alternativas más sencillas para la optimización en la producción de una proteína específica; por su parte, las secuencias codificantes son las proteínas con interés de expresar.

**Tabla 12. Frecuencia de tipo de biopartes por año y total.**

Tipo de bioparte	FRECUENCIA				
	2008	2009	2010	2011	TOTAL
Promotor	13	31	53	52	149
Secuencia codificante	7	21	35	54	117
Compuesta	7	23	26	31	87
Plásmido	0	5	8	7	20
DNA	3	3	8	3	17
RNA	2	1	7	6	16
RBS	0	1	2	5	8
Chasis	0	2	3	2	7



**Figura 22. Gráfica donde se muestra la frecuencia de cada tipo de bioparte utilizada en el IGEM desde el año 2008 hasta el 2011 (promotor, secuencia codificante, parte compuesta, plásmido, DNA, RNA, RBS y chasis).**



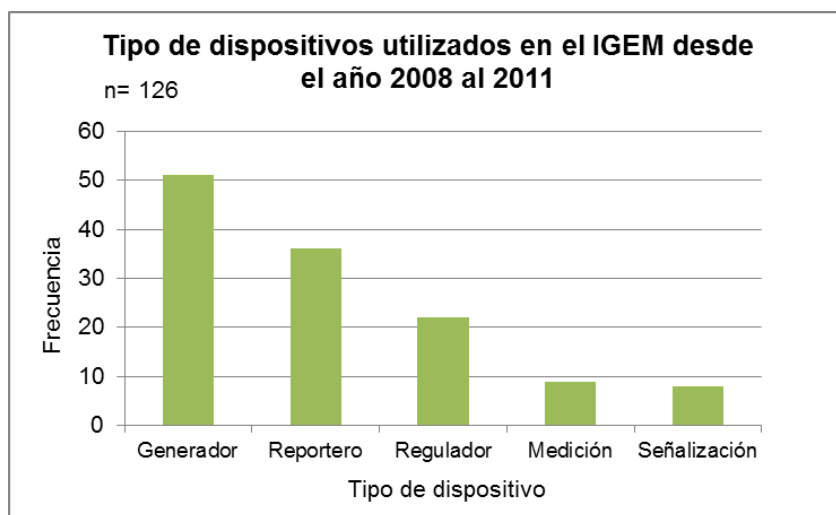
**Figura 23.** Gráfica sobre el tipo de bioparte utilizada por año, desde el 2008 hasta el 2011 (promotor, secuencia codificante, parte compuesta, plásmido, DNA, RNA, RBS y chasis).

### 6.6.2 Dispositivos

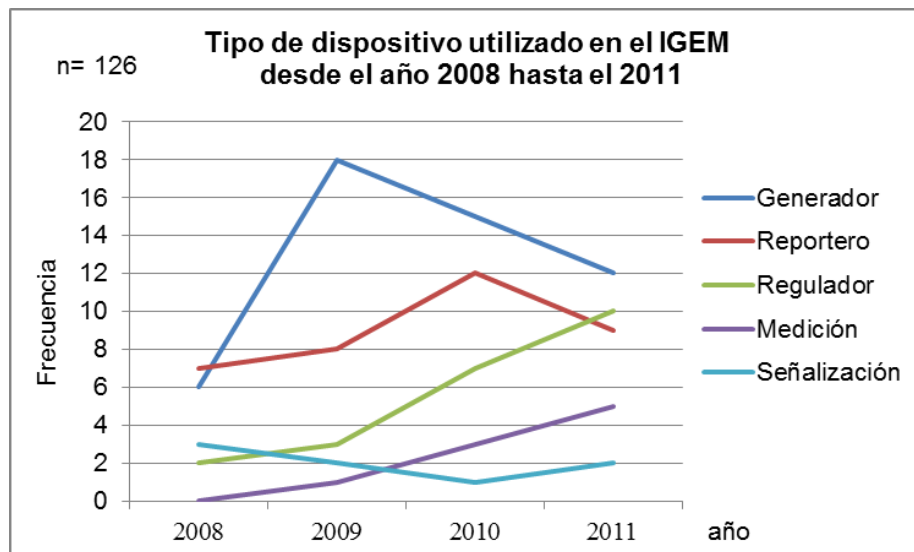
En el caso de los dispositivos, se observa en la figura 25 que entre el año 2008 y el 2009 los generadores de proteínas fueron los más utilizados y aunque su uso decayó en los años subsecuentes, se siguen manteniendo como el tipo de dispositivo más utilizado en el IGEM, por lo antes mencionado. Por otra parte, los dispositivos reporteros aumentaron considerablemente del año 2009 al 2010, pero decayeron en el 2011; mientras que el uso de dispositivos reguladores ha aumentado, junto con los de medición (aunque en una menor cantidad). Los dispositivos de señalización disminuyeron desde el año 2008 hasta el 2010, y aumentaron en una pequeña cantidad para el 2011. Esto indica una tendencia a generar cada vez más dispositivos reguladores y de medición para simplificar la prueba del desempeño de las biopartes diseñadas mediante determinaciones *in vivo*.

**Tabla 13. Frecuencia del tipo de dispositivos por año y total.**

Tipo de dispositivo	FRECUENCIA				
	2008	2009	2010	2011	TOTAL
Generador	6	18	15	12	51
Reportero	7	8	12	9	36
Regulador	2	3	7	10	22
Medición	0	1	3	5	9
Señalización	3	2	1	2	8



**Figura 24. Gráfica sobre la frecuencia de cada tipo de dispositivo utilizado en el IGEM, desde el año 2008 hasta el 2011 (generador, reportero, regulador, medición y señalización).**



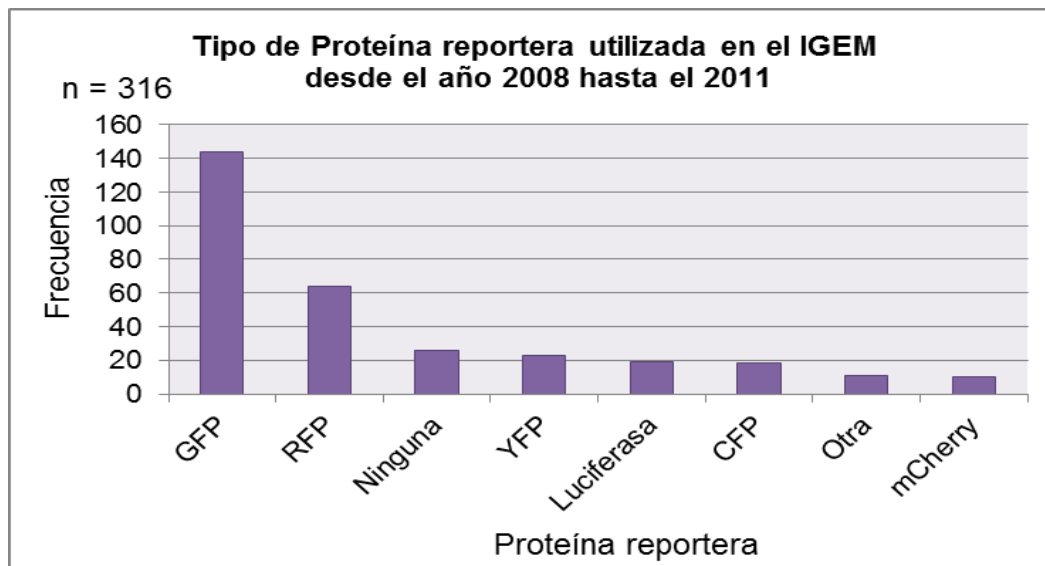
**Figura 25. Frecuencia de los tipos de dispositivos utilizados en el IGEM por año desde el 2008 hasta el 2011 (generador, reportero, regulador, medición y señalización).**

### 6.7 Proteínas reporteras.

Comúnmente se utilizan proteínas fluorescentes u otro tipo de producto reportero para medir indirectamente la expresión genética. Se encontró que la mayor parte de equipos en el IGEM utilizaron a la proteína verde fluorescente (GFP) o a la roja fluorescente (RFP), seguidas por la proteína amarilla fluorescente (YFP), como indicadores de la señal de salida de los dispositivos caracterizados (tabla 14; figura 26).

**Tabla 14. Frecuencia de las diferentes proteínas reporteras por año y por total.**

Proteína reportera	FRECUENCIA				
	2008	2009	2010	2011	TOTAL
GFP	15	39	46	44	144
RFP	1	14	26	23	64
Ninguna	4	4	5	13	26
YFP	4	4	7	8	23
Luciferasa	1	3	9	6	19
CFP	1	4	7	6	18
Otra	2	1	1	7	11
mCherry	1	0	4	5	10

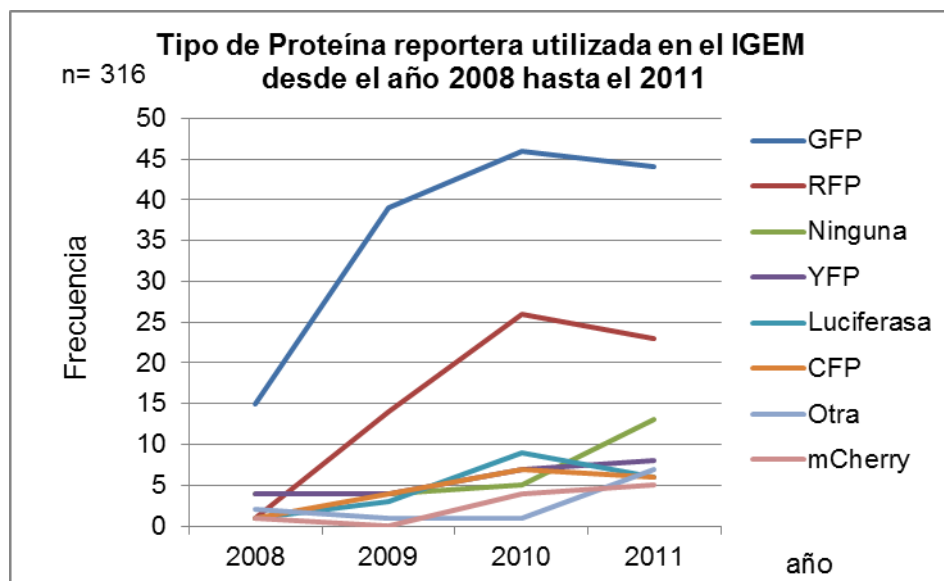


**Figura 26. Gráfica sobre el tipo de proteína reportera utilizada en el IGEN desde el año 2008 hasta el 2011 (GFP, RFP, Ninguna, YFP, luciferasa, CFP, otra, mCherry).**

Se puede observar en la figura 27 que la GFP ha prevalecido como la proteína reportera más utilizada, a pesar de desventajas como su lenta degradación; esto debido a que es la proteína fluorescente con más antigüedad de uso; también cabe aclarar que dentro de la GFP se han obtenido mutantes con una tasa de degradación mayor y una actividad aumentada. En el caso de la RFP, se nota que en el 2008 se usaba poco, pero a través de los años su uso se ha incrementado al grado de ser la segunda proteína reportera más utilizada, ésta cuenta con la ventaja de poder observarse a simple vista. Después de estas dos proteínas, ha habido un aumento en caracterizaciones en donde no se utiliza proteína reportera, debido a que la señal de salida del dispositivo no lo requiere porque la cantidad de producto es proporcional a la actividad genética de la bioparte o dispositivo caracterizado.

Es importante señalar que existe una tendencia creciente en el uso de Luciferasa como reportera de dispositivos sintéticos y en el de pigmentos como licopeno, carotenoides o melanina, en donde se busca un reportero dentro del espectro visible para no depender del uso de luz UV en la prueba de las construcciones genéticas generadas.





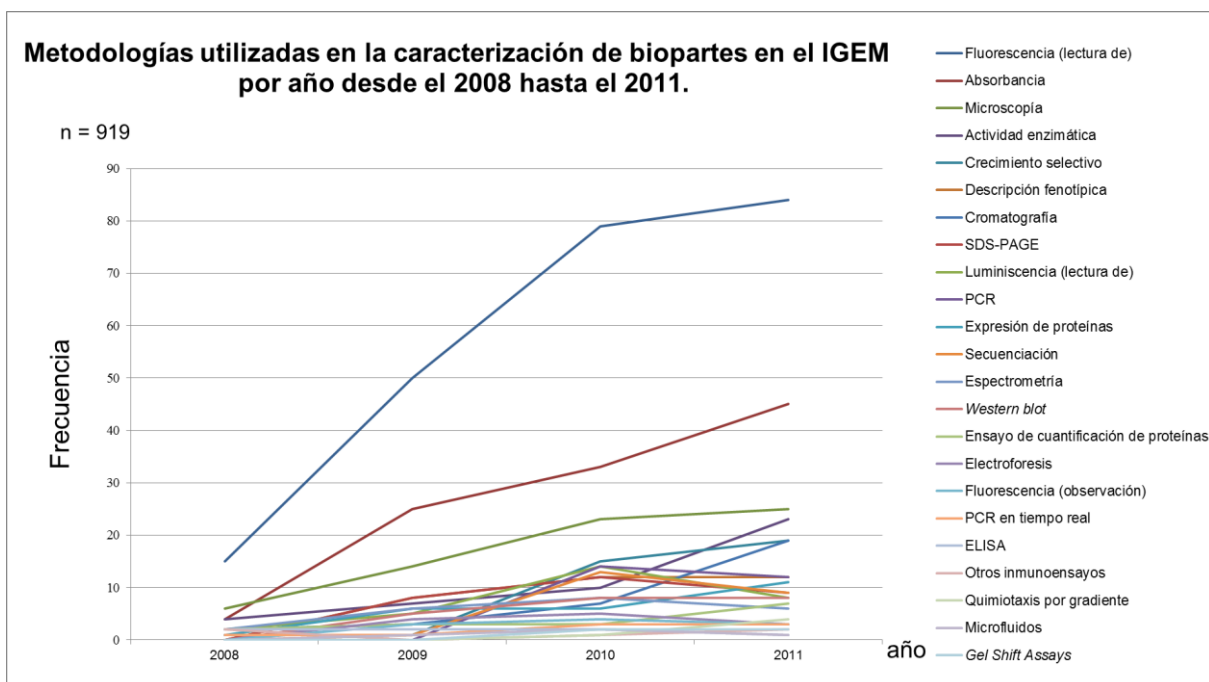
**Figura 27.** Gráfica sobre los tipos de proteínas reporteras utilizadas por año en el IGEM, desde el 2008 hasta el 2011 (GFP, RFP, Ninguna, YFP, Luciferasa, CFP, Otra, mCherry).

### 6.8 Metodologías.

A continuación se muestra la tabla 15 sobre los tipos de metodologías utilizadas por equipos IGEM desde el año 2008 hasta el 2011 para caracterizar biopartes y su respectiva figura (28). Posteriormente, se muestran las tablas 16, 17 y 18 sobre los tipos de microscopía, cromatografía y espectrometría utilizadas, con sus respectivas figuras (29, 30 y 31), por último se delimitaron los tipos de metodologías utilizadas en la caracterización básica de una bioparte y por tipo de bioparte o biopartes en las tablas 19, 20 y 21 y en las figuras 32, 33 y 34.

**Tabla 15. Frecuencia del tipo de Metodologías utilizadas en el IGEM, desde el año 2008 hasta el 2011.**

Metodología	FRECUENCIA				
	2008	2009	2010	2011	TOTAL
Fluorescencia (lectura de)	15	50	79	84	228
Absorbancia	4	25	33	45	107
Microscopía	6	14	23	25	68
Actividad enzimática	4	7	10	23	44
Crecimiento selectivo	1	1	15	19	36
Descripción fenotípica	0	8	12	12	32
Cromatografía	2	3	7	19	31
SDS-PAGE	0	8	12	9	29
Luminiscencia (lectura de)	2	5	14	8	29
PCR	0	0	14	12	26
Expresión proteínas	1	6	6	11	24
Secuenciación	0	1	13	9	23
Espectrometría	2	6	8	6	22
<i>Western blot</i>	0	5	8	8	21
Ensayo de cuantificación de proteínas	2	3	3	7	15
Electroforesis	0	4	5	3	12
Fluorescencia (observación)	0	3	4	3	10
PCR en tiempo real	1	1	3	3	8
ELISA	2	2	2	1	7
Otros inmunoensayos	2	0	1	2	5
Quimiotaxis por gradiente	0	0	1	4	5
Microfluidos	0	1	2	1	4
<i>Gel Shift Assays</i>	0	0	2	2	4

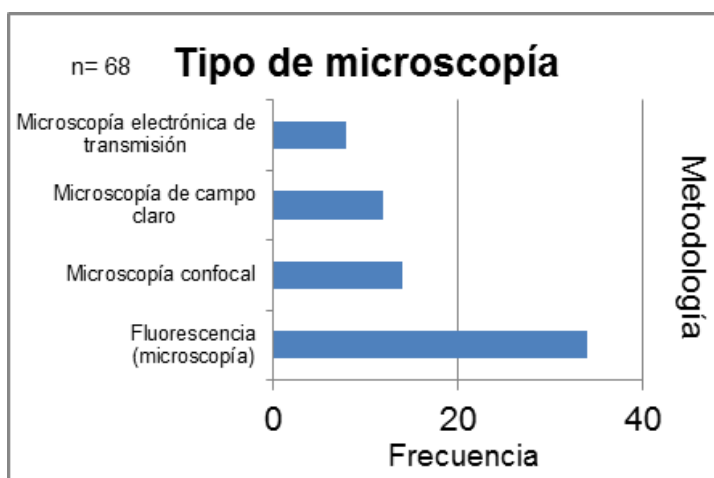


**Figura 28. Gráfica sobre el tipo de metodología utilizada para caracterizar biopartes en el IGEM (Microscopía, actividad enzimática, crecimiento selectivo, descripción fenotípica, cromatografía, SDS-PAGE, Luminiscencia (lectura de), PCR, expresión de proteínas, secuenciación, espectrometría, *Western blot*, Ensayo de cuantificación de proteínas, electroforesis, fluorescencia (observación), PCR en tiempo real, ELISA, otros inmunoensayos, quimiotaxis por gradiente, microfluidos y *Gel Shift Assays*).**

En la tabla 15 y la figura 28 se puede observar que, en general, la metodología que impera para la caracterización de biopartes es la lectura de fluorescencia seguida por la absorbancia y la microscopía (en su mayoría microscopía fluorescente). Esto refleja el gran uso de biopartes cuyo rendimiento puede ser medido mediante la cuantificación de la expresión genética reflejada en la producción de una proteína reportera, generalmente fluorescente.

**Tabla 16. Frecuencia del tipo de microscopía utilizada en el IGEM.**

Tipo de microscopía	Frecuencia
Fluorescencia (microscopía)	34
Microscopía confocal	14
Microscopía de campo claro	12
Microscopía electrónica de transmisión	8
TOTAL	68

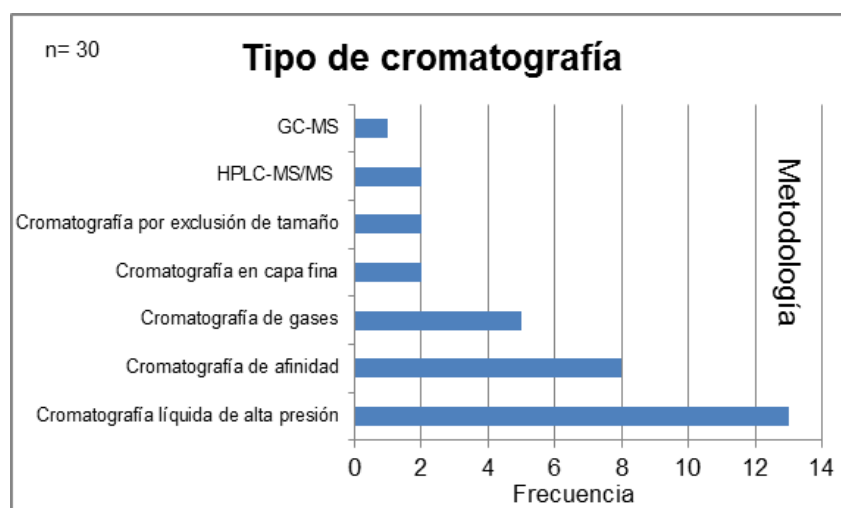


**Figura 29. Gráfica sobre los tipos de microscopía utilizada en el IGEN (Microscopía electrónica de transmisión, microscopía de campo claro, microscopía confocal y fluorescencia (microscopía)).**

En la tabla 16 y la figura 29 se observa que la microscopía más utilizada es la de fluorescencia, seguida por la confocal, la de campo claro y la microscopía electrónica de transmisión. Esto debido a que la mayoría de métodos de caracterización utilizan una proteína fluorescente como reportera.

**Tabla 17. Frecuencia del tipo de cromatografía utilizada en el IGEN.**

Tipo de cromatografía	Frecuencia
Total	30
Cromatografía líquida de alta presión	13
Cromatografía de afinidad	8
Cromatografía de gases	5
Cromatografía en capa fina	2
Cromatografía de exclusión molecular	2
HPLC-MS/MS	2
GC-MS	1

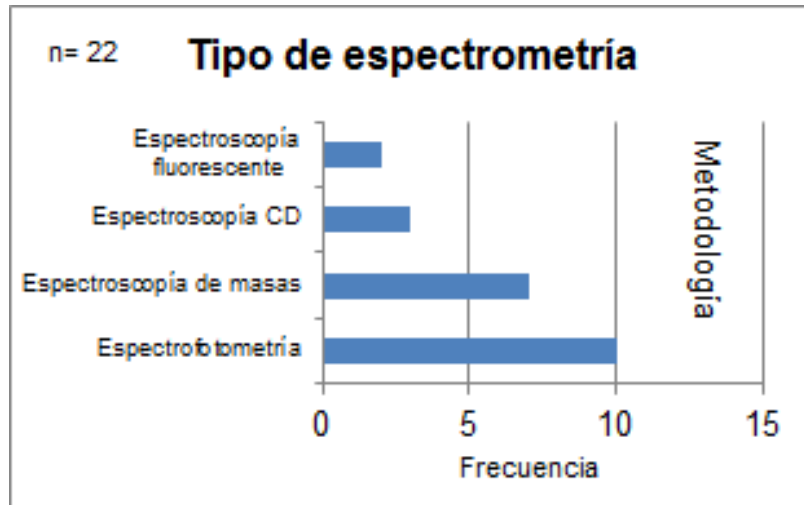


**Figura 30.** Gráfica sobre los tipos de cromatografía utilizada en el IGEM (GC-MS, HPLC-MS/MS, cromatografía por exclusión de tamaño, cromatografía en capa fina, cromatografía de gases, cromatografía de afinidad y cromatografía líquida de alta presión).

En la tabla 17 y figura 30 se observa que el tipo de cromatografía más utilizada es la líquida de alta presión, debido a las ventajas que se mencionan posteriormente. El segundo tipo más utilizado es la cromatografía de afinidad, seguida de la de gases.

**Tabla 18.** Frecuencia del tipo de espectrometría utilizada en el IGEM.

Tipo de espectrometría	Frecuencia
Espectrofotometría	10
Espectroscopía de masas	7
Espectroscopía de dicroísmo circular	3
Espectroscopía fluorescente	2
Total	22



**Figura 31. Gráfica sobre los tipos de métodos de espectrometría utilizada en el IGEM.**

En la tabla 18 y figura 31 se observa que el tipo de espectrometría más utilizado es el de espectrofotometría, debido a que esta metodología permite realizar varios ensayos, como el monitoreo del crecimiento bacteriano, la cuantificación de proteínas, entre otros. Le sigue la espectrometría de masas, la espectrometría de dicroísmo circular y por último, la espectroscopía fluorescente.

### **6.8.1. Caracterización básica de biopartes.**

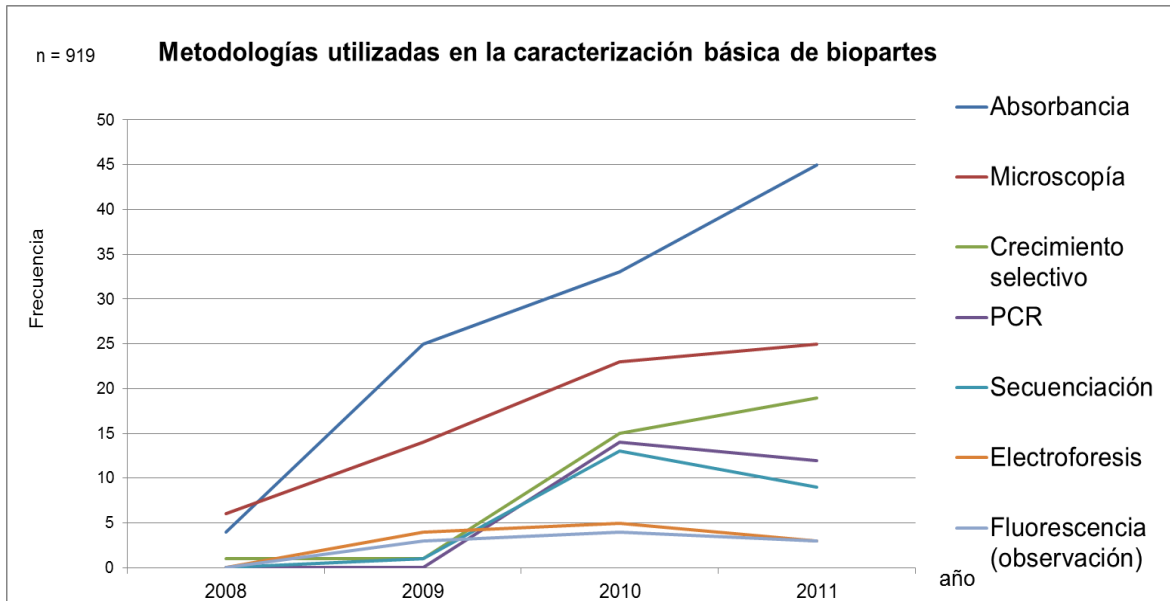
En esta sección se incluyeron los tipos de metodologías por los cuales se comprueba la funcionalidad cualitativa de las biopartes a caracterizar, así como la verificación de su secuencia. Se puede observar en la tabla 19 y figura 32 que la metodología más utilizada es la absorbancia, cuyo crecimiento ha sido casi exponencial, debido a la facilidad para su medición. En los ensayos en donde se mide la absorbancia sobre un determinado tiempo, se puede verificar el aumento de biomasa, debida tanto al crecimiento bacteriano como a la producción de los productos genéticos resultado de cada bioparte. Esto ayuda a establecer una relación del uso de recursos y de la tasa de crecimiento y sobrevivencia relacionadas con la inserción de construcciones genéticas, sirve también para probar la toxicidad de dichas construcciones en algunos casos, como los interruptores de muerte celular o biopartes que codifican a alguna toxina como

método de selección. También ha sido utilizada para la obtención de la actividad relativa del promotor, utilizandola en conjunto con la fluorescencia por célula.

El uso de la microscopía en pruebas cualitativas es ampliamente utilizada debido a la facilidad de observar visualmente la expresión genética. En el caso de la microscopía fluorescente por medio de intensidades de fluorescencia con imágenes en donde se compara con los controles positivo y negativo; existen también programas de software capaces de analizar las imágenes, obteniendo histogramas de intensidades de fluorescencia sobre el desempeño de una bioparte dada, logrando arrojar datos cuantitativos aproximados; la microscopía confocal permite la obtención de imágenes tridimensionales, en algunos casos fluorescentes para observar estructuras específicas, la microscopía óptica permite observar características fenotípicas y la de transmisión electrónica permite la observación de formación de complejos de biomoléculas a grandes aumentos. En cuanto a las metodologías utilizadas para la verificación de secuencia (PCR, secuenciación y electroforesis), que son procedimientos de rutina en Biología Sintética para corroborar la transformación, se nota que del año 2009 al 2010 hubo un aumento considerable, en el 2011 disminuyó su uso en caracterización debido a que muchas biopartes ya habían sido físicamente rectificadas o se hicieron, pero no fueron reportados como parte de la caracterización (tabla 19 y figura 32).

**Tabla 19. Frecuencia de las metodologías utilizadas en el IGEM para llevar a cabo una caracterización básica o cualitativa, desde el año 2008 hasta el 2011.**

BÁSICA (CHASIS, CEPA, PLASMIDO, PRUEBA CUALITATIVA)					
Metodología	2008	2009	2010	2011	Total
Absorbancia	4	25	33	45	107
Microscopía	6	14	23	25	68
Crecimiento selectivo	1	1	15	19	36
PCR	0	0	14	12	26
Secuenciación	0	1	13	9	23
Electroforesis	0	4	5	3	12
Fluorescencia (observación)	0	3	4	3	10



**Figura 32. Gráfica sobre los tipos de metodologías utilizadas para caracterización básica en el IGEM, desde el año 2008 hasta el 2011 (Absorbancia, microscopía, crecimiento selectivo, PCR, secuenciación, electorforesis y fluorescencia (observación)).**

### 6.8.2 Caracterización de promotores y biopartes asociadas.

En esta sección se incluyeron las metodologías utilizadas para la caracterización de promotores, DNA, RNA, RBS, partes compuestas, dispositivos reguladores, reporteros y de señalización. Se agruparon de esta manera debido a que este tipo de biopartes se caracteriza mediante la medición de la tasa de expresión genética, ya sea directamente o indirectamente mediante la expresión de una proteína reportera.

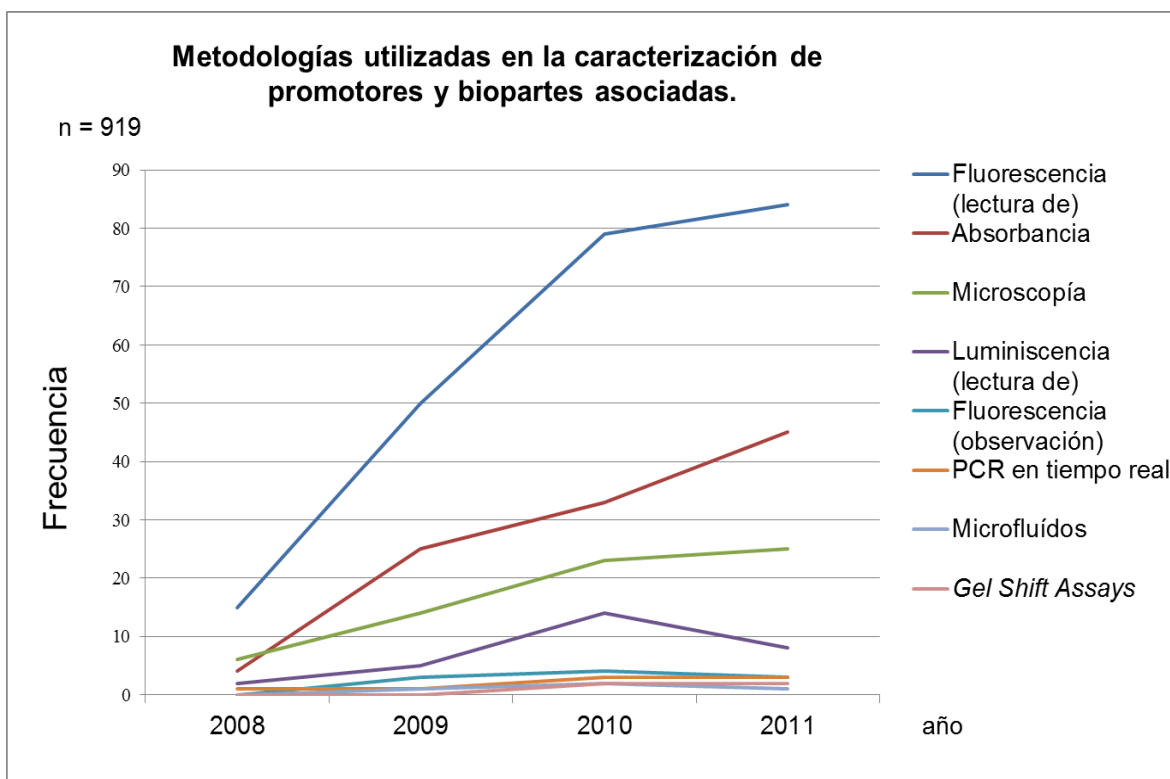
En la tabla 20 y la figura 33 se puede observar que la lectura de fluorescencia es la metodología más utilizada en la caracterización de este tipo de biopartes, seguido por la absorbancia y la microscopía, esto debido a lo mencionado antes. La lectura de luminiscencia aumentó desde el año 2008 hasta el 2010, en el 2011 disminuyó, lo que indica poca aceptación por parte de la comunidad IGEM. Por último, se puede observar que metodologías como el PCR en tiempo real y los chips de microfluidos han aumentado en la caracterización; estos tipos de metodologías permiten una caracterización en tiempo real y la obtención de datos cuantitativos absolutos, siendo las que pueden caracterizar de forma más directa y confiable. Desafortunadamente, los costos en el uso de estas metodologías son



altos y no están disponibles para muchos laboratorios, lo que limita que se adopten ampliamente en la comunidad. El caso de los ensayos de motilidad en gel, aunque sea poco su uso, representa una buena alternativa para el estudio de interacciones entre DNA y proteínas.

**Tabla 20. Frecuencia de las metodologías utilizadas en el IGEN para caracterizar promotores, DNA, RNA, dispositivos reguladores, de señalización, partes compuestas y RBS, desde el año 2008 hasta el 2011.**

PROMOTOR, DNA, RNA, REGULADORA, REPORTERA, SEÑALIZACIÓN, COMPUESTA					
Metodología	2008	2009	2010	2011	Total
Fluorescencia (lectura de)	15	50	79	84	228
Absorbancia	4	25	33	45	107
Microscopía	6	14	23	25	68
Luminiscencia (lectura de)	2	5	14	8	29
Fluorescencia (observación)	0	3	4	3	10
PCR en tiempo real	1	1	3	3	8
Microfluídos	0	1	2	1	4
<i>Gell Shift Assays</i>	0	0	2	2	4



**Figura 33. Frecuencia de las metodologías utilizadas en la caracterización de promotores y biopartes asociadas por año, desde el 2008 hasta el 2011 (Fluorescencia (lectura de), absorbancia, microscopía, Luminiscencia (lectura de), Fluorescencia (observación), PCR en tiempo real, Microfluídos y *Gel Shift Assays*).**

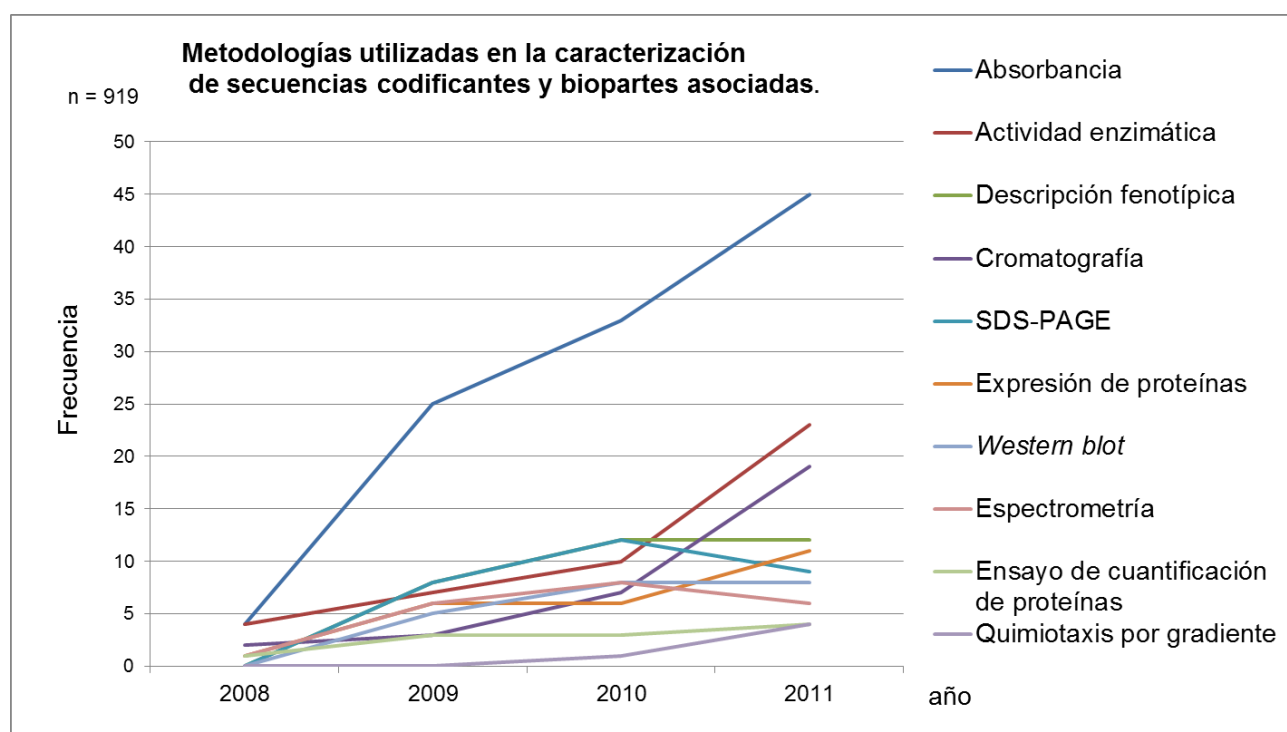
### **6.8.3 Caracterización de secuencias codificantes y biopartes asociadas.**

En esta sección se incluyeron las metodologías utilizadas en la caracterización de biopartes que están relacionadas con la producción de proteínas o partes de ellas, que son las secuencias codificantes, unidades de traducción, generadores de proteínas, dominios proteicos y algunas partes compuestas.

Se puede observar en la tabla 21 y figura 34 que la absorbancia es la más utilizada para la medición de la producción de biomasa, aunque ésta no especifica la producción de una proteína dada. Se nota un incremento en el uso de ensayos para medir la actividad enzimática desde el año 2008 hasta el 2010 y luego se dispara en el 2011, probablemente debido a que muchas de las secuencias codifican a enzimas, las cuales son caracterizadas mediante la obtención de sus parámetros enzimáticos ( $K_M$  y  $K_{cat}$ ). En el caso de la descripción fenotípica como indicador de la expresión genética (la proteína de interés), se nota un aumento en su uso durante los cuatro años. El uso de SDS-PAGE incrementó del año 2008 al 2010, pero disminuyó para el 2011, mientras que otras metodologías como el *Western blot*, la cromatografía y la espectrometría han aumentado en uso. Para el caso específico de la cromatografía, se nota que el tipo más utilizado de esta metodología es la cromatografía líquida de alta presión (HPLC), debido a su alta sensibilidad y a que permite la obtención de datos cuantitativos precisos; le sigue la cromatografía por afinidad, que es útil para la purificación de biomoléculas específicas. En el caso de la espectrometría, la más utilizada es la espectrofotometría debido a que es una metodología de amplio uso entre diversos laboratorios y permite realizar distintos tipos de ensayos dependiendo de la naturaleza de la proteína a cuantificar; los ensayos de cuantificación de proteínas han aumentado pero se mantienen en poco uso, así como los ensayos de quimiotaxis por gradiente de concentración, en donde se prueban proteínas implicadas en la motilidad bacteriana.

**Tabla 21. Frecuencia de las metodologías utilizadas en el IGEM para caracterizar secuencias codificantes y biopartes asociadas, desde el año 2008 hasta el 2011.**

Secuencias codificantes y biopartes asociadas					
Metodología	2008	2009	2010	2011	Total
Absorbancia	4	25	33	45	107
Actividad enzimática	4	7	10	23	44
Descripción fenotípica	0	8	12	12	32
Cromatografía	2	3	7	19	31
SDS-PAGE	0	8	12	9	29
Expresión de proteínas	1	6	6	11	24
<i>Western blot</i>	0	5	8	8	21
Espectrometría	1	6	8	6	21
Ensayo de cuantificación de proteínas	1	3	3	4	11
Quimiotaxis por gradiente	0	0	1	4	5



**Figura 34. Gráfica sobre las metodologías utilizadas en el IGEM para caracterizar secuencias codificantes y biopartes asociadas, desde el año 2008 hasta el 2011 (Absorbancia, actividad enzimática, descripción fenotípica, cromatografía, SDS-PAGE, expresión de proteínas, *Western blot*, espectrometría, ensayo de cuantificación de proteínas y quimiotaxis por gradiente).**

## 6.9 Equipo de laboratorio.

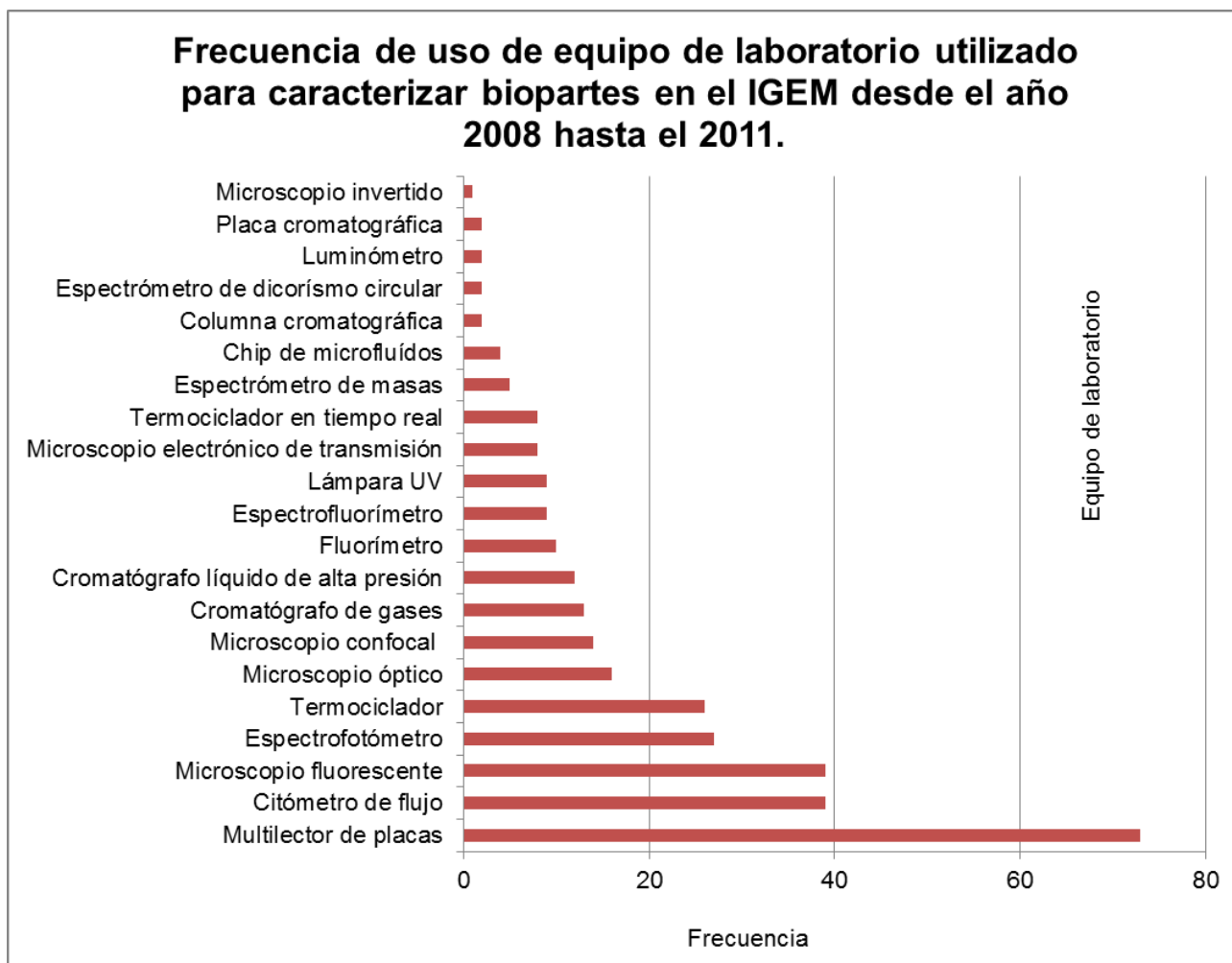
Se analizó el tipo de equipo de laboratorio que se utiliza en la caracterización de biopartes para establecer cuál es la infraestructura mínima para que un laboratorio de Biología Sintética realice investigaciones completas en donde sea posible la caracterización cuantitativa del rendimiento y desempeño de las construcciones ahí desarrolladas.

A continuación se muestra la tabla 22 sobre los diferentes aparatos de laboratorio utilizados en la caracterización de biopartes por equipos IGEM desde el año 2008 hasta el 2011 y su respectiva figura (35). Posteriormente se muestran cuatro tablas (23, 24, 25 y 26) y sus respectivas figuras (36, 37, 38 y 39) agrupadas por las siguientes metodologías: 1) Ensayos de fluorescencia; 2) Espectrometría; 3) Cromatografía y 4) Microscopía.

En general, en la tabla 22 y figura 35 se observa que el equipo de laboratorio con mayor uso es aquel que está relacionado con las técnicas de rutina de un laboratorio de ingeniería genética y que permite la realización de distintos tipos de ensayos. Se puede resumir que los cinco aparatos más utilizados para la caracterización de biopartes son: 1. Multilector de placas; 2. Citómetro de flujo; 3. Microscopio fluorescente; 4. Espectrofotómetro y 5. Termociclador. De estos cinco aparatos, el multilector de placas es el que cuenta con mayores ventajas, ya que puede utilizarse para un amplio tipo de ensayos, desde lectura de fluorescencia y luminiscencia, hasta inmunoensayos como la prueba ELISA para probar biopartes con etiquetas inmunoactivas; además es posible la lectura de absorbancia y permite llevar a cabo determinaciones en intervalos de tiempo, para obtener la tasa de expresión genética para una gran cantidad de pequeñas muestras en paralelo.

**Tabla 22. Frecuencia del equipo de laboratorio utilizado para la caracterización de biopartes en el IGEM, desde el año 2008 hasta el 2011.**

Frecuencia					
Equipo de laboratorio	2008	2009	2010	2011	Total
Multilector de placas	11	21	18	23	73
Citómetro de flujo	4	8	15	12	39
Microscopio fluorescente	4	11	11	13	39
Espectrofotómetro	4	10	8	5	27
Termociclador	0	0	14	12	26
Microscopio óptico	0	4	6	6	16
Microscopio confocal	4	0	4	6	14
Cromatógrafo de gases	0	1	2	10	13
Cromatógrafo líquido de alta presión	2	2	2	6	12
Fluorímetro	1	1	4	4	10
Espectrofluorímetro	0	0	3	6	9
Lámpara UV	0	3	4	2	9
Microscopio electrónico de transmisión	0	4	3	1	8
Termociclador en tiempo real	1	1	3	3	8
Espectrómetro de masas	0	1	1	3	5
Chip de microfluidos	0	1	2	1	4
Columna cromatográfica	0	0	0	2	2
Espectrómetro de difracción circular	0	1	1	0	2
Luminómetro	0	0	0	2	2
Placa cromatográfica	0	0	2	0	2
Microscopio invertido	0	0	1	0	1



**Figura 35. Frecuencia del equipo de laboratorio utilizado por equipos IGEM para caracterizar, desde el año 2008 hasta el 2011 (Microscopio invertido, placa cromatográfica, luminómetro, espectrómetro de dicorismo circular, columna cromatográfica, chip de microfluidos, espectrómetro de masas, termociclador en tiempo real, microscopio electrónico de transmisión, lámpara UV, espectrofluorímetro, fluorímetro, cromatógrafo líquido de alta presión, cromatógrafo de gases, microscopio confocal, microscopio óptico, termociclador, espectrofotómetro, microscopio fluorescente, citómetro de flujo y multilector de placas).**

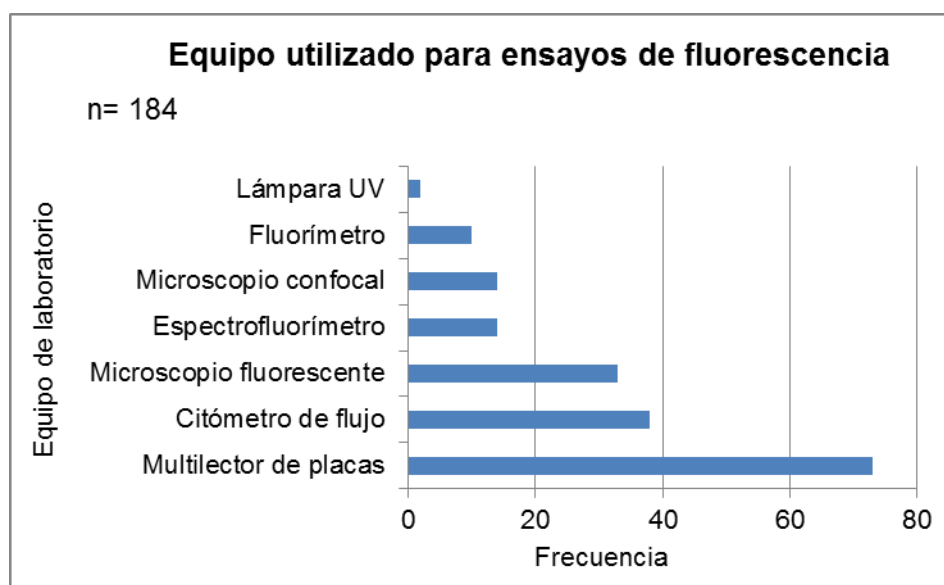
### 6.9.1 Equipo de laboratorio utilizado en ensayos de fluorescencia.

Los ensayos de fluorescencia constituyen la metodología imperante para la caracterización de biopartes, en su mayoría promotores. Para llevarlos a cabo existen diferentes aparatos de laboratorio, se puede observar en la tabla 23 y figura 36 que el aparato más utilizado es el multilector de placas, debido a lo antes mencionado (determinaciones de un gran número de muestras en intervalos de

tiempo definidos), seguido por el citómetro de flujo, en donde se obtienen mediciones puntuales de fluorescencia por célula. Estos dos aparatos permiten la obtención de datos cuantitativos confiables. El tercero es el microscopio fluorescente, seguido del espectrofluorímetro, el microscopio confocal y el fluorímetro. El uso de lámparas UV es escaso ya que sólo permite la obtención de datos cualitativos.

**Tabla 23. Equipo de laboratorio utilizado en ensayos de fluorescencia en el IGEM, desde el año 2008 hasta el 2011.**

Ensayos de fluorescencia	Frecuencia
Multilector de placas	73
Citómetro de flujo	38
Microscopio fluorescente	33
Espectrofluorímetro	14
Microscopio confocal	14
Fluorímetro	10
Lámpara UV	2
Total	184



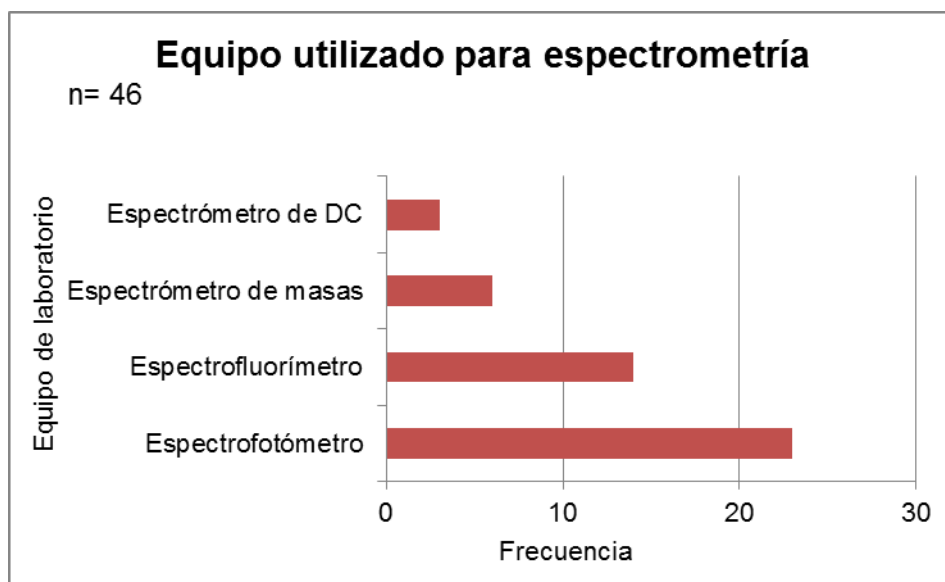
**Figura 36. Gráfica de sobre el equipo de laboratorio utilizado en los ensayos de fluorescencia por equipos IGEM para caracterizar, desde el año 2008 hasta el 2011 (Lámpara UV, fluorímetro, microscopio confocal, espectrofluorímetro, microscopio fluorescente, citómetro de flujo y multilector de placas).**

### 6.9.2 Equipo de laboratorio utilizado en espectrometría.

Para ensayos de espectrometría, el aparato más utilizado es el espectrofotómetro, debido a que es uno de los aparatos básicos con los que debe contar un laboratorio de Biología Sintética. Los demás aparatos para medir espectros son más específicos como el espectrofluorímetro, el espectrómetro de masas y el de dicroísmo circular (DC) como se observa en la tabla 24 y la figura 37.

**Tabla 24. Frecuencia del equipo de laboratorio utilizado en los ensayos de Espectrometría por equipos IGEM para caracterizar, desde el año 2008 hasta el 2011.**

Espectrometría	Frecuencia
Espectrofotómetro	23
Espectrofluorímetro	14
Espectrómetro de masas	6
Espectrómetro de DC	3
Total	46



**Figura 37. Gráfica sobre el equipo de laboratorio utilizado en los ensayos de espectrometría por equipos IGEM para caracterizar, desde el año 2008 hasta el 2011 (Espectrómetro de DC, espectrómetro de masas, espectrofluorímetro y espectrofotómetro).**

### 6.9.3 Equipo de laboratorio utilizado en cromatografía.

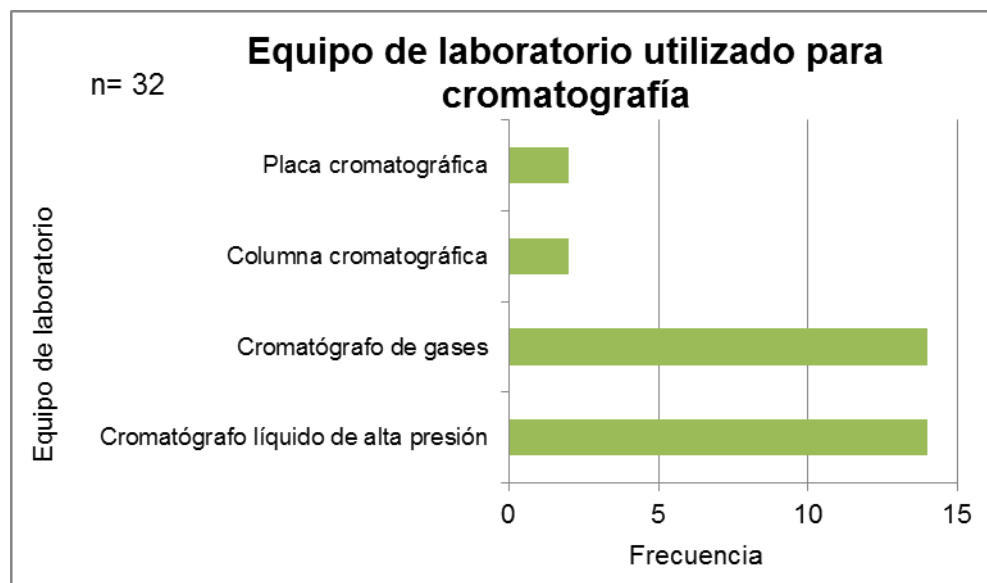
El uso de técnicas cromatográficas ha aumentado en el IGEM a través de los años, debido a que permite la purificación de proteínas con alta sensibilidad y la



obtención de datos cuantitativos confiables. Existen diversos tipos de cromatografía y cada uno tiene un aparato específico. Se encontró que la mayor parte de equipos IGEM utilizan cromatógrafo líquido de alta presión y el de gases, seguido por columnas y placas cromatográficas, con un uso mínimo como se observa en la tabla 25 y en la figura 38.

**Tabla 25. Frecuencia del equipo de laboratorio utilizado en cromatografía por equipos IGEM para caracterizar, desde el año 2008 hasta el 2011.**

Cromatografía	Frecuencia
Cromatógrafo líquido de alta presión	14
Cromatógrafo de gases	14
Columna cromatográfica	2
Placa cromatográfica	2
Total	32



**Figura 38. Gráfica sobre el equipo de laboratorio utilizado en cromatografía por equipos IGEM para caracterizar, desde el año 2008 hasta el 2011 (Placa cromatográfica, columna cromatográfica, cromatógrafo de gases y cromatógrafo líquido de alta presión).**

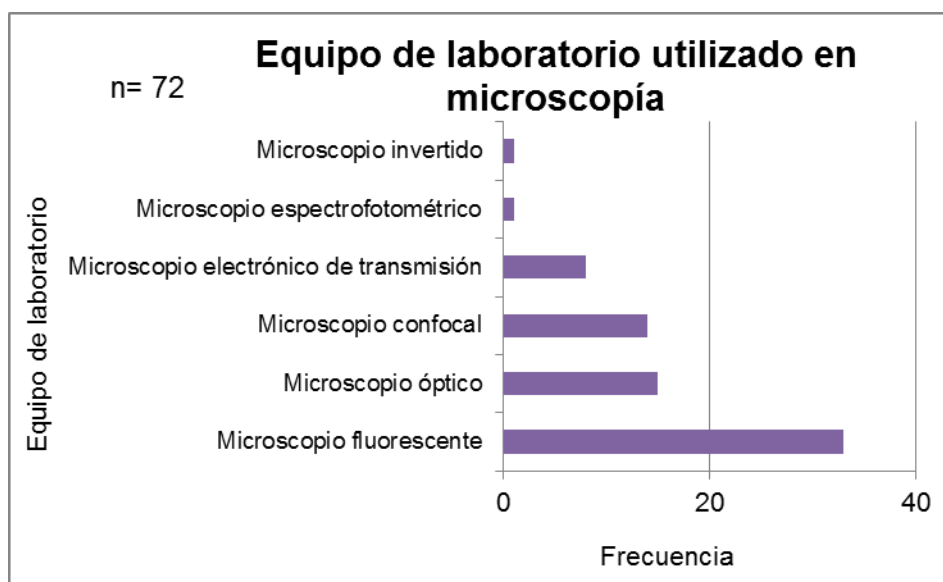
#### 6.9.4 Equipo de laboratorio utilizado en microscopía

La microscopía es una de las técnicas más utilizadas para la caracterización de biopartes que codifican alguna característica fenotípica visible, o bien una proteína reportera fluorescente. Se encontró que el tipo de microscopio más utilizado es el

fluorescente, lo que refleja la gran cantidad de biopartes que utilizan una proteína reportera fluorescente. Los otros tipos de microscopios son utilizados en menor proporción, pero permiten la obtención de imágenes para la observación de características particulares según la naturaleza de cada bioparte a caracterizar (tabla 26; figura 39).

**Tabla 26. Frecuencia del equipo de laboratorio utilizado en microscopía por equipos IGEM para caracterizar, desde el año 2008 hasta el 2011.**

Microscopía	Frecuencia
Microscopio fluorescente	33
Microscopio óptico	15
Microscopio confocal	14
Microscopio electrónico de transmisión	8
Microscopio espectrofotométrico	1
Microscopio invertido	1
Total	72



**Figura 39. Gráfica de barras sobre el equipo de laboratorio utilizado en microscopía por equipos IGEM para caracterizar, desde el año 2008 hasta el 2011 (Microscopio invertido, microscopio espectrofotométrico, microscopio electrónico de transmisión, microscopio confocal, microscopio óptico y microscopio fluorescente).**

## 6.10 Tipo de medida, características medidas y unidades de medición

Para el análisis del tipo de medida, características medidas y unidades de medición, se tomaron en cuenta las siguientes metodologías, por ser consideradas las más relevantes: absorbancia, actividad enzimática, crecimiento selectivo, electroforesis, fluorescencia (tanto lectura como observación), luminiscencia (lectura), microscopía, PCR, PCR en tiempo real y secuenciación.

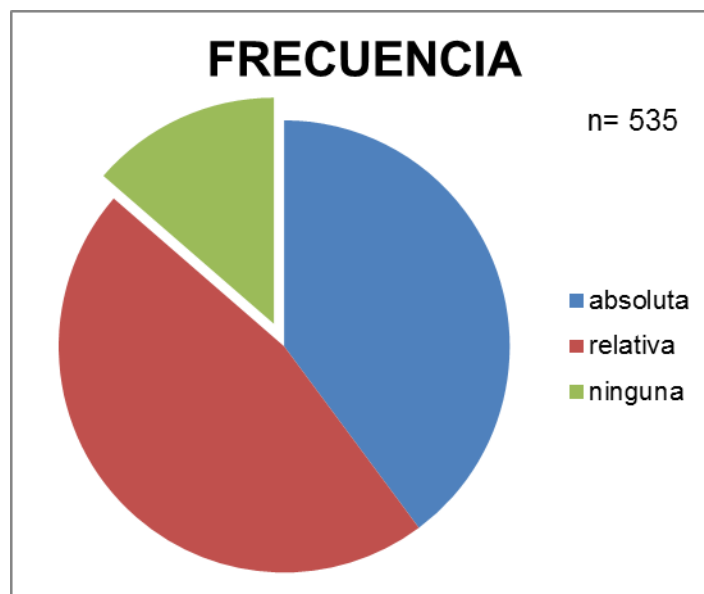
### 6.10.1 Tipo de medida

El tipo de medida se dividió en tres: absoluta, relativa y ninguna. Las medidas absolutas son aquellas que establecen de forma completa el valor de una medida; las medidas relativas definen su valor en relación con otra medida, un acercamiento como el que se hace en ciencias de la computación ([http://www.librosweb.es/css/capitulo3/unidades\\_de\\_medida.html](http://www.librosweb.es/css/capitulo3/unidades_de_medida.html)). En la categoría “ninguna” entra la microscopía, en donde la caracterización es cualitativa ya que solamente se obtiene una imagen que indica si el dispositivo genético funciona o no, por lo que no utilizan unidades de medición.

Se encontró que las medidas relativas son más utilizadas en Biología Sintética ya que en la mayoría de metodologías cada unidad de medida depende de la calibración del equipo así como de las condiciones en las que se llevan a cabo, las cuales cambian de un experimento a otro, seguidas de las absolutas, cuya obtención es menos sencilla debido a que están relacionadas con grandes coeficientes de variación. A continuación se muestra la tabla 27 sobre la frecuencia de cada tipo de medida así como el porcentaje que representa y su respectiva figura (40).

**Tabla 27. Frecuencia del tipo de medida utilizada en el IGEM, desde el año 2008 hasta el 2011.**

Tipo de medida	FRECUENCIA	Porcentaje
absoluta	213	40
relativa	249	46
ninguna	73	14
Total	535	100



**Figura 40. Gráfica sobre el porcentaje del tipo de medida utilizada en el IGEM, desde el año 2008 hasta el 2011 (absoluta, relativa y ninguna).**

### 6.10.2 Características medidas

Después de la selección previa sobre las metodologías más relevantes, se hizo una selección de las características medidas con mayor uso en el IGEM. De esta selección se obtuvo la siguiente tabla, con su respectiva gráfica.

A continuación se mencionan las características medidas más relevantes contenidas en la tabla 28 y mostradas en la figura 41; posteriormente se muestra la tabla 29 y la figura 42 sobre la frecuencia de uso de estas características desde el 2008 hasta el 2011.

La expresión de proteínas reporteras es la característica más utilizada, debido a que la cantidad de expresión es proporcional a la actividad genética. Existen otras características derivadas de ésta, como es la actividad del promotor y la actividad relativa del promotor (la tasa de iniciación de la transcripción), las cuales se obtienen mediante las mismas metodologías, pero toman en cuenta más variables. La fase de crecimiento es la segunda característica más medida debido a la facilidad con la que se obtiene, ya que son mediciones puntuales de la densidad óptica de una muestra.

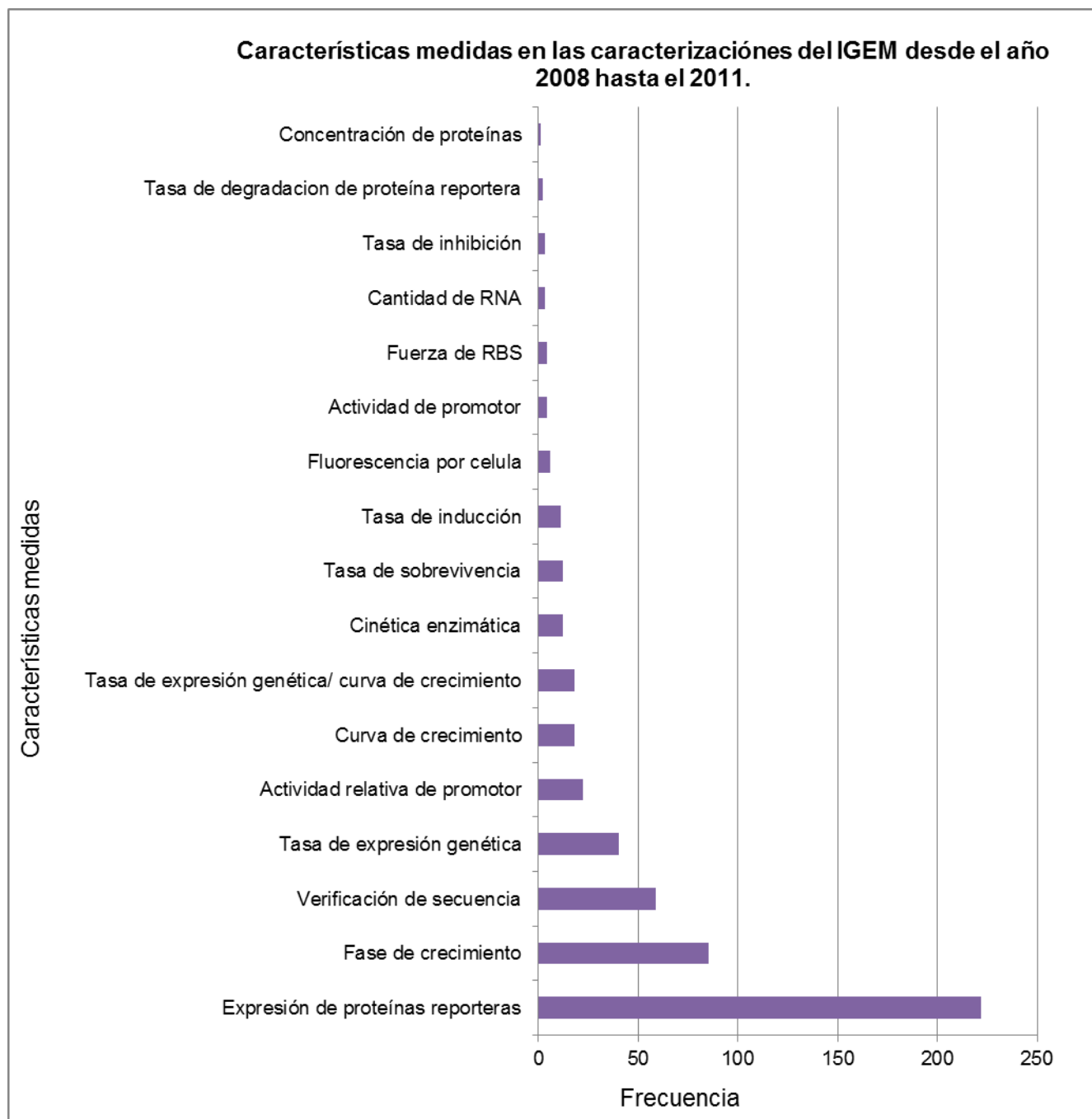
La tasa de expresión genética se puede medir mediante varias metodologías, dependiendo de la naturaleza de la bioparte a caracterizar; cuando es una

construcción que incluye una proteína reportera fluorescente está relacionada con la expresión de esta a lo largo de un determinado tiempo. La actividad relativa del promotor es igual a la actividad del promotor, pero se utiliza un promotor de referencia. La curva de crecimiento, obtenida a partir de varias mediciones de la densidad óptica a lo largo de un tiempo determinado, sirve para estimar si la inserción de biopartes o dispositivos sintéticos afecta el crecimiento bacteriano y la demanda de recursos.

Para determinar qué características medir al caracterizar una bioparte, se debe tener en cuenta su naturaleza; por ejemplo: si es una proteína anticongelante, debe probarse la resistencia al frío mediante la tasa de sobrevivencia a diferentes temperaturas; si es un promotor, se debe medir su actividad, preferentemente relativa, si se trata de una enzima debe medirse su cinética enzimática

**Tabla 28. Frecuencia de las características medidas más relevantes en el IGEM, desde el año 2008 hasta el 2011.**

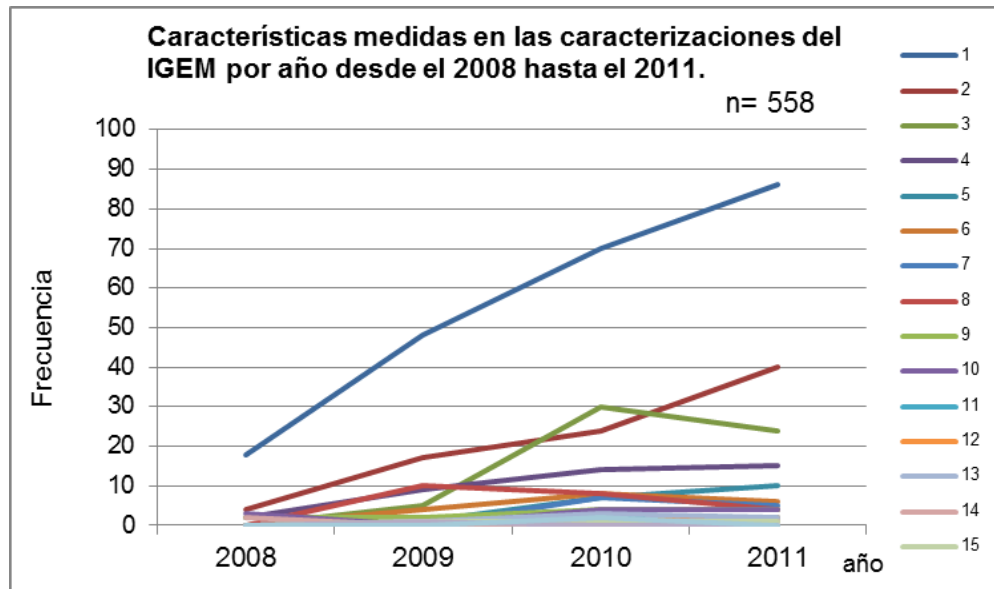
Características medidas	Frecuencia
Expresión de proteínas reporteras	222
Fase de crecimiento	85
Verificación de secuencia	59
Tasa de expresión genética	40
Actividad relativa del promotor	22
Curva de crecimiento	18
Tasa de expresión genética/ curva de crecimiento	18
Cinética enzimática	12
Tasa de sobrevivencia	12
Tasa de inducción	11
Fluorescencia por célula	6
Actividad del promotor	4
fuerza de RBS	4
cantidad de RNA	3
tasa de inhibición	3
tasa de degradación de proteínas reporteras	2
concentración de proteínas	1



**Figura 41. Gráfica sobre las características medidas más relevantes en el IGEM desde el año 2008 hasta el 2011 (concentración de proteínas, tasa de degradación de proteínas reporteras, tasa de inhibición, cantidad de RNA, fuerza de RBS, actividad de promotor, fluorescencia por célula, tasa de inducción, tasa de sobrevivencia, cinética enzimática, tasa de expresión genética/ curva de crecimiento, curva de crecimiento, actividad relativa del promotor, tasa de expresión genética, verificación de secuencia, fase de crecimiento y expresión de proteínas reporteras).**

**Tabla 29. Frecuencia de las características medidas en las caracterizaciones de equipos IGEM por año desde el 2008 hasta el 2011.**

Características medidas en las caracterizaciones por año					
Frecuencia	2008	2009	2010	2011	Total
Expresión de proteínas reporteras	18	48	70	86	222
Fase de crecimiento	4	17	24	40	85
Verificación de secuencia	0	5	30	24	59
Tasa de expresión genética	2	9	14	15	40
Curva de crecimiento	0	1	7	10	18
Tasa de expresión genética/ curva de crecimiento	0	4	8	6	18
Tasa de supervivencia	0	0	7	5	12
Actividad relativa del promotor	0	10	8	4	22
Cinética enzimática	2	2	4	4	12
Tasa de inducción	3	0	4	4	11
Fuerza de RBS	0	0	2	2	4
Tasa de inhibición	0	0	1	2	3
Fluorescencia por célula	0	1	3	2	6
Actividad del promotor	2	0	1	1	4
Cantidad de RNA	0	1	1	1	3
Concentración de proteínas	0	1	0	0	1
Tasa de degradación de proteína reportera	0	0	2	0	2



**Figura 42.** Gráfica de la la tabla 22. El número identificador de cada característica es correspondiente al orden en la tabla del siguiente modo: 1) expresión de proteínas reporteras; 2) fase de crecimiento; 3) verificación de secuencia; 4) tasa de expresión genética; 5) curva de crecimiento; 6) tasa de expresión genética/ curva de crecimiento; 7) tasa de supervivencia; 8) actividad relativa del promotor; 9) cinética enzimática; 10) tasa de inducción; 11) fuerza de RBS; 12) tasa de inhibición; 13) fluorescencia por célula; 14) actividad del promotor; 15) cantidad de RNA; 16) concentración de proteínas y 17) tasa de degradación de proteína reportera.

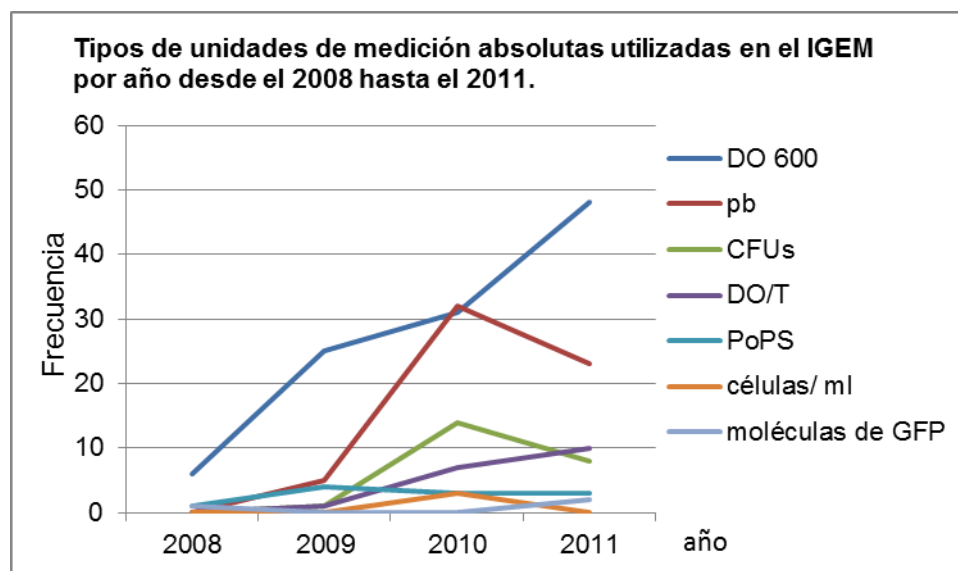
### 6.10.3 Unidades de medición

Partiendo de la clasificación del tipo de medida, se obtuvieron las unidades de medición, tanto absolutas como relativas. Se muestra las unidades absolutas en la tabla 30 y figura 43; las relativas en la tabla 31 y figura 44.

#### 6.10.3.1 Unidades absolutas

**Tabla 30. Frecuencia de los tipos de medidas absolutas utilizadas en el IGEM por año, desde el 2008 hasta el 2011. Se enlistan las siguientes: densidad óptica a 600 nm (DO 600); pares de bases (pb); unidades de formación de colonias (CFUs); densidad óptica sobre tiempo (DO/t); polimerasas por segundo (PoPS); células por mililitro (células/ml) y moléculas de GFP.**

Medidas absolutas					
Frecuencia	2008	2009	2010	2011	total
DO 600	6	25	31	48	110
Pb	0	5	32	23	60
CFUs	0	1	14	8	23
DO/ t	0	1	7	10	18
PoPS	1	4	3	3	11
células/ ml	0	0	3	0	3
moléculas de GFP	1	0	0	2	3



**Figura 43. Gráfica sobre los tipos de unidades de medición absolutas utilizadas en el IGEM por año, desde el 2008 hasta el 2011 (DO 600, pb, CFUs, DO/T, PoPS, células/ml y moléculas de GFP).**

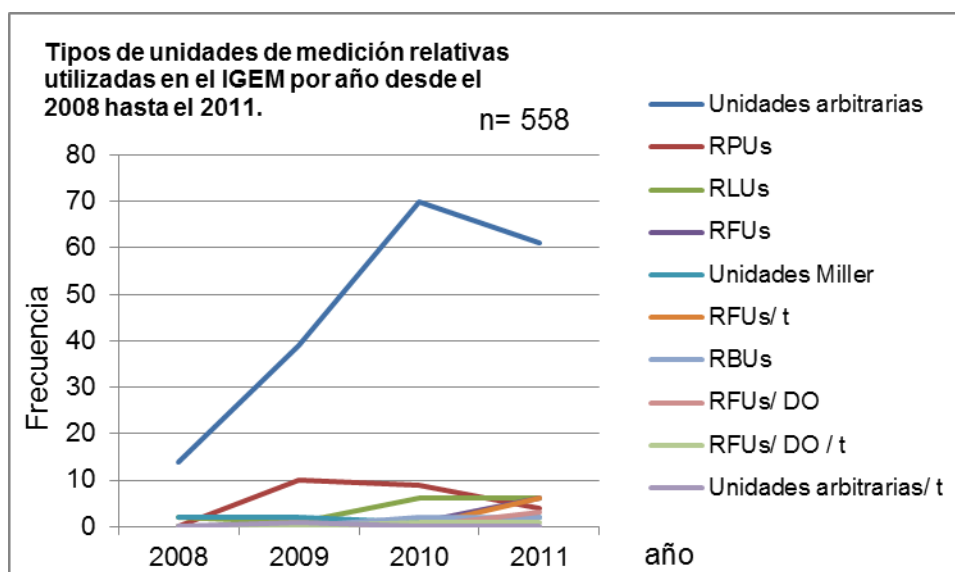


Se observa en la tabla 30 y figura 43, que la densidad óptica es la más utilizada, debido a su fácil obtención. Es importante señalar que las unidades absolutas con menor uso son las más relevantes para la caracterización cuantitativa, pero su obtención es más complicada debido a que implica equipo de laboratorio costoso y grandes coeficientes de variación.

#### 6.10.3.2 Unidades relativas.

**Tabla 31. Frecuencia de los tipos de medidas relativas utilizadas en el IGEM por año, desde el 2008 hasta el 2011. Se enlistan las siguientes: Unidades arbitrarias (au); unidades relativas del promotor (RPU); unidades relativas de luminiscencia (RLUs); unidades relativas de fluorescencia (RFUs); unidades Miller, RFUs/ tiempo; unidades relativas de unión ribosomal (RBU); RFUs/DO; RFUs/DO/t y unidades arbitrarias/t.**

Medidas relativas					
Frecuencia	2008	2009	2010	2011	total
Unidades arbitrarias	14	39	70	61	184
RPU	0	10	9	4	23
RLUs	2	1	6	6	15
RFUs	0	0	1	6	7
Unidades Miller	2	2	1	2	7
RFUs/ t	0	0	0	6	6
RBU	0	0	2	2	4
RFUs/ DO	0	0	0	3	3
RFUs/ DO / t	0	0	1	1	2
Unidades arbitrarias/ t	0	1	0	0	1



**Figura 44. Gráfica sobre los tipos de unidades de medición relativas utilizadas en el IGEM por año, desde el 2008 hasta el 2011 (Unidades arbitrarias (au); unidades relativas del promotor (RPU); unidades relativas de luminiscencia (RLU); unidades relativas de fluorescencia (RFU); unidades Miller, RFU/ tiempo; unidades relativas de unión ribosomal (RBU); RFU/DO; RFU/DO/t y unidades arbitrarias/t.)**

El uso de unidades relativas está más ampliamente adoptado, debido a que la calibración de los equipos de medición y las condiciones en las que se lleva a cabo la caracterización pueden ser muy variadas de un experimento a otro causando grandes coeficientes de variación al utilizar unidades absolutas. Este es el caso de las unidades arbitrarias, las cuales no son de gran utilidad en la caracterización debido a que no es posible comparar resultados entre laboratorios.

Como consenso general se ha establecido que el uso de unidades relativas que toman un estándar de referencia es la mejor aproximación para describir datos de caracterizaciones ya que éstas logran coeficientes de variación menores y son comparables entre laboratorios. Sin embargo se observa en la figura 44 que no han sido tan ampliamente adoptadas como se esperaba. En el caso particular de las unidades relativas de promotor (RPU), se nota que durante el 2009 aumento su uso y se mantuvo en el 2010, pero disminuyó en el 2011, esto indica que se necesitan promover más dentro del IGEM para poder aprovechar las ventajas que representa su adopción.

#### 6.10.4 Tabla resumen de características con mayor uso y tabla generalizada sobre caracterización.

Se realizó la tabla 32 a modo de resumir las 10 características medidas con mayor frecuencia, el tipo de metodología utilizada para su obtención y las unidades de medición utilizadas para expresar cada una de éstas.

**Tabla 32. Tabla resumen de las 10 características más utilizadas en el IGEM desde el 2008 hasta el 2011.**

Característica medida	Metodologías	Unidades de medición
Actividad relativa del promotor	Fluorescencia (lectura) Absorbancia	RPU (unidades relativas del promotor)
Cinética enzimática	Actividad enzimática Luminiscencia (lectura)	Unidades Miller DO (Densidad óptica) RLUs (Unidades relativas de luminiscencia)
Curva de crecimiento	Absorbancia	Densidad óptica/ tiempo
Expresión de proteínas reporteras	Fluorescencia (lectura) Fluorescencia (observación) Luminiscencia (lectura) Absorbancia Microscopía	CFUs (unidades de formación de colonia) DO Moléculas de GFP Células/ ml Unidades arbitrarias RFUs (unidades relativas de fluorescencia) RLUs
Fase de crecimiento	Absorbancia	DO
Fluorescencia por célula	Fluorescencia (lectura)	Unidades arbitrarias Células/ mL
Verificación de secuencia	PCR Electroforesis Secuenciación	pb (pares de bases)
Tasa de expresión genética	Absorbancia Fluorescencia (lectura) Luminiscencia (lectura) PCR en tiempo real	DO PoPS (polimerasas por segundo) RFUs/ t Unidades arbitrarias Unidades arbitrarias/ t Unidades Miller
Tasa de expresión genética/ curva de crecimiento	Fluorescencia (lectura) Luminiscencia (lectura)	RFUs/ t RFUs/ DO/ t RLUs/ DO Unidades arbitrarias
Tasa de inducción	Fluorescencia (lectura)	Unidades arbitrarias Células/ mL
Tasa de sobrevivencia	Crecimiento selectivo Fluorescencia (observación)	CFUs Células/ mL

A partir de la tabla resumen, los tipos de biopartes más relevantes y los parámetros sugeridos por el IGEM se generó la Tabla general de caracterización en donde se muestra la aproximación de medición a seguir partiendo del tipo de bioparte.

**Tabla 33. Tabla general de caracterización.**

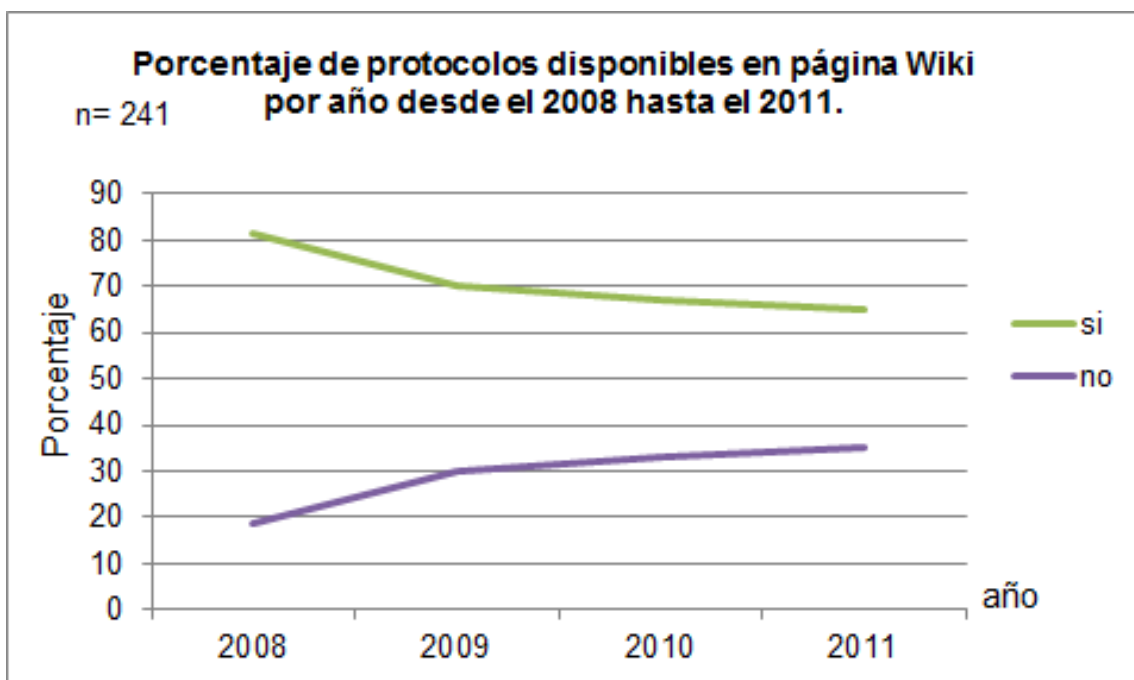
Tipo de bioparte	Parámetro a medir	Unidades de medición	Metodologías	Equipo de laboratorio
Promotor Compuesta DNA	Actividad transcripcional o tasa de transcripción	PoPS RPU RFUs RLUs	Lectura de fluorescencia y absorbancia Lectura de luminiscencia Microscopía	Multilector de placas Fluorímetro Citómetro de flujo Espectrofotómetro Microscopio de fluorescencia
RBS RNA	Actividad de traducción o tasa de traducción Concentración de pequeñas moléculas	RiPs RBU	Lectura de fluorescencia y absorbancia Lectura de luminiscencia Microscopía	Multilector de placas Fluorímetro Citómetro de flujo Espectrofotómetro Microscopio de fluorescencia
Terminador	Eficiencia de terminación	RFUs RLUs	Lectura de fluorescencia y absorbancia Lectura de luminiscencia Microscopía	Multilector de placas Fluorímetro Citómetro de flujo Espectrofotómetro Microscopio de fluorescencia
Secuencia codificante Compuesta Unidad de traducción Dominio proteico Enzimas	Concentración proteica Tasa de síntesis proteica $K_M$ y $K_{cat}$ Flujo metabólico	[GFP] moléculas de GFP GFP / s % proteínas	Lectura de fluorescencia <i>Western blot</i> Actividad enzimática Cromatografía Espectrometría SDS_PAGE Absorbancia Descripción fenotípica Cuantificación de proteínas	Multilector de placas Espectrofotómetro Microscopio de fluorescencia Cromatógrafo Microscopio de transmisión electrónica

## 6.11 Protocolos y páginas de caracterización disponibles en las wikis del IGEM.

Se muestra la tabla 34 y la figura 45 sobre el porcentaje de los equipos IGEM que compartieron protocolos de medición en la Wiki oficial del concurso, contra los que no lo hicieron. En la tabla 35 y figura 46 se muestra a los que tienen una página exclusiva para explicar cómo se llevó a cabo la caracterización de biopartes o los datos importantes de éstas contra los que no lo hicieron.

**Tabla 34. Porcentaje de equipos que compartieron protocolos en Wiki contra los que no en el IGEM, desde el año 2008 hasta el 2011.**

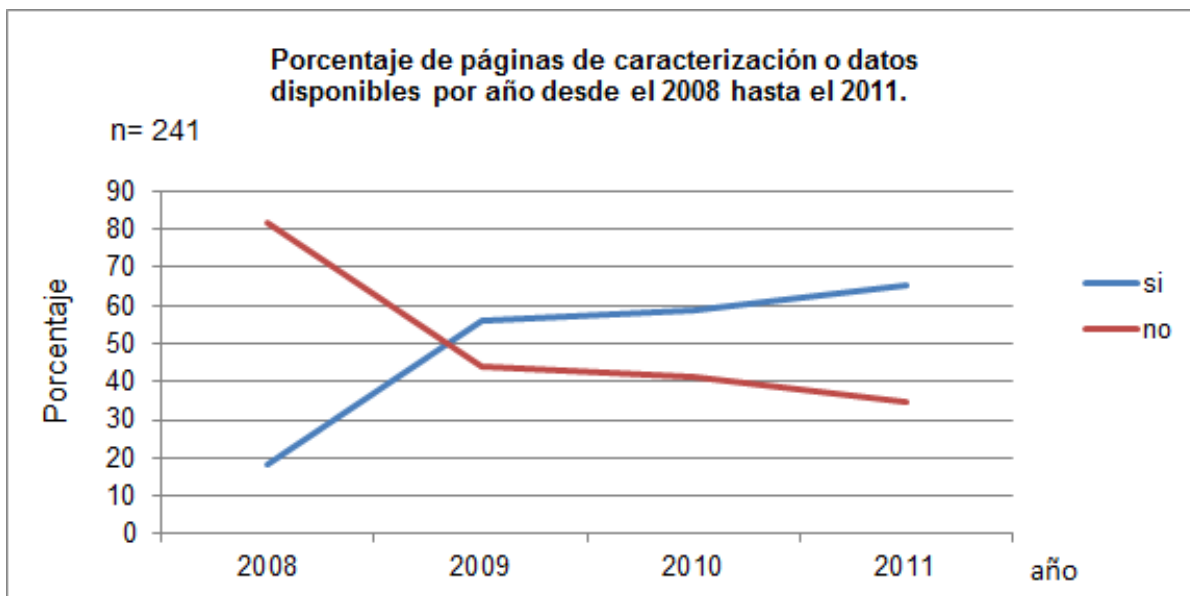
Porcentaje de protocolos disponibles en página Wiki por año.				
Protocolos disponibles	2008	2009	2010	2011
si	81	70	67	65
no	19	30	33	35



**Figura 45. Gráfica sobre el porcentaje de protocolos disponibles en página Wiki por año, desde el 2008 hasta el 2011.**

**Tabla 35. Porcentaje de equipos con páginas exclusivas de caracterización o de datos en Wiki contra los que no contaban con ellas en el IGEM, desde el año 2008 hasta el 2011.**

Porcentaje de páginas de caracterización disponibles por año				
Págs. de caracterización	2008	2009	2010	2011
si	18.5	56	59	65.5
no	81.5	44	41	34.5



**Figura 46. Gráfica sobre el porcentaje de equipos con páginas exclusivas de caracterización en el IGEM.**

Se puede notar en la tabla 34 y figura 45 que el porcentaje de protocolos disponibles en la Wiki ha disminuido en los cuatro años del estudio pero se sigue manteniendo por arriba del porcentaje de los que no están disponibles, mientras que el porcentaje de páginas de caracterización o secciones de datos en la Wiki ha aumentado considerablemente llegando a más del 60% de los equipos en el año 2011 (tabla 35; figura 46). Esto refleja que se ha hecho un énfasis en la caracterización y cada vez son más los equipos que caracterizan sus biopartes y utilizan los datos resultantes para secciones específicas en las páginas Wiki. Sin embargo, los protocolos disponibles en la misma página han disminuido casi un 20% desde el año 2008 al 2011. Teóricamente, se busca una caracterización estandarizada en donde se utilicen los mismos protocolos a grandes rasgos, pero en la práctica esto no resulta sencillo debido a que muchas de las biopartes a caracterizar tienen gran potencial para su explotación industrial, por lo que los métodos y protocolos de caracterización no son publicados abiertamente. Para enfrentar este reto, es necesario la implementación de licencias de uso sobre las biopartes; no se considera que una bioparte pueda ser patentada debido a que sus componentes son parte de un lenguaje común (el DNA) y de librerías comunes (como el Registro de Partes) por lo que es más adecuado el

acercamiento del uso de licencias, como se hace con los programas de software en ciencias de la computación.

### **Uso de *OpenWetware*.**

Se encontró que del año 2008 al 2011, solamente cuatro equipos utilizaron *OpenWetware* para publicar sus métodos y protocolos de caracterización. De estos cuatro equipos, tres fueron del año 2010 y el otro del 2011. Esto demuestra una falta de uso o poco interés de la comunidad por usar esta plataforma web.

### **6.12 Condiciones de medición.**

Las condiciones de medición utilizadas en caracterización dependen principalmente del tipo de chasis y de la naturaleza de la bioparte a caracterizar (si el organismo es aeróbico, anaeróbico, halófilo, termófilo o si la bioparte confiere resistencia a la temperatura, a un rango de pH, codifica a metabolitos que se inhiben por alguna condición específica, entre otros). En esta sección no se realizaron tablas ni gráficas, ya que las condiciones de medición se dan por sentado y la mayoría de los equipos no las mencionaban. En general se pueden resumir las siguientes condiciones:

- Los medios de cultivo más utilizados son los de cultivo bacteriano, LB y M9. El LB es el medio estándar de crecimiento para *E. coli*, rico en nutrientes y el M9, un medio mínimo que posee bajos niveles de fluorescencia y absorbancia de fondo (<http://openwetware.org/wiki/LB>; [http://openwetware.org/wiki/M9\\_medium](http://openwetware.org/wiki/M9_medium)).
- Cuando se utiliza *E. coli*, la temperatura óptima es de 37°C, a menos que se requiera caracterizar el desempeño de la cepa a diferentes temperaturas, en donde se prueban entre tres y cinco diferentes temperaturas oscilando entre los 25 y los 40°C.
- Cuando se utiliza *S. cerevisiae*, la temperatura óptima es de 28°C, con variaciones que van desde los 20 hasta los 30°C.
- Los antibióticos más utilizados son kanamicina, cloranfenicol, ampicilina y tetraciclina.
- Plásmidos linearizados estándar pSB1A3, pSB1C3, pSB1K3.m1 y pSB1T3 ([http://partsregistry.org/Help:Distribution\\_Kits](http://partsregistry.org/Help:Distribution_Kits)).

Para información detallada sobre alguno de los organismos chasis en específico, se sugiere revisar libros de metodologías para su cultivo.

## 7 Discusión.

### 7.6 Definición de caracterización en Biología Sintética.

La definición general de caracterización en Biología Sintética es la misma aplicada en otras ciencias: “determinar los atributos peculiares de algo, de modo que claramente se distinga de los demás”; sin embargo, se especificó en mayor grado con fines prácticos para esta disciplina.

Caracterizar es determinar las características funcionales y de composición de una construcción genética. Dentro de las características funcionales destacan las interfaces (señales de entrada y de salida), el rendimiento estático y el dinámico; la confiabilidad y la demanda de recursos. Por su lado, las características de composición se refieren a la secuencia de DNA que compone la parte así como su número de identificación. Es importante la especificación de las condiciones de medición llevadas a cabo en cada caracterización, ya que pequeñas variaciones pueden afectar enormemente los resultados.

Se distinguen dos tipos o etapas de caracterización: la cualitativa y la cuantitativa. La primera consiste en la verificación de la composición física de la parte y en la realización de una prueba cualitativa de su rendimiento, es decir, si funciona o no; mientras que la caracterización cuantitativa consiste en la detallada descripción del rendimiento de la bioparte y sus requerimientos operacionales.



### **7.7 Elementos principales en el diseño de protocolos de caracterización.**

En cuanto al diseño de metodologías y protocolos para caracterización, debe considerarse la naturaleza de la construcción genética a probar, es decir, la elección de los parámetros que mejor describan el desempeño de la misma: cuando se trata de promotores el parámetro que mejor mide el desempeño es la tasa de iniciación de la transcripción, conocida como la actividad del promotor o actividad transcripcional; si se caracteriza un sitio de unión al ribosoma (RBS), determinar la actividad de traducción es lo procedente; cuando se trata de una secuencia que codifica a una proteína, los parámetros a elegir son la concentración del producto o la tasa de síntesis proteica; si la secuencia codifica a una enzima se miden los parámetros  $K_M$  y  $K_{cat}$  respectivamente. Si bien hay experimentos específicos para distintos tipos de biopartes, de manera general y estandarizada se puede probar su desempeño correlacionando el funcionamiento de la construcción genética completa (de más de una bioparte) con la tasa de síntesis de una proteína reportera. De este modo han surgido dispositivos de medición que contienen las biopartes a probar con la secuencia que codifica a la proteína reportera facilitando llevar a cabo mediciones *in vivo* a través de intervalos de tiempo definidos con el uso de aparatos capaces de medir fluorescencia o luminiscencia.

Sin importar la metodología utilizada, se propone el uso de unidades de medición estándar para que diferentes caracterizaciones puedan ser comparadas entre sí. En este sentido se distinguen dos tipos de unidades de medición, las absolutas y las relativas. Las medidas absolutas son aquellas que establecen de forma completa el valor de una medida; las medidas relativas definen su valor en relación con otra medida que sirve como estándar de referencia. Las unidades absolutas más relevantes son las polimerasas por segundo (*PoPS*), las unidades de formación de colonias (CFUs) y la densidad óptica (DO). Las relativas son la actividad relativa del promotor (RPU), las

unidades relativas de fluorescencia y de luminiscencia (RFUs y RLUs) así como la actividad relativa del sitio de unión al ribosoma (RBUs). Para reportar parámetros que están relacionados con la tasa de expresión genética, se sugiere el uso de unidades relativas, específicamente aquellas que toman como referencia un estándar, ya que de este modo es posible la obtención de resultados con coeficientes de variación menores comparadas con las unidades absolutas; este es el caso de las RPU, cuya utilización ha aumentado en el IGEM año con año, aunque no han sido tan ampliamente adoptadas como se esperaba, posiblemente por la falta de difusión del kit de caracterización.

La elección de parámetros es fundamental para el manejo posterior de datos en modelación matemática ya que el número de variables tomadas en cuenta en un modelo dependerá del número de parámetros disponibles, obtenidos tanto mediante investigación bibliográfica como experimental. La obtención de más de un parámetro a partir de la tasa de síntesis de la proteína reportera es posible si se toma como función del producto de la transcripción, el cual refleja el desempeño cuantitativo de la bioparte a prueba; esto solo es válido si se cuenta con un buen diseño experimental que tome en cuenta variaciones en las condiciones de medición incluyendo diferentes medios de cultivo, fuentes de carbono, pH, temperatura, cantidad de moléculas inductoras, distintas moléculas inductoras, chasis, plásmido y antibióticos durante varias generaciones. Estas variaciones deben ser medidas paralelamente para así obtener datos suficientes y adecuados para su uso en modelación.

Los datos obtenidos en una caracterización deben integrarse a una hoja de datos estandarizada, en donde se puedan obtener fácilmente los parámetros y mediciones necesarias para el uso de la bioparte en cuestión.

El IGEM sugiere cinco parámetros básicos para una caracterización: rendimiento estático, rendimiento dinámico, compatibilidad, confiabilidad y demanda de recursos. Actualmente son pocos los equipos IGEM que logran

medir más de una de estas características. Además, se observó que son escasas las hojas de datos generadas, obstaculizando el uso estandarizado de las biopartes del Registro de Partes ([www.partsregistry.org](http://www.partsregistry.org)) por lo que es necesario establecer las especificaciones mínimas que deben reportarse en una hoja de datos estándar así como alentar a los futuros equipos IGEM a que generen hojas de datos para cada bioparte caracterizada. También cabe destacar que el uso de páginas de *Openwetware* es prácticamente nulo. Esto indica que hay mucho trabajo por hacer para promover caracterizaciones más estandarizadas entre laboratorios en cuanto a protocolos y el desarrollo de kits de caracterización para cada tipo de bioparte, así como las condiciones estándar para llevar a cabo las mediciones.

El chasis mayormente utilizado y por lo tanto estandarizado es el de la bacteria *E. coli*, siendo las cepas DH5 $\alpha$ , BL21, Top 10, JM109 y MG 1655 las que tienen mayor uso, debido a sus ventajas biotecnológicas. En cuanto al tipo de biopartes, las más caracterizadas por equipos IGEM son los promotores y las secuencias codificantes, los dispositivos mayormente caracterizados tienen estos tipos de biopartes en su composición, los cuales son los generadores de proteínas y los dispositivos reporteros. Esto debido a las implicaciones que tienen en la obtención de productos de utilidad para varias industrias como la farmacéutica o la alimenticia.

Para reportar el desempeño de las construcciones genéticas, lo más común es utilizar una proteína fluorescente. La proteína que más se utiliza es la GFP, a pesar de que tiene la desventaja de su lenta tasa de degradación así como la necesidad de utilizar filtros de luz UV para su determinación. Una aproximación para la obtención de kits de caracterización más sencillos es la de utilizar reporteros dentro del espectro visible, lo que ha marcado una tendencia a la búsqueda de pigmentos o reacciones colorimétricas que reporten la actividad transcripcional.

A pesar de que existen métodos que permiten llevar a cabo mediciones muy precisas como el PCR en tiempo real o la lectura de fluorescencia mediante citómetro de flujo o lectores de placas, el equipo de laboratorio necesario para su implementación es costoso y delicado, por lo que su disponibilidad no es sencilla para estudiantes o investigadores con poca experiencia. Por eso, la infraestructura de laboratorio disponible es parte fundamental en el desarrollo y diseño de protocolos de caracterización viables.

### **7.8 Caracterización en la Facultad de Ciencias, UNAM.**

El taller de Biología Sintética cuenta con los servicios básicos de un laboratorio de biología molecular en donde aparatos de uso rutinario como los termocicladores, cámaras de electroforesis y espectrofotómetro están presentes. Con este tipo de infraestructura es posible la obtención de parámetros tales como absorbancia, cantidad de DNA, cantidad de proteínas y crecimiento bacteriano.

Como se mencionó previamente, se puede lograr una caracterización adecuada mediante ensayos de fluorescencia. Para llevar a cabo este tipo de protocolos se pueden utilizar citómetros de flujo, fluorímetro o multilectores de placas. De estos tres aparatos, el que ofrece mayores ventajas es el multilector de placas ya que permite tomar mediciones de intensidades de fluorescencia y densidad óptica *in vivo* de un gran número de muestras a lo largo de un tiempo determinado además de que es posible llevar a cabo otros ensayos como lectura de luminiscencia o pruebas ELISA.

El taller de Biología Sintética de la Facultad de Ciencias no cuenta actualmente con un lector de placas; sin embargo, es necesaria su adquisición para poder implementar protocolos de caracterización cuantitativos que cumplan con los estándares actuales.

Otra opción es el desarrollo de un nuevo método de medición en donde se utilicen dispositivos con reporteros dentro del espectro visible o con señales de salida fácilmente medibles como señales luminosas, cambios en el pH o reacciones

colorimétricas a partir de las cuales se puedan obtener los parámetros básicos, como la actividad transcripcional o la tasa de síntesis proteica.

Para que los datos resultantes sean útiles y promuevan una caracterización estandarizada, es necesario el uso de estándares de referencia y el diseño de hojas de datos para cada bioparte. Es importante tener en cuenta que para que una caracterización sea robusta hay que diseñar experimentos que permitan la medición simultánea de varias muestras cada una con ligeras variaciones, como se menciona previamente.

El taller de Biología Sintética es la única dependencia de la Facultad de Ciencias que lleva a cabo investigaciones dentro del marco teórico aquí descrito. Se espera que los trabajos de investigación generados dentro del taller aumenten tanto en número como en complejidad una vez que se implementen protocolos de caracterización cuantitativa.

### 7.9 Caracterización cuantitativa del biosensor de CO<sub>2</sub> del equipo Ciencias\_UNAM, 2012.

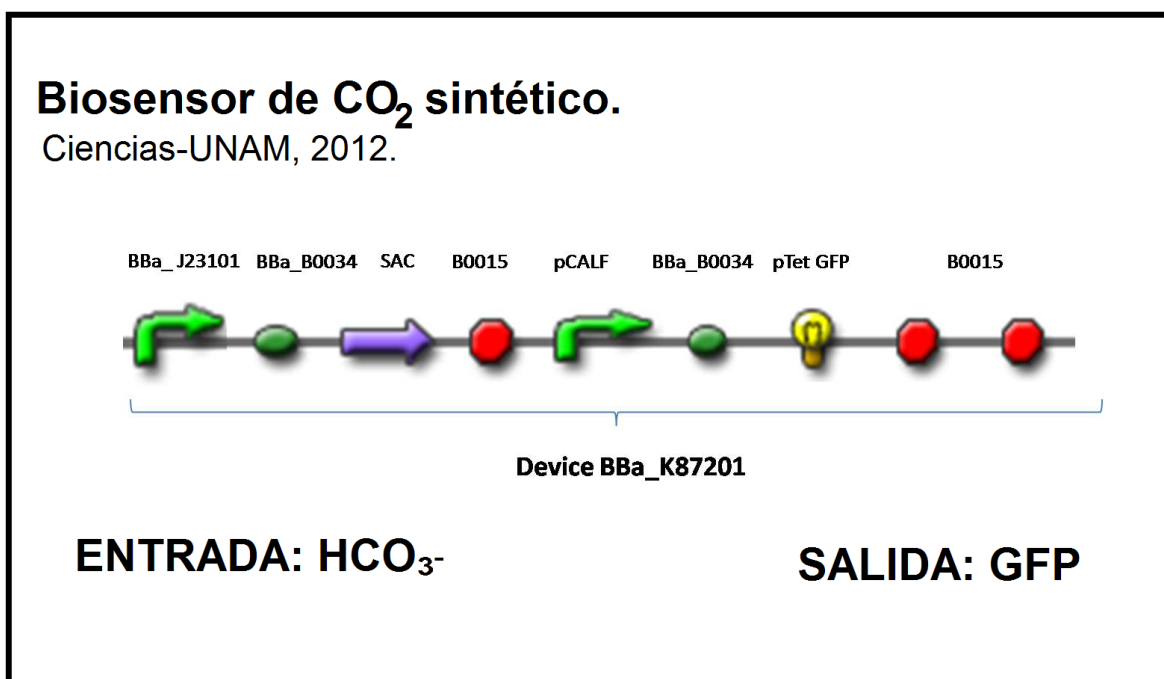


Figura 47. Construcción del biosensor de CO<sub>2</sub> sintético con el diagrama del Registro de Partes.

El biosensor de dióxido de carbono diseñado por el equipo del IGEM 2012 Ciencias-UNAM es un dispositivo que consiste en dos módulos: un convertidor de señal y un generador de GFP como señal de salida. Este dispositivo está conformado por dos promotores, tres RBS, una secuencia codificante, una proteína reportera (GFP) y sus respectivos terminadores (tres) (figura 47), debido a su naturaleza se considera un dispositivo reportero.

Para caracterizar cuantitativamente este tipo de dispositivos la manera más adecuada es mediante la lectura de fluorescencia en distintos intervalos de tiempo con el uso de un multilector de placas con filtros para GFP utilizando un estándar de referencia.

Se propone su caracterización utilizando el kit de caracterización, mediante los siguientes pasos:

1. Transformación, inserción en células competentes y clonación de la bioparte de referencia BBa\_I20260 y la de prueba BBa\_K87201 en *E. coli*, especificar cepa utilizada. La bioparte BBa\_I20260 es un kit de medición que utiliza el promotor J23101, con una actividad reportada de 1RPU; el RBS B0032; la secuencia codificante a GFP y un doble terminador. La bioparte BBa\_K87201 es el biosensor de CO<sub>2</sub> que se observa en la imagen 47.
2. Sembrar tres cajas Petri para los controles negativo, positivo y la construcción prueba. El control negativo consiste en la cepa de *E. coli* sin ningún plásmido insertado, el control positivo es la bioparte BBa\_I20260 y la construcción prueba es la BBa\_K87201, el biosensor de CO<sub>2</sub>. De preferencia utilizar medio M9, ya que posee una menor fluorescencia de fondo que el LB, lo que permite una mejor medición de la GFP.
3. Escoger tres colonias de cada caja para inocularlas en medio de cultivo y dejarlas crecer toda la noche a 37°C con agitación utilizando nueve tubos.
4. Diluir 1/100 en medio fresco e incubar a 37° C durante tres horas.
5. Obtener 3 alícuotas de cada construcción. Para la construcción de prueba sacar nueve alícuotas en lugar de 3 para probar distintas concentraciones de inductor.

6. Inducir la construcción de prueba y esperar 30 minutos. Medir intensidades de GFP y DO<sub>600</sub> paralelamente con el multilector de placas equipado con filtros de emisión y excitación para GFP.
7. Después de 30 minutos volver a medir GFP y DO600.
8. Repetir el paso 7 dos veces más.

Si se requiere una caracterización más completa se recomienda repetir el protocolo utilizando dos cepas de *E. coli* simultáneamente, de preferencia DH5α y TOP 10. También se pueden variar otras condiciones como la temperatura o el pH y aumentar el número de mediciones por varias horas.

### **7.10 Importancia de la caracterización en el establecimiento de la Biología Sintética como una ciencia formal, perspectivas.**

Uno de los pilares en los que se basa la Biología Sintética es la estandarización para el diseño y construcción de dispositivos genéticos confiables. Se distinguen dos tipos de estandarización, la de composición física y la funcional. La primera ha sido lograda mediante la adopción de los estándares de composición de biopartes. La segunda implica mayor complejidad. Si bien aún no se ha logrado en su totalidad, se han propuesto varios métodos y aproximaciones para llevarla a cabo, entre ellos destacan la generación del kit de caracterización, el establecimiento de promotores de referencia, el surgimiento de parámetros recomendados para medir y hojas de datos ejemplo. Sin embargo, todavía hay mucho trabajo por hacer para lograr una amplia adopción de protocolos estandarizados y unidades de medición capaces de ser comparables entre experimentos.

Debido a la variada naturaleza de las biopartes existentes en el Registro de Partes, no se puede esperar utilizar un solo protocolo estándar; en su lugar, se espera el surgimiento de ciertos estándares sobre cada tipo de bioparte, el establecimiento de las unidades de medición, las condiciones similares y los parámetros mínimos requeridos para una caracterización integral, así como la generación de hojas de datos de fácil interpretación.

Para lograr esto es necesaria la colaboración entre investigadores por medio de la compartición de protocolos de caracterización.

Otro factor importante para lograr la estandarización funcional de las biopartes generadas es la implementación de licencias de uso sobre las biopartes para evitar futuros problemas legales referentes al uso de biopartes exclusivas o de alto interés económico.

Las mediciones hechas durante una caracterización sirven como guía para el diseño de dispositivos confiables, sin embargo, por la naturaleza dinámica del DNA es necesario llevar a cabo un mantenimiento periódico de las biopartes que incluya la re-caracterización de las mismas, probando así su confiabilidad.

Si se logra cumplir con todos estos requerimientos, el diseño de dispositivos sintéticos cada vez más complejos será posible, menos costoso y más eficiente, lo cual llevará a la Biología Sintética a un siguiente nivel de formalización como ciencia aplicada. Es por esto que se concluye que la caracterización representa el factor limitante en la Biología Sintética en cuanto a la estandarización funcional se refiere.



## 8 Conclusiones.

- Caracterizar es determinar las características funcionales y de composición de una construcción genética.
- Los elementos principales a tener en cuenta para el diseño de protocolos de caracterización son el tipo de bioparte, la elección de los parámetros que mejor describan el desempeño de ésta, unidades de medida adecuadas, metodologías necesarias y equipo de laboratorio disponible.
- Para poder montar protocolos de caracterización cuantitativa en la Facultad de Ciencias se requiere la adquisición de un multilector de placas, adaptar los protocolos para detectar actividad transcripcional mediante q-PCR en tiempo real o bien, el desarrollo de métodos de medición más sencillos y austeros.
- El biosensor de CO<sub>2</sub> sintético puede ser caracterizado utilizando el kit de caracterización que usa la bioparte Bba\_I20260 como estándar de referencia, mediante la lectura de fluorescencia y absorbancia.
- La caracterización representa el factor limitante en la Biología Sintética en cuanto a la estandarización funcional se refiere.

## 9 Perspectivas

A partir de los resultados y las conclusiones presentadas en este trabajo, las perspectivas de investigaciones futuras sobre la caracterización de biopartes se orientan hacia la estandarización de las metodologías y de las biopartes mismas, para generar módulos interconectables funcionales y poder así diseñar sistemas biológicos que desarrollen tareas complejas u optimicen la producción de biomoléculas de valor.

Para lograr que tanto laboratorios de países desarrollados como los que se encuentran en países en vías de desarrollo, caractericen sus biopartes adecuadamente, se espera que surja un kit de caracterización que permita cuantificar la actividad transcripcional utilizando equipo de laboratorio básico, como lo es un espectrofotómetro, mediante la medición de concentración de pigmentos o reacciones colorimétricas.

Por último, se espera que se estandaricen los métodos de caracterización del grupo de Biología Sintética de la Facultad de Ciencias, se monten los protocolos para caracterizar biopartes utilizando un estándar de referencia y se organicen los resultados en hojas de datos de fácil interpretación. Así, se generará una biblioteca de biopartes con funcionalidad reportada para el futuro diseño de módulos y sistemas biológicos dentro del grupo.

## 10 Anexo

### 10.6 Glosario

**Bioparte / Biobrick:** Secuencia de DNA que codifica para una función específica. Las funciones codificadas están relacionadas con la regulación genética, la señalización celular o la síntesis proteica.

**Biología Sintética:** disciplina que se ocupa del estudio y diseño de sistemas biológicos estandarizados y jerarquizados que no existen de forma natural, utilizando herramientas de ingeniería genética y modelación matemática.

**Output:** es la señal de salida de un dispositivo; es decir, la molécula que es producida como producto final de la regulación codificada en una construcción genética. Puede ser un RNA, una proteína o un metabolito.

**Input:** señal de entrada de un dispositivo; es decir, la molécula que activa la transcripción en una construcción genética.

**Interfaz:** conexión física y funcional entre dos dispositivos o sistemas.

**Generador de señal de salida:** bioparte que genera una molécula como respuesta a la actividad transcripcional inducida por el *input*.

**Convertidor de señal:** dispositivo biológico que ante una molécula que activa el *input* genera otra molécula como señal de salida por medio del *output*, por lo que se dice que transforma un tipo de señal en otra.

**Cicatriz de marca:** secuencia corta de DNA que queda como residuo de la restricción y ligación de dos biopartes, eliminándose el sitio de restricción.

**Módulo:** conjunto compartimentado de dispositivos con funciones interconectadas que llevan a cabo tareas complejas.

**Wiki:** (del hawaiano wiki wiki “rápido”) sitio web colaborativo que puede ser editado por los usuarios.

**Polimerasas por segundo (PoPS):** número de polimerasas por segundo que transcribe información hasta pasar un punto definido en el DNA, en este caso, el terminador de la bioparte.

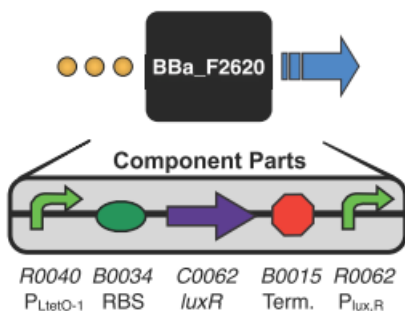
**Unidad relativa de promotor (RPU):** Unidad de medida de la actividad de un promotor, o actividad transcripcional de un dispositivo regulado por un promotor. Se denomina relativa porque toma como referencia un estándar, en este caso es el promotor J23101, con una actividad reportada de 1RPU.

**Chasis:** organismo hospedero donde se insertan las construcciones genéticas. Se denomina chasis debido a una analogía con la ingeniería mecánica en donde el chasis es la estructura que integra entre sí y sujeta a los componentes de un sistema.

**Herramienta CAD:** herramienta para el diseño asistido por computadora, por sus siglas en inglés. Es un software que permite diagramar planos de circuitos, utilizar gráficos vectoriales y crear objetos 2D y 3D con alto nivel de detalle.

## 10.7 Apéndice.

Este apéndice consiste en explicar un ejemplo de procesamiento de datos procedentes de la caracterización del dispositivo celular *BBa\_F2620* y los modelos de ecuaciones utilizados como viene descrito en el artículo de Canton et al del año 2008, así como la explicación de la ecuación de Hill y la ley de acción de masas que son utilizadas normalmente en la modelación de redes de regulación genética. El dispositivo de comunicación celular *BBa\_F2620* consiste en el factor de transcripción *LuxR*, el cual se activa en presencia de una molécula de señalización ( $3OC_6HSL$ ), y está regulado por el promotor represible por tetraciclina  $P_{LtetO-1}$ . La señal de entrada o *input* es la molécula de homoserín lactona y la señal de salida u *output* son Polimerasas por segundo (*PoPS*) producidas por un segundo promotor que está regulado por *LuxR*. Está constituido por cinco biopartes: el promotor  $P_{LtetO-1}$ , un RBS, la secuencia codificante para *LuxR*, un terminador y el promotor  $P_{luxR}$  como se observa en la figura 48. Si este dispositivo es utilizado en una célula que contenga el promotor regulado por tetraciclina, *TetR*, se puede adherir un segundo *input* como aTc (homólogo de la tetraciclina) para producir una función Y (*AND*) booleana.



**Figura 48. Diagrama de la bioparte *BBa\_F2620*.**

La caracterización de este dispositivo se realizó indirectamente utilizando el dispositivo reportero *BBa\_E0240*, un generador de proteína verde fluorescente (*GFP*) que está constituido por un RBS, la secuencia codificante para la *GFP* y un doble terminador. Entonces, la combinación de ambos dispositivos se considera

un sistema compuesto de regulación genética denominado *BBa\_T9002*. Para obtener los parámetros requeridos se procesaron los datos obtenidos experimentalmente mediante modelación matemática.

El procesamiento de datos se dividió en dos etapas, en la primera se calculó el *output* del dispositivo *BBa\_E0240* a partir de las mediciones experimentales hechas con un multilector de placas y en la segunda se calculó el *output* del dispositivo *BBa\_F2620* utilizando los datos obtenidos y un sistema de ecuaciones similar al utilizado en modelos previos de Drew Endy, que relacionan la expresión de *GFP* con el *output* del promotor.

Etaapa 1. Cálculo del *output* de *BBa\_E0240*.

1. Primero se sustrajo la absorbancia de fondo, al restar la densidad óptica procedente de los pozos con medio M9 de la densidad óptica de los pozos experimentales de la siguiente manera:

$$A_{\text{corregida}} = A_{\text{cruda}} - A_{\text{medio}} \quad \text{Ecuación 1}$$

Dónde:

$A_{\text{corregida}}$  = se asume como la cantidad directamente proporcional al número de células en un pozo.

$A_{\text{cruda}}$  = la absorbancia de los pozos experimentales

$A_{\text{medio}}$  = la absorbancia de los pozos que contenían solamente medio M9

2. Se hizo lo mismo para descartar la fluorescencia de fondo utilizando el dispositivo libre de GFP *BBa\_T9002* como control negativo de la siguiente manera:

$$G_{\text{corregida}} = G_{\text{cruda}} - G_{\text{celular}} \quad \text{Ecuación 2}$$

Dónde:

$G_{\text{corregida}}$  = se asume como la cantidad proporcional al número total de moléculas de GFP en un pozo.

$G_{\text{cruda}}$  = la fluorescencia de los pozos experimentales

$G_{\text{celular}}$  = la fluorescencia de los pozos con el dispositivo libre de GFP.

Los datos resultantes fueron convertidos a unidades absolutas de CFUs/ pozo y moléculas de GFP/ pozo utilizando el método de calibración mostrado abajo en las ecuaciones 3 y 4.

$$CFU = 3.1E8A_{corrected} - 1.6E6 \quad \text{Ecuación 3}$$

$$GFP = 7.0E8G_{corrected} + 6.0E11 \quad \text{Ecuación 4}$$

3. Cálculo de la tasa de síntesis de GFP por célula  $S_{cell}$ .

Para calcular la tasa de síntesis de la GFP se asume que la tasa total de síntesis,  $S_{total}$ , es igual a la derivada con respecto del tiempo de GFP, como se muestra abajo en la ecuación 5.

$$S_{total} = \frac{dGFP}{dt} \quad \text{Ecuación 5}$$

Una vez obtenida la tasa total de síntesis, se obtiene la tasa de síntesis por célula mediante la ecuación número 6 mostrada abajo, esto asumiendo que la GFP no se degrada y sin considerar la dilución debida al crecimiento celular.

$$S_{cell} = \frac{S_{total}}{CFU} \quad \text{Ecuación 6}$$

Etapa 2. Datos esperados contra datos observados.

4. Para interpretar la conducta del dispositivo *BBa\_F2620* a partir de las observaciones hechas en el generador de GFP *BBa\_E0240* se utilizó un modelo de ecuaciones diferenciales ordinarias el cual describe la relación entre el *output* y el *input* del dispositivo *BBa\_F2620*.

En este modelo, el *input* está definido como la tasa de síntesis del mRNA y las polimerasas por segundo, ambos dependientes del tiempo como se observa en la figura 9 de la introducción. El *output* está definido como la tasa de síntesis de la GFP madura por célula (moléculas de GFP por célula por segundo).

Las ecuaciones diferenciales que describen la conducta del sistema son las siguientes:

$$\dot{[M]} = PoPS(t) - \gamma_M [M] \quad \text{Ecuación 7}$$

$$\dot{[I]} = \rho [M] - (a + \gamma_I) [I] \quad \text{Ecuación 8}$$

$$S_{cell} = a [I] \quad \text{Ecuación 9}$$

Dónde:

$[M]$ : concentración de mRNA por célula

$[I]$ : cantidad de GFP inmadura

$PoPS(t)$ : es la tasa de síntesis de mRNA dependiente del tiempo

$\gamma_M$ : tasa de degradación del mRNA

$\rho$ : tasa constante de síntesis de GFP por molécula de mRNA

$a$ : tasa de maduración de la GFP

$\gamma_I$ : tasa de degradación de la GFP inmadura (incorporando la degradación y dilución debida al crecimiento celular).

5. Se asume que en el minuto 60 el modelo de arriba para el dispositivo BBa\_E0240 se encuentra en estado estacionario. Por lo tanto se utiliza la relación de estado estacionario descrito en la ecuación 10 para calcular el *output* específico esperado para el dispositivo BBa\_F2620 a partir del observado en el BBa\_E0240.

$$PoPS^{ss} = \frac{\gamma_M (a + \gamma_I) S_{cell}^{ss}}{a\rho}$$

*Ecuación 10*

6. Por último, para calcular el *output* transitorio del dispositivo BBa\_F2620 en los experimentos de tiempo de respuesta, se rearrregló el modelo de las ecuaciones 7, 8 y 9 para relacionar el *output* dependiente del tiempo con los



valores medidos de tasa de síntesis de GFP ( $S_{cell}$ ) como se muestra en la ecuación 11.

$$PoPS(t) = \frac{\ddot{S}_{cell} + (\gamma_I + \gamma_M + a)\dot{S}_{cell} + \gamma_M(\gamma_I + a)S_{cell}}{a\rho}$$

*Ecuación 11*

7. Ecuación de Hill (ecuación 12). Describe las dinámicas enzimáticas que no siguen la ecuación de Michaelis-Menten o procesos en donde se asume una relación lineal entre la velocidad de reacción de la enzima y la cantidad de sustrato disponible hasta llegar a la saturación.

$$\theta = \frac{[L]^n}{K_d + [L]^n} = \frac{[L]^n}{(K_A) + [L]^n} = \frac{1}{\left(\frac{K_A}{[L]}\right)^n + 1} \quad \text{Ecuación 12}$$

Dónde:

$\Theta$  = fracción de los sitios de unión ocupados.

$[L]$  = concentración de moléculas de ligando libres

$[K]_d$  = constante de equilibrio de disociación

$[K]_A$  = concentración de moléculas de ligando al ocupar la mitad de los sitios de unión.

$n$  = coeficiente de Hill. Cuando es mayor a 1 indica una unión cooperativa positiva; cuando es menor a 1 indica unión cooperativa negativa y cuando es igual a 1 indica que no hay unión cooperativa.

8. Ecuación de Hill adaptada para la obtención de  $PoPS$  en el dispositivo de comunicación celular *BBa\_F2620* (tomado de Canton et al, 2008).

$$P_{out} = \frac{P_{max}[3OC_6HSL]^n}{K^n + [3OC_6HSL]^n} \quad \text{Ecuación 13}$$

Dónde:

$P_{out}$  = cantidad de PoPS por célula de *BBa\_F2620* (Cantidad de señal de salida).

$P_{max}$  = nivel máximo de señal de salida

$K^n$  = nivel de señal de salida necesario para producir la mitad del output máximo

$[3OC_6HSL]$  = concentración de moléculas de inductor (homoserín lactona)

$n$  = coeficiente de Hill, que describe la transición de una señal de salida baja a una alta.

#### 9. Ley de acción de masas.

Esta ley es aplicable en reacciones químicas reversibles, en donde: “la velocidad de reacción es proporcional a las masas activas de las sustancias reaccionantes”.

Si se tiene una reacción del tipo  $A + B \rightleftharpoons C + D$ , la velocidad de reacción directa es proporcional a las actividades de los reactivos A y B, y la indirecta es proporcional a las actividades de los productos C y D. Esta reacción se incrementará hasta llegar a un estado de equilibrio, en donde las velocidades de reacción directa e indirecta se igualan. Para este equilibrio se obtiene una constante de equilibrio, que determina el tiempo en que tarda una reacción en llegar al estado de equilibrio y es dependiente de la temperatura.

$$K_c = \frac{[C]^c \cdot [D]^d}{[A]^a \cdot [B]^b} = \frac{K_d}{K_i}$$

*Ecuación 14*

Dónde:

$K_c$  = constante de equilibrio

A, B, C y D = reactivos y productos de la reacción

A, b, c y d = número de moléculas de los reactivos y productos.

## 11 Referencias

### 11.1 Bibliográficas

1. Andrianantoandro, E. et al., 2006. Synthetic biology: new engineering rules for an emerging discipline. *Molecular systems biology*, 2, p.2006.0028.
2. Arkin, A., 2008. Setting the standard in synthetic biology. *Nature biotechnology*, 26(7), pp.771–4.
3. Benner, S. A y Sismour, a M., 2005. Synthetic biology. *Nature reviews. Genetics*, 6(7), pp.533–43.
4. Calvillo, R.P., 2011. *Construcción, clonación, expresión y caracterización de dos biopartes sintéticas (BBa\_K328003 y BBa\_K328004) del gen cspA en Escherichia coli ante la respuesta a la disminución de temperatura.* Tesis, Universidad Autónoma de Querétaro.
5. Canton, B., Labno, A. y Endy, D., 2008. Refinement and standardization of synthetic biological parts and devices. *Nature biotechnology*, 26(7), pp.787–93.
6. Castro, M.F., 2011. *Biología Sintética, análisis de una disciplina emergente.* Tesis, Facultad de Ciencias, UNAM.
7. Endy, D., 2005. Foundations for engineering biology. *Nature*, 438(7067), pp.449–53.
8. Helman, N. et al., 2007. *Bio Building Basics: A Conceptual Instruction Biology.* , (May), pp.1–24.
9. Hooshangi S, Thiberge S, Weiss R., 2005. Ultrasensitivity and noise propagation in a synthetic transcriptional cascade. *Proc Natl Acad. Sci USA* 102: pp 3581–3586.
10. Juárez, J.P., 2012. *Detección de la transferencia horizontal de genes in vivo utilizando herramientas de Biología sintética.* Tesis, Facultad de Ciencias, UNAM.
11. Kelly, J.R. et al., 2009. Measuring the activity of BioBrick promoters using an in vivo reference standard. *Journal of biological engineering*, 3, p.4.
12. M. B. Gerstein, et al., 2007. What is a gene, post-ENCODE? History and updated definition. *Genome Research* 17(6):669-681.
13. Pfaffl, M.W. et al., 2004. Determination of stable housekeeping genes, differentially regulated target genes and sample integrity: BestKeeper--Excel-based tool using pair-wise correlations. *Biotechnology letters*, 26(6), pp.509–15.
14. Porcar, M. et al., 2011. The ten grand challenges of synthetic life. *Systems and synthetic biology*, 5(1-2), pp.1–9.

15. Purnick P. E. y Weiss R., 2009. The second wave of synthetic biology: from modules to system. *Nature reviews. Molecular cell biology* 10(6):410-422.
16. Robles S.L.V., 2012. *Construcción sintética de una proteína anticongelante inducida por un choque frío: un modelo en Escherichia coli*. Tesis, Facultad de Ciencias, UNAM.
17. Shetty et al. 2008. Engineering BioBrick vectors from BioBrick parts. *Journal of Biological Engineering*. Doi: 10.1186/1754-1611-2-5
18. Shetty, R. y Rettberg, R., *BBF RFC 29: Naming of standards of physical composition of BioBrick parts*. *dspace.mit.edu*.
19. Voigt, C.A., 2006. Genetic parts to program bacteria. *Current opinion in biotechnology*, 17(5), pp.548–57.
20. Yeh, BJ, Lim, WA, 2007. Synthetic biology: lessons from the history of synthetic organic chemistry. *Nature Chemical Biology* 3(9), pp. 521-525 DOI: 10.1038/nchembio0907-521

## 11.2 Referencias Web.

1. Biology online. 2008. *Retroalimentación negativa, definición*. Recurso en línea Disponible en: [http://www.biology-online.org/dictionary/Negative\\_feedback](http://www.biology-online.org/dictionary/Negative_feedback)
2. IGEM, 2008. *International Genetically Engineered Machine competition, results page*. Página Wiki. Disponible en: <http://igem.org/Results?year=2008>
3. IGEM, 2009. *International Genetically Engineered Machine competition, results page*. Página Wiki. Disponible en: <http://igem.org/Results?year=2009&region=All&division=igem>
4. IGEM, 2010. *International Genetically Engineered Machine competition, results page*. Página Wiki. Disponible en: <http://igem.org/Results?year=2010&region=All&division=igem>
5. IGEM, 2011. *Criterios de evaluación*. Página Wiki. Disponible en: <http://2011.igem.org/Judging>
6. IGEM, 2011. *International Genetically Engineered Machine competition, results page*. Página Wiki. Disponible en: <http://igem.org/Results?year=2011&region=All&division=igem>
7. IGEM, 2012. *Hoja de datos ejemplo*. Página Wiki. Disponible en: [http://igem.org/Sample\\_Data\\_Page](http://igem.org/Sample_Data_Page).

8. IGEM, Ciencias-UNAM. 2012. *Partes*. Página Wiki. Disponible en: <http://2012.igem.org/Team:Ciencias-UNAM/Parts>.
9. IGEM. 2012. *Kits de distribución*. Página Wiki. Disponible en: [http://partsregistry.org/Help:Distribution\\_Kits](http://partsregistry.org/Help:Distribution_Kits)
10. IGEM. 2012. *Videos sobre la medición de partes*. Página Wiki. Disponible en: [http://igem.org/Videos/Measuring\\_Parts](http://igem.org/Videos/Measuring_Parts), 2012.
11. Laboratorio Nacional de Genómica para la Biodiversidad. 2013. *Biología de sistemas genéticos*. Recurso online. Disponible en: <http://www.langebio.cinvestav.mx/?pag=118>
12. Libros web. 2012. *Unidades de medida. Capítulo 3*. Recurso en línea. Disponible en: [http://www.librosweb.es/css/capitulo3/unidades\\_de\\_medida.html](http://www.librosweb.es/css/capitulo3/unidades_de_medida.html)
13. Openwetware.org. 2006. *Caracterización de partes, acercamientos*. Página Wiki. Disponible en: [http://openwetware.org/wiki/Parts\\_characterization/Characterization\\_approaches](http://openwetware.org/wiki/Parts_characterization/Characterization_approaches).
14. Openwetware.org. 2008. *Medio mínimo M9*. Página Wiki. Disponible en: [http://openwetware.org/wiki/M9\\_medium](http://openwetware.org/wiki/M9_medium)
15. Openwetware.org. 2009. *The BioBricks Foundation:BBFRFC10*. Página Wiki. Disponible en: [http://openwetware.org/wiki/The\\_BioBricks\\_Foundation:BBFRFC10](http://openwetware.org/wiki/The_BioBricks_Foundation:BBFRFC10).
16. Openwetware.org. 2009. *Main page*. Página Wiki. Disponible en: [www.openwetware.org](http://www.openwetware.org)
17. Openwetware.org. 2006. *Caracterización de partes, técnicas de medición*. Página Wiki. Disponible en: [http://openwetware.org/wiki/Parts\\_characterization/Measurement\\_techniques](http://openwetware.org/wiki/Parts_characterization/Measurement_techniques).
18. Openwetware.org. 2011. *Medio LB*. Página Wiki. Disponible en: <http://openwetware.org/wiki/LB>;
19. Registry of Standar Biological Parts. 2011. *Registro de Partes Biológicas Estándar*. En línea. Disponible en: [www.partsregistry.org](http://www.partsregistry.org).
20. Registry of Standar Biological Parts. 2011. *Registro de Partes Biológicas Estándar, caracterización de partes*. Recurso en línea. Disponible en: [http://partsregistry.org/Characterization\\_of\\_Parts](http://partsregistry.org/Characterization_of_Parts).
21. Registry of Standar Biological Parts. 2011. *Registro de Partes Biológicas Estándar, catálogo*. Recurso en línea. Disponible en: [www.partsregistry.org/catalog](http://www.partsregistry.org/catalog).
22. Surveymonkey, 2012. *¿Qué con la caracterización?, encuesta*. Disponible en: <http://www.surveymonkey.com/s/BDH25PJ>