



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA  
DE MÉXICO**

---

---

**FACULTAD DE CIENCIAS**

**Desarrollo de un biosensor sintético para la detección de  
CO<sub>2</sub> y perspectivas de biorremediación**

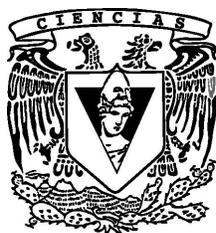
**T E S I S**

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:**

**BIÓLOGO**

**P R E S E N T A:**

**RICARDO MUNGUÍA DÍAZ**



**DIRECTOR DE TESIS:  
Dr. PABLO PADILLA LONGORIA  
2017**

CIUDAD UNIVERSITARIA, CD.MX.



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



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

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

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

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

Datos del alumno	
Apellido Paterno	Munguía
Apellido materno	Díaz
Nombre	Ricardo
Telefono	5537161429
Universidad Autónoma de México	
Carrera	Biología
No. de cuenta	408070162
Datos del tutor	
Grado	Dr.
Nombre (s)	Pablo
Apellido paterno	Padilla
Apellido materno	Longoria
Datos del sinodal 1	
Grado	Dr.
Nombre (s)	Claudia Andrea
Apellido paterno	Segal
Apellido materno	Kischinevsky
Datos del sinodal 2	
Grado	Q.
Nombre (s)	Viviana
Apellido paterno	Escobar
Apellido materno	Sánchez
Datos del sinodal 3	
Grado	M. en C.
Nombre (s)	Alfonso José
Apellido peterno	Vilchis
Apellido materno	Peluyera
Datos del sinodal 4	
Gtrado	M. en Bioética
Nombre (s)	José Antonio
Apellido paterno	Alonso
Apellido materno	Pavón

## Agradecimientos

Debido a la naturaleza interdisciplinaria de este trabajo que se elaboró en colaboración con investigadores y alumnos en las áreas de biología y matemáticas, además del apoyo de diversas instituciones de la UNAM, no solo es necesario un reconocimiento, si no un agradecimiento, ya que sin su ayuda este trabajo no hubiera sido posible. Agradezco al Laboratorio de Biología Molecular de la Facultad de Ciencias, en especial a la Dra. Claudia Segal Kichinevzky y el apoyo técnico de la Q. Viviana Escobar Sánchez quienes proporcionaron reactivos y tiempo para asesoramiento, al Laboratorio de la Dra. María Soledad Funes Argüello en el Instituto de Fisiología Celular, en donde se realizó el trabajo experimental, la Unidad de Microscopía del Instituto de Investigaciones Biomédicas donde se tomaron las fotos presentes en los resultados y al Instituto de Investigaciones en Matemáticas Aplicadas a Sistemas, en especial al Dr. Pablo Padilla Longoria, quien junto a los matemáticos Luis Martínez y Mario Sánchez colaboraron con la modelación matemática. También la colaboración de la Asociación Mexicana de Biología Sintética y de su director Gerónimo Villanueva fue parte crucial para el desarrollo de este proyecto. A los biólogos Ileana de la Fuente Colmenares y Jesús Pérez Cuapio, egresados de la Facultad de Ciencias de la UNAM, sin la ayuda de ellos y de muchas otras personas más que colaboraron de manera extraordinaria, esto nunca se hubiera logrado.

De manera personal quiero agradecer a todas aquellas personas que estuvieron a mi lado a lo largo de estos años y que sin su apoyo hubiese sido imposible que llegara tan lejos. En especial a mis padres, Héctor y Carmen y hermanos Rodrigo y Paulina por brindarme todo su amor y apoyo incondicional. A mis tíos Gustavo, Nadia, Raúl y Marilú, así como mis primos Gus, Betty y Nadia quienes siempre estuvieron para mí y me apoyaron en todo momento, a las familias Gerardo Barbosa y Mata Barbosa que sin su confianza simplemente no estaría aquí y a Nadxieeli Fuentes, cuyo nombre simboliza mi sentir por todos ellos.

## Índice

Portada.....	1
Hoja de datos de contacto.....	2
Agradecimientos.....	3
Índice.....	4
Índice de tablas.....	6
Índice de figuras.....	7
Índice de apéndices.....	8
Resumen.....	10
1. Introducción.....	13
1.1 Biología sintética.....	13
1.1.1 Definición y antecedentes históricos.....	13
1.1.2 Nociones básicas sobre biología sintética.....	14
1.1.3 Aplicaciones de la biología sintética.....	17
1.2 Contaminación ambiental.....	19
1.2.1 Definición.....	19
1.2.2 Contaminación por exceso de CO <sub>2</sub> aumento y efectos en el ambiente.....	19
1.2.3 Importancia fisiológica del CO <sub>2</sub> y sus efectos.....	21
1.2.4 Detección de la contaminación por CO <sub>2</sub> .....	23
1.3 Biosensores.....	26
1.3.1 Definición.....	26
1.3.2 Ventajas y desventajas de los biosensores.....	27
1.3.3 Aplicaciones.....	27
1.3.4 Ejemplo de biosensor en el marco de la biología sintética: biosensor de arsénico.....	28
2. Justificación.....	31
3. Hipótesis.....	31
4. Objetivos.....	31
5. Material y método.....	32
5.1 Diseño de la bioparte.....	32

5.1.1 Módulo transductor.....	33
5.1.2 Modulo señalizador.....	36
5.2 Síntesis de la bioparte Bba_K872001.....	39
5.3 Preparación de células quimiocompetentes.....	41
5.4 Transformación por choque térmico.....	41
5.5 Minipreparación de plásmidos.....	41
5.6 Digestiones de los plásmidos con enzimas de restricción.....	42
5.7 Electroforesis y purificación de DNA.....	44
5.8 Ligación del DNA.....	45
5.9 Inducción de la actividad del plásmido.....	45
5.10 Procesamiento digital de imágenes.....	46
5.11 Análisis estadístico.....	47
5.12 Modelación matemática.....	47
6. Resultados.....	50
6.1 Observación de la actividad.....	51
6.2 Procesamiento digital de imágenes.....	54
6.3 Análisis estadístico.....	62
6.4 Simulación.....	64
7. Discusión.....	66
8. Perspectivas.....	72
8.1 Perspectivas para futuros trabajos.....	72
8.2 Perspectivas para biorremediación.....	73
9. Conclusiones.....	83
10. Referencias.....	84
11. Apéndices.....	90

## Índice de tablas

Tabla 1.- Clasificación de biopartes por tipo de acuerdo con la simbología del <i>Registry of Standard Biological Parts</i> .....	15
Tabla 1A.- Continuación de Tabla 1.....	16
Tabla 2.- Valores de $p$ obtenidos de las pruebas <i>U de Mann – Whitney</i> mediante la comparación de las fluorescencias dentro de los rangos determinados mediante procesamiento digital de imágenes.....	63
Tabla 3.- Componentes de la secuencia obtenida mediante el método de síntesis .....	91
Tabla 4.- Tabla de datos y rangos utilizados en la prueba <i>U de Mann-Whitney</i> .....	99

## Índice de figuras.

Figura 1.- Incremento en la concentración de CO <sub>2</sub> atmosférico de 1959 a 2012 en el observatorio de Manu Loa, Hawaii.....	20
Figura 2.- Esquema de un sensor potenciométrico para la detección de CO <sub>2</sub> .....	24
Figura 3.- Esquema de un sensor manométrico para la detección de CO <sub>2</sub> .....	25
Figura 4.- Biosensor de arsénico desarrollado por alumnos de la Universidad de Edimburgo para el concurso iGEM 2006.....	29
Figura 5.- Bioparte completa para la detección de CO <sub>2</sub> .....	32
Figura 6.- Diagrama de la función de la bioparte Bba_K872001.....	33
Figura 7.- Modulo transductor de la bioparte Bba_K872001.....	33
Figura 8.- Caracterización de diversos promotores del <i>Parts Registry</i> .....	34
Figura 9.- Diagrama de la reacción de sAC.....	36
Figura 10.- Modulo señalizador de la bioparte Bba_K872001.....	37
Figura 11.- Diagrama de la regulación del operón <i>caiTABCDE</i> .....	38
Figura 12.- Caracterización del promotor <i>pCaiF</i> .....	39
Figura 13.- Mapa del plásmido pUC57.....	40
Figura 14.- Esquema del ensamblaje estándar de <i>biobricks</i> .....	43
Figura 15.- Mapa de restricción de la bioparte Bba_K872001.....	46
Figura 16.- Inducción de la fluorescencia del utilizando diversas concentraciones de HCO <sub>3</sub> <sup>-</sup> en células transformadas con el plásmido Bba_K872001 en un periodo de activación de 5 minutos.....	52
Figura 17.- Inducción de la fluorescencia del utilizando diversas concentraciones de HCO <sub>3</sub> <sup>-</sup> en células transformadas con el plásmido Bba_K872001 en un activación de 30 minutos.....	53
Figura 18.- Inducción de la fluorescencia del utilizando diversas concentraciones de HCO <sub>3</sub> <sup>-</sup> en células transformadas con el plásmido Bba_K872001 en un periodo de activación de 60 minutos.....	54
Figura 19.- Imágenes procesadas de la fluorescencia utilizando diversas concentraciones de HCO <sub>3</sub> <sup>-</sup> en células transformadas con el plásmido Bba_K872001 en un periodo de activación de 5 minutos.....	56
Figura 20.- Imágenes procesadas de la fluorescencia utilizando diversas concentraciones de HCO <sub>3</sub> <sup>-</sup> en células transformadas con el plásmido Bba_K872001 en un periodo de activación de 30 minutos.....	57
Figura 21.- Imágenes procesadas de la fluorescencia utilizando diversas concentraciones de HCO <sub>3</sub> <sup>-</sup> en células transformadas con el plásmido Bba_K872001 en un periodo de activación de 60 minutos.....	58

Figura 22.- Histogramas de las fluorescencias de las imágenes procesadas utilizando diversas concentraciones de $\text{HCO}_3^-$ en células transformadas con el plásmido Bba_K872001 en un periodo de activación de 5 minutos.....	59
Figura 23.- Histogramas de las fluorescencias de las imágenes procesadas utilizando diversas concentraciones de $\text{HCO}_3^-$ en células transformadas con el plásmido Bba_K872001 en un periodo de activación de 30 minutos.....	60
Figura 24.- Histogramas de las fluorescencias de las imágenes procesadas utilizando diversas concentraciones de $\text{HCO}_3^-$ en células transformadas con el plásmido Bba_K872001 en un periodo de activación de 60 minutos.....	61
Figura 25.- Gráficas de las soluciones numéricas a la ecuación {6}.....	64
Figura 26.- Gráfica de la relación entre GFP, $\text{HCO}_3^-$ y la saturación del sistema.....	65
Figura 27.- Implementación del biosensor.....	73
Figura 28.- Anatomía Kranz y metabolismo $\text{C}_4$ simplificado.....	77
Figura 29.- Funcionamiento del promotor <i>cbb</i> .....	79
Figura 30.- Sistema tentativo de regulación doble para la implementación en plantas.....	80

## Índice de apéndices

Apéndice 1.- Secuencia que elaborada por método se síntesis.....	90
Apéndice 2.- Preparación de células quimiocompetentes.....	92
Apéndice 3.- Transformación por choque térmico.....	93
Apéndice 4.- Minipreparación de plásmidos.....	94
Apéndice 5.- Digestión con enzimas de restricción.....	95
Apéndice 6.- Electroforesis en gel de agarosa y purificación de DNA.....	96
Apéndice 7.- Ligación.....	98
Apéndice 8.- Tabla de datos y rangos utilizados en la prueba <i>U</i> de Mann-Whitney.....	99

## Resumen

El presente trabajo aborda el desarrollo de un biosensor de dióxido de carbono ( $\text{CO}_2$ ) dentro del marco de la biología sintética. Esta nueva rama de la biología aborda el estudio de los sistemas biológicos y su modificación genética para que generen fenotipos no existentes en la naturaleza con una función específica diseñados a partir de secuencias de DNA con comportamientos medibles y predecibles.

Debido al incremento acelerado de la concentración  $\text{CO}_2$  en la atmósfera causado por actividades antropocéntricas que acentúa el efecto invernadero, contribuyendo a la aceleración del calentamiento global y su correlación al aumento en la incidencia en enfermedades respiratorias como el asma, la necesidad de monitorearlo se ha convertido en un asunto no sólo de cuidado ambiental sino de salud pública. Los métodos tradicionales de medición y rastreo ambiental no contemplan variables biológicas, por lo que un biosensor puede funcionar como una herramienta que brinde mediciones estables de  $\text{CO}_2$  y afectaciones *in vivo* de los organismos.

Utilizando la capacidad de los organismos de convertir  $\text{CO}_2$  a  $\text{HCO}_3^-$ , se diseñó un biosensor que detecta el  $\text{HCO}_3^-$  que podría servir para generar una medición indirecta del  $\text{CO}_2$  que los organismos absorben utilizando adenilato ciclasas reguladas por bicarbonato. Se ha mostrado que las adenilato ciclasas reguladas por bicarbonato en conjunto con anhidrasas carbónicas pueden funcionar como sensores de  $\text{CO}_2$  (Tresguerres, 2010)

Para la elaboración del biosensor se diseñó una bioparte (secuencias genéticas que cumplen una función específica) compuesta de dos módulos, un módulo “transductor” que se encarga de transformar la señal de  $\text{CO}_2$  en una señal de AMPc que es captada por el módulo “señalizador” que toma esta señal y emite una respuesta observable en forma de GFP (proteína verde fluorescente, por sus siglas en inglés).

Se desarrolló un modelo matemático de ecuaciones diferenciales en el que se relaciona la cantidad de  $\text{CO}_2$  detectable con la cantidad de GFP producida así como simulaciones por computadora en las que se aproximan los valores máximos de inducción y el comportamiento de la activación de la bioparte.

Los resultados muestran que existe una mayor producción de GFP cuando se encuentra más  $\text{HCO}_3^-$  disuelto en el medio, y que su activación es inmediata, por lo que su activación es independiente del tiempo, pues siempre se activa, pero la intensidad es dependiente de la concentración.

Este trabajo puede ser extendido y utilizado para rastrear *in vivo* procesos que generen  $\text{CO}_2$  y determinar la concentración mínima de inducción de la actividad, lo que daría el rango completo en el que el biosensor funciona y se presenta una perspectiva teórica de cómo podría ser utilizado en organismos para que no sólo detecte el  $\text{CO}_2$ , sino que lo asimile de manera más eficiente a fin de que pueda ser utilizado con fines de biorremediación *in situ* del aire en ciudades, campo muy poco explorado en la actualidad.

El siguiente trabajo se estructura de la siguiente manera:

**Introducción.** Revisión de algunos antecedentes sobre biología sintética, contaminación ambiental y biosensores proporcionando el marco teórico sobre el cual se desarrolla el trabajo.

**Método.** Se detalla el diseño de la bioparte, la manera en la que ésta funciona y los pasos previos a la síntesis del DNA. También se presentan los procedimientos de experimentales para la obtención de bacterias transgénicas, la preparación de células competentes, transformación, minipreparación de plásmidos, digestión con enzimas de restricción, electroforesis del DNA, purificación y ligación de fragmentos de DNA. Se detalla la manera en que se dio la inducción de la actividad de la bioparte y la obtención de resultados por método fotográfico. Por último se encuentra la modelación matemática realizada, los supuestos del modelo y las ecuaciones que se elaboraron.

**Resultados.** Se presentan las fotografías de la activación de la bioparte con distintas concentraciones de inductor y en diferentes tiempos de inducción, así como los controles negativos. Además los resultados de la modelación matemática, la simulación numérica y la relación entre GFP y  $\text{HCO}_3^-$ .

**Discusión de resultados.** Se discute sobre la funcionalidad de la bioparte, su velocidad de

activación, la presencia de fluorescencia basal, la relación entre el tiempo de inducción, concentración del inductor y la cantidad de GFP detectada, y los resultados de la modelación con respecto a lo observado experimentalmente y lo previamente reportado.

Perspectivas. Se señalan los pasos necesarios para trabajos posteriores y se extrapola la idea de un trabajo consecuente, en donde en base a la bioparte se pueda diseñar un sistema de biorremediación de CO<sub>2</sub>.

Conclusiones. Se concluye que los resultados presentaron la respuesta esperada y fue posible detectar la cantidad de HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> con respecto a la producción de GFP en intervalos donde la concentración de HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> es mayor a los 25 mM.

## 1. Introducción

En este capítulo se abordarán las nociones básicas sobre biología sintética, sus antecedentes históricos, conceptos y aplicaciones. También se pone una perspectiva sobre la contaminación ambiental y el aumento de CO<sub>2</sub> en la atmósfera y su medición, así como las repercusiones que esto tiene en los organismos. Por último, se da una introducción a los biosensores, su definición, funcionamiento y aplicaciones, además de ejemplos de biosensores elaborados dentro del marco de la biología sintética.

### 1.1 *Biología sintética*

En esta sección se presenta una introducción a la biología sintética, sus antecedentes históricos, nociones básicas como caracterización y estandarización, y la diferencia con respecto a la biología molecular y sus aplicaciones actuales.

#### 1.1.1 Definición y antecedentes históricos

La biología sintética es una disciplina emergente que a su vez combina herramientas de áreas como la genómica funcional, ingeniería de proteínas y metabólica, biología química, biología de sistemas y bioinformática (Liang *et al*, 2010). Aunque el desarrollo de la biología sintética no se propagó sino hasta mediados de la década del 2000, el término apareció por primera vez en 1980 cuando Barbara Hobom (Hobom, 1980) lo usó para describir bacterias modificadas utilizando tecnología de DNA recombinante. Estas bacterias son sistemas vivos (biológicos) alterados por intervención humana (sintéticos) y en ese sentido biología sintética fue considerado sinónimo de bioingeniería (Benner y Sismour, 2005).

Posteriormente, en el año 2000, Eric Kool y otros volvieron a introducir el término en la reunión anual de la Sociedad Americana de Química y fue usado para describir la síntesis de compuestos orgánicos de manera no natural y es una extensión del término química biomimética (Benner y Sismour, 2005).

Sin embargo, debido a la gran cantidad de disciplinas que convergen en la biología sintética ésta

significa diferentes cosas para diferentes personas (Liang *et al*, 2010). Algunas definiciones de biología sintética son:

- El diseño deliberado de sistemas biológicos novedosos o mejorados que se dibujan en los principios dilucidados por biólogos, químicos, físicos e ingenieros (Liang *et al*, 2010).
- El ensamble de componentes no naturales (sintéticos) para generar sistemas químicos que soportan la evolución darwiniana (Benner y Sismour, 2005).
- La modificación de sistemas biológicos complejos, compuestos de elementos modulares (Boyle y Silver, 2009).
- El diseño y síntesis de estructuras químicas como enzimas y proteínas, circuitos genéticos y células que no existen en la naturaleza como tal (Malinova *et al*, 2012).
- El rediseño de sistemas biológicos naturales así como la creación de nuevos sistemas genéticos y organismos con funciones nuevas y aplicaciones biotecnológicas, aplicando principios básicos de ingeniería al ensamblado racional de módulos biológicos funcionales bien caracterizados en sistemas biológicos más complicados con propiedades deseadas (Zurbriggen *et al*, 2012).

De las definiciones anteriores, aunque diversas, podemos rescatar el siguiente como punto en común: la modificación genética de organismos (sistemas biológicos) para que generen fenotipos no existentes como tales en la naturaleza que cumplen una función específica. Esto en principio no diferencia mucho a la biología sintética de la biología molecular, ya que algunos métodos y conceptos básicos para la biología sintética no son recientes y se han explorado en distintos contextos desde hace mucho tiempo (Malinova *et al*, 2012), sin embargo la diferencia radica en conceptos de ingeniería adaptados a la biología molecular como el de caracterización, estandarización y bioparte que se abordarán a continuación.

### 1.1.2 Nociones básicas sobre biología sintética

A diferencia de la biología molecular, la pregunta que define la investigación en biología sintética es: ¿Cómo desarrollar principios de ingeniería para sistemas biológicos? Para lograrlo se combinan elementos de ingeniería y de biología molecular en la generación de organismos sintéticos (Adrianantoandro *et al*, 2006). Esta combinación da origen a diversos conceptos, uno de estos es el de la estandarización, que se entiende como “la composición física (acoplamiento físico) y funcional

(conocimiento cuantitativo de su funcionamiento) de los dispositivos genéticos” (de la Fuente Colmenares, 2013).

Junto a este concepto de estandarización se encuentra el de caracterización, entendida como “el proceso de determinación de características funcionales y de composición de un dispositivo genético, tanto cuantitativas como cualitativas” (de la Fuente Colmenares, 2013). De lo anterior se puede decir que un dispositivo genético tras pasar por el proceso de caracterización, se convierte en un dispositivo estandarizado con características físicas y funcionales definidas.

Otro concepto importante es el de bioparte, que engloba a secuencias genéticas relacionadas con la regulación, señalización o síntesis que se encuentran delimitadas en módulos estandarizados, lo cual facilita su búsqueda en bases de datos y su uso en el diseño de un vector. Actualmente el *Registry of Standard Biological Parts* (iGEM Foundation, 2003) mantiene un catálogo de biopartes y las clasifica de acuerdo a su tipo. La clasificación se presenta en la Tabla 1 (de la Fuente Colmenares, 2013).

Símbolo	Nombre	Descripción
	Promotor	Secuencia de DNA que recluta a la maquinaria transcripcional.
	Sitio de unión a ribosoma (rbs)	Secuencia en el mRNA procarionte donde se unen los ribosomas e inician la transcripción.
	Dominios proteínicos	Secuencia de DNA que constituyen porciones de proteínas que al juntarse forman una proteína completa.
	Secuencia codificante	Secuencia de DNA que codifica la secuencia de aminoácidos de una proteína.

Tabla.1. Clasificación de biopartes por tipo de acuerdo con la simbología del *Registry of Standard Biological Parts*.

Símbolo	Nombre	Descripción
	Unidades traduccionales	Unidades compuestas de un sitio de unión a ribosoma y una secuencia codificante
	Terminadores	Secuencias en el mRNA que causan que la transcripción se detenga.
	DNA	Secuencias de DNA que le dan funcionalidad al DNA mismo, como sitios de unión, recombinación, espaciadores, entre otros.
	Esqueleto plasmídico	Secuencia de pDNA que contiene el sufijos, de la bioparte, origen de replicación, marcador de selección y prefijo de la bioparte.
	Plásmidos	Secuencia de DNA circular de doble hebra que se replica independiente al DNA cromosómico.
	Oligonucleótidos	Secuencias cortas de una hebra de DNA usadas como punto de inicio para la amplificación por PCR o secuenciación
	Partes compuestas	Combinación de dos o más biopartes.

Tabla 1A. Continuación de Tabla 1

Entre los desafíos de la biología sintética está el de reducir el enorme volumen y complejidad de los datos biológicos en formulaciones teóricas concisas con capacidad de predicción (Kaznessis, 2007).

La teoría de sistemas, desarrollada principalmente en la ingeniería (von Bertalanffy, 1976), es un enfoque que permite analizar a los organismos como una entidad (Adriantoandro *et al*, 2006), por lo que los dispositivos biológicos generados no son vistos como objetos independientes, sino integrados y funcionando en un ambiente celular (Adriantoandro *et al*, 2006).

La teoría de sistemas también acepta la idea de isomorfismos. Isomorfismo quiere decir que aunque los sistemas tengan diversos orígenes, pueden ser análogos y entenderse bajo los mismos principios (von Bertalanffy, 1976), lo que nos permite adaptar la gran variedad de modelos matemáticos de sistemas físicos a los sistemas biológicos, lo que da a la biología sintética una visión más abstracta y global del comportamiento de estos sistemas.

La combinación de los conceptos de estandarización y caracterización junto con los principios de la teoría de sistemas hace que la biología sintética, como ingeniería, emerja de la biología como una disciplina basada en la cuantificación, haciendo énfasis en el comportamiento del sistema, en el que secuencias de DNA con fenotipos sintéticos exhiben respuestas dinámicas predecibles (Kaznessis, 2007), lo cual tiene diversas aplicaciones en varias ramas industriales y en la investigación.

### 1.1.3 Aplicaciones de la biología sintética

La biología sintética tiene una amplia aplicación en las industrias médica, química, alimentaria y agrícola, así como en la investigación en las ciencias biológicas (Liang *et al*, 2010) ya que una de las ventajas que presenta es que los módulos sintéticos son más fáciles de entender cuantitativamente que los módulos naturales (Adriantoandro *et al*, 2006) y a través del diseño de circuitos genéticos podemos interpretar por analogía cómo funcionan los circuitos genéticos refinados por la evolución (Liang *et al*, 2010).

Las aplicaciones, en general, consisten en la modificación de redes metabólicas, rutas de señalización y comunicación celular, así como la modelación matemática que permiten entender el comportamiento de estos sistemas, ya que ésta es fundamental en la optimización de biosensores, flujos metabólicos y análisis cuantitativos dentro de la biología sintética (Benítez y López, 2012).

El reporte de vigilancia científica, tecnológica y competitiva elaborado en el 2012 por la Asociación Mexicana de Biología Sintética (Biosintética) indica que los sistemas biosintéticos aplicados por industrias y grupos de investigación se pueden condensar en tres ramas principales: médica, energética y ambiental.

En el caso de la industria médica, el enfoque principal de los sistemas biosintéticos ha sido la generación de alternativas para el tratamiento de enfermedades infecciosas y cáncer, aunque también se trabaja en la optimización de procesos para la obtención de fármacos como antibióticos, péptidos antimicrobianos, y compuestos como artemisina y coenzima Q10 (Benítez y López, 2012).

En el caso de la industria energética la biología sintética se ha enfocado en la producción de biocombustibles que tengan un menor impacto ambiental como hidrógeno y bioetanol (Benítez y López, 2012).

En el caso de las aplicaciones ambientales, que son las que cuentan con menores estudios, se ha enfocado es en la detección y recuperación de agentes contaminantes como metales pesados y arsénico, aunque también existen esfuerzos en la biorremediación (Benítez y López, 2012).

Aunque es poco estudiado, las aplicaciones ambientales podrían tener gran importancia por el impacto en la calidad de vida de que tiene en las personas, ya que no sólo afecta a los individuos de manera directa, sino al ambiente en su conjunto, el caso del dióxido de carbono es de particular interés en este trabajo y se analizará con más detalle a continuación

## 1.2 *Contaminación ambiental*

En esta sección se presenta la definición de contaminación y contaminante y se centra en la contaminación por dióxido de carbono (CO<sub>2</sub>), su aumento, medición, importancia y afectaciones tanto a nivel ambiental como a nivel individuo.

### 1.2.1 Definición

La contaminación se define como un cambio indeseable en las características físicas, químicas o biológicas del medio que pueden afectar la salud, supervivencia o actividades de los seres humanos o de cualquier otro ser vivo (Miller Jr., 2002) y contaminante como un agente que se encuentra en el lugar incorrecto o con una concentración incorrecta que causa contaminación (Wellborn, 1988).

La contaminación representa una problemática mundial ya que afecta condiciones de vida y bienes culturales, además de que agota y deteriora nuestros recursos naturales y materias primas (Vilee, 1997). En el caso del CO<sub>2</sub>, cabe señalar que en sí mismo no es un agente contaminante y es un elemento necesario para la vida, pues contribuye a la regulación de la temperatura del planeta y es un elemento clave del ciclo biogeoquímico del carbono. Sin embargo, el aumento de su concentración en la atmósfera conlleva a efectos perjudiciales al ambiente, por lo que se podría decir que la contaminación por CO<sub>2</sub> no es por su presencia solamente, sino por el excedente que existe en la actualidad.

### 1.2.2 Contaminación por exceso de CO<sub>2</sub>, aumento y efectos en el ambiente

El CO<sub>2</sub> compone aproximadamente el 0.03% de la atmósfera (Tresguerres *et al*, 2010) y de acuerdo al Panel Intergubernamental de Cambio Climático (IPCC por sus siglas en inglés) en el 2012 su concentración era de 393.8 partes por millón (ppm), un 24% más que en 1959, que era de 315.9 ppm (IPCC, 2013) (fig. 1A). Entre el 2001 y el 2012 la concentración atmosférica de CO<sub>2</sub> ha incrementado en promedio 2.0 +/- 0.1 ppm al año y en esa década se registró la mayor la tasa de incremento desde que se tiene registro, en 1958 (IPCC, 2013) (fig. 1B).

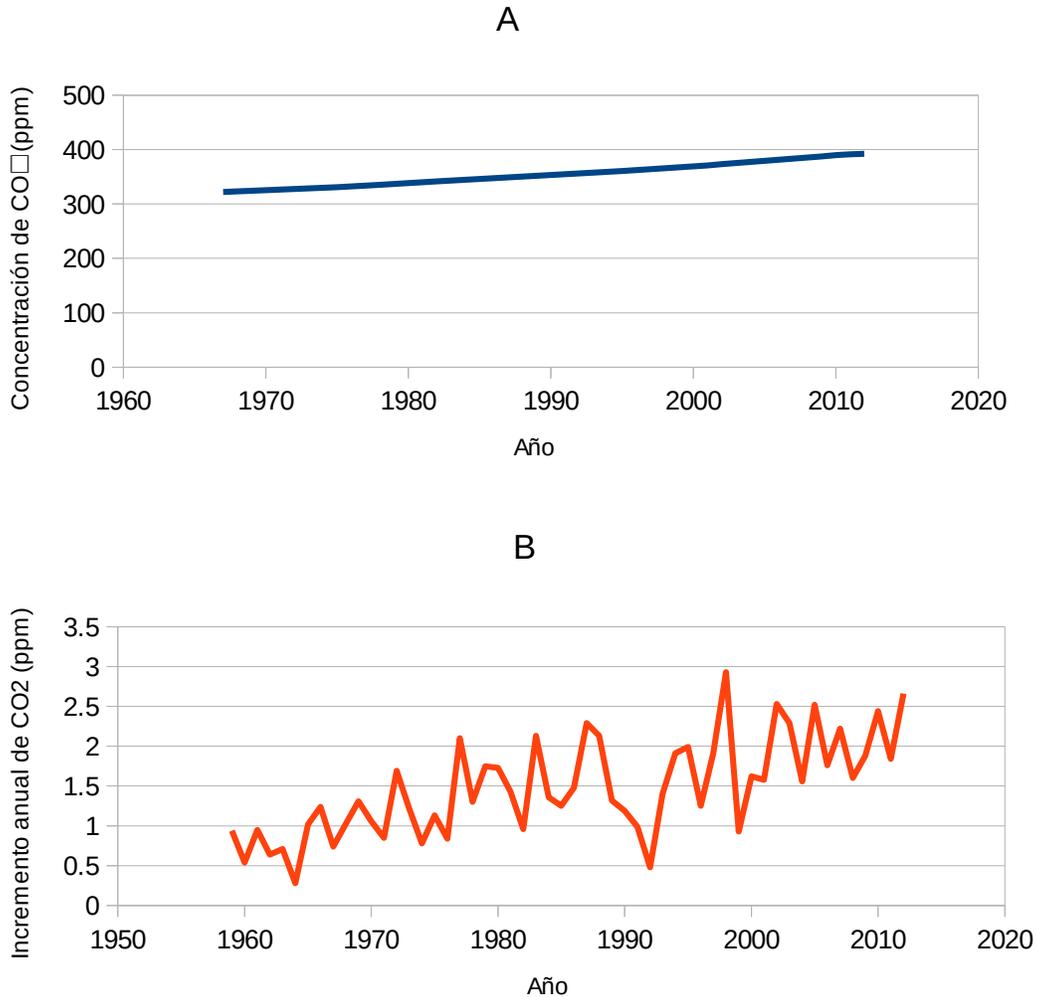


Fig. 1. Incremento en la concentración de CO<sub>2</sub> atmosférico desde 1959 a 2012 en el observatorio de Manu Loa, Hawaii. Datos tomados del National Oceanic & Atmospheric Administration. (A) Concentraciones anuales promedio en ppm. (B) Incrementos anuales en ppm.

Se calcula que las emisiones anuales promedio de CO<sub>2</sub> están relacionadas en su mayoría a la generación de energía, que del 2000 al 2008 produjeron el 85% de la emisión total de CO<sub>2</sub>, mientras que el otro 15% se debe a la producción agroalimentaria y actividades de construcción (Dhakal, 2010). Del total de las emisiones de CO<sub>2</sub>, se calcula que aproximadamente el 55% son absorbidas por el suelo y el océano y sólo el 45% permanece en la atmósfera (Friedlingstein y Prentice, 2012).

En el caso de México, la contaminación atmosférica se concentra principalmente en las zonas de alta densidad demográfica o industrial y las emisiones de contaminantes son mayores a las 16 millones de toneladas anuales, de las cuales 65% provienen de los vehículos (Villela, 2010). En la Ciudad de México se concentra la mayor proporción de contaminantes atmosféricos con 24%, en Guadalajara el 4% y en Monterrey 3% y el resto se concentra en las zonas industriales del país (Villela, 2010).

El incremento en la cantidad de CO<sub>2</sub> provoca afectaciones de manera directa al medio acuático y aéreo. Algunas de estas son cambios en la temperatura y en el ciclo hidrológico (IPCC, 2013), por la atenuación del efecto invernadero. Éste es un efecto natural que atrapa calor en la tropósfera absorbiendo parte del calor que fluye al espacio de la Tierra, irradiándola de nuevo hacia la superficie terrestre (Miller Jr., 2002). Un exceso en la concentración de gases de efecto invernadero causa un aumento del efecto invernadero, aumentando gradualmente la temperatura media de la atmósfera (Miller Jr., 2002).

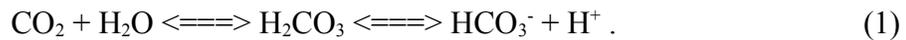
Los ecosistemas tropicales, en especial los arrecifes de coral, son muy sensibles a este cambio, ya que muchas especies tropicales tienen una tolerancia térmica baja, y viven a 1 o 2°C de sus límites térmicos críticos (Munday *et al*, 2012) y el aumento de temperaturas en estas especies reduce el alcance aeróbico, reduciendo su tolerancia a la hipoxia (Munday *et al*, 2012). También el incremento en la acidificación del océano está relacionado con el aumento en las emisiones de CO<sub>2</sub> (IPCC, 2013); esto afecta directamente a los organismos secretores de carbonato de calcio (CaCO<sub>3</sub>) ya que la reducción del pH del océano degrada las cubiertas elaboradas con este compuesto como conchas, espículas y estructuras de soporte de organismos como los corales (Munday *et al*, 2012). Sin embargo, también existen afectaciones fisiológicas directas debido al exceso en la concentración de CO<sub>2</sub>.

### 1.2.3 Importancia fisiológica del CO<sub>2</sub> y sus efectos

El CO<sub>2</sub> y el agua son los productos finales de las rutas metabólicas que proporcionan energía a los organismos y son dos de los catabolitos más importantes en los organismos no fotosintéticos (Buck y Levin, 2011), mientras que para los organismos fotosintéticos representan los elementos principales para la síntesis de componentes energéticos mediante procesos como la fotosíntesis.

La fotosíntesis es el proceso mediante el cual se produce materia orgánica a partir de materia inorgánica utilizando la energía lumínica como fuente principal del proceso. Ésta se lleva a cabo en dos etapas, una llamada “luminosa” que se lleva a cabo en presencia de luz, donde la energía se transforma en energía química mediante la síntesis de moléculas como ATP y NADPH. La segunda etapa, llamada fase oscura es en la que se llevan a cabo las transformaciones químicas del CO<sub>2</sub> en azúcares como la glucosa mediante el ciclo de Calvin.

Existen mecanismos de acumulación de carbono para aumentar la eficiencia del ciclo de Calvin. La reacción química en su forma condensada se muestra en la reacción (1) y se da de la siguiente manera de forma general. El CO<sub>2</sub> al entrar al organismo se disuelve en agua, hidratándose, formando H<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>. Este compuesto es altamente inestable y se disocia rápidamente en HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> y H<sup>+</sup>, cabe señalar que existe un equilibrio químico entre el CO<sub>2</sub> y el HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> y este es dependiente del pH del medio en el que se disocia (Buck y Levin, 2011).



El equilibrio CO<sub>2</sub>/HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> sirve como amortiguador para fluidos intra y extracelulares y son sustratos o productos finales de la calcificación, fotosíntesis, respiración, homeostasis celular (Tresguerres *et al*, 2010) y niveles de acidez sanguínea (Wellborn, 1988). También tiene un papel fundamental en la regulación del pH a nivel de organismo (Buck y Levin, 2011). En el caso de los mamíferos, este equilibrio también está involucrado en procesos fisiológicos como el flujo sanguíneo y en la formación del humor acuoso y fluido cerebroespinal (Buck y Levin, 2011). Debido a esto, el equilibrio entre el CO<sub>2</sub> y el HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> está altamente regulado por enzimas como la anhidrasa carbónica (CA) que permite que el equilibrio se dé de manera casi instantánea y la adenilato ciclasa (AC) que permite la señalización de las concentraciones de HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> en las células (Tresguerres, 2010).

El aumento en la concentración ambiental de CO<sub>2</sub> causa alteraciones a nivel organismo. Un ejemplo de esto lo presentan los peces, que son especialmente sensibles al CO<sub>2</sub>. Altas concentraciones de éste afectan su respiración, circulación y metabolismo (Munday *et al*, 2012). Además en algunos casos alteran respuestas conductuales, perdiendo la capacidad de reconocer pistas químicas ambientales

ya que al acumularse  $\text{HCO}_3^-$  ocurre una reducción compensatoria de  $\text{Cl}^-$  para regular el equilibrio ácido-base, afectando las membranas neuronales, en especial al receptor de GABA-A, ocasionando respuestas contrarias a señales químicas ambientales (Munday *et al*, 2012).

#### 1.2.4 Detección de la concentración de $\text{CO}_2$

Debido al constante aumento, los efectos nocivos en el ambientales e importancia fisiológica del  $\text{CO}_2$ , la necesidad de detectar y rastrear su concentración se ha hecho cada vez más importante. A continuación se describen los dos métodos más comunes para la medición del  $\text{CO}_2$ :

- Métodos potenciométricos. Estos, miden el cambio del pH siguiendo la concentración de iones  $\text{H}^+$  producidos por las reacciones reversibles del ácido carbónico (Botré y Botré, 1990). La ventaja de estos sensores es que son de fácil implementación en el campo, sin embargo su desventaja radica en la interferencia química y en los tiempos de respuesta (fig. 2) (Cammaroto *et al*, 1998).
- Métodos manométricos. Estos, miden la velocidad de producción de  $\text{CO}_2$  en una solución amortiguada con  $\text{HCO}_3^-$  (Botré y Botré, 1990). La ventaja de estos sensores es una alta estabilidad mecánica y química y la desventaja es que al utilizar sensores de infrarrojo pueden ser alteradas por las interferencias de otras especies absorbentes (Cammaroto *et al*, 1998) (fig. 3).

Los métodos anteriores corresponden a sistemas mecánicos, sin embargo en sistemas biológicos pueden ser implementados formas análogas a estos utilizando enzimas, ya se ha mostrado que las adenilato ciclasas reguladas por bicarbonato en conjunto con anhidrasas carbónicas pueden funcionar como sensores de  $\text{CO}_2$  (Tresguerres, 2010). Esto representa una ventana de oportunidad para poder utilizar organismos para su detección, ya que permiten observar los efectos biológicos directos de los contaminantes del aire que se detectan mas rápido y a menores concentraciones que en materiales no vivos (Wellborn, 1988).

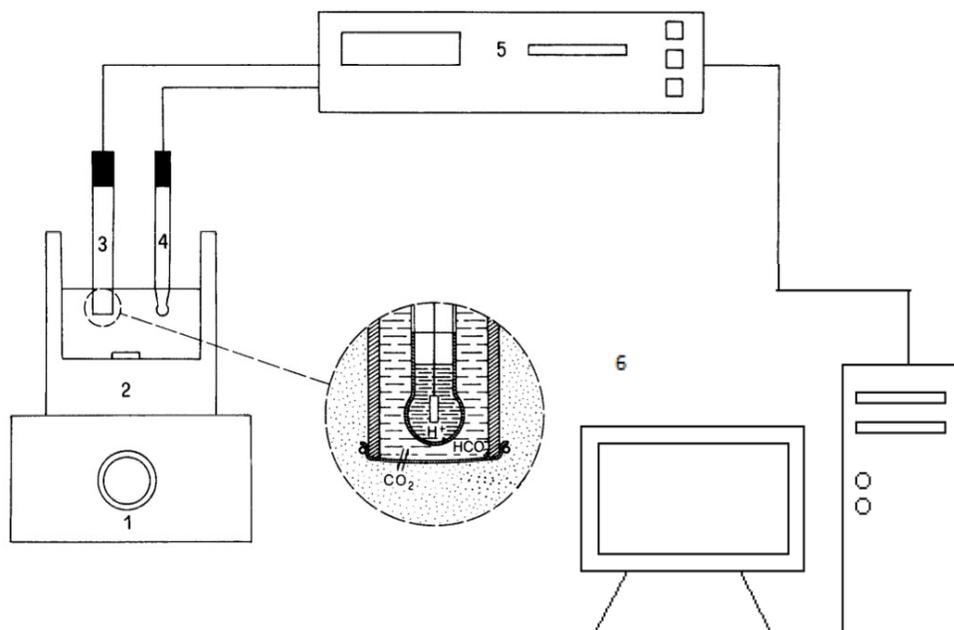


Fig. 2. Esquema de un sensor potenciométrico para la detección de CO<sub>2</sub> (modificado de Botré y Botré, 1990). (1) Agitador magnético. (2) Celda termostabilizada. (3) Sensor de pCO<sub>2</sub> y vista alargada de su punta. (4) Microelectrodo de pH. (5) Potenciómetro de doble canal. (6) Sistema de adquisición de datos.

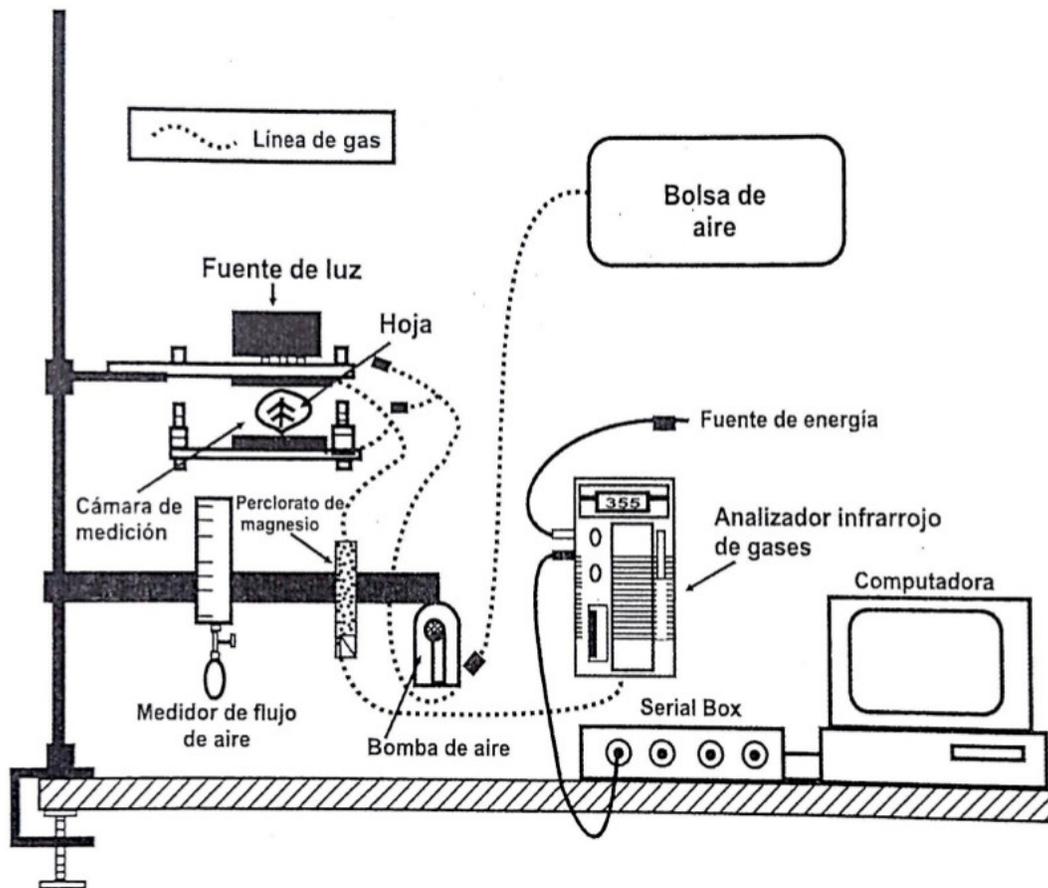


Fig. 3. Esquema de un sensor manométrico para la detección de CO<sub>2</sub>. (tomado de Rodés García y Collazo, 2006). Montaje de un dispositivo IRGA (Analizador Infrarrojo de Gases, por sus siglas en inglés)

### 1.3 Biosensores

En esta sección se presenta la definición y funcionamiento de un biosensor, sus ventajas y desventajas comparados, con sensores mecánicos y sus aplicaciones. También se presentan ejemplos de biosensores elaborados dentro del marco de la biología sintética.

#### 1.3.1 Definición

Un biosensor puede ser definido como un dispositivo que contiene dos fases interactivas, una que responde a una sustancia o proceso biológico y otra que transduce esa respuesta en una cantidad física medible (Deen *et al*, 2008). El motivo principal de su uso es el de combinar la alta especificidad de los componentes biológicos con la capacidad de cuantificación de las herramientas electrónicas (Sonnleitner, 2000).

Los biosensores pueden ser de tipo manual llamados *off-line*, o automáticos, llamados *on-line*, realizar mediciones en el lugar donde se encuentran “*in-site*”, o posteriores al muestreo “*off-site*”, continuas o discretas con respecto al tiempo y pueden ser invasivos o no invasivos con respecto al sistema biológico en el que se implementan (Sonnleitner, 2000).

Su funcionamiento depende de diversos factores, pero se le da seguimiento utilizando dos tipos de elementos de reconocimiento biológico: biocatalizadores como enzimas, mediante la inhibición de la reacción enzima-sustrato y células completas, mediante la observación de perturbaciones metabólicas (Rawson, 2003), aunque también pueden utilizarse bioligandos como anticuerpos y ácidos nucleicos, así como la producción de proteínas reporteras como la proteína verde fluorescente (GFP por sus siglas en inglés) (Castillo *et al*, 2004).

Los biosensores han adquirido una importancia en distintas áreas como medicina, calidad alimentaria, control y monitoreo ambiental (Castillo *et al*, 2004) y comercialmente se espera que vayan al alza siendo las principales áreas a desarrollar los diagnósticos moleculares y la investigación en ciencias biológicas (Deen *et al*, 2008).

### 1.3.2 Ventajas y desventajas de los biosensores

A diferencia de los sensores mecánicos, los biosensores incorporan sistemas biológicos relevantes que permiten el rastreo de efectos tóxicos en componentes biológicos (Rawson, 2003), esto no sólo tiene aplicaciones para su detección, sino también puede ser utilizado para realizar pruebas de toxicidad (Rawson, 2004). Además permiten un rango de detección más amplio, desde una especie/un contaminante a múltiples especies/múltiples contaminantes y que los componentes que se acumulan, sean examinados más fácilmente que organismos de niveles tróficos más elevados, debido a la menor cantidad de biomasa que estos poseen (Mayfield, 2003). También pueden ser utilizados en múltiples contextos. En el contexto biomédico, los biosensores tienen muchas ventajas sobre los métodos analíticos, ya que son propensos a la miniaturización, detectan sustratos clave sin la necesidad previa de separación, tienen un periodo de respuesta más rápido y son más fáciles de usar (Castillo *et al*, 2004).

Sin embargo, a diferencia de los sensores mecánicos, éstos tienen una estabilidad reducida, son propensos a interferencia electroquímica por métodos de muestreo complejos (Castillo *et al*, 2004); en periodos largos de tiempo su confiabilidad se reduce, son sensibles a la absorción de compuestos biológicos no deseados y son degradados rápidamente (Sonnleitner, 2000). Además de presentar problemas con la variabilidad propia de los sistemas biológicos (Rawson, 2003)

### 1.3.3 Aplicaciones

La contaminación ambiental ha tenido un impacto en la salud humana y en la calidad de vida en general, por lo que se han desarrollado muchos biosensores para la determinación de compuestos con relevancia ambiental como fenoles, pesticidas y metales pesados (Castillo *et al*, 2004). De manera general, dos aplicaciones han sido blanco de los biosensores: la detección de contaminantes específicos y la detección de cambios en la química ambiental (Rawson, 2003)

De acuerdo con Castillo *et al*. (2004), se han utilizado biosensores para aplicaciones biomédicas tan diversas como la detección de urea en sangre y orina, colesterol en muestras de suero sanguínea, etanol en saliva humana y en la actualidad existen de manera comercial biosensores para medir

glucosa, colesterol y ácido úrico, entre otros.

Algunos biosensores con uso potencial en la industria alimentaria se utilizan para detectar azúcares como glucosa, lactosa y fructuosa, alcoholes como etanol y metanol y metabolitos como glicerol, sulfitos e histamina en productos como miel, vino, cerveza, leche y mantequilla (Castillo *et al*, 2004).

#### 1.3.4 Ejemplo de biosensor en el marco de la biología sintética: biosensor de arsénico

En biología sintética, el desarrollo de biosensores ha sido amplio, en el marco del concurso iGEM (International Genetically Engineered Machine) se tienen registrados más de 100 proyectos relacionados con el desarrollo de biosensores desde el inicio de la competencia en el año 2003, hasta la fecha.

Uno de los casos con mayor éxito en el concurso es un biosensor de arsénico diseñado en el 2006 por alumnos de la Universidad de Edimburgo, debido a que la contaminación por arsénico es un problema de envenenamiento global y la detección requería un proceso lento. Su objetivo fue crear un biosensor que pudiera detectar de manera confiable concentraciones de arsénico dentro de un umbral y que fuera fácil de utilizar en el campo.

Ellos diseñaron un sistema en el que se pudiera determinar la concentración de arsénico en función del pH de la solución en la que las bacterias se encuentran. Lo lograron acoplando 4 dispositivos que funcionan de la siguiente manera (fig. 4):

1. Dispositivo 1: un promotor constitutivo y el gen que codifica la proteína represora LacI. En ausencia de lactosa LacI reprime la transcripción del dispositivo 4 cuando se une a una región reguladora presente en la secuencia.
2. Dispositivo 2: un promotor regulado por un represor muy sensible al arsénico, de tal manera que cualquier concentración mayor a 5 ppm se una al represor y permitan la expresión génica. Este promotor está unido al gen que expresa la molécula  $\lambda$  cl que es un represor que inhibe la transcripción en una región reguladora específica en el dispositivo 4.

3. Dispositivo 3: Un promotor regulado por un represor relativamente sensible al arsénico, de tal manera que una concentración mayor a 20 ppm se una al represor y permita la expresión génica, este promotor se encuentra unido al gen de la enzima LacZ, que hidroliza la lactosa presente en el medio, desactivando el dispositivo 4 y disminuyendo el pH en el medio producto de la degradación de la lactosa.
4. Dispositivo 4: un promotor con dos secuencias reguladoras, una con afinidad a LacI y otra con afinidad a  $\lambda$  cl, de tal manera que solo es activado en presencia de lactosa y ausencia de arsénico. También cuenta con la secuencia codificante del gen de la ureasa, que al ser activado cataliza la conversión de urea en amoníaco y dióxido de carbono, incrementando así el pH.

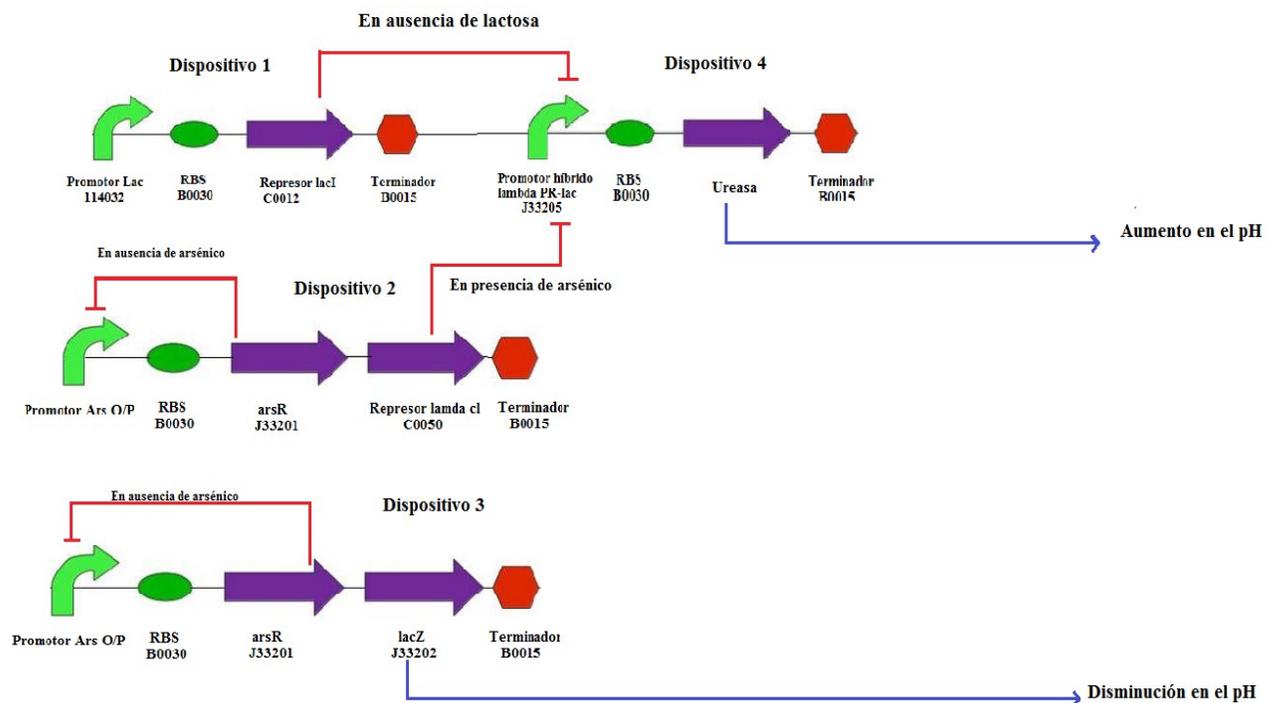


Fig. 4. Biosensor de arsénico desarrollado por alumnos de la Universidad de Edimburgo para el concurso iGEM 2006, Modificado de [http://2006.igem.org/wiki/index.php/University\\_of\\_Edinburgh\\_2006](http://2006.igem.org/wiki/index.php/University_of_Edinburgh_2006)

El sistema funciona de la siguiente manera.

- En ausencia de lactosa y de arsénico: El dispositivo 1 es el único activo, hay producción de LacI y esta reprime el funcionamiento del dispositivo 4, los dispositivos 2 y 3 permanecen inactivos.
- En presencia de lactosa y ausencia de arsénico: El dispositivo 4 es activado, por la liberación de la región regulada por LacI permitiendo la producción de ureasa, esta hidroliza la urea en amoníaco y dióxido de carbono, aumentando el pH en el medio. De tal manera que cuando no hay arsénico presente, el pH de la solución es básico.
- En presencia de lactosa y arsénico en una concentración entre 5 ppm y 20 ppm: se activa el dispositivo 2 y se produce  $\lambda$  cl, que desactiva al dispositivo 4, de tal manera que no hay producción de ureasa y el pH permanece neutro. De tal manera que cuando hay entre 5 y 20 ppm de arsénico presente, el pH de la solución es neutro.
- En presencia de lactosa y arsénico en una concentración mayor a 20 ppm: El arsénico activa al dispositivo 3, y se produce LacZ que hidroliza la lactosa en la solución y la acidifica. El dispositivo 4 sigue reprimido así que no existe neutralización ácido/base. De tal manera que si la concentración de arsénico es mayor a 20 ppb el pH de la solución es ácido.

## 2. Justificación

La contaminación del aire es de particular interés debido a la cantidad de contaminantes que se depositan, especialmente el  $\text{CO}_2$  producto de las emisiones de las actividades humanas. Sin embargo, debido a que el aire es un medio que permite la rápida dispersión de los agentes contaminantes, su detección se vuelve un problema, por lo que valdría preguntarse ¿Cómo generar una manera para la detección del  $\text{CO}_2$  presente en el aire? A pesar de la existencia de métodos mecánicos que dan una posible solución a este problema y la existencia de indicadores biológicos que ayudan a la evaluación de la calidad del ambiente, la existencia de un organismo genéticamente modificado que funcione como biosensor de  $\text{CO}_2$  aporta la posibilidad de detectar tanto de manera cuantitativa y cualitativa la calidad del ambiente además de que ofrece la oportunidad de biorremediación dentro del mismo sistema.

## 3. Hipótesis

Debido a que el  $\text{CO}_2$  se disuelve en el agua formando ácido carbónico ( $\text{HCO}_3^-$ ) a una velocidad constante, es posible detectar indirectamente la presencia de  $\text{CO}_2$  midiendo el  $\text{HCO}_3^-$  que se forma en un volumen de agua.

## 4. Objetivos

1. Obtener un organismo genéticamente modificado que sea capaz de detectar la concentración indirecta de  $\text{CO}_2$  en el ambiente mediante una ruta de señalización que tenga como entrada  $\text{HCO}_3^-$  y como salida GFP.
2. Obtener un modelo matemático que prediga la actividad del sistema y ayude a la evaluación de la cantidad de  $\text{CO}_2$  presente en la muestra.

## 5. Material y métodos

En este capítulo se abordarán los materiales y métodos utilizados para el diseño y la construcción del biosensor. Desde su diseño y el funcionamiento de sus componentes, su construcción física en el laboratorio, la inducción de los genes a observar y la modelación matemática que se realizó.

### 5.1 Diseño del biosensor

Para lograr que el sistema biológico funcionara como biosensor de CO<sub>2</sub>, se diseñó una bioparte que está constituida por dos módulos (Fig. 5.): un módulo transductor y un módulo señalizador. El módulo transductor funciona convirtiendo una señal de HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> a otra de cAMP y el módulo efector toma esta señal de cAMP para inducir la formación de proteína verde fluorescente (GFP), por lo que la presencia de GFP indica la presencia de bicarbonato disuelto en el medio. El bicarbonato es un producto de la disociación del en el agua por lo tanto la cantidad de GFP está relacionada con la cantidad de CO<sub>2</sub> que se disoció en el agua (fig. 6.).

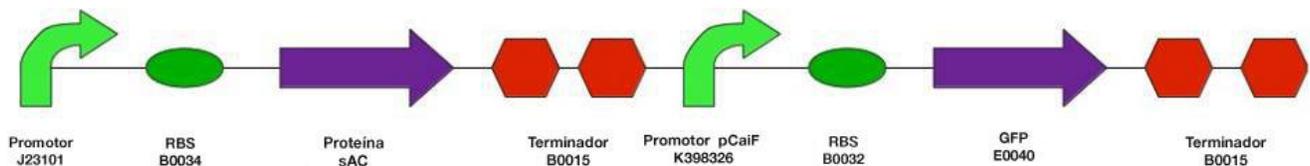


Fig. 5. Bioparte completa para la detección de CO<sub>2</sub>. Simbología del *Registry of Standard Biological Parts* ([http://parts.igem.org/Main\\_Page](http://parts.igem.org/Main_Page)).

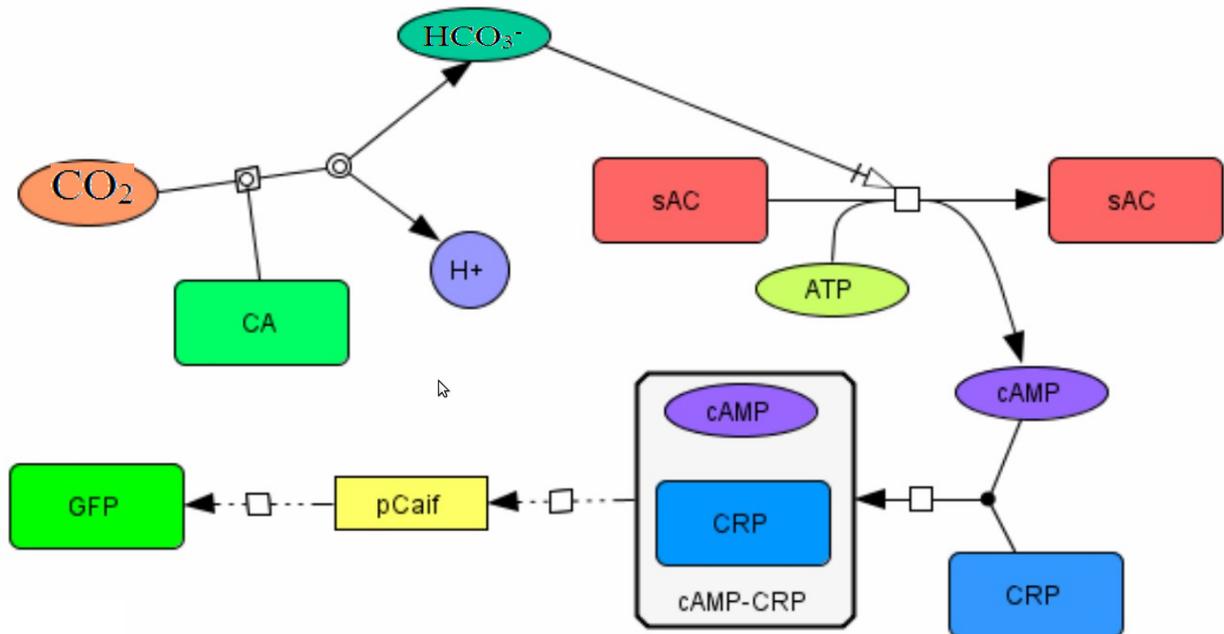


Fig. 6. Diagrama de la función de la bioparte BBa\_K872001. Elaborado con CellDesigner (Funahashi *et al*, 2003). Elipses: sustratos de enzimas. Rectángulos redondeados: proteínas. Círculos: productos enzimáticos no relevantes. Rectángulos: promotores. CO<sub>2</sub>: dióxido de carbono, HCO<sub>3</sub><sup>-</sup>: ión bicarbonato, CA: anhídrida carbónica, sAC: adenilato ciclasa soluble, CRP: proteína receptora de AMPc, pCaif: promotor de Caif.

### 5.1.1 Módulo transductor

El módulo transductor está compuesto por un promotor constitutivo de alta copia (J23101) junto a un sitio de unión a ribosoma con alta fuerza de unión (B0034) y la secuencia que codifica para la proteína adenilato ciclasa soluble (sAC, por sus siglas en inglés) proveniente del nemátodo *Brugia malayi*, seguida por dos secuencias terminadoras (B0015) (fig. 7.).

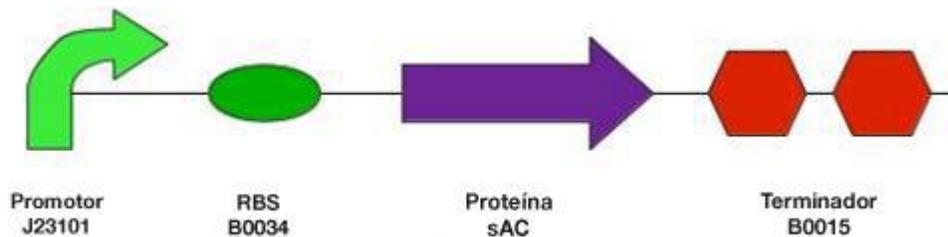


Fig. 7. Módulo transductor de la bioparte BBa\_K872001. Simbología del *Registry of Standard Biological Parts* ([http://parts.igem.org/Main\\_Page](http://parts.igem.org/Main_Page)).

El promotor J23101 es el promotor estándar utilizado en construcciones de biología sintética en el marco del *Registry Of Standard Biological Parts*. En el año 2009 alumnos de la Universidad de Ciencia y Tecnología de China (USTC) lo caracterizaron midiendo la expresión de GFP y comparándola con la expresión de diversos promotores y observó que éste es el que mayor fluorescencia se presenta en la menor cantidad de tiempo (fig. 8).

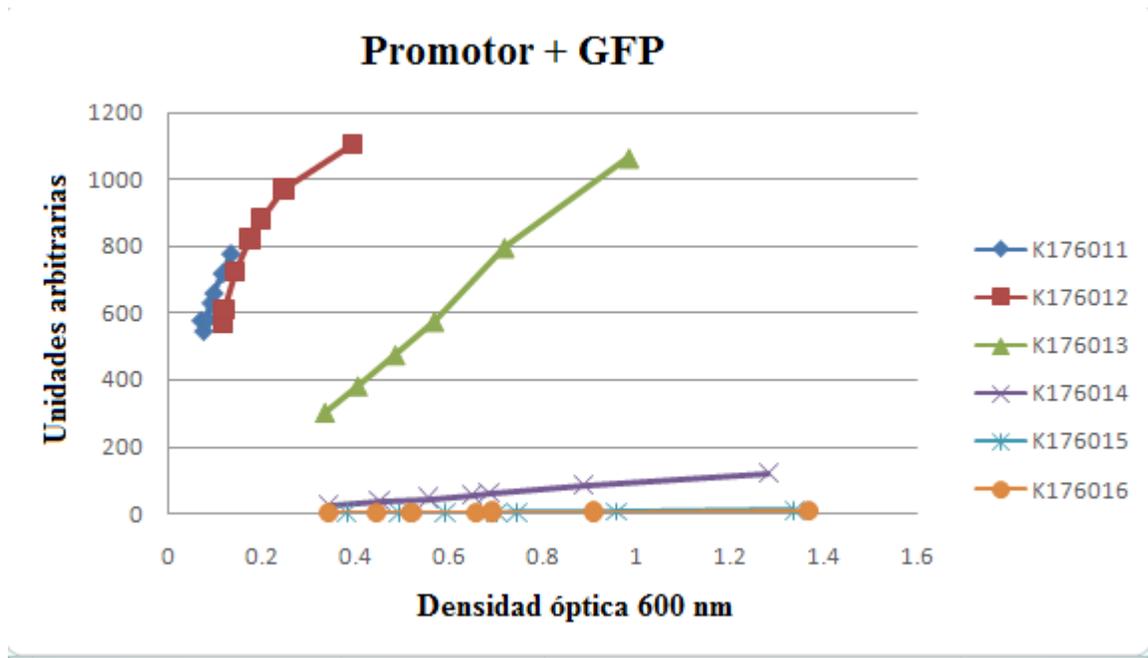


Fig. 8. Caracterización de diversos promotores del *Parts Registry*. Todos los promotores fueron caracterizados midiendo la expresión de GFP mediante su fluorescencia. Las líneas corresponden a distintos promotores: K176011, J23100. K176012: J23101. K176013: J23107. K176014: J23105. K176015: J23109 K176016: J23103. Modificado de UTSC 2009 ([http://parts.igem.org/Part:BBa\\_K176012](http://parts.igem.org/Part:BBa_K176012))

sAC es la proteína encargada en este sistema de convertir la señal de  $\text{HCO}_3^-$  a cAMP, tiene un peso aproximado de 187 kDa; presenta un mecanismo proteolítico de activación enzimática (Buck *et al*, 1999) y se ha observado que tiene una región inhibitoria retenida en 9 residuos de aminoácidos en la región C-terminal que regula al segundo dominio catalítico (Chaloupka *et al*, 2006).

Se ha visto que la formación de cAMP por bicarbonato regulada por sAC está conservada evolutivamente, y esta involucrada en una gran variedad de procesos biológicos como la activación espermática, regulación del pH y homeostasis celular, movimiento de cilios en epitelio en contacto con el aire y la producción de ATP por fosforilación oxidativa en la mitocondria (Buck *et al*, 2011).

Esta proteína es estructural, molecular y bioquímicamente distinta a las adenilato ciclasas transmembranales (tmACs), ya que carece de dominios transmembranales (Zippin *et al*, 2001) y no es regulada por proteínas G (Tresguerres *et al*, 2010), sino que necesita sustratos como  $Mg^{2+}$ , ATP y  $HCO_3^-$ . Además sus dominios catalíticos están más relacionados con ciclasas de cianobacterias que con ciclasas de mamíferos (Zippin *et al*, 2001), sin embargo, a pesar de sus diferencias en la regulación, ambas pertenecen a la familia de las nucleotidil ciclasas de clase III, por lo que sus mecanismos catalíticos son muy similares (Steegborn *et al*, 2005).

El mecanismo catalítico de la enzima ocurre en dos pasos; el primero es la unión de la enzima con su sustrato (ATP) que forma un complejo enzima-sustrato en una configuración “abierta”, con una unión de un ion de magnesio que sirve como anclaje del sustrato (Fig. 9. A y B), que puede ser remplazado por un ion de calcio, incrementando así la afinidad de la enzima por su sustrato. El segundo es el reclutamiento de un segundo ion de magnesio y el cierre del sitio activo que es facilitado por el bicarbonato, esto permite la formación de un estado de transición, en el que la activación del grupo hidroxil 3' de la ribosa y el  $P\alpha$  se unen formando un anillo, previo a la liberación de  $P\beta$  y  $P\gamma$ , formando cAMP y liberándose de la enzima (Steegborn *et al*, 2005) (Fig. 9)

Vale la pena resaltar que la estimulación de sAC por bicarbonato eleva la  $V_{max}$  con un pequeño efecto en la constante de Michaelis ( $K_m$ ), por el cambio alostérico producido por éste, facilitando la catálisis y el calcio ayuda a la coordinación del ATP y  $Mg^{2+}$  con el centro catalítico, incrementando la  $K_m$  (Chaloupka *et al*, 2006).

Otra enzima relevante para el funcionamiento de este módulo es la anhidrasa carbónica (CA por sus siglas en inglés) que es una metaloenzima de zinc que cataliza la reacción reversible del  $CO_2$  y el agua. Aunque la reacción de interconversión del  $CO_2$  a  $HCO_3^-$  puede ocurrir de manera no enzimática y toma aproximadamente un minuto a 4 °C y pH 8, esta enzima puede catalizar  $10^6$  conversiones por segundo (Kupriyanova y Pronina, 2011) y es considerada como una de las enzimas con mayor velocidad y antigüedad del planeta (Gilmour 2010). Está involucrada en procesos de mineralización y precipitación de carbonatos, además del secuestro a larga escala del  $CO_2$  que derivó en la transformación de la atmósfera de reductora a oxidante (Kupriyanova y Pronina, 2011).

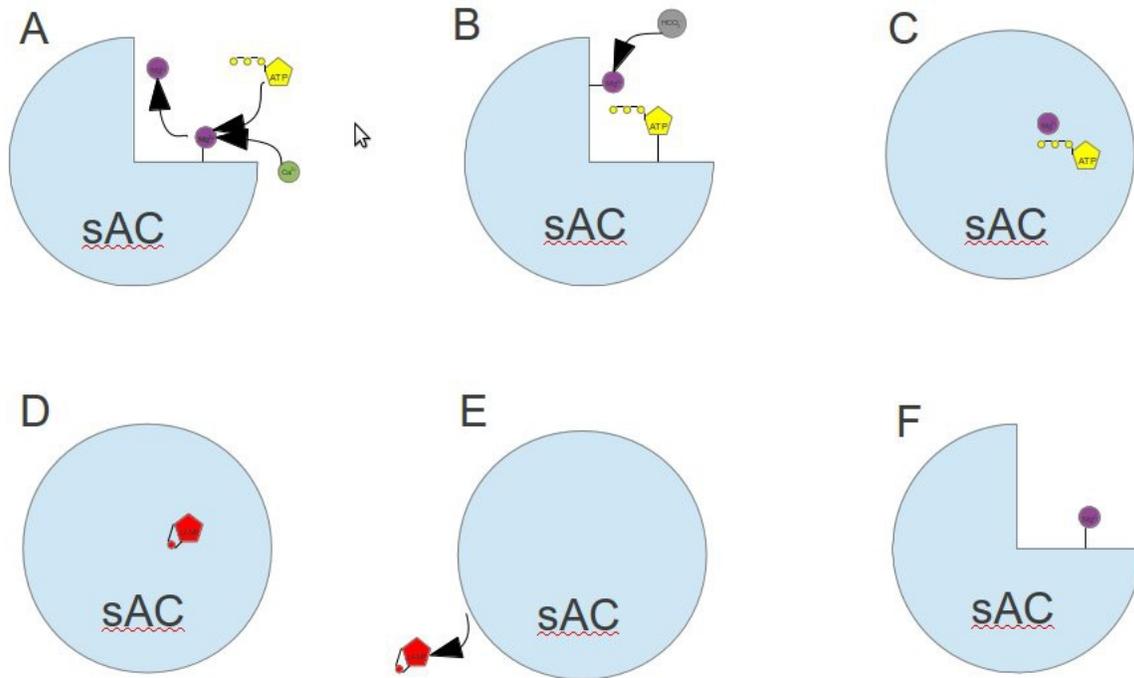


Fig. 9. Diagrama de la reacción de sAC. (A) La enzima se encuentra en configuración “abierta” y el sustrato (ATP, hexágono amarillo) se une al ion  $Mg_2^+$  (circulo morado) expuesto de la enzima, que puede ser sustituido por un ion  $Ca_2^+$  (circulo verde) que incrementa la afinidad de la enzima. (B). Se da un reclutamiento de un ion  $Mg_2^+$  por parte de la enzima que es facilitado por un ion de  $HCO_3^-$  (circulo azul) generando un cambio alostérico en la enzima que pasa a una configuración “cerrada”. (C) La configuración “cerrada” coacciona al sustrato a dar un “giro”, lo que debilita los enlaces de los  $P\beta$  y  $P\gamma$  del ATP (D) Se rompen los enlaces de los  $P\beta$  y  $P\gamma$  del sustrato y el  $P\alpha$  reacciona con el hidroxil de la ribosa formando un anillo y el producto final (cAMP, hexágono rojo). (E) El sustrato es liberado por un un túnel formado por el cambio alostérico de la enzima. (F) La enzima regresa a su estado inicial de configuración “abierta” con el ion  $Mg_2^+$  expuesto. Modificado de Steegborn *et al*, 2005.

### 5.1.2 Módulo señalizador

El módulo señalizador está compuesto por el promotor *caiF* unido a un sitio de unión a ribosoma con fuerza de unión media (B0032), junto con la secuencia que codifica para la proteína verde fluorescente (GFP), seguida por dos terminadores (B0015) (fig. 10).

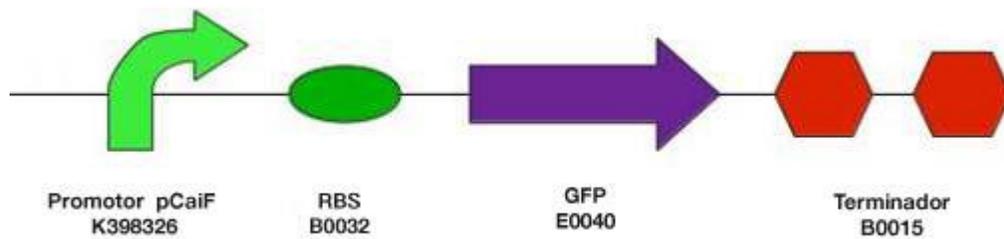


Fig. 10. Módulo señalizador de la bioparte BBa\_K872001, Simbología del *Registry of Standard Biological Parts* ([http://parts.igem.org/Main\\_Page](http://parts.igem.org/Main_Page)).

En nuestro sistema el promotor de *caiF* es el encargado de promover la síntesis de GFP cuando existe un incremento en cAMP. En su estado natural, está involucrado en el metabolismo de la L-carnitina, asociado al operón *caiTABCDEF*, cuya activación está relacionada a condiciones anaeróbicas (Bernal *et al*, 2007) y de baja concentración de glucosa (Sevilla *et al*, 2007).

En el operón *caiTABCDEF*, el promotor *caiF* se encuentra río abajo y en orientación contraria con respecto al operón *caiTABCDE* y su expresión es dependiente de la proteína receptora de cAMP (CRP), que junto con el a AMPc forma un complejo que activa su transcripción (Buchet *et al*, 1998). *CaiF* es un péptido de 131 residuos de aminoácidos que regula esta ruta metabólica (Buchet *et al*, 1999), estimulando significativamente la actividad de la carnitina deshidrogenasa y activando la transcripción del operón *caiTABCDE* y del operón *fixABCX* (Eichler *et al*, 1996) (Fig. 11).

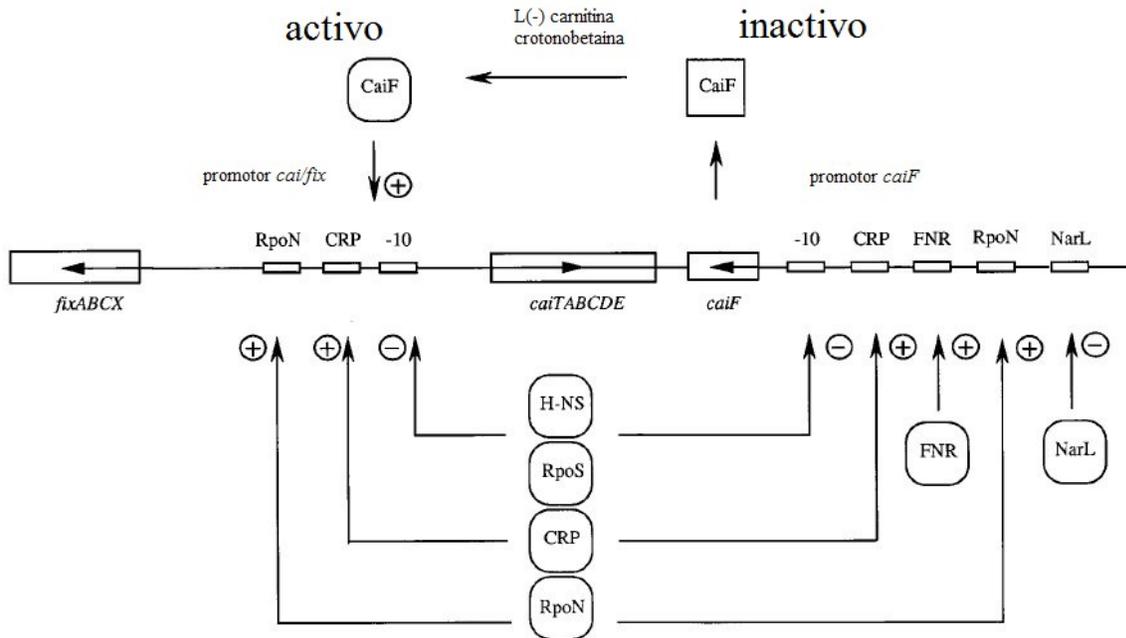


Fig. 11. Diagrama de la regulación del operón *caiTABCDE* encargado del metabolismo de la L-carnitina en *E. coli*. Cuando existe una alta concentración de cAMP (naturalmente presente como una señal de estrés por falta de glucosa), el cAMP se une a la proteína CRP expresada constitutivamente en *E. coli*, formando un complejo que une a la región de reconocimiento de CRP. Dentro de la región de reconocimiento de CRP existen varios activadores y represores. Después de la activación del péptido CaiF, éste se une a la región promotora *cai/fix* (ya que regula a ambos operones) y permite la expresión del operón completo. Esquema modificado de Eichler *et al*, 1996.

En condiciones normales, la acumulación de cAMP la lleva a cabo en el sistema de la fosfotransferasa, activando la ruta de señalización de las adenilato ciclasas (Sevilla *et al*, 2007) y su dinámica está determinada por ATP, glucosa-6-fosfato y glucosa (Hormiga *et al*, 2010). En el contexto de la biología sintética, se ha empleado pCaiF como un promotor que detiene la producción de proteínas que utilizan alquenos como fuente primaria de carbono, una vez que la glucosa y los azúcares simples estuvieran ausentes del medio (TU\_Delft, 2010). Los alumnos de TU\_Delft han caracterizado este promotor bajo diferentes concentraciones de glucosa, utilizando un medio de cultivo definido (M9), en donde se observó en todos los casos que la producción de GFP era mas rápida y en mayor cantidad que el promotor de alta copia J23101, exceptuando el caso de menor glucosa (2g/L), probablemente debido a la carga metabólica que se impone por la baja concentración de azúcares (Fig.

12).

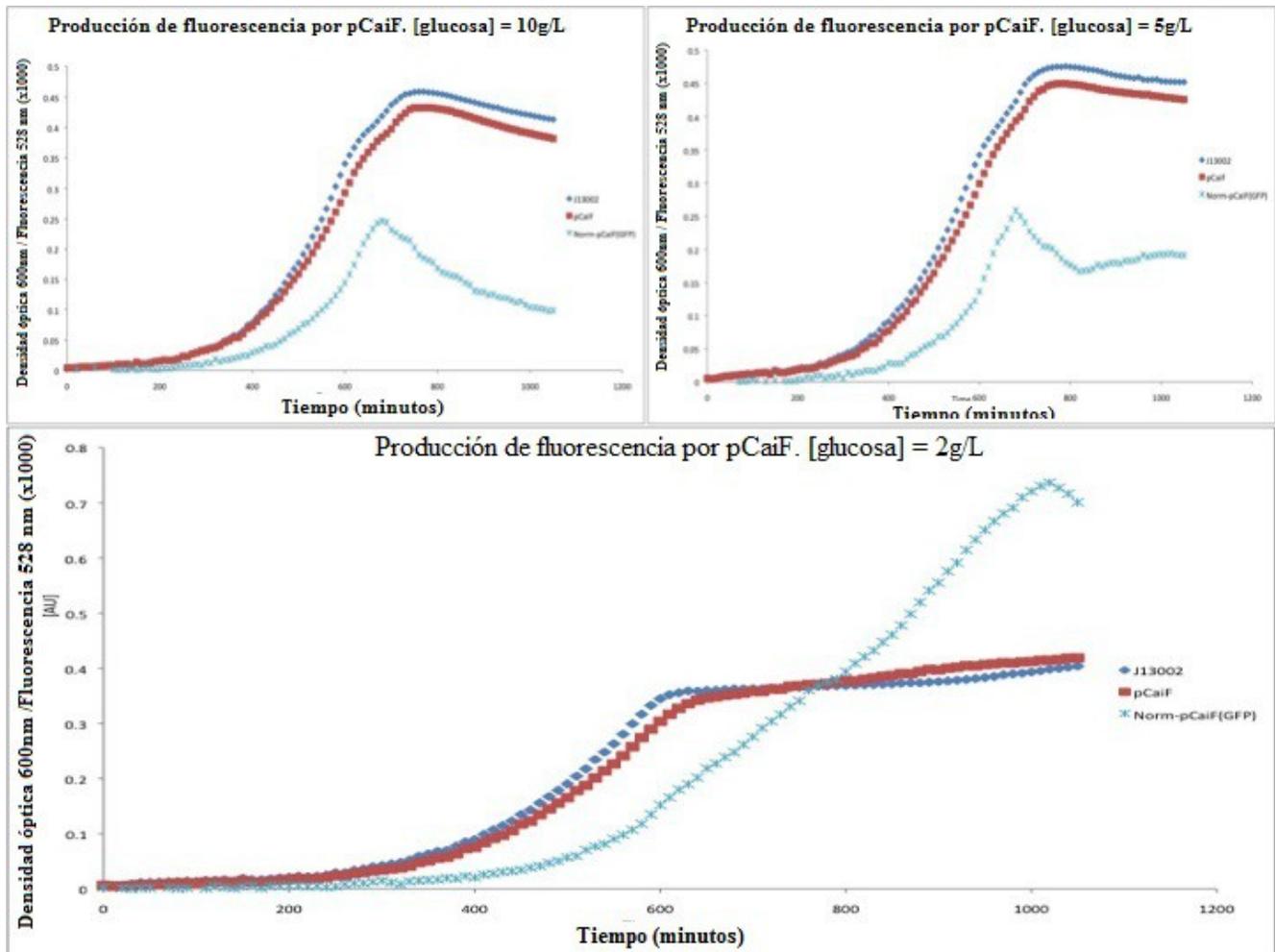


Fig. 12. Caracterización del promotor pCaiF utilizando varias concentraciones de glucosa. Modificado de TU\_Delft 2010 ([http://parts.igem.org/File:TU\\_Delft\\_pCaiF\\_glucose.jpg](http://parts.igem.org/File:TU_Delft_pCaiF_glucose.jpg))

### 5.2 Síntesis de la bioparte BBa\_K872001

La síntesis de la bioparte BBa\_K872001, preparación y transformación de las células y preparación de los inductores para su activación, se llevaron a cabo en el laboratorio de la Dra. María Soledad Funes Argüello, en el Instituto de Fisiología Celular de la UNAM, con apoyo de la Dra. Claudia Andrea Segal Kischinevsky del laboratorio de Biología Molecular y Genómica de la Facultad de Ciencias, quien proporcionó los reactivos para la preparación de los inductores.

La bioparte se obtuvo por medio de síntesis artificial a cargo de la empresa *Genescript Corporation* con la secuencia que se muestra en el apéndice 1. Las secuencias para construirla se obtuvieron de *Registry of Standard Biological Parts* ([http://parts.igem.org/Main\\_Page](http://parts.igem.org/Main_Page)), de la *Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes* (<http://www.genome.jp/kegg/> (Kanehisa y Goto, 2000)) y de *Restriction Enzyme dataBASE* (<http://rebase.neb.com/rebase/rebase.html> (Roberts *et al*, 2010)). Se optimizó el uso de codones para *E.coli* utilizando el programa ApE. La secuencia fue clonada dentro del plásmido pUC57 con resistencia a ampicilina (Fig.11).

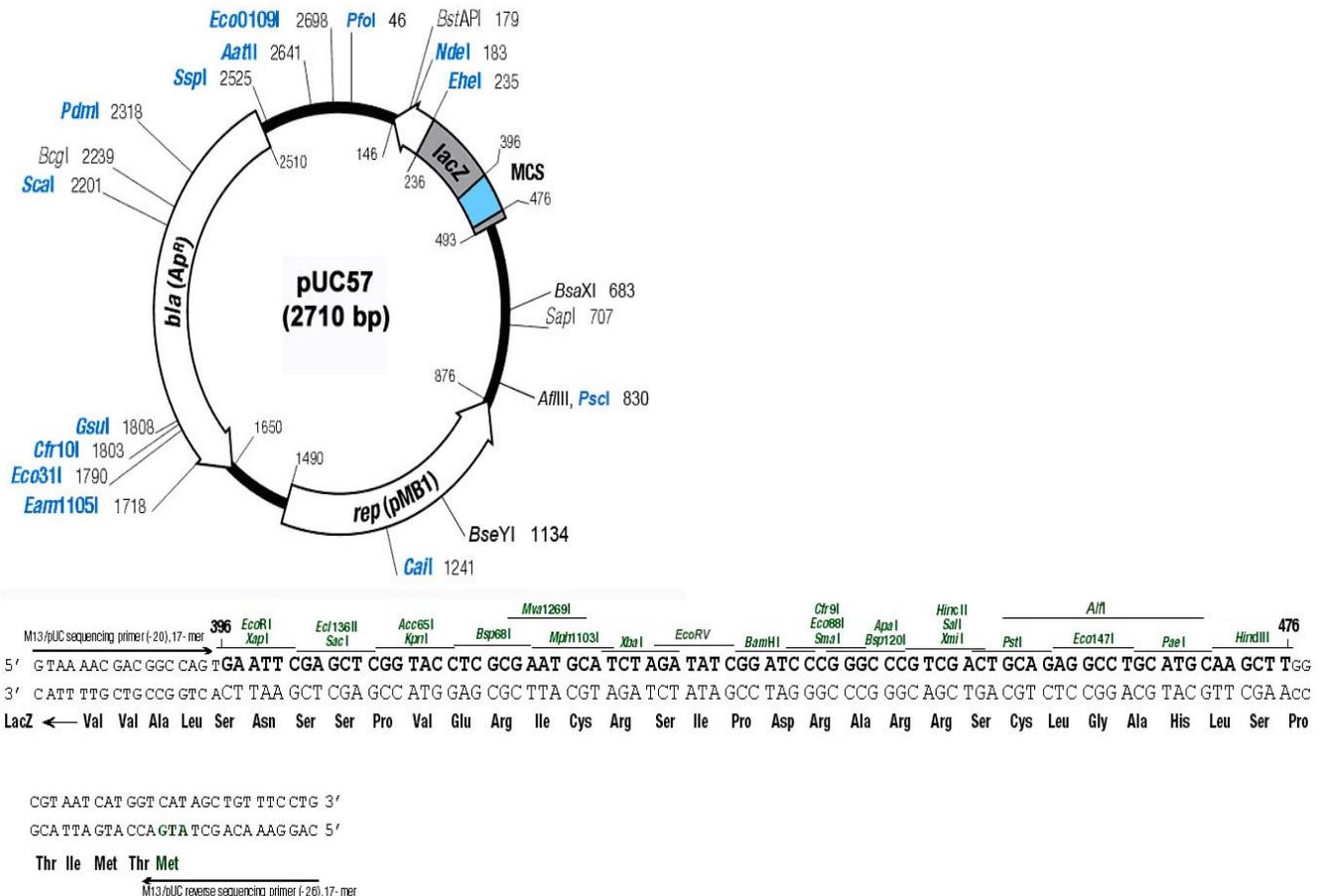


Fig. 13. Mapa del plásmido pUC57.

Las secuencias utilizadas en este trabajo se depositaron en el *Registry of Standard Biological Parts* con los siguientes números de referencia: BBa\_K872000 para el módulo transductor, BBa\_K872001 para el biosensor completo y BBa\_K872002 para la proteína sAC. El módulo señalizador ya se había reportado anteriormente.

### 5.3 Preparación de células quimiocompetentes

Se prepararon células químicamente competentes (*E. coli* cepa DH5 $\alpha$ ) (apéndice 2), se tomó una colonia y se incubó toda la noche en 2 mL de medio LB líquido a 37°C con agitación constante. Una vez pasado este periodo se tomaron 250  $\mu$ L de preinóculo y se incubó en 50 mL de medio LB fresco y se creció en agitación constante hasta alcanzar una densidad óptica aproximada de 0.4 a 600 nm. Se dejó reposar en hielo y se centrifugó 10 minutos a 4000 rpm, se decantó el sobrenadante y se lavó con 25 mL de CaCl<sub>2</sub> 100 mM. Se dejó incubar en hielo durante 20 minutos y se volvió a centrifugar 10 minutos a 4000 rpm, se decantó el sobrenadante y se resuspendió la pastilla en 0.5 mL de CaCl<sub>2</sub> – glicerol 17%. Se prepararon alícuotas de 50  $\mu$ L en tubos de polipropileno y se guardaron a -80°C para su uso posterior.

### 5.4 Transformación de las células por choque térmico

Se transformaron las células mediante choque térmico (apéndice 3). Se colocaron alícuotas de 3  $\mu$ L de los plásmidos a transformar y se comprobó que no quedaran gotas adheridas a las paredes del tubo, se tomaron células competentes previamente descongeladas y se transfirieron al tubo con los plásmidos, mezclándolos suavemente, se incubaron 20 minutos en hielo y se dió un pulso durante 90 segundos a 42 °C, sumergiendo sólo la punta del tubo para evitar cualquier contaminación y se regresaron al hielo durante 2 minutos. Posteriormente se agregó 1 mL de medio LB y se homogenizó suavemente. Se incubaron durante 90 minutos a 37 °C con agitación a 150 rpm, se tomaron 100  $\mu$ L y se sembraron en cajas petri con los antibióticos correspondientes a los marcadores de selección (100  $\mu$ g/mL de ampicilina para el plásmido con la secuencia de interés y 25  $\mu$ g/mL de cloranfenicol para el vector receptor) y se distribuyó suavemente con un asa en las cajas petri.

### 5.5 Minipreparación del plasmido

Se purificaron los plásmidos mediante el método de miniprep (apéndice 4). Se utilizó el kit de purificación de plásmidos *Qiagen Spin Miniprep kit*. Se prepararon cultivos de 3 ml de *E. coli* previamente transformadas en medio LB líquido con los antibióticos correspondientes de selección de cada plásmido. Después se transfirió 1 mL de cultivo en tubos de polipropileno y se centrifugó durante 2 minutos a 11000 rpm. Posteriormente se descargó el sobrenadante dejando solo la pastilla. Se

resuspendió la pastilla en 250  $\mu\text{L}$  de buffer P1 con RNAsa A a 4°C y se utilizó un vórtex para homogenizar hasta que no quedaran rastros de la pastilla en el fondo. Después se añadieron 250  $\mu\text{L}$  de buffer P2 y se mezcló cuidadosamente por inversión 6 veces y se dejó la reacción durante 5 minutos. Posteriormente se neutralizó añadiendo 350  $\mu\text{L}$  de buffer N3 y se mezcló suavemente por inversión 6 veces hasta que la mezcla tuviera una consistencia turbia. Se centrifugaron las muestras a 13000 rpm durante 10 minutos hasta que se formó una pastilla blanca. Se transfirió el sobrenadante a una columna de purificación dentro de un tubo de polipropileno y se centrifugaron durante 1 minuto a 13000 rpm. Se descartó el eflujo y se lavó la columna con 0.75 mL de buffer PE con etanol previamente agregado y se centrifugó durante 1 minuto a 13000 rpm. Se volvió a descartar el eflujo y se centrifugó para secar la columna de purificación durante 1 minuto a 13000 rpm. Se transfirió la columna de purificación a un tubo de polipropileno limpio y se agregaron 50  $\mu\text{L}$  de ddH<sub>2</sub>O, se dejó reposar durante 5 minutos y posteriormente se centrifugó un minuto a 13000 rpm. Se descartó la columna de purificación y se guardó el tubo de polipropileno con el plásmido purificado a - 80°C.

#### 5.6 Digestiones de los plásmidos con enzimas de restricción

Para estandarizar la bioparte Bba\_K872001 es necesario incluirla en un vector que contenga los sitios de restricción *EcoRI* y *XbaI* flanqueando del lado izquierdo de la secuencia y los sitios de restricción *SpeI* y *PstI* del lado derecho de la secuencia (Fig. 14.). El vector utilizado para la estandarización fue pSB1C3. Como las secuencias tanto del vector donante como del vector receptor son conocidas, se realizaron digestiones con las enzimas *EcoRI* y *PstI* conforme al protocolo 10 estipulado por el *Registry of Standard Biological Parts* (apéndice 5), Todas las enzimas de restricción y buffers se obtuvieron del *Biobrick Assembly Kit* de *New England Biolabs*. Se tomaron 250 ng de cada uno de los plásmidos y se ajustó su volumen a 16  $\mu\text{L}$  utilizando ddH<sub>2</sub>O. Se agregaron 2.5  $\mu\text{L}$  de NEBuffer 2 y 0.5  $\mu\text{L}$  de BSA. Posteriormente se agregaron las enzimas de restricción en relación 1:1 (0.5 $\mu\text{L}$  de cada enzima) para un volumen total de 20  $\mu\text{L}$ . Se dejaron incubar toda la noche a 37°C y se inactivó la reacción calentando en baño seco a 80 °C durante 20 minutos. Se comprobó que las digestiones fueran correctas mediante una electroforesis para corroborar que los fragmentos fueran del peso correcto.

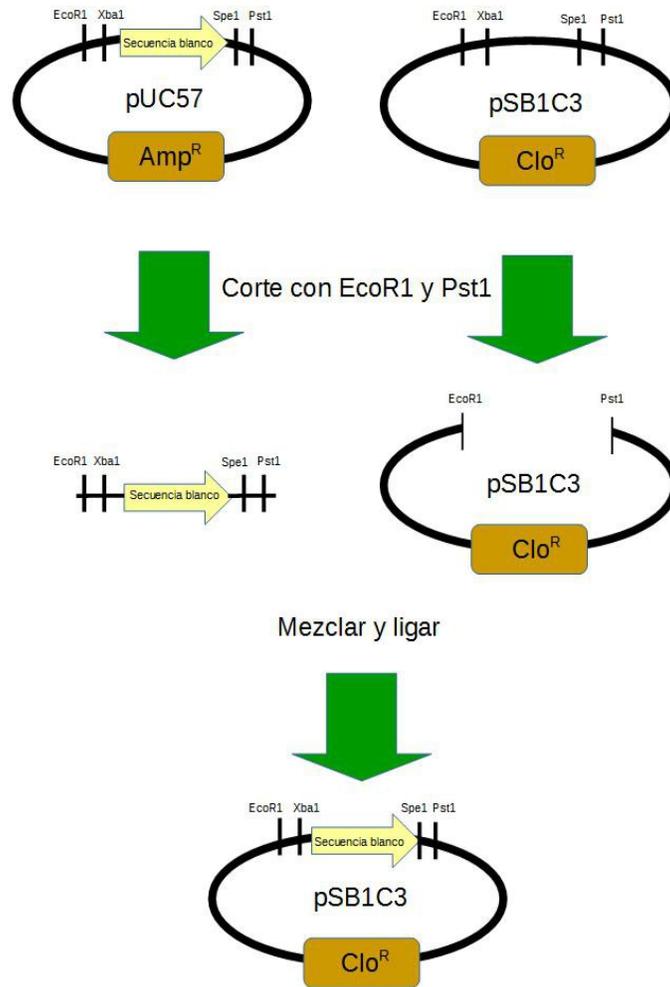


Fig. 14. Esquema del ensamblaje estándar de Biobricks. Modificado de <http://parts.igem.org/File:3AAssembly.png>

### 5.7 Electroforesis y purificación de DNA

Se identificó el DNA por medio de electroforesis en gel de agarosa y se procedió a realizar una purificación de banda de los fragmentos de interés (apéndice 6). El gel se preparó al 1% de agarosa con buffer TAE 1x en una charola de 10 cm por 15 cm con 15 pozos. Se cargaron los pozos con buffer de carga para DNA 6x con *GelRed* 6x (*Genescript corporation*) y se corrió el gel durante 1 hora con un voltaje de 100 V. Se observaron los resultados con un transiluminador UV en un cuarto oscuro.

Las bandas de interés mostraron pesos aproximados de 2000 pb para la secuencia blanco y 2070 pb para el vector receptor. Se cortaron las bandas con un bisturí y se separó el fragmento pasándolo a un tubo polipropileno previamente pesado. Se agregó binding buffer en volumen 1:1 con respecto al peso del fragmento de agarosa y se incubó a 50°C por 10 minutos hasta que el gel se disolvió totalmente y adquirió un color amarillento. Se transfirió el contenido a una columna de purificación y se centrifugó durante un minuto a 16000 rpm y se descartó el eflujo. Se añadieron 700 µL de buffer de lavado y se volvió a centrifugar, se descartó el sobrenadante, se secó la muestra centrifugándola una vez más. Se transfirió la columna de purificación a un tubo limpio y se agregaron 50 µL de ddH<sub>2</sub>O precalentada a 65°C, se reposó durante 6 minutos y se procedió a centrifugar durante 2 minutos a 16000 rpm. Para la elución del DNA. Se cuantificó el DNA utilizando un nanoespectrofotometro usando como blanco el agua que se usó para eluir.

### 5.8 Ligación del DNA y transformación.

Una vez purificados tanto el inserto como el vector donante se combinaron y se efectuó una ligación (apendice 7), inmediatamente después se efectuó una transformación utilizando cloranfenicol como agente selector. El producto final fue el plásmido utilizado para los experimentos que se muestra en la fig. 15. Se realizaron ligaciones para insertar la secuencia de interés en el vector pSB1C3 (apendice 7), que contiene una resistencia a cloranfenicol y un origen de replicación de alta copia. La ligasa T4 y el buffer se obtuvieron del *Biobrick assembly kit* de *New England Biolabs* y se transformó en *E. coli* quimiocompetentes.

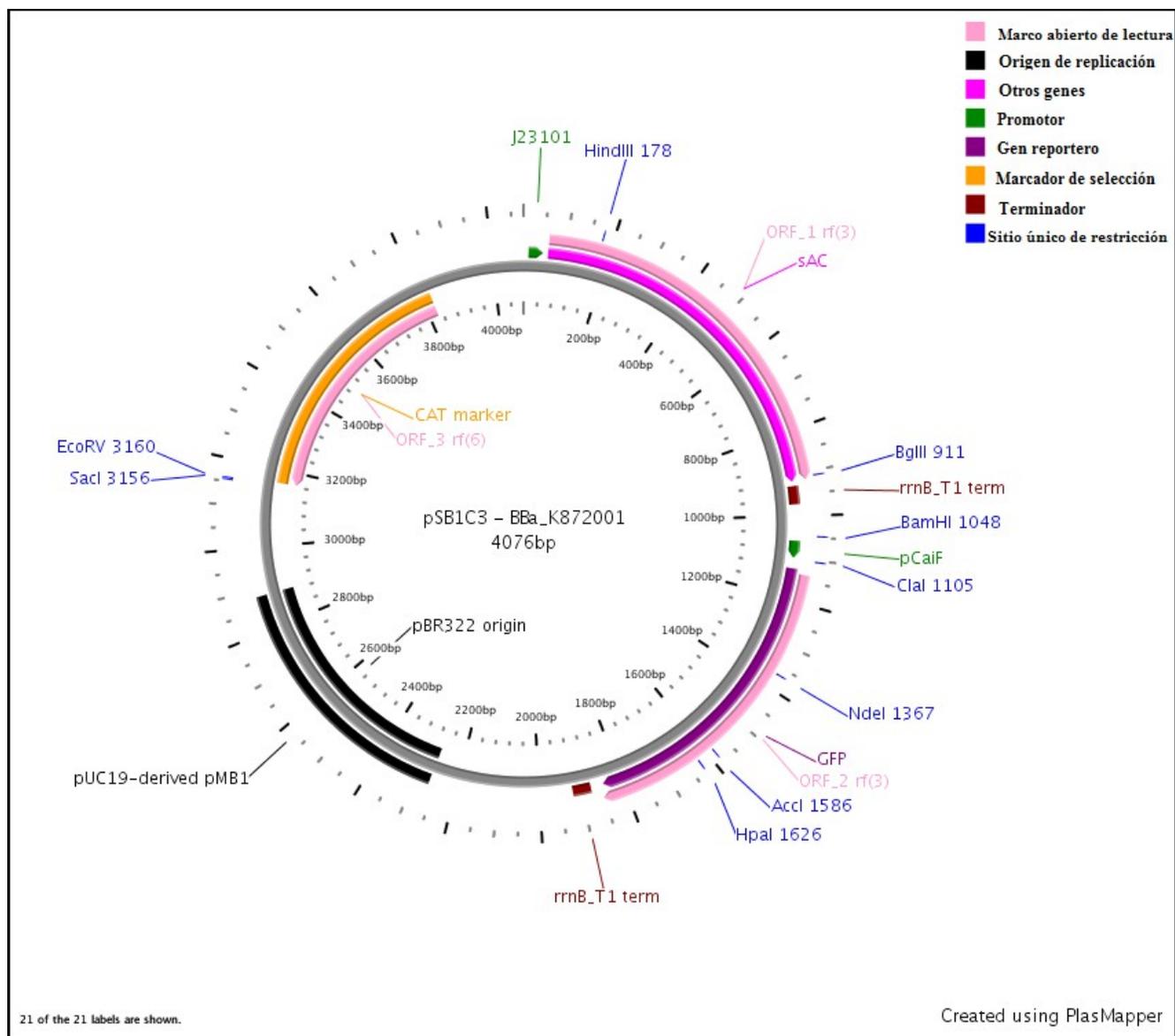


Fig. 15, Mapa de restricción de la bioparte (BBa\_K872001) en el vector (pSB1C3) utilizado para transformar a las células. Elaborado con PlasMapper (Dong *et al*, 2004)

### 5.9 Inducción de la actividad del plásmido

Para la inducción de la actividad se tomaron las células transformadas y se traspasaron a medio LB fresco para su proliferación hasta que alcanzaron una lectura aproximada de 0.4 en densidad óptica a 600 nm. Se separaron 3 muestras en tubos de polipropileno de 15 mL para ser transportada en hielo para la inducción y observación de la actividad, que se realizó en la Unidad de Microscopía del Instituto de Investigaciones Biómicas de la UNAM.

Para inducir la activación del plásmido, se prepararon tres inductores de la siguiente manera. Todas las muestras contenían 1 mL de bacterias transformadas con el plásmido y 1 mL de inductor compuesto de 10 mM de  $MgCl_2$ , 5 mM de ATP y  $NaHCO_3^-$  en diferentes concentraciones, 40 mM para la máxima activación, 25 mM para la activación intermedia y 0 mM para el control negativo. También se añadió un control negativo de células sin transformar para el control negativo general. Las inducciones se realizaron en tubos polipropileno agregando primero las células y después el inductor en una relación 1:1 y homogeneizando con ayuda de una micropipeta utilizando para cada muestra una punta estéril. Este método de inducción de sAC fue reportado por Chen *et al* (2000) y Choloupka *et al* (2006) para la proteína purificada.

Se realizaron tres diferentes tiempos de inducción, dejando las células incubar con el inductor a temperatura ambiente durante 5 minutos, 30 minutos y 60 minutos respectivamente, con las diferentes concentraciones de inductor. Los experimentos se realizaron por triplicado y se obtuvieron fotografías mediante el uso de microscopía de fluorescencia a 100x. Las fotografías fueron obtenidas en la unidad de microscopía del Instituto de Investigaciones Biomédicas a cargo de Miguel Tapia Rodríguez. Se utilizó un microscopio Nikon Optiphot-2 con iluminación difractada y las fotografías se tomaron con una cámara Sony Cybershot de 4 megapíxeles a una distancia focal de 3.7 mm con un segundo de exposición.

Para la observación se tomó una muestra de 1  $\mu L$  de las células inducidas y se colocó en un portaobjetos limpio con ayuda de una micropipeta y utilizando una punta estéril. Por cada muestra, se colocó un cubreobjetos limpio procurando que la muestra no escurriera por los bordes. Posteriormente se montó en el microscopio, se realizó la observación y se tomaron fotografías para reportar la inducción.

#### 5.10 Procesamiento digital de imágenes

Para la obtención de datos cuantitativos se sometió a un procesamiento digital cada una de las imágenes mostradas en este trabajo. Para el procesamiento digital de imágenes se utilizó el programa ImageJ (Abramoff *et al*, 2004). Las imágenes fueron obtenidas en formato JPG con una resolución de

2272 por 1704 píxeles y una composición de color tipo RGB y a cada imagen se le aplicó el siguiente tratamiento. Se extrajeron los canales de cada color que compone la imagen y se seleccionó solamente el canal verde. Se sustrajo el fondo de la imagen utilizando el algoritmo “rolling ball” (Stenberg, 1983) que se sugiere para imágenes de este tipo con radio de 50 píxeles para la curvatura de la parábola. Se obtuvo el histograma y la tabla de observaciones de la imagen para determinar los valores de intensidad que contienen el mayor número de observaciones positivas con fluorescencia y conocer la distribución de las observaciones. Se seleccionó un umbral de datos donde se encontrarán la mayoría de las observaciones positivas, el límite inferior fue determinado por el método de triángulo, utilizado para obtener el primer valor significativo diferente al valor de fondo de la imagen, y para el límite superior se utilizó el valor máximo de observaciones positivas cuyas observaciones fueran superiores a 10. Se determinó el umbral de observaciones utilizadas para el análisis estadístico entre los valores de 15 y 43 de los valores de la tabla de observaciones. Se contrastaron las imágenes del canal verde junto con las imágenes con el umbral, con una opacidad del 50% para observar que los valores dentro del umbral correspondieran a los valores de fluorescencia de la imagen.

### *5.11 Análisis estadístico*

Se importó la tabla de observaciones de ImageJ a Minitab 17 (Minitab Inc., 2010) para la elaboración del análisis estadístico. Se realizaron pruebas  $U$  de Mann-Whitney para determinar si existen diferencias significativas entre los valores observados en cada imagen. Se compararon las tablas de observaciones de las imágenes en pares utilizando como rango el umbral obtenido anteriormente para determinar los valores mínimos y máximos de fluorescencia, con un nivel de significancia del 95% ( $\alpha = 0.05$ ). La tabla de observaciones utilizadas para el análisis estadístico se encuentra en el apéndice 8.

### *5.12 Modelación matemática*

Se elaboró un sistema de ecuaciones diferenciales con la finalidad de determinar la relación entre el  $\text{HCO}_3^-$  y la GFP viendo la producción de esta última con respecto a la primera. Una vez obtenida la ecuación que define esta relación se realizó un programa para determinar las soluciones numéricas para este sistema en condiciones experimentales de inducción y para la máxima saturación

posible determinada por el modelo. Para elaborar las simulaciones se utilizó por el programa Mathematica 7 (Wolfram Research, Inc. 2008).

### Ecuaciones diferenciales.

El modelo está basado en las siguientes suposiciones.

1. Las concentraciones de  $\text{HCO}_3^-$  permanecen dentro de dos niveles  $[0, K]$  siendo  $K$  la concentración en el punto de saturación.
2. GFP tiene una expresión basal  $j$ . Esta suposición está apoyada por la observación de que en una concentración de  $0 \text{ NaHCO}_3$  existe la expresión de GFP por las condiciones internas de la célula o por la inducción por otros medios.
3. La expresión de GFP varía entre el nivel basal  $j$  y la concentración de saturación  $J$ . Esta suposición esta apoyada por la observación de que en todas las muestras observadas de células transformadas existe producción de GFP en diferentes grados de intensidad.

Definamos de la siguiente manera las concentraciones de  $\text{HCO}_3^-$  y GFP respectivamente:

$$\begin{aligned}x(t) &= [\text{HCO}_3(t)] \\y(t) &= [\text{GFP}(t)]\end{aligned}\quad \{2\}$$

con la siguiente restricción de tiempo:

$$0 \leq t < t_0 \quad \{3\}$$

Con lo anterior podemos escribir la siguiente ecuación diferencial de primer orden:

$$\frac{dy(t)}{dt} = k_1 x(t) y(t) \quad \{4\}$$

Después podemos definir a  $x$  y a  $y$  en términos de  $t$ :

$$(x(t), y(t)) = \left( \frac{K}{t_0} t, j \left[ \frac{J}{j} \right] \left( \frac{t}{t_0} \right)^2 \right) \{5\}$$

Y eliminando  $t$  podemos obtener una expresión de  $y$  con respecto a  $x$ :

$$y(x) = j \left[ \frac{J}{j} \right] \left( \frac{x}{K} \right)^2 \{6\}$$

Esta última expresión nos dice como es la relación de la expresión de GFP con respecto a  $\text{HCO}_3^-$ , donde:

$y(x)$  es la función de GFP con respecto  $\text{HCO}_3^-$ .

$j$  es el nivel de expresión basal de GFP, que se podría considerar como la expresión mínima de éste y es independiente a la concentración de  $\text{HCO}_3^-$ , ya que se expresa aunque no haya inducción alguna.

$J$  es la concentración de saturación de GFP, que se podría considerar como la expresión máxima de éste.

$X$  es el valor de  $\text{HCO}_3^-$  en el momento de la inducción.

$K$  es la concentración de saturación de  $\text{HCO}_3^-$ , en este punto es en el que la reacción de la enzima sAC se satura.

Existen algunas derivaciones de la ecuación {6} que resultan útiles para entender la dinámica del sistema y que ayudan a explicar los resultados.

1.  $j$  siempre es mayor a 0, pero siempre es menor a  $J$ . Esto se confirma con la existencia de fluorescencia basal en los experimentos, que siempre es menor a la fluorescencia inducida por  $\text{HCO}_3^-$ .
2. Si  $X < K$  y  $J > j$  entonces  $y(x)$  tiene un crecimiento muy bajo.
3. Si  $X > K$  y  $J > j$  entonces  $y(x)$  tiene un crecimiento muy alto.
- 4.- Si  $x=K$ , entonces  $y(x)$  tiende  $J$  linealmente..

## 6. Resultados

Para que determinar si funciona el biosensor de dióxido de carbono es necesario que exista una correlación entre la cantidad de bicarbonato de sodio (molécula análoga al dióxido de carbono) y la fluorescencia producida por las células, de modo que a mayor cantidad de bicarbonato de sodio presente en las muestras, mayor es la fluorescencia. Se compararon imágenes obtenidas por observación con microscopia de fluorescencia para determinar que esta relación es positiva y que la expresión de fluorescencia es dependiente de la activación del plásmido. Para determinar si la fluorescencia es significativamente diferente en los distintos niveles de inducción, las imágenes se sometieron a un procesamiento digital en el que se aislaron los puntos que presentan fluorescencia conforme a una escala de color, en la que a cada punto (o pixel) se le asignó un valor dependiendo de la tonalidad que presenta. Una vez obtenidos los valores, estos se agruparon en una escala con un rango que va del 0 al 255, siendo 0 el valor del negro y 255 el del verde más brillante. Posteriormente se eligieron los rangos que contengan la mayor cantidad de observaciones y se aplicaron pruebas  $U$  de Mann-Whitney, comparando las imágenes por pares para determinar si existen diferencias en los datos de los rangos de activación y comprobar si hay diferencias significativas entre las imágenes.

Por otra parte, para entender el funcionamiento del biosensor es necesario entender como se relaciona la fluorescencia con el bicarbonato. El modelo de ecuaciones diferenciales elaborado nos da una relación directa entre GFP y  $\text{HCO}_3^-$  en la ecuación {6}. Se encontraron las soluciones numéricas para esta relación dados los parámetros de la inducción y de la máxima saturación hipotética. Estas soluciones numéricas del modelo de ecuaciones diferencias sirven como referencia para comparar los resultados obtenidos en el laboratorio y determinar si la relación es consistente entre lo observado en los experimentos y la predicción del modelo.

## 6.1 *Observación de la actividad*

Las fig. 16, 17 y 18 son las imágenes resultantes de la inducción de la expresión de GFP y sugieren que la máxima producción de GFP se da en las concentraciones mas elevadas del agente inductor ( $\text{NaHCO}_3$  40 mM, fig. 16D, 17D y 18D) y aunque la concentración del agente inductor sea nula, existe una expresión basal de GFP (fig. 16B, 17B y 18B). Se agregaron controles negativos de células sin transformar (fig. 16A, 17A y 18A) para determinar si de la presencia de ruido de fondo, corresponde a la activación basal del plásmido que se utilizó para transformar a las células o es producto de algún agente externo, como el medio de cultivo o efecto de la luz del transiluminador del microscopio.

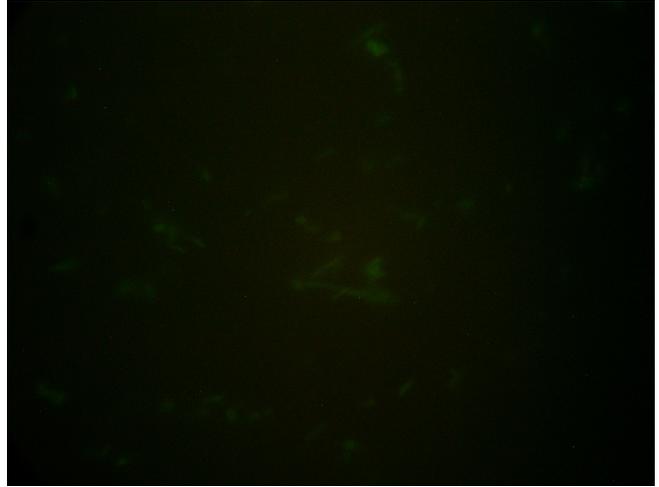
La imágenes que que contienen una cantidad de inductor de 25 mM (fig. 16C, 17C y 18C) parece que no tienen una diferencia significativa con las imágenes que solo presentan la activación basal, lo que sugiere que la cantidad de inductor no fue suficiente para activar el sistema más allá del punto basal, o que el estrés es suficiente para activar la producción de GFP a niveles de inducción con una concentración de 25 mM. La única diferencia visual que se puede apreciar es que en las imágenes que solo presentan la activación basal, no se presentan figuras de células definidas y la fluorescencia tiene una apariencia mas difuminada, la cual puede ser producto del efecto estrella de la difracción.

Existe también una diferencia en la expresión de GFP entre los tiempos de inducción para las muestras que contenían mayor cantidad de agente inductor (40 mM), siendo la muestra con tiempo de inducción de 5 minutos la que presenta menor cantidad de fluorescencia y las muestras con tiempo de inducción de 30 minutos y 60 minutos presentan una fluorescencia similar. Esto sugiere que en altas concentraciones de inductor, existe un tiempo entre los 5 y los 30 minutos en el que la fluorescencia alcanza su máximo punto de saturación.

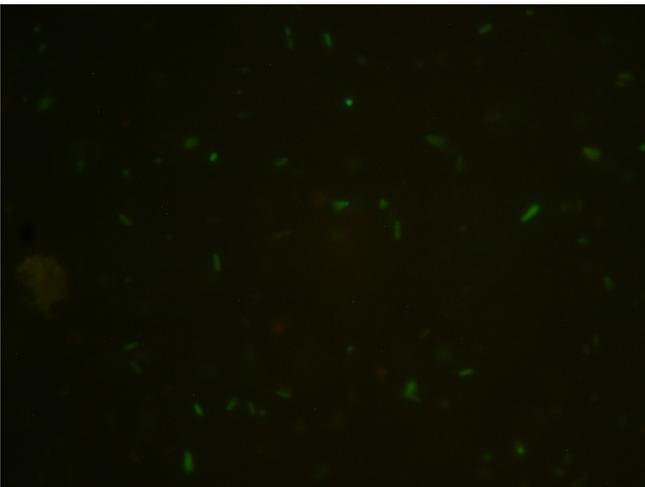
**A** Control negativo, sin bioparte 5 min 40 mM



**B** Expresión basal, con bioparte, 5 min 0 mM



**C** Expresión media, con bioparte, 5 min, 25 mM



**D** Expresión alta, con bioparte, 5 min 40 mM

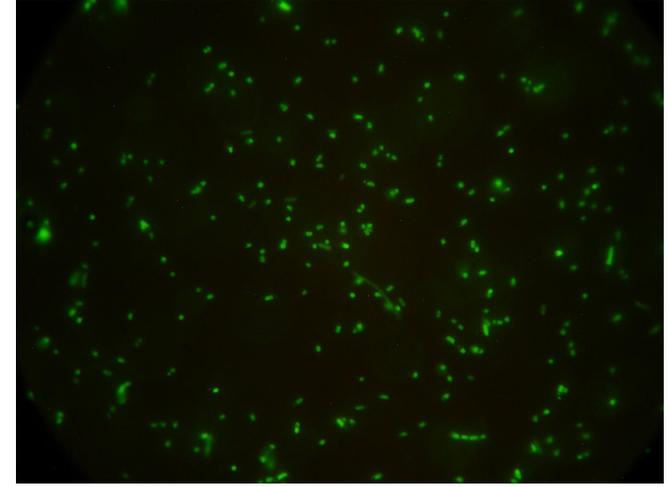
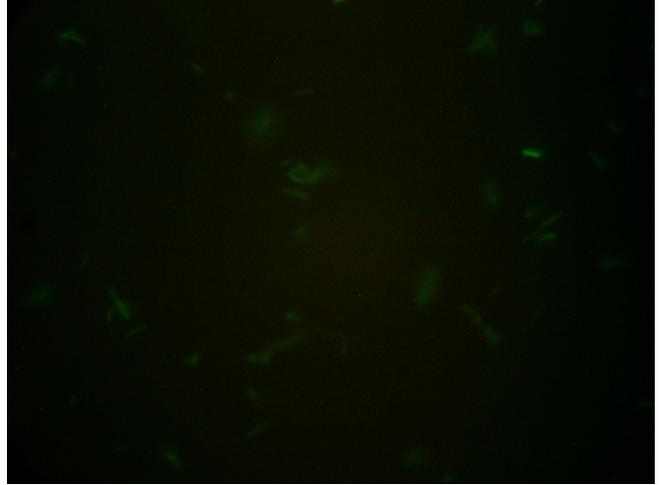


Fig. 16. Inducción de la fluorescencia utilizando diversas concentraciones de  $\text{HCO}_3^-$  en células transformadas con el plásmido BBa\_K872011 en un periodo de activación de 5 minutos. A: Control negativo sin plásmido. B: concentración de  $\text{NaHCO}_3^-$  0 mM. C: concentración de  $\text{NaHCO}_3^-$  25 mM. D: concentración de  $\text{NaHCO}_3^-$  40 mM.

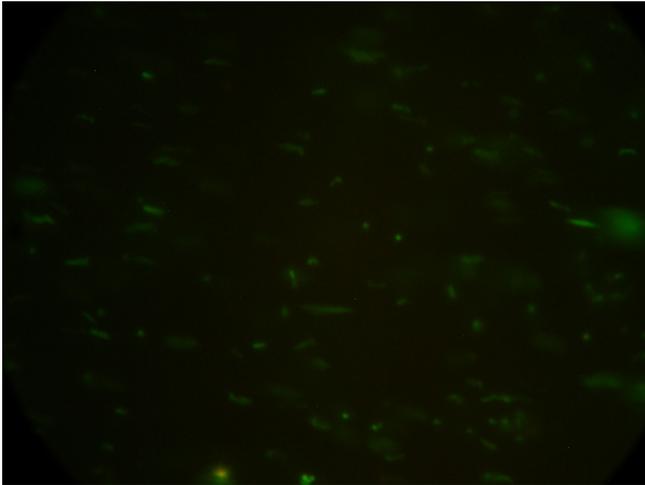
**A** Control negativo, sin bioparte 30 min 40 mM



**B** Expresión basal, con bioparte, 30 min 0 mM



**C** Expresión media, con bioparte, 30 min, 25 mM



**D** Expresión alta, con bioparte, 30 min, 40 mM

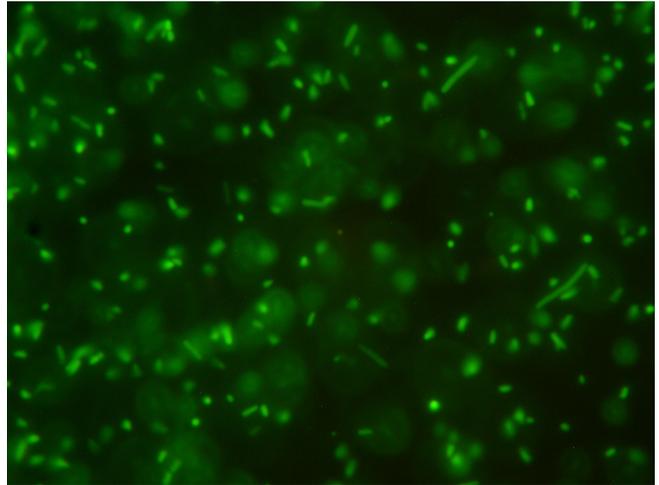
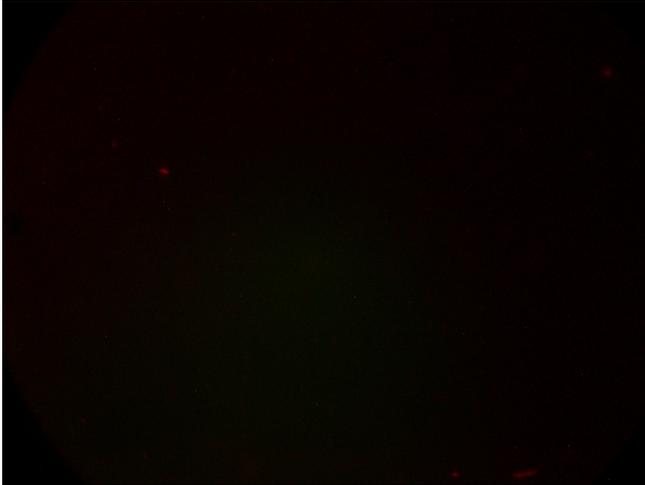
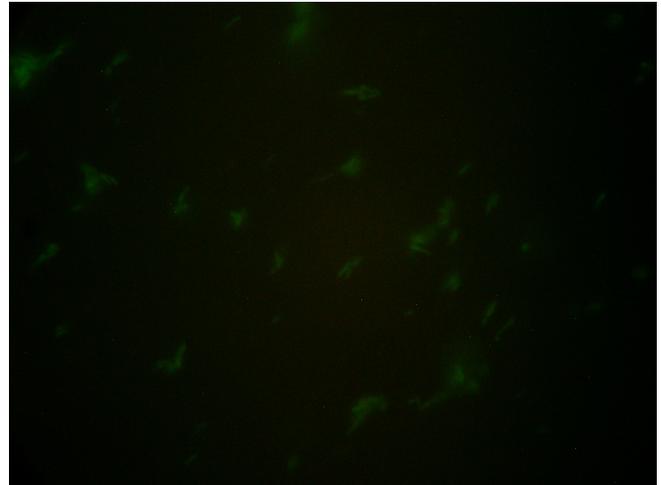


Fig. 17. Inducción de la fluorescencia utilizando diversas concentraciones de  $\text{HCO}_3^-$  en células transformadas con el plásmido BBa\_K872011 en un periodo de activación de 30 minutos A: Control negativo sin plásmido. B: concentración de  $\text{NaHCO}_3^-$  0 mM. C: concentración de  $\text{NaHCO}_3^-$  25 mM. D: concentración de  $\text{NaHCO}_3^-$  40 mM.

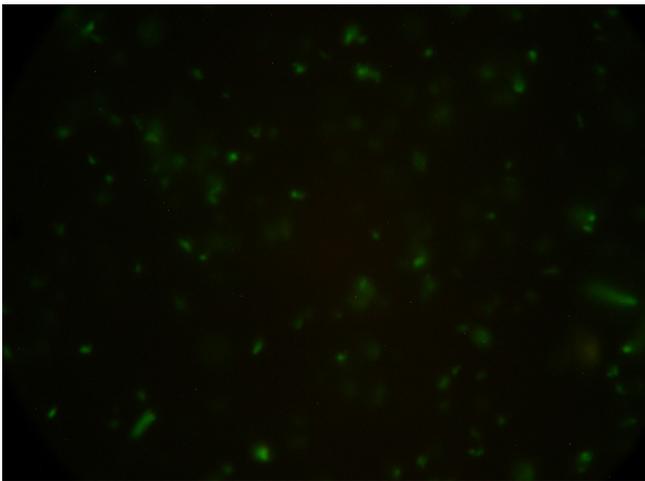
**A** Control negativo, sin bioparte 60 min 40 mM



**B** Expresión basal, con bioparte, 60 min 0 mM



**C** Expresión media, con bioparte, 60 min, 25 mM



**D** Expresión alta, con bioparte, 60 min, 40 mM

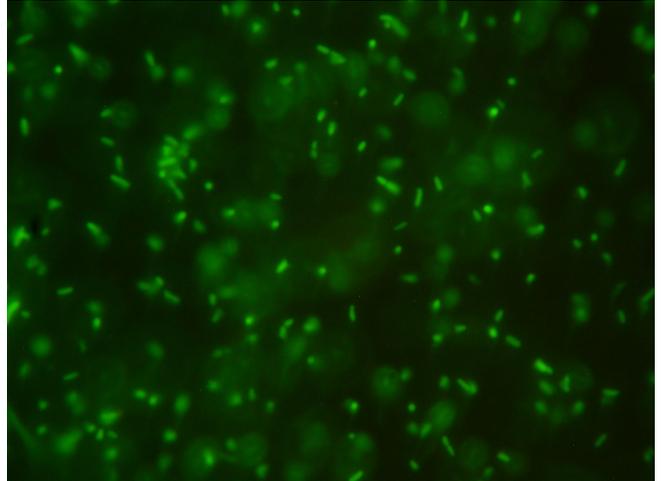


Fig. 18. Inducción de la fluorescencia utilizando diversas concentraciones de  $\text{HCO}_3^-$  en células transformadas con el plásmido BBa\_K872011 en un periodo de activación de 60 minutos. A: Control negativo sin plásmido. B: concentración de  $\text{NaHCO}_3^-$  0 mM. C: concentración de  $\text{NaHCO}_3^-$  25 mM. D: concentración de  $\text{NaHCO}_3^-$  40 mM.

## 6.2 Procesamiento digital de imágenes

Las fig. 19, 20 y 21 son el resultado del procesamiento digital de imágenes y sugieren, al igual que las fig. 16, 17 y 18 que las muestras con mayor concentración de activador son las que tienen mayor cantidad de píxeles con fluorescencia detectada. Solo que la apariencia de fluorescencia es menos aparente pues se encuentra suprimido el efecto estrella. Una de las diferencias visuales más

aparentes es que conforme se aumenta la cantidad de inductor, se encuentran mejor definidas las figuras de los células que presentan fluorescencia.

Los píxeles remarcados en rojo representan la muestra de datos utilizados para el análisis estadístico y están contenidos en un umbral entre los valores 15 y 43 del histograma de tonalidad de la imagen (fig. 22, 23 y 24), no se tomaron en cuenta los valores más bajos del histograma pues estos valores corresponden al fondo de la imagen ni los valores más altos para evitar incurrir en falsos negativos, ya que cuando se aumentaba el valor máximo del rango del umbral, la cantidad de ruido aumentaba notablemente.

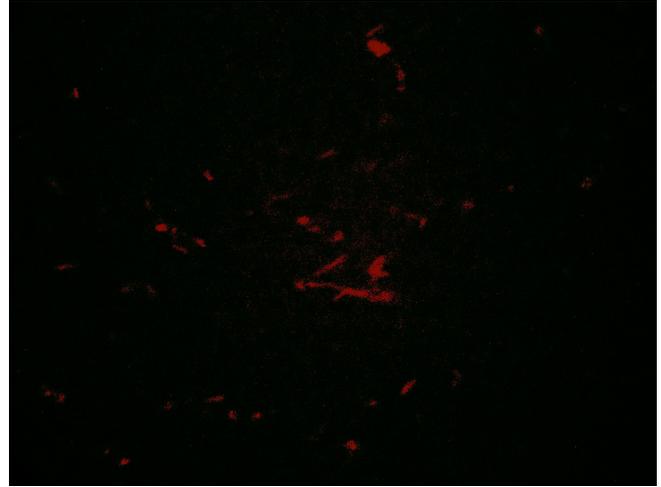
Las imágenes correspondientes a los controles negativos (fig. 19A, 20A y 21A) contienen valores dentro del umbral determinado para valores con activación positiva lo que indica la presencia de ruido en las muestras producto de la luz del microscopio utilizado para observar las muestras y del formato de las imágenes, aunque este no fue significativo.

Además los histogramas de las imágenes indican que la distribución de las observaciones no es de tipo normal ( $z$ ) y se ajusta mejor a una de tipo  $\chi^2$ , por lo que un análisis no paramétrico resulta mas adecuado para la interpretación de los datos obtenidos

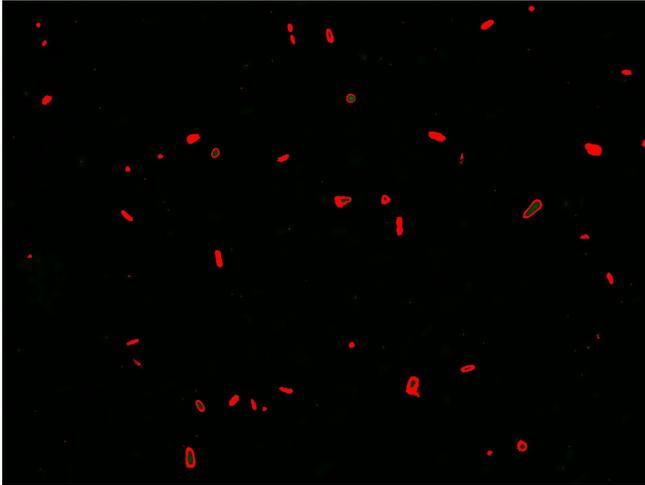
**A** Control negativo, sin bioparte 5 min 40 mM



**B** Expresión basal, con bioparte 5 min 0 mM



**C** Expresión media, con bioparte 5 min 25 mM



**D** Expresión alta, con bioparte 5 min 40 mM

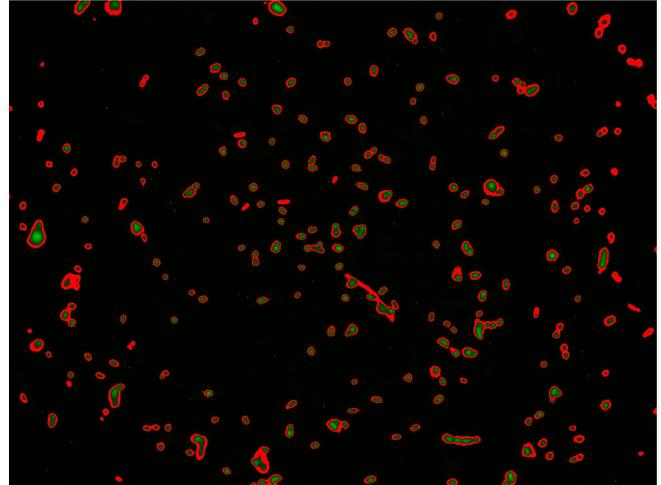
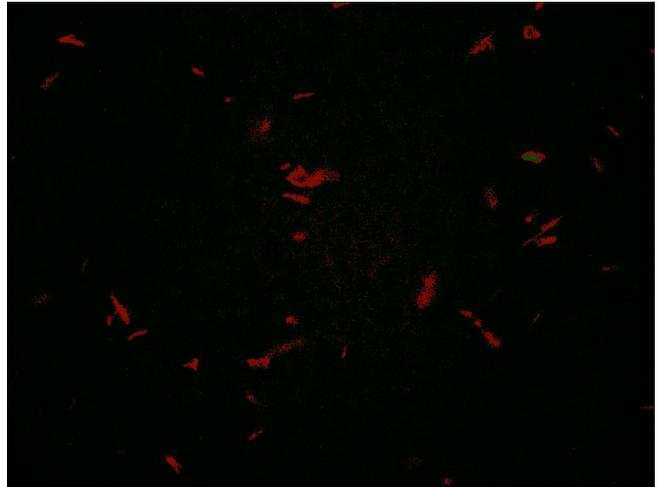


Fig. 19. Imágenes procesadas de la fluorescencia utilizando diversas concentraciones de  $\text{HCO}_3^-$  en células transformadas con el plásmido BBa\_K872001 en un periodo de activación de 5 minutos. A: Control negativo sin plásmido. B: concentración de  $\text{NaHCO}_3^-$  0 mM. C: concentración de  $\text{NaHCO}_3^-$  25 mM. D: concentración de  $\text{NaHCO}_3^-$  40 mM.

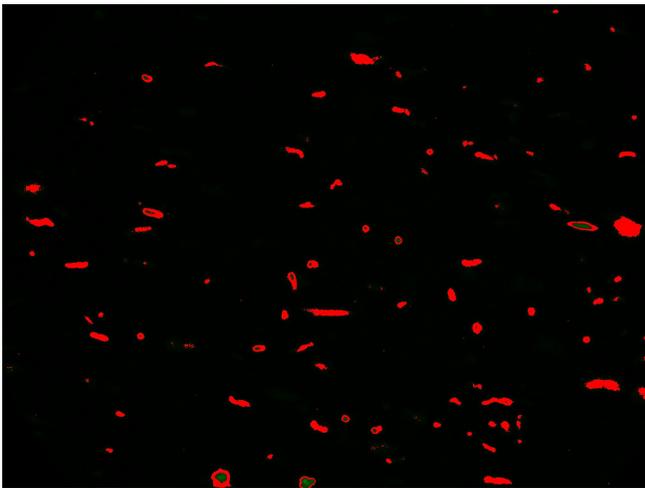
**A** Control negativo, sin bioparte 30 min 40 mM



**B** Expresión basal, con bioparte 30 min 0 mM



**C** Expresión media, con bioparte 30 min 25 mM



**D** Expresión alta, con bioparte 30 min 40 mM

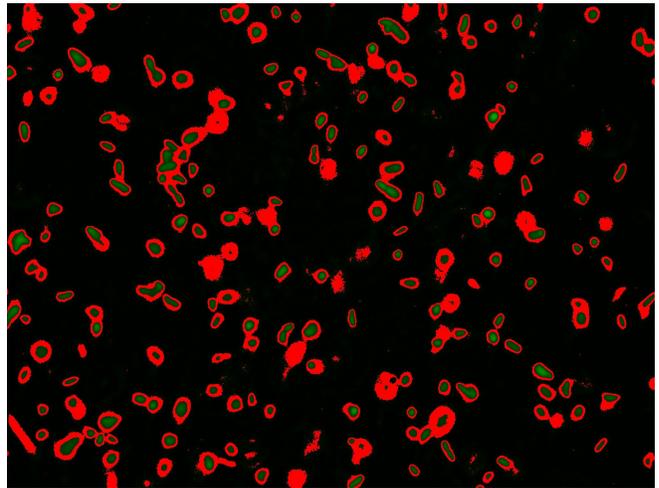
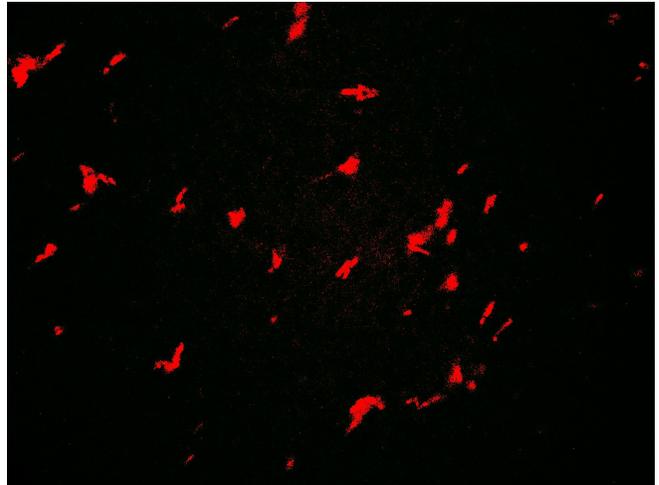


Fig.20. Imágenes procesadas de la fluorescencia utilizando diversas concentraciones de  $\text{HCO}_3^-$  en células transformadas con el plásmido que contiene la construcción en un periodo de activación de 30 minutos. A: Control negativo sin plásmido. B: concentración de  $\text{NaHCO}_3^-$  0 mM. C: concentración de  $\text{NaHCO}_3^-$  25 mM. D: concentración de  $\text{NaHCO}_3^-$  40 mM.

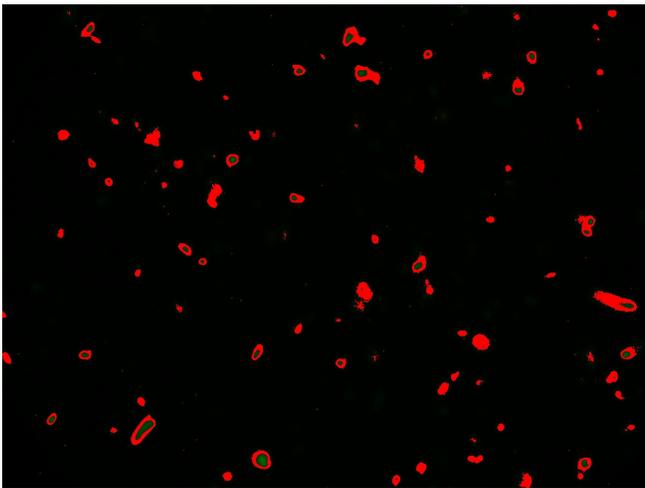
**A** Control negativo, sin bioparte 60 min 40 mM



**B** Expresión basal, con bioparte 60 min 0 mM



**C** Expresión media, con bioparte 60 min 25 mM



**D** Expresión alta, con bioparte 60 min 40 mM

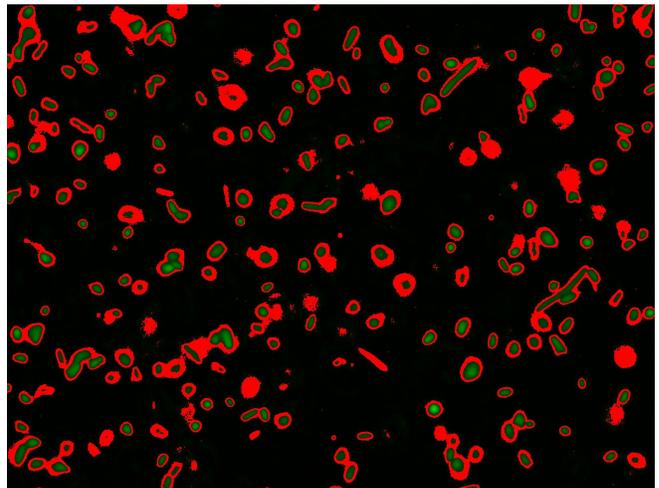
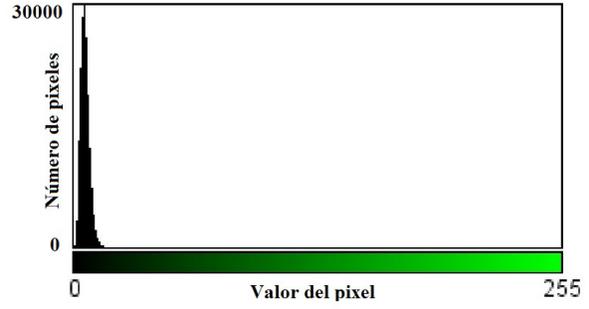


Fig.21. Imágenes procesadas de la fluorescencia utilizando diversas concentraciones de  $\text{HCO}_3^-$  en células transformadas con el plásmido que contiene la construcción en un periodo de activación de 60 minutos. A: Control negativo sin plásmido. B: concentración de  $\text{NaHCO}_3^-$  0 mM. C: concentración de  $\text{NaHCO}_3^-$  25 mM. D: concentración de  $\text{NaHCO}_3^-$  40 mM

**A** Control negativo, sin bioparte 5 min 40 mM



**B** Expresión basal, con bioparte 5 min 0 mM



**C** Expresión media, con bioparte 5 min 25 mM



**D** Expresión alta, con bioparte 5 min 40 mM

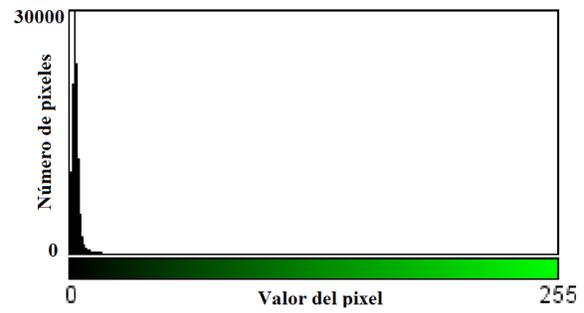
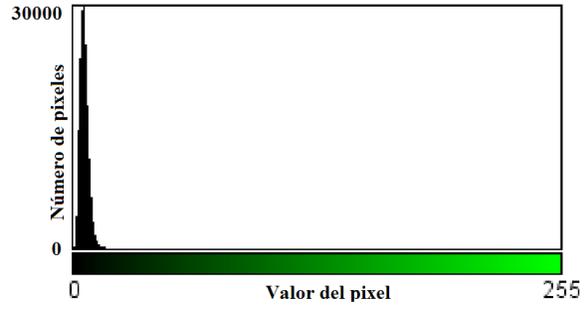


Fig. 22. Histogramas de las de la fluorescencia de imágenes procesadas utilizando diversas concentraciones de  $\text{HCO}_3^-$  en células transformadas con el plásmido que contiene la construcción en un periodo de activación de 5 minutos. A: Control negativo sin plásmido. B: concentración de  $\text{NaHCO}_3^-$  0 mM. C: concentración de  $\text{NaHCO}_3^-$  25 mM. D: concentración de  $\text{NaHCO}_3^-$  40 mM.

**A** Control negativo, sin bioparte 30 min 40 mM



**B** Expresión basal, con bioparte 30 min 0 mM



**C** Expresión media, con bioparte 30 min 25 mM



**D** Expresión alta, con bioparte 30 min 40 mM

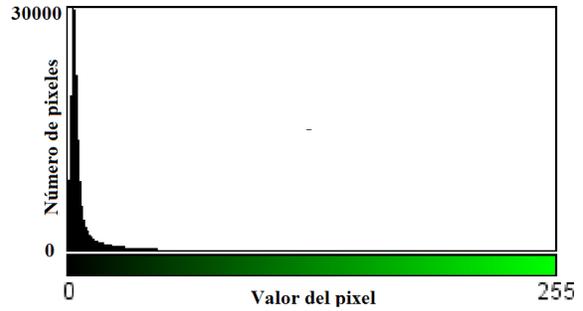
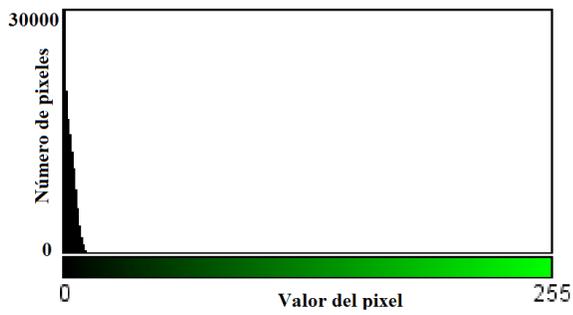
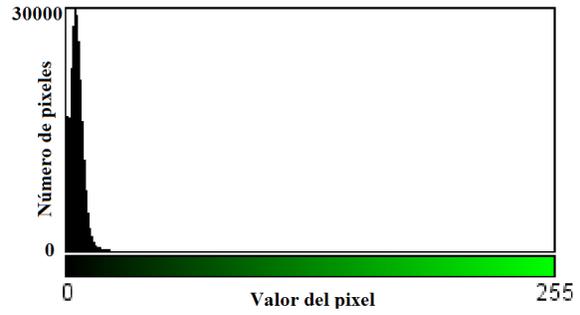


Fig. 23. Histogramas de las de la fluorescencia de imágenes procesadas utilizando diversas concentraciones de  $\text{HCO}_3^-$  en células transformadas con el plásmido que contiene la construcción en un periodo de activación de 30 minutos. A: Control negativo sin plásmido. B: concentración de  $\text{NaHCO}_3^-$  0 mM. C: concentración de  $\text{NaHCO}_3^-$  25 mM. D: concentración de  $\text{NaHCO}_3^-$  40 mM.

**A** Control negativo, sin bioparte 60 min 40 mM



**B** Expresión basal, con bioparte 60 min 0 mM



**C** Expresión media, con bioparte 60 min 25 mM



**D** Expresión alta, con bioparte 60 min 40 mM

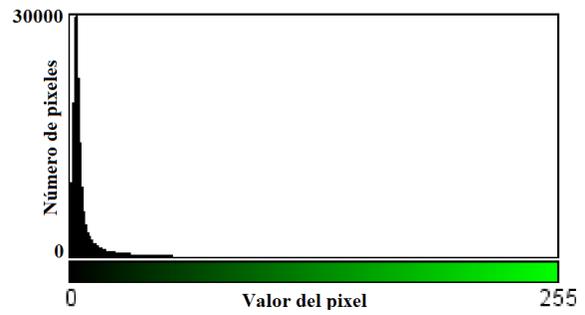


Fig. 24. Histogramas de la fluorescencia de las imágenes procesadas utilizando diversas concentraciones de  $\text{HCO}_3^-$  en células transformadas con el plásmido que contiene la construcción en un periodo de activación de 60 minutos. A: Control negativo sin plásmido. B: concentración de  $\text{NaHCO}_3^-$  0 mM. C: concentración de  $\text{NaHCO}_3^-$  25 mM. D: concentración de  $\text{NaHCO}_3^-$  40 mM.

### 6.3 Análisis estadístico

Para conocer si existen diferencias significativas entre las imágenes de las muestras se utilizaron pruebas  $U$  de Mann -Whitney. De los histogramas de se extrajeron los datos de los valores de los pixeles con valores positivos de fluorescencia (la tabla con los valores se encuentra en el apéndice 8), y se utilizó el umbral obtenido para en el procesamiento digital de imágenes como los valores de rango de las pruebas. Para cada prueba se utilizó un nivel significancia del 95% ( $\alpha = 0.05$ ).

La tabla 2 contiene los valores de  $p$  de cada una de pruebas realizadas, los valores superiores a  $\alpha = 0.05$  están remarcados en verde y corresponden a las pruebas que no presentan diferencias significativas entre las muestras. De las 66 pruebas realizadas, 11 no presentaron diferencias significativas que se encuentran agrupadas en su mayoría cuando se compararon las muestras que contenían 25 mM de inductor con las que contenían 0 mM de inductor, lo que sugiere que se requiere una concentración mayor a 25 mM de inductor para hacer una distinción de la activación basal con respecto a la activación del sistema.

Otra resultado notable se encontró cuando se compararon las imágenes con 40 mM de activador entre los 30 y 60 minutos posteriores a la activación, la cual no presenta diferencia significativa, lo que sugiere que cuando el sistema se encuentra saturado, solo toma media hora para que se produzca la máxima fluorescencia.

	5 min transformar	sin 30 min transformar	sin 60 min transformar	sin 5 min 0 mM	sin 30 min 0 mM	sin 60 min 0 mM	sin 5 min 25 mM	sin 30 min 25 mM	sin 60 min 25 mM	sin 5 min 40 mM	sin 30 min 40 mM	sin 60 min 40 mM
5 min sin transformar	na	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
30 min sin transformar		na	0	0.0002	0	0	0	0	0	0	0	0
60 min sin transformar			na	0	0	0	0	0	0	0	0	0
5 min 0 mM				na	0.2135	0.0306	0.0816	0.0086	0.0006	0	0	0
30 min 0 mM					na	0.2372	0.938	0.1862	0.0159	0	0	0
60 min 0 mM						na	0.0901	0.0791	0.5087	0.0073	0	0
5 mM 25 mM							na	0.093	0	0	0	0
30 min 25 mM								na	0.157	0.0002	0	0
60 min 25 mM									na	0.0002	0	0
5 min 40 mM										na	0	0
30 min 40 mM											na	0.565
60 min 40 mM												na

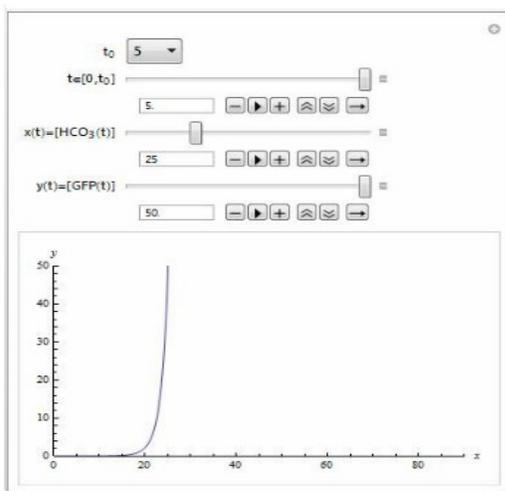
Tabla 2: Valores de  $p$  obtenidos de las pruebas *U de Mann – Whitney* mediante la comparación de fluorescencias dentro de los rangos determinados mediante procesamiento digital de imágenes.

## 6.4 Simulación

Se procedió a encontrar las soluciones numéricas a la ecuaciones {2} utilizando una simulación por computadora con el programa Mathematica 7 (Wolfram Reserch Inc, 2008). En estas simulaciones la máxima cantidad de GFP permitida es de 50 ua (unidades arbitrarias). Se calculó la solución numérica para el valor máximo posible de saturación  $K$  de  $\text{HCO}_3^-$  que es de 90 mM. Lo que se observó en estas simulaciones es que en algún punto la respuesta del sistema es muy rápida a la concentración de  $\text{HCO}_3^-$ , y la respuesta ocurre incluso en bajas concentraciones de  $\text{HCO}_3^-$ .

Posteriormente se exploró la relación de GFP y  $\text{HCO}_3^-$  a diferentes niveles de saturación de  $\text{HCO}_3^-$  (fig. 26), para explorar si el nivel de saturación de entrada afectaba la dinámica del sistema, Lo que se observó en la fig. 26 es que sin importar en que punto se da la saturación de  $\text{HCO}_3^-$  no se afecta la dinámica del sistema, por lo que la expresión de GFP se ve saturada en algún punto y que los niveles de GFP, crecen exponencialmente, dependen del punto de saturación de  $\text{HCO}_3^-$  y de la cantidad de  $\text{HCO}_3^-$  por lo que existe una relación entre  $\text{HCO}_3^-$  y GFP dada por la saturación de  $\text{HCO}_3^-$ .

A



B

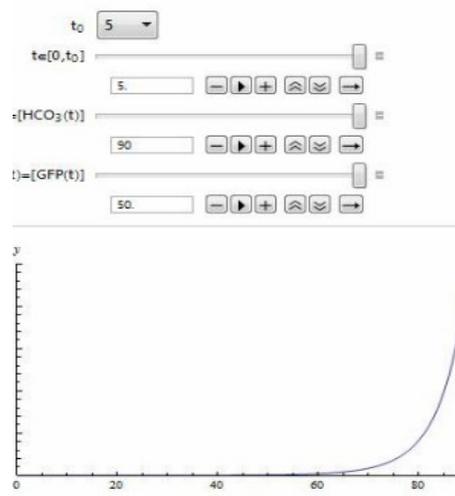


Fig. 25. Gráficas de las soluciones numéricas a la ecuación {6}. A: Solución con una concentración de 25 mM de  $\text{HCO}_3^-$ ; esta concentración corresponde al rango experimental utilizado en la inducción experimental B: Solución numérica a 90 mM de  $\text{HCO}_3^-$ ; esta concentración corresponde a la  $K$  máxima hipotética del sistema.

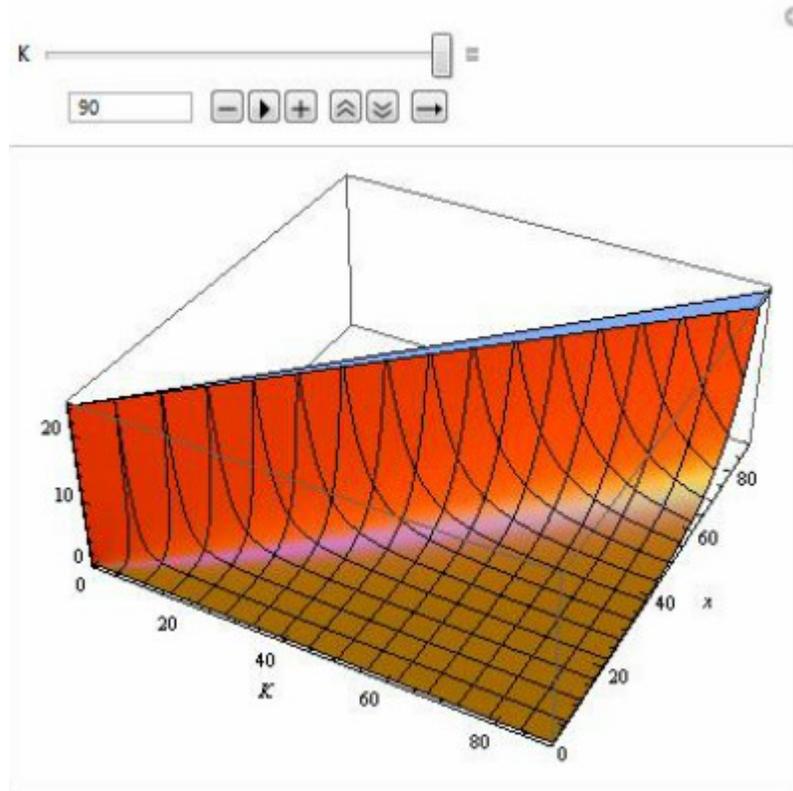


Fig.26. Gráfica de la relación entre GFP (eje Z) y HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> (eje X) y la saturación del sistema (eje Y). El plano azul (en la parte superior de la gráfica) representa el rango en el que el sistema se encuentra saturado en su expresión de GFP con respecto al HCO<sub>3</sub><sup>-</sup>, mientras mayor es la concentración de HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> y la saturación máxima del sistema, mayor es el rango en el que se da la saturación de GFP. Sin embargo, sin importar cual sea el punto de saturación del sistema (K), el comportamiento del sistema es el mismo.

## 7. Discusión

Las imágenes de las figuras 16A, 17A y 18A corresponden a los controles negativos de células sin transformar y no existe presencia de GFP, como es esperado. Las fig. 17A y 18A muestran la presencia de fluorescencia pero corresponden a artefactos producto de los reactivos utilizados para la inducción de la actividad o del medio de cultivo. De estos artefactos solo el de la fig. 17A fue detectado como falso positivo en el procesamiento digital de la imagen (fig. 19A), por el tipo de fluorescencia que presenta que es de color amarillo, esto debido al sistema de composición de la imagen. El sistema RGB descompone las imágenes en tres canales, rojo verde y azul, y dado que el color verde es una composición entre los colores amarillo y azul, el sistema aproxima las observaciones amarillas a su color más cercano, que es el verde. Sin embargo no fueron determinantes para dar falsos positivos en las pruebas estadísticas

Las imágenes de las figuras 16B, 17B y 18B son controles con células transformadas y con todos los reactivos utilizados para la inducción a excepto  $\text{NaHCO}_3^-$ . Se observa que existe una fluorescencia basal que corresponde con el valor  $j$  de la ecuación {6} cuyo valor es superior a 0. Esta fluorescencia se podría considerar como la producción mínima de GFP posible debido a la presencia de cAMP intracelular, producto de otros procesos y no al producido por sAC. También es posible que esta activación sea producto de la degradación del ATP utilizado en el inductor. Lo que muestra que existe una activación del módulo señalizador independiente a la activación del módulo transductor.

La producción de GFP a partir de concentraciones de cAMP intracelular a nivel basal es relevante al momento de obtener muestras por la posibilidad de tener falsos positivos. En células con condiciones de estrés elevado por falta de alimento u oxigenación deficiente se pueden presentar falsos positivos por la activación de pCaiF independiente de la actividad de sAC. Se sugiere para su implementación futura tener condiciones ambientales estables y controlables. También es posible que la muestra presentara una inducción pasiva durante el transporte y manejo de las muestras, pues resultó imposible su manejo en condiciones anaerobias..

Las imágenes de las figuras 16C, 17C y 18C que corresponden a la inducción realizada con 25 mM de  $\text{NaHCO}_3^-$  presentan una respuesta similar en los tres tiempos de activación pero son

significativamente diferentes a las imágenes de las figuras 16D, 17D y 18D como se observó en la tabla 8. La observación de diferencias concuerda con la aseveración de que a mayor cantidad de inductor, mayor es la fluorescencia, sin embargo las similitudes pueden explicarse por el siguiente motivo. Una de las derivaciones nos dice que si la cantidad de  $\text{HCO}_3^-$  ( $X$ ) es menor a la concentración de saturación de  $\text{HCO}_3^-$  ( $K$ ) y si la concentración de saturación de GFP ( $J$ ) es mayor a expresión basal, la producción de GFP dependiente de  $\text{HCO}_3^-$  será en bajas cantidades. Es posible que la cantidad de inductor que contiene esta muestra sea menor a la concentración de saturación y por lo tanto solo observamos un incremento lineal en la producción de GFP. Es no contradice la observación de la fig. 26 de que sin importar la cantidad de  $\text{HCO}_3^-$  la concentración de GFP llegará a la saturación y es posible que los incrementos sean tan bajos que incluso en el mayor tiempo de inducción (60 minutos) el sistema no a llegado a su punto máximo de saturación.

La afirmación de que 25 mM de  $\text{NaHCO}_3$  es una concentración menor a la concentración de saturación concuerda con los resultados de los análisis estadísticos de las fotografías. Cuando se compararon las las fotografías correspondientes a las muestras que contenían 0 mM y 25 mM de  $\text{NaHCO}_3$  no se observaron diferencias significativas en la fluorescencia que presentan las imágenes, con la excepción en las que la diferencia entre el tiempo de las muestras fuera mayor a media hora. Esto quiere decir que el tiempo mínimo de activación en el que se pueden observar diferencias en la fluorescencia para concentraciones iguales o menores a 25 mM es de más de media hora.

Mientras que en la fluorescencia presentada en las figuras 16D, 17D y 18D, que corresponden a la inducción realizada a 40 mM de  $\text{NaHCO}_3$  que es la máxima del rango experimental, se muestra una clara diferencia con respecto a las demás y tienen la mayor inducción. Una de las derivaciones nos dice que si la cantidad de  $\text{HCO}_3^-$  ( $X$ ) es mayor a la concentración de saturación de  $\text{HCO}_3^-$  ( $K$ ) y si la concentración de saturación de GFP ( $J$ ) es mayor a expresión basal, la producción de GFP dependiente de  $\text{HCO}_3^-$  sera exponencial. Es posible que la cantidad de inductor que contiene esta muestra sea igual o mayor a la del punto de saturación por lo que la producción de GFP sea exponencial. La diferencia entre la imagen 16C y 16D sugieren que el punto de saturación del sistema se encuentra entre los 25mM y 40 mM de  $\text{NaHCO}_3$  , que 5 minutos son suficientes para determinar una diferencia entre un medio saturado y uno insaturado.

De estas observaciones podemos deducir que para poder distinguir la expresión basal de GFP de la expresión por la actividad del biosensor en concentraciones de 25 mM de  $\text{NaHCO}_3^-$  o menores, es necesario que pase un periodo mayor a los 30 minutos posteriores a la inducción. En concentraciones de inductor de 40 mM o mayores es necesario que pase un periodo de 5 minutos para poder obtener una observación que sea significativamente diferente a la expresión basal del sistema.

La fluorescencia de las imágenes nos muestra la conducta en estados estacionarios del sistema, sin embargo las soluciones numéricas nos ayudan a comprender como funcionaría el sistema a lo largo del tiempo. La fig. 25 nos muestra como se comportaría el sistema a concentraciones de 25 mM y 90 mM. Estas simulaciones suponen que diferentes concentraciones de  $\text{HCO}_3^-$  llegan a una producción de GFP arbitraria en el mismo tiempo, y lo que nos muestran es que sin importar la concentración de  $\text{HCO}_3^-$  se presenta un comportamiento exponencial, es decir existe un punto en donde el crecimiento es acelerado. Este punto corresponde al punto de saturación de  $\text{HCO}_3^-$  ( $K$ ) y es desconocido, pero podemos observar lo siguiente: comparando las pendientes de las imágenes A y B de la figura 19, observamos que mientras mayor sea la concentración de  $\text{HCO}_3^-$  la pendiente disminuye y que la producción de GFP es mayor en el punto previo a la saturación que en concentraciones menores. Esto indica que la dinámica del sistema se conserva para las distintas concentraciones de  $\text{HCO}_3^-$  podemos a mayores concentraciones de  $\text{HCO}_3^-$  y por lo tanto, mayor el punto de saturación, existe un tiempo menor de generación de respuesta pero un tiempo mayor para que este llegue al punto de saturación.

Las observaciones del sistema apoyan parcialmente la modelación matemática del sistema . Comprando las imágenes 16C y 16D se observa que aunque el tiempo no es el suficiente para alcanzar la saturación existen diferencias. Esto por que no es necesario que las muestras se saturen para obtener respuestas diferenciales y pueden indicar estados de transición entre la activación previa y posterior al punto de saturación. Esto es relevante para tratar de determinar la actividad *in vivo* del sistema. Debido a que existe una inducción pasiva y constante del medio, se podrían tomar muestras en diversos intervalos de tiempo y observar en que punto empieza el crecimiento exponencial, esto podría utilizarse para determinar una ecuación que, tomando en cuenta este tiempo, la tasa de difusión de  $\text{CO}_2$  y el punto de saturación de  $\text{HCO}_3^-$  determinen la cantidad de  $\text{CO}_2$  ambiental.

Otra resultado notable se encontró cuando se compararon las imágenes con 40 mM de inductor

entre los 30 y 60 minutos posteriores a la activación, la cual no presenta diferencia significativa, lo que sugiere que cuando el sistema se encuentra saturado, solo toma media hora para que se produzca la máxima fluorescencia.

El análisis estadístico nos muestra que la mayoría de las muestras que no presentan diferencia significativa se encuentran agrupadas cuando se comparan las fluorescencias obtenidas con 0 mM de inductor y 25 mM de inductor, esto puede deberse a que es necesario que exista una concentración mayor a los 25 mM de inductor para que se presente una diferencia significativa en la producción de GFP. Otro de factores que se puede considerar para explicar la similitud es que las imágenes obtenidas carecía de la resolución suficiente para efectuar el análisis de manera correcta. Las imágenes fueron obtenidas en formato JPG, que es un formato de alta compresión infomática. Esto quiere decir que sin importar la resolución, la imagen es codificada de tal manera que los valores de los pixeles se pueden alterar para reducir el tamaño del archivo, y en esta codificación se perdieran los suficientes datos para impedir que se hiciera una discriminación correcta. Sin embargo, las imágenes de las fig. 19, 20 y 21 muestran que fue posible capturar la mayoría de los puntos de interés con la presencia mínima de ruido. Los datos que no se capturaron fue por que al aumentar el umbral de observaciones la presencia de ruido aumentaba considerablemente (resultados no mostrados), lo que podría comprometer al análisis y dar falsos positivos, pero lo que resulta notable es que todos los datos no capturados de las fig. 19, 20 y 21 corresponden a las muestras que contenían 25 mM y 40 mM de inductor (incisos C y D), lo que nos dice que aunque fueron excluidos del análisis, es claro que a mayor concentración de inductor mayor es la producción de GFP. Esto implica que el procesamiento digital de imágenes podría ser una alternativa viable para comparar fluorescencias si se carece de espectrofotómetro para medir la absorbancia y puede resultar útil para arrojar resultados preliminares, o como método de comprobación secundario si se mejora el método de captura de datos, utilizando un formato cuyo grado de compresión sea menor, como TIFF o BMP.

El análisis estadístico utilizado también resulto ser adecuado debido a la distribución de datos de las muestras, ya que claramente al observar los histogramas de las fig. 22, 23, y 24 se observa que las muestras no tienen una distribución normal, si no una con un claro sesgo a hacia los valores con menor intensidad, esto se debe a que la mayor parte de las imágenes presentan un fondo negro, cuyo valor es cercano al 0, y aunque el método de ajuste suprimió todos los valores correspondientes al

fondo, que se encontraban entre los rangos 0 y 14 de la tabla de observaciones, algunos valores que presentan fluorescencia muy tenue formaron parte del análisis y los datos que presentaron una sobresaturación de fluorescencia representan la minoría de los datos. Otro aspecto notable es que las muestras con mayor cantidad de inductor (fig.22D, 23D y 24D) presentaron la mayor cantidad de valores donde hay fluorescencia.

De los valores obtenidos en la tabla 2, podemos notar que existen algunos patrones relacionados con el tiempo. Cuando se compararon las muestras que tenían 0 mM de inductor a los 5 y 60 minutos posteriores a la inducción se observó que existen diferencias significativas debido solo a la producción basal de cAMP, pero cuando se compararon las muestras con 0 mM de inductor a los 5 y 30 minutos posteriores a la inducción, no se observaron diferencias significativas, lo mismo ocurrió cuando se compararon las muestras con 0 mM de inductor a los 30 y 60 minutos posteriores a la inducción. Este dato es importante para determinar el tiempo de vida medio que tiene el sistema para generar una respuesta confiable cuando no hay inducción o la inducción es muy débil, que es menor a los 30 minutos posteriores a la inducción, antes de que la producción basal de cAMP sea lo suficientemente significativa para generar un falso positivo. En las muestras que contenían 25 mM de inductor se observó el mismo patrón, existen diferencias significativas cuando se compararon muestras a los 5 y 60 minutos posteriores a la inducción, pero no se encontraron diferencias cuando se compararon a los 5 y 30 minutos posteriores a la inducción ni a los 30 y 60 minutos posteriores a la inducción. También se observó que cuando se compararon las muestras a los 60 minutos posteriores a la inducción con 0 mM y 25 mM de inductor no existen diferencias significativas y tampoco existen diferencias significativas cuando se compararon a los 5 y 30 minutos posteriores a la inducción.

Donde se observaron diferencias significativas fue cuando se compararon a las muestras a los 30 minutos posteriores a la inducción con 25 mM de inductor y a los 5 minutos posteriores a la inducción con 0 mM de inductor, así como en las muestras a los 60 minutos posteriores a la inducción con 25 mM de inductor y los 5 y 30 minutos posteriores a la inducción con 0 mM de inductor. Esto es importante por que nos dice el intervalo de tiempo en el que podemos tomar una muestra confiable cuando existe una inducción significativamente superior a la basal, que es un periodo entre los 5 y 60 minutos.

De tal manera que si solo existe inducción basal, basta un periodo de media hora para determinar que la muestra no presenta inducción alguna y si hay inducción de la actividad se vea una diferencia a los 30 minutos posteriores a la inducción y se tiene un periodo menor a una hora para poder obtener una muestra confiable. Esto es importante para cualquier tipo de implementación futura, ya que no solamente tienen que tomar en cuenta el tiempo de exposición y la toma de muestras, sino también para comprobar que la inducción se está generando es necesario compararla siempre con la inducción basal.

En resumen podemos concluir lo siguiente:

- El punto de saturación del sistema se encuentra entre los 25 y 40 mM de  $\text{HCO}_3^-$ . En este intervalo se da la expresión más significativa de GFP con respecto  $\text{HCO}_3^-$ . Si la inducción es menor a este punto la producción de GFP será lenta.
- Si la la inducción es menor al punto de saturación, se requiere de un tiempo mayor a 60 minutos para observar una saturación completa del medio. Si la inducción es mayor al punto de saturación se puede observar una saturación completa del medio en un intervalo de entre 5 y 30 minutos.
- Siempre va a existir una producción basal de GFP, que es independiente a la concentración de  $\text{HCO}_3^-$ , sin embargo esta producción basal será menor que una la producción por inducción. Esto es importante para determinar los menores niveles de fluorescencia y determinar ruido o falsos positivos.
- A mayor punto de saturación de la muestra, menor es el tiempo en el que se presenta una inducción y mayor es el tiempo en el que se satura la muestra. Esto puede ser utilizado para la determinación de  $\text{CO}_2$  ambiental.

## 8. Perspectivas

### 8.1 Perspectivas para futuros trabajos

De los resultados podemos delimitar que el punto de saturación de  $\text{HCO}_3^-$  del sistema BBa\_K872001 se encuentra entre los 25 mM y 40 mM de  $\text{NaHCO}_3$  sin embargo no sabemos con exactitud en donde se encuentra este punto, por lo que es necesario realizar más pruebas con cantidades de inductor dentro de este rango. De la misma manera, sabemos que la saturación de GFP se da en un tiempo entre los 5 y 30 minutos, una vez determinado el punto de saturación de  $\text{HCO}_3^-$  es necesario saber el tiempo que le toma al sistema saturarse por completo. Estos son factores críticos para determinar los rangos en los que el biosensor funciona y poderlo relacionar con la cantidad de  $\text{CO}_2$  en el ambiente.

También es necesario probar *in vivo* el biosensor para observar si este puede ser inducido solamente por las condiciones ambientales y en que tiempo se da esta inducción. El modelo señala que sin importar la cantidad de  $\text{HCO}_3^-$  la inducción se da hasta la saturación, pero debido a la enorme diferencia que existe entre la cantidad de  $\text{CO}_2$  y la del medio intracelular, es posible que la inducción sea muy lenta, o muy baja o las dos, lo cual podría confundirse con ruido ambiental o con falsos positivos por la activación independiente de pCaiF. Estas pruebas no sólo confirmarían la viabilidad del biosensor, si no que ayudarían a mejorarlo para futuras aplicaciones. La fig. 27 muestra una posible implementación *in vivo* del sistema propuesto.

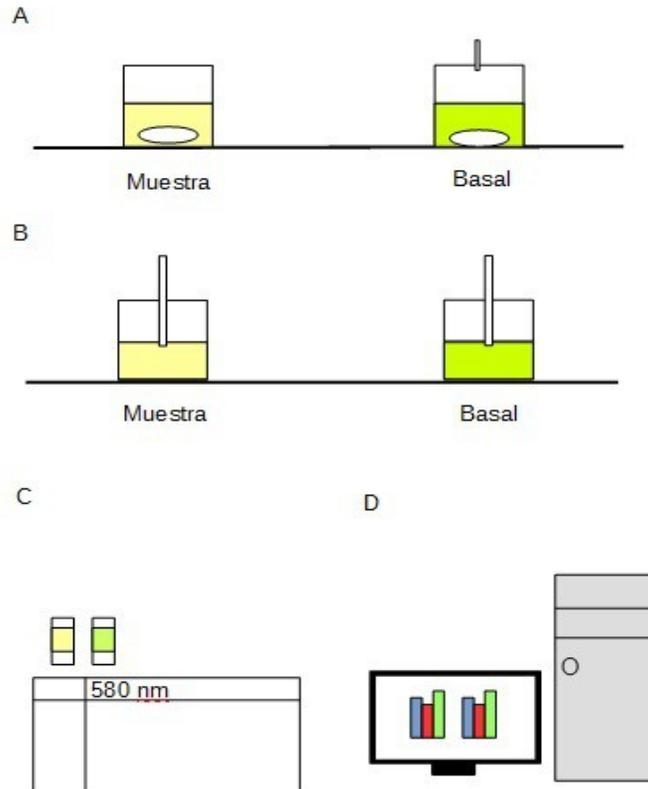


Fig. 27. Implementación del biosensor, A) Se elaboran dos dispositivos de los cuales uno funciona como muestra, al que se debe de permitir la entrada de aire, y otro basal, que permite la salida de gas pero no su ingreso con la finalidad de determinar cual es el estado de activación mínimo del sistema. B) Toma de muestras tanto del dispositivo muestra como del dispositivo basal, las muestras se deben de tomar de manera rápida y no se debe de efectuar un recambio en el medio, también las muestras se deben de tomar a intervalos de tiempo regulares. C) Cuantificación de las muestras por método de espectrometría, a 580 nm para detectar la presencia de GFP. D) Análisis de la muestra, se comparan los datos obtenidos de la muestra con el de la basal, y se detectan diferencias por una prueba de chi-cuadrada, considerando la basal como la muestra esperada y la muestra como obtenida.

## 8.2 Perspectiva sobre biorremediación del aire

Una de las potenciales ventajas que un biosensor tiene sobre un sensor mecánico es la posibilidad de retirar los contaminantes del ambiente mediante la modificación o integración de nuevas rutas metabólicas. Como se ha mencionado anteriormente, esto se ha hecho principalmente con metales pesados acumulándolos dentro de los organismos, en un proceso que han denominado bioacumulación.

Estos métodos sólo se han podido aplicar en para la biorremediación de agua y suelo, pero su aplicación al medio aéreo resulta problemático por los siguientes factores:

- La concentración de contaminantes en el aire es de varios ordenes de magnitud menor a los de medios como el agua o el suelo por la inmensa cantidad de volumen del medio.
- Los contaminantes se dispersan con mayor facilidad en el aire que en el agua o el suelo por la menor densidad del aire, limitando su capacidad de segmentación para un tratamiento mas efectivo.

Debido a la difusión y la concentración del  $\text{CO}_2$ , es necesario que se utilicen enormes volúmenes de biomasa para que se pueda acumular contaminantes de manera significativa o por otra parte, organismos capaces de metabolizar enormes cantidades de contaminantes de la manera más eficiente posible. Los organismos fotosintéticos son los únicos capaces de llevar este proceso a cabo. De hecho la asimilación de  $\text{CO}_2$  es necesaria para la generación de moléculas energéticas, que se realiza en el ciclo de Calvin, ruta metabólica encargada de la fijación del  $\text{CO}_2$ , llamado también metabolismo  $\text{C}_3$  y se ha comprobado que mientras mayor sea la concentración de  $\text{CO}_2$ , en el ambiente, mayor es el crecimiento de dichos organismos (Rainer, 2006).

En el caso de  $\text{CO}_2$  como contaminante del aire es importante recordar que este es una molécula integral en la regulación de la temperatura y en los ciclos biogeoquímicos y es su presencia excesiva en el medio es lo que lo convierte en contaminante. El objetivo de una biorremediación de  $\text{CO}_2$  no es eliminarlo por completo del aire, si no reducir su cantidad a niveles no contaminantes.

Pero uno de los problemas más grandes que presentan los organismos fotosintéticos para la acumulación de  $\text{CO}_2$  es la baja eficiencia de este proceso. La enzima encargada de la fijación del  $\text{CO}_2$  en los organismos fotosintéticos es la ribulosa bifosfato carboxilasa/oxigenasa (RuBisCO), y puede fijar  $\text{CO}_2$  y  $\text{O}_2$ . El  $\text{O}_2$  un inhibidor competitivo del  $\text{CO}_2$  para la RuBisCO y ya que el  $\text{O}_2$  se encuentra en mayor cantidad en la atmósfera y tiene mayor afinidad por la RuBisCO que el  $\text{CO}_2$ , los organismos fotosintéticos tiendan a fijar con mayor frecuencia  $\text{O}_2$  y expulsar  $\text{CO}_2$ . Este proceso es llamado fotorrespiración y se estima que la fijación de  $\text{CO}_2$  se reduce entre 30 y 50% debido a este fenómeno (Raines, 2006).

De acuerdo con Raines (2006) se ha intentado aumentar la eficiencia de la acumulación de CO<sub>2</sub> en organismos fotosintéticos utilizando los siguientes enfoques:

- Modificación de la enzima mediante mutagénesis dirigida. Se sustituyeron de aminoácidos en el sitio catalítico de la subunidad grande de la RuBisCO con la finalidad de aumentar la afinidad de esta enzima por el CO<sub>2</sub>, modificando las propiedades catalíticas de la enzima, pero como resultado disminuyeron la afinidad de la enzima por el CO<sub>2</sub>, produciendo enzimas con menor eficiencia a las presentes en estado natural. También se han intentado técnicas de mutagénesis aleatoria, estas aproximaciones tampoco han logrado el mejoramiento de la RuBisCO,
- Introducción de diferentes variedades de RuBisCO en plantas. Se introdujeron variedades de RuBisCO con una mayor afinidad por el CO<sub>2</sub>, provenientes de algas rojas como *Galdiera partita* y *Cyanidium caldarium*, en plantas de tabaco y aunque niveles significativos de la enzima fueron detectados, su actividad no es evidente debido a la falta de chaperoninas requeridas para el ensamblaje de la RuBisCO proveniente de las algas rojas. Se han detectado variedades de RuBisCO con mayor afinidad en organismos que crecen en ambientes áridos, con temperaturas elevadas o salinos, pero se desconoce la eficiencia en la carboxilación de la enzima, por lo que no es seguro que la introducción de estas variedades aumente la fijación del CO<sub>2</sub>, en los organismos blanco. Por otro lado también se ha observado que las variedades de RuBisCO encontradas en las plantas de cultivos, que generalmente son los organismos blanco, se encuentran entre las variedades más eficientes de esta enzima.
- Manipulación genética del ciclo metabólico de la fotorrespiración. Aunque la fotorrespiración tiene un impacto negativo en la fijación del CO<sub>2</sub> atmosférico, se cree necesario para la viabilidad de las plantas en ambientes oxigénicos, pues se ha observado que organismos con mutaciones en que inhiben el metabolismo de la fotorrespiración son incapaces de crecer en medios oxigénicos y solo son capaces de crecer en medios con altas concentraciones de CO<sub>2</sub>, por lo que la manipulación genética del mecanismo de la fotorrespiración parece que no incrementa la fijación del CO<sub>2</sub> si no que disminuye la viabilidad de las plantas.
- Introducción de mecanismos de concentración de CO<sub>2</sub> en plantas. Se intentó expresar enzimas del metabolismo C<sub>4</sub> en plantas carentes de anatomía Kranz, con la perspectiva de que los mecanismos metabólicos de concentración de CO<sub>2</sub> fueran suficientes para aumentar la tasa de fijación de CO<sub>2</sub>, sin embargo lo que se observó es que en las plantas que expresan estas enzimas

no hay aumento en la actividad fotosintética, y en algunos casos se disminuyó la actividad fotosintética a tal grado que las plantas presentaron alteraciones fisiológicas como blanqueamiento en las hojas o crecimiento interrumpido. Sin embargo, la sobreexpresión de enzimas encargadas de la concentración de  $\text{CO}_2$  como la fosfoenol piruvato carboxilasa (PEPC) en organismos que presentan anatomía Kranz aumenta la absorción de  $\text{CO}_2$ .

Aunque ninguno de estos enfoques produjo un resultado positivo o significativo, se pueden extraer conclusiones que son importantes para trabajos posteriores y analizar diferentes enfoques que puedan dar algunos resultados positivos. Dos de las conclusiones que podemos sacar de estos trabajos es que la manipulación directa de la RuBisCO y del metabolismo de la fotorrespiración disminuyen la actividad fotosintética y la acumulación de  $\text{CO}_2$  no es una cuestión que dependa únicamente del metabolismo, si no que es dependiente de factores fisiológicos.

Algunas plantas presentan una adaptación fisiológica que aumenta la eficiencia de la RuBisCO, un tipo de anatomía especial llamada anatomía Kranz (fig. 28) en la que también se encuentra una ruta de fijación de carbono llamado metabolismo  $\text{C}_4$ . En plantas con anatomía Kranz la captura del  $\text{CO}_2$  se realiza en células especializadas llamadas células de mesófilo y la fijación del  $\text{CO}_2$  se efectúa en otro tipo de células llamadas células de la vaina. El transporte y la fijación del carbono se da en dos partes, la primera en las células del mesófilo, mediante la formación de ácido oxaloacético producto de la catálisis de bicarbonato y fosfoenol piruvato realizada por la enzima fosfoenol piruvato carboxilasa (PEPC), este posteriormente es convertido a malato y pasa a las células de la vaina, donde es descarboxilado, liberando  $\text{CO}_2$  que es tomado por la RuBisCO para su fijación final en moléculas de en glucosa, producto del metabolismo  $\text{C}_3$ . Este proceso impide que el oxígeno y la RuBisCO se combinen, y aumenta la concentración de  $\text{CO}_2$  en las células de la vaina, inhibiendo así los efectos de la fotorrespiración aumentando la eficiencia de este proceso.

Raines (2006) señala que en altas concentraciones de  $\text{CO}_2$  el factor limitante de la fotosíntesis no es la actividad de la RuBisCO, si no la regeneración de su sustrato, la ribulosa bifosfato (RuBP), que es el producto del ciclo de Calvin. También se ha encontrado que algunas especies que crecen en ambientes con altas concentraciones de  $\text{CO}_2$  la concentración de RuBisCO disminuye, y en plantas transgénicas que presentan una reducción del 30% en la concentración de RuBisCO, pero que crecen en

concentraciones de 1000 ppm de CO<sub>2</sub>, mostraron un incremento en la tasa de asimilación de CO<sub>2</sub>.

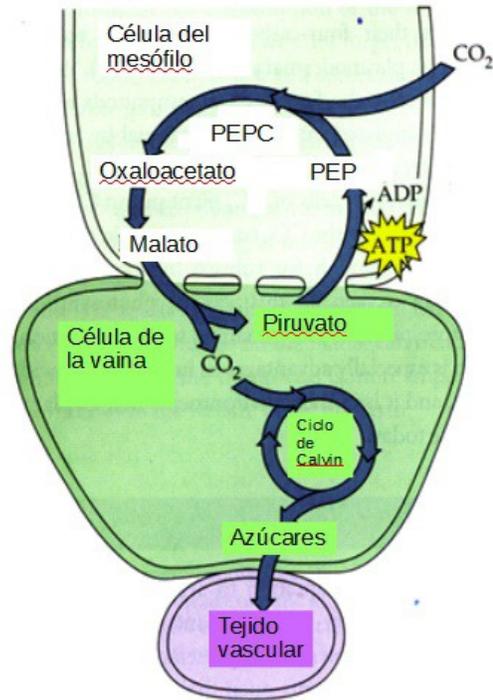


Fig. 28. Anatomía Kranz y metabolismo C<sub>4</sub> simplificado. Modificado de Mathews *et al* 2000.

El análisis de plantas transgénicas con alteraciones en los niveles de enzimas involucradas en la regeneración de RuBP, permitieron determinar que tres enzimas son las limitantes en su regeneración: la seduheptulosa 1-7 bifosfatasa (SBPasa), la aldolasa y la transacetolasa, y la sobre expresión de estas enzimas pueden aumentar la tasa de fijación de CO<sub>2</sub>, cuando los organismos se encuentran altas concentraciones de CO<sub>2</sub> ambiental (Raines, 2006).

Si podemos crear organismos transgénicos con una mayor tasa de fijación de CO<sub>2</sub>, estos podrían utilizarse para la biorremediación del aire de manera más eficiente que organismos silvestres. Una posibilidad es utilizar organismos con anatomía Kranz para expresar enzimas encargadas de la concentración de CO<sub>2</sub> y la regeneración de RuBP con la finalidad de incrementar la fijación de CO<sub>2</sub>.

Como se mencionó anteriormente los organismos con anatomía Kranz separan la absorción y la fijación del CO<sub>2</sub> en dos tipos de células distintas, las células del mesófilo, encargadas de la absorción

del CO<sub>2</sub> y con una baja concentración de CO<sub>2</sub>, y las células de la vaina, encargadas de la fijación del CO<sub>2</sub> y con una alta concentración alta de CO<sub>2</sub>. La diferencia en la concentración de CO<sub>2</sub>, así como la presencia de metabolitos específicos presentes en las células de la vaina y las células del mesófilo son elementos que pueden utilizarse como moduladores para la regulación de un plásmido que exprese proteínas distintas dependiendo de estos elementos, de tal manera que las proteínas que se expresarían en las células del mesófilo donde la concentración de CO<sub>2</sub> es menor aumenten su capacidad de transportarlo a las células de la vaina, y las proteínas que se expresan en las células de la vaina, donde la concentración de CO<sub>2</sub> es mayor, promuevan la regeneración de RuBP, aumentando así el proceso de fijación de carbono.

La bioparte Bba\_K872001 se activa en condiciones donde HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> esta presente en altas concentraciones. Esta podría funcionar como regulador del plásmido en las células del mesófilo, mientras que su activación en las células de la vaina sería basal o no significativa.

Por otra parte es necesario complementarlo con un sistema que opere en bajas concentraciones de CO<sub>2</sub>. Kusian *et al* (1997) reportó que el promotor *cbbR* del operón *cbb* de algunas bacterias fotótótrofas se activa cuando la concentración de CO<sub>2</sub> son bajas (menores al 5% en medio intracelular) y cuando hay moléculas donantes de electrones. Si se caracterizara este promotor y se estandarizara se podría generar una bioparte que funcionaria como la regulación opuesta de la bioparte que se presento en este trabajo.

El operón *cbb* es el encargado de regular la expresión de genes encargados de la fijación de CO<sub>2</sub> en diversos organismos, incluyendo bacterias púrpuras sulfurosas y no sulfurosas, bacterias quimioautótrofas marinas y de agua dulce, cianobacterias y bacterias metilotróficas (Dangel y Tabita, 2015). Este operón es regulado por CbbR, una proteína de entre 300 y 330 residuos de aminoácidos, que actúa como regulador transcripcional del tipo LysR. Esta forma dímeros que se unen en dos regiones promotoras del operón *cbb* separadas por 20 pares de bases, formando un tetrámero compuesto de dímeros (Dangel y Tabita, 2015).

Una vez formado el complejo CbbR-promotor, ocurre un cambio conformacional en el complejo que pliega el DNA en un angulo que permite la activación de la transcripción (fig.29). Dangel

y Tabita (2015) señalan que existen diferentes moléculas que funcionan como efectoras, dentro de las cuales destacan RuBP, que funciona como efector universal y PEP, que en el caso de *R. sphaeroides* y *R. capsulatum* funciona como efector mientras que en *R. eutropha* y *R. palustris* funciona como represor.

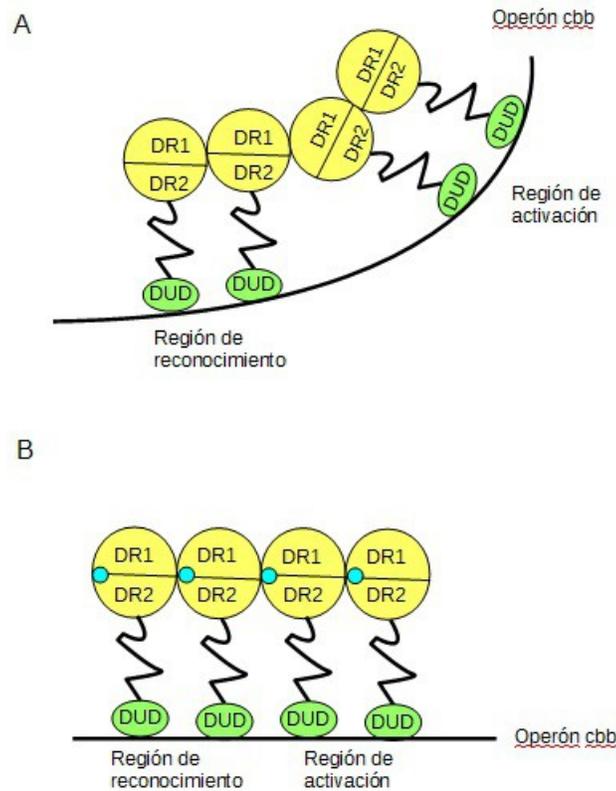


Fig. 29. Funcionamiento del promotor *cbb*. A) Promotor unido a la secuencia de reconocimiento y de activación en la región río arriba del operón *cbb* sin el activador; en este estado la secuencia genética se encuentra plegada lo que impide que la maquinaria transcripcional se una a la secuencia. B) Promotor unido a la secuencia de reconocimiento y activación en la región río arriba del operón *cbb* con el activador; en este estado el activador modifica los dominios de reconocimiento DR1 y DR2 regresando la secuencia genética a un estado con un plegamiento menor, lo que permite a la maquinaria transcripcional unirse a la secuencia.

Este promotor puede ser utilizado para la expresión de proteínas en las células de la vaina, utilizando la concentración de  $\text{CO}_2$  y la presencia de moléculas que funcionan como efectores producto del ciclo de Calvin, como RuBP, y si se utilizan secuencias provenientes de organismos como *R. eutropha* o *R. palustris* en los cuales la presencia de PEP actúa como represor de *cbb*, podemos generar

un ciclo activación-represión dependiente de pocos metabolitos que se encuentran en condiciones excluyentes. La fig. 30 muestra como sería el sistema hipotético y su regulación.

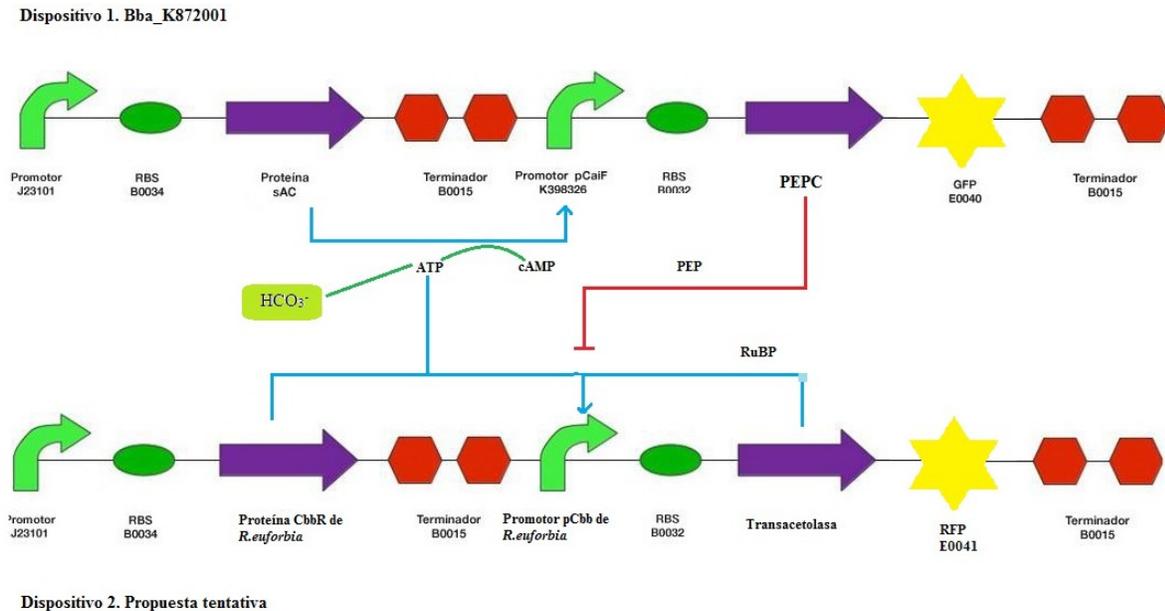


Fig. 30. Sistema tentativo de regulación doble para implementación en plantas. El dispositivo 1 (parte superior) corresponde al sistema Bba\_K872001 que se diseñó en el presente trabajo, al cual se le añadió la proteína PEPC (fosfoenol piruvato carboxilasa). El dispositivo 2 (parte inferior) corresponde a una propuesta tentativa utilizando los genes del operón *cbb*.

El funcionamiento del sistema se da de la siguiente manera:

En las células del mesófilo:

- Se expresan los dos promotores constitutivos, por lo que hay producción de sAC y CbbR.
- Si existe una alta disponibilidad de  $\text{HCO}_3^-$  en el medio, sAC se activa convirtiendo ATP en cAMP, lo cual promueve la activación de pCaiF.
- pcaiF promueve la expresión de la enzima fosfoenol piruvato carboxilasa (PEPC) que es la encargada de convertir el fosfoenol piruvato (PEP) a oxaloacetato, utilizando  $\text{HCO}_3^-$ . Este es el paso limitante del metabolismo  $\text{C}_4$  que da la primera fijación de  $\text{CO}_2$  en las células del mesófilo.
- CbbR se une al promotor pcbb, pero la presencia de fosfoenol piruvato actúa como represor y la falta de ribosa 1,5 bifosfato (RuBP) que es la molécula activadora, inhiben la transcripción de la transacetolasa.
- La molécula reportera que se expresa es GFP, y en el medio debe de estar presente fosfoenol

piruvato, así como cAMP

En las células de la vaina.

- Se expresan los dos promotores constitutivos, por lo que hay producción de sAC y CbbR.
- Si no hay disponibilidad de  $\text{HCO}_3^-$  la expresión de pCaiF se dará de forma basal o de manera limitada.
- PcaiF promueve la expresión a niveles basales de PEPC, sin embargo no se encuentra presente el sustrato de la enzima.
- CbbR se une al promotor pcbb, activando la transcripción de la transacetolasa por la presencia de ATP y RuBP. La transacetolasa es una de las enzimas encargadas de la regeneración de RuBP, paso limitante en el metabolismo C3.
- La molécula reportera que se expresa es RFP, con una expresión basal de GFP, y en el medio debe de estar presente RuBP y ATP.

Pero para que esta propuesta sea viable se necesita de algunos trabajos previos

1. Caracterización y estandarización de pcbb y CbbR. Aunque ya existen trabajos *in vitro* sobre la regulación metabólica del operón cbb (Kusian *et al*, 1997; Dangel y Tabita, 2015) y es un operón con amplia presencia en organismos autótrofos, es recomendable la extracción y estandarización del promotor y del regulador para conocer cual es su actividad en un organismos como *E.coli* y si la regulación en un organismo modelo es similar a la que presentan los organismos en su estado silvestre, viendo la expresión de un gen reportero.
2. Ligación con la bioparte existente. Ya que se tiene la bioparte estandarizada y probada, podemos ligarla con Bba\_K872001 y tratar de obtener las dos respuestas de manera independiente, observar si hay interferencia o activaciones resultantes de falsos positivos.
3. Análisis y adecuación del sistema en el metabolismo de plantas. Debido a que las biopartes utilizan genes altamente regulados por los organismos autótrofos y varias de las moléculas que utiliza el sistema se encuentran presentes en organismos superiores, es necesario conocer si la red metabólica de las células vegetales no interfiere con la actividad del plásmido, y de ser así que clase de interferencia podríamos esperar, y si el sistema es viable en organismos superiores donde los procesos ocurren en una escala y complejidad mayores. Además de las adecuaciones

que se deben de hacer a las mismas biopartes, el cambio de esqueleto plasmidico, ajuste de codones preferenciales, cambio de vector de transformación, integraciones de genes para que se desean probar, agregar patrones de metilación para evitar degradación, y viabilidad energética.

Esta propuesta excede los límites de este trabajo, y para probar su funcionalidad se requiere de un trabajo a mayor escala y un diseño del sistema más cuidadoso debido a los múltiples factores que intervienen en la regulación genética de organismos más complejos, por lo que se vuelve indispensable que antes de empezar a explorar las posibilidades *in vitro* se realice un análisis *in silico* utilizando un modelo matemático que toma en cuenta la dinámica del sistema como un todo y no lo reduce a solo los componentes esenciales.

El enfoque de la biología sintética, que trata de integrar funciones a sistemas más complejos mediante el uso de herramientas como la teoría de sistemas puede ser de gran utilidad por su naturaleza interdisciplinaria, en la que biólogos y matemáticos manejan un lenguaje común y les permita colaborar en propuestas de este tipo. Esta integración y normalización de términos es la que yo considero más importante de la biología sintética y que cada vez se vuelve más necesaria para abordar proyectos como el que se elaboró en este trabajo y futuros trabajos que puedan derivar de este.

## 9. Conclusiones

Fue posible diseñar y construir un plásmido (Bba\_K872001) mediante el cual células de *E.coli* fueran capaces de detectar concentraciones de  $\text{HCO}_3^-$  y producir GFP como respuesta utilizando herramientas de la biología sintética. Esta construcción podría utilizarse para la medición indirecta de  $\text{CO}_2$  debido a la interconversión que ocurre cuando se precipita en agua formando  $\text{HCO}_3^-$ .

En este sistema la producción de GFP es baja cuando la concentración de  $\text{HCO}_3^-$  es baja, en el punto de saturación de  $\text{HCO}_3^-$  la producción de GFP se vuelve exponencial.

El punto de saturación del sistema se encuentra entre los 25 y 40 mM de  $\text{HCO}_3^-$ , si la cantidad de inductor es menor a la del punto de saturación se requiere de un tiempo mayor a 60 minutos para observar la saturación completa de GFP. Si la cantidad de inductor es mayor o igual al punto de saturación, la expresión de GFP se da en un tiempo entre los 5 y 30 minutos.

En este sistema, siempre va a existir una producción basal de GFP, que es independiente a la función de  $\text{HCO}_3^-$ , sin embargo esta producción basal será menor que una la producción por inducción. Esto es importante para determinar los menores niveles de fluorescencia y determinar ruido o falsos positivos.

Fue posible modelar el sistema utilizando ecuaciones diferenciales, se determinó la relación de GFP con respecto  $\text{HCO}_3^-$ , como una relación exponencial en donde hay inducción hasta el punto de saturación. Sin importar la cantidad de  $\text{HCO}_3^-$  el sistema llegara a la saturación. El punto de saturación de  $\text{HCO}_3^-$  representa el punto de inflexión de este sistema pero no afecta su dinámica. Esto concuerda con las observaciones obtenidas por microscopia de fluorescencia.

Son necesarios trabajos posteriores para determinar el punto de saturación de  $\text{HCO}_3^-$  y analizar el tiempo que le toma al sistema llegar a la saturación de GFP. Es necesario realizar más pruebas con concentraciones de inductor en el rango de 25 mM y 40 mM y analizar más muestras con diferentes concentraciones de inductor entre 5 y 30 minutos posteriores a la inducción. A su vez, es necesario probar el biosensor *in vivo* para determinar si la inducción es suficiente para generar una respuesta.

## 10. Referencias

Abramoff, M.D., Magalhaes, P.J., Ram, S.J. 2004. *Image Processing with ImageJ*. Biophotonics International, vol 11:7, pp. 36-42.

Adrianantoandro, E., Baso, S., Karig, D., Weiss, R. 2006. *Synthetic biology: new engineering rules for an emerging discipline*. Molecular systems biology 16. 2006.0028

Benitez, G., y A. López. 2012. 2012 *Global Synthetic Biology Technology Surveillance Report*. Asociación Mexicana de Biología Sintética. México. Pp: 45-57

Benner, S. A., y A. M. Sismour. 2005. *Synthetic biology*. Nature Reviews Genetics. Vol. 3 533-543.

Berkley, 2006. Addressable Bacterial Communication. En <http://2006.igem.org/wiki/index.php/Berkeley>. Consultado en febrero 2014.

Bernal, V., González-Veracruz, M., Cánovas, M., Ibarra, J. L. 2007. *Plasmid maintenance and physiology of a genetical engineered Escherichia coli strain during continous L-carnitine production*. Biotechnology Letters 29: 1549-1556

Botré, C., y F. Botré. 1990. *Determination of a Carbonic Anhydrase Activity by a pCO<sub>2</sub> Sensor*. Analytical Biochemistry 185. 254-264

Boyle, P.M y P. A Silver. 2009. *Harnessing nature's toolbox:regulatory elements for synthetic biology*. Journal of the Royal Society Interface. Vol 6 S535-S546

Buchet, A., Nasser, W., Eichler, K., Mandrand-Berthelot, M. 1999. *Positive co-regulation of the Escherichia coli carnitine pathway cai and fixoperons by CRP and the CaiF activator*. Molecular microbiology 34 (3) 562-575

Buck, J., Sinclair, M. L., Schapal, L., Cann, M. J., Levin, L. R. 1999. *Cytosolic adenylyl cyclase*

*defines a unique signaling molecule in mammals*. Procedures of the Natural Academy of Sciences Vol. 96 pp: 79-84

Buck, J., y L. Levin. 2011. *Physiological sensing of carbon dioxide/ bicarbonate/ pH/ via cyclic nucleotide signaling*. Sensors (11): 2112-2128.

Cammaroto, C., Diliberto, L., Ferralis, M., Manca, R., Soma, A., Giordano, M. 1998. *Use of carbonic anhydrase in electrochemical biosensor for dissolved CO<sub>2</sub>*. Sensors and Actuators B 28: 439-447.

Castillo, J., Gáspar, S., Leth, S., Niculescu, M., Mortari, A., Bontidean, I., Soukharev, V., Dorneanu, S.A., Ryabov, A.D., Csöregi, E. 2004. *Biosensors for life quality, desing development and applications*. Sensors and actuatirs B 102: 179-194

Chaloupka, J. A., Bullock, S. A., Iourgenk, V., Levin, L. R., Buck, Jochen. 2006. *Autoinhibitory regulation of soluble Adenylyl cyclase*. Molecular reproduction and Development 73: 361-368.

Chen, Y., Cann, M. J., Litvin, T. N., Iourgenko, V., Sinclair, M. L., Levin L. R., Buck, J. 2000. *Soluble Adenylyl Cyclase as an Evolutionary Conserved Bicarbonate Biosensor*. Science 289: 625 628

Cormack, B.P., Valdivia, R.H., y S. Falkow. 1996. *FACS-optimized mutants of green fluorescent protein (GFP)*. Gene 173: 33-38

Dangel AW, Tabita FR. 2015. *CbbR, the master regulator for microbial carbon dioxide fixation*. J Bacteriol 197:3488 –3498.

de la Fuente Colmenares, I. 2013. *Definición y caracterización en Biología Sintética y propuesta de una metodología estándar para la caracterización de biopartes*. Tesis de licenciatura. Universidad Nacional Autónoma de México.

Deen, M. J., Shinwary, M. W., Selvaganapathy, P. K. 2008. *Towards low-cost high-sensitivity integrated biosensors*. Procedures of the 26<sup>th</sup> international conference on microelectronics. Nis, Serbia

11 – 14 mayo de 2008

Dhakal, S. 2010. *GHG emissions from urbanization and oportunities for urban carbon mitigation*. Current opinion in enviromental sustainability. 2: 227-283

Eichler, K., Buchet, A., emke, R., Kleber, H. P., Mandrand-Berthelot, M. 1996. *Indentification and characterization of caiF gene encoding a potencial transcripcional activator of carnitine metabolism in Escherichia coli*. Journal of bacteriology 178 (5): 1248

Elowitz, MB., y Leibler S.A. 2000. *Synthetic Oscillatory Network of Transcriptional Regulators* Nature. Jan 20;403(6767):335-8

Friedlingstein, P e I.C. Prentice. 2010. *Carbon climate feedbacks. A review for model and observation based estimates*, Curren opinion in enviromental sustainability 2: 251-257.

Funahashi, A., Tanimura, N., Morohashi, M., Kitano, H. 2003. *CellDesigner: a process diagram editor for gene-regulatory and biochemical networks*. BIOSILICO, 1:159-162

Gilmour, K. M. 2010. *Perspectives on Carbonic Anhydrase*. Comparative biochemistry and physiology A 157: 193-197.

Hobom, B. (1980). Gene surgery: on the threshold of synthetic biology. Med. Klin. 75, 834-841

Hormiga, J., González-Alcón, C., Sevilla, A., Cánovas, M., Torres, N. V. 2010. *Quantitative analysis of the dinamic signaling pathway involved in the cAMP mediated induction of L-carnitine biosynthesis in E.coli cultures*. Molecular Biosystems 6: 699-710

Kanehisa, M. Y S. Goto. 2000. *KEGG: Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes*. Nucleic Acids Research. 28, 27-30

Kaznessis, Y. N. 2007. *Models for synthetic biology*. BMC Systems biology 1: 47-50

Kupriyanova, E. V., y N.A. Pronina, 2011. *Carbonic Anhydrase: Enzyme that has Transformed the Biosphere*. Russian Journal of Plant Physiology Vol. 58 No. 2 197-209.

Liang, J., Luo, Y., Zhao, Y. 2010. *Synthetic biology: putting synthesis into biology*. WIREs Reviews: Systems biology and Medicine Vol 3 7-20.

Malinova, V., Nallani, N., Meller, W.P., Sinner, E.K., 2012. *Synthetic biology inspired by synthetic chemistry*. FEBS Letters Vol. 586 (15) 2146-2156.

Mayfield, C.I. *Microbial systems*. En Handbook of ecotoxicology (Hoffman, D. J., Rattner, B. A., Burton Jr., G. Alden., Jr., John Cairnes editores). 2003. Lewis Publisher. E.U. Pp: 9-25.

Miller Jr., G. T. 2002. *Introducción a la Ciencia Ambiental desarrollo sostenible de la Tierra Un enfoque integrado*. 5° edición. Thomson. España. Pp: 435.

Minitab 17 Statistical Software (2010). [Computer software]. State College, PA: Minitab, Inc. (www.minitab.com)

Munday, P. L., McCormick, M. I., Nilson, G. E. Göron, E. 2012. *Impact of global warming and rising CO2 levels on coral reef fishes: what hope for the future?*. The Journal of experimental biology 215: 3865-3873.

Rawson, D. M. *Bioprobes and biosensors*. En Handbook of ecotoxicology (Hoffman, D. J., Rattner, B. A., Burton Jr., G. Alden., Jr., John Cairnes editores). 2003. Lewis Publisher. E.U. Pp: 428 – 437.

Roberts, R.J., Vincze, T., Posfai, J., Macelis, D. 2010. *REBASE--a database for DNA restriction and modification: enzymes, genes and genomes*. Nucleic Acids Research. 38: D234-D236.

Rodés, R., y M. Collazo. *Medición de la actividad fotosintética*. En Manual de prácticas de fotosíntesis (Ródes, R., y M. Collazo editores). 2006. 1° edición. Las prensas de ciencias. México. Pp: 71.

Sevilla, A., Cánovas, M., Keller, D., Reimers, S., Ibarra, J.L. 2007. *Impairing and monitoring glucose repression in L-carnitine biosynthesis*. *Biotechnology Programming* 23: 1286-1296

Sonnleitner, B. *Instrumentation of Biological Processes*. En Advances in biochemical engineering biotechnology 66. Bioanalysis and Biosensors for Bioprocess Monitoring (Scheper, T., y B, Sonnleitner editores). 2000. Springer-Verlag. E.U. Pp: 3-64

Steebhorn, C., Litvin, T. N., Levin, L R., Buck, J., Wu, H. 2005. *Bicarbonate activation of adenylyl cyclase via promotion of catalytic active site closure and metal recruitment*. *Nature structural and molecular biology*. Vol. 12 No. 1

Sternberg, Stanley 1983. *Biomedical Image Processing*, IEEE Computer.

The iGEM Foundation. 2003. *Registry of Standard Biological Parts*. En [http://parts.igem.org/Main\\_Page](http://parts.igem.org/Main_Page). Consultado en febrero 2014.

Tresguerres, M., Buck, J., Lonny, L. R. 2010. *Physiological carbon dioxide, bicarbonate and pH sensing*. *Pflungers Archives European Journal of Physiology* 460: 953-964.

TU\_Delft 2010. Alkanivore. Enabling hydrocarbon degradation in aqueous environments. En [http://2010.igem.org/Team:TU\\_Delft#page=Home](http://2010.igem.org/Team:TU_Delft#page=Home). Consultado en febrero 2014

University of Edinburgh. Biosensor that can detect detect several different concentrations of arsenic and emit a pH signal in response. En [http://2006.igem.org/wiki/index.php/University\\_of\\_Edinburgh\\_2006](http://2006.igem.org/wiki/index.php/University_of_Edinburgh_2006). Consultado en febrero 2014

Vilee, C. A. 1997. *Biología*. 8° edición. McGraw Hill. México. Pp: 839

Villela, A. *Contaminación atmosférica*. En Educación para la sustentabilidad ambiental una perspectiva necesaria.(Almeida-Leñero, L., Nuñez, I., Barahona, A.). 2010. 1° edición. Las prensas de ciencias.

México. Pp: 147-152

Wayne-Davies, M. *ApE: A plasmid Editor*. En <http://biologylabs.utah.edu/jorgensen/wayned/ape/>. Consultado noviembre 2013.

Wellborn, A. 1988. *Air pollution and acid rain, the biological impact*. Longman scientific and technical. E.U. Pp: 1-22, 163.181.

Wolfram Research, Inc. 2008. *Mathematica, Version 7.0*, Champaign, IL

Xiaoli D., Stothard, P., Forsythe, I. J., Wishart, D. S. 2004. *PlasMapper: a web server for drawing and auto-annotating plasmid maps*. *Nucleic Acids Reseach* Jul 1;32 (Web Server issue):W660-4.

Zippin, J. H., Levin, L. R., Buck, J. 2001. *CO<sub>2</sub>/HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> responsive soluble adenylyl cyclase as a putative metabolic sensor*. *TRENDS in Endocrinology and Metabolism* Vol. 12 No. 8

Zurbrigger, M., Moor, A., Weber, W., 2012. *Plant and bacterial systems biology as plataform for plant synthetic bio(techno)logy*. *Journal of Biotechnology* Vol. 160 (1-2) 80-90.

## 11. Apéndices

### Apéndice 1. Secuencia que se obtuvo por método de síntesis

*La secuencia que se presenta a continuación esta seccionada en las diferentes biopartes que la componen, separadas por un número que hace referencia a la tabla posterior para facilitar su identificación. El número total de pb es de 2006*

(1)gaattc(2)tctaga(3)tttacagctagctcagtcctaggtattatgctagc(4)aaagaggagaaa(5)atgagcctatggaatgatttgcgattattttcactcttgcattatactcgtattcatttaattacaattcaaagccgctgatcagaactgattgctcggttgactttatttggagcttcaggcattagacgaaggaaaagaaatggaaaaagacatgcgcaaaatcgagctgttttagaaaatatttggccagcgcgatgttgcgaatatttcccttaaaagaaactgaaaggctgaattgtactcagaagctcgagataatgctgcaatagtattattacaactgaattgataaatttatatggaattggatgctaacaatgagggtgttgaatgtttacgacttctaatgagattatgccgactttgatatgcaactcagtcgtagatgattaaatgcattgaaaagatcaaaacaatctcgactacatatggcagcatcaggcttatttggtaaagtaaccggttattcacatgttgcgccgtgtattattgctattcgccttttagccctatacaatataatgaacattcgttaataattttaactttaggatagggcattaatgttgggtccgggtgtagcaggtgttattgggtgcaagaagccacattatgatatttggggtaactcggcaacgttgcagcagaatggatagtctgggtgtagcgggcaaaatacaataacggaagaaacgaaaatatcttagaaaaagaaggcttcgagttgaatgccgtggaataattaatgtaaaaggtaaaaggatgaagacatacttcattaagatcagaagaagactgaatttggatttaataagatctg(6)accaggcatcaataaaacgaaaggctcagtcgaaagactgggcctttcgtttatctgttgttgcggtgaaacgctctctactagagtcactggctcaccttgggtgggctttctgcgtttata(7)ggatcc(8)tactag(9)aagcaggatttagctcacacttatcgacggatgaaagttgcatactatcgata(8)tactag(10)agtcacacaggaaag(8)tactag(11)atgcgtaaaggagaagaacttttactggagttgtcccaattctgttgaaatagatggatgtaaatgggcacaaatttctgtcagtgagagggtgaaggatgcaacatacggaaaacttaccttaaatttattgcactactgaaaactacctgttccatggccaacactgtcactactttcgggtatgggtgtcaatgctttgcgagataccagatcatatgaaacagcatgacttttcaagagtgccatgcccgaaggttatgtacaggaaagaactatatttcaaaagatgacgggaactacaagacacgtgctgaagtcaagttgaaggatgatacccttgaatagaatcgagttaaaaggatttgaatttaagaagatggaaacattcttggacacaaattggaatacaactataactcacacaatgtatacatatggcagacaaacaaagaatggaatcaaagtaacttcaaaattagacacaacattgaagatggaaagcgttcaactagcagaccattatcaacaaaactccaattggcagatggcctgtcctttaccagacaaccattacctgtccacacaatgcctttcgaaagatcccaacgaaaagagagaccatggccttcttgagttgtaacagctgctgggattacacatggcatggatgaactatacaataataa(8)tactag(6)accaggcatcaataaaacgaaggctcagtcgaaagactgggcctttcgtttatctgttgttgcggtgaaacgctctctactagagtcacactggctcaccttgggtgggctttctcgtttata(12)actagt(13)ctgcag

No. en la secuencia	Tipo de parte	Parte	Catálogo	No. catalogo	Referencia
1	Sitio de restricción	EcoRI	REBASE	993	Roberts <i>et al</i> , 2010
2	Sitio de restricción	XbaI	REBASE	2126	Roberts <i>et al</i> , 2010
3	Promotor	Promotor de alta copia	RSBP	BBa_J23101	IGEM2006_ Berkley, 2006
4	Sitio de unión a ribosoma	Alta fuerza de unión	RSBP	BBa_B0034	Elowitz y Leibler, 2000
5	Proteína	sAC	KEGG	Bm1_53800	Kanehisa y Goto, 2000
6	Terminador	Terminador doble	RSBP	BBa_B0015	IGEM200 Berkley, 2006
7	Sitio de restricción	BamHI	REBASE	185	Roberts <i>et al</i> , 2010
8	Cicatriz de unión	XbaI -SpeI	-	-	-
9	Promotor	pCaiF	RSBP	BBa_K398326	TU_Delft, 2010
10	Sitio e unión a ribosoma	Fuerza de unión media	RSBP	BBa_B0032	Elowitz y Leibler, 2000
11	Proteína	GFP	RSBP	BBa_E0040	Cormack <i>et al</i> , 1996
12	Sitio de restricción	SpeI	REBASE	1717	Roberts <i>et al</i> , 2010
13	Sitio de restricción	PstI	REBASE	1536	Roberts <i>et al</i> , 2010

Tabla 3. Componentes de la secuencia obtenida mediante el método de síntesis. Siglas: KEGG: Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes. RSBP: Registry of Standard Biological Parts. REBASE: Restriction Enzyme Database. Casillas con “-” son referentes a que las partes no se encontraron en un catalogo en específico.

## Apéndice 2. Preparación de células quimiocompetentes.

1. Incubar una alícuota de células, en 2 mL de medio LB líquido 8 horas a 37°C con agitación constante a 250 rpm.
2. Con el preinoculo incubar 250 µL en 50 ml de medio LB fresco y crecer en agitación contante a 250 rpm a 37°C en promedio tres horas hasta alcanzar una densidad óptica aproximada de 0.4 a 600 nm.
3. Reposar el matraz en agua hielo 10 minutos.
4. Centrifugar 10 minutos a 4°C - 4,000 rpm.
- 5.- Decantar el sobrenadante dejando aproximadamente 1 mL y lavar con 25 mL de CaCl<sub>2</sub> 100 mM a 4°C.
- 6.- Incubar en hielo 20 minutos.
- 7.- Centrifugar 10 minutos a 4°C – 4,000 rpm
8. Decantar totalmente el sobrenadante, resuspender las células en 0.5 mL de CaCl<sub>2</sub> – glicerol 17%
9. Alicuotar de 50µl en tubos de polipropileno de 1.5 mL, congelar y guardar a -80°C.
10. Para probar la correcta preparación de las células se debe utilizar el protocolo de transformación insertando un gen reportero con concentración conocida y obteniendo resultados positivos.

### Apéndice 3. Transformación por choque térmico.

- 1.- En tubos limpios y estériles colocar una alícuota de 3-4  $\mu\text{L}$  del plásmido a transformar (stock).
  - 2.- Dar un *spin* para bajar cualquier gota que se haya adherido a la pared del tubo.
  - 3.- Descongelar las células competentes. El descongelamiento debe de ser rápido y se utiliza una alícuota por ensayo
  - 4.- Tomar con una pipeta el contenido total del tubo de células competentes y transferirlo al tubo que contiene el plásmido, mezclar de manera suave.
  - 5.- Incubar en hielo 20 min.
  - 6.- Prender el baño María y estabilizar en 42°C.
  - 7.- Someter a choque térmico en el baño María 90 segundos procurando solo sumergir la punta del tubo para evitar que el agua se filtre y contamine el contenido.
  - 8.- Inmediatamente regresar los tubos al hielo y esperar 2 min.
  - 9.- Agregar 300  $\mu\text{L}$  de medio LB estéril y pipetear muy suave.
  - 10.- Incubar a 37°C con agitación vigorosa a 150 rpm 90 minutos.
  - 11.- Tomar 100  $\mu\text{l}$  con pipeta y sembrar en cajas petri a temperatura ambiente con el antibiotico correspondiente al marcador de selección .
- Las cajas de siembra deben haber sido preparadas con las dosis correctas de antibiótico, el agar debe mostrar una consistencia firme, es común que si las cajas tienen mucho tiempo en refrigeración pierdan consistencia por lo que se deben revisar antes de comenzar el experimento.*
- 12.- Utilizar una haza de siembra distribuir de forma homogénea

#### Apéndice 4. Minipreparación de plásmidos

1. Dejar un inoculo de 12 horas (*overnight*) en tubos falcon en medio LB líquido con el antibiótico correspondiente al marcador de selección. .
2. Tomar 1 ml de cultivo celular y centrifugar 2 minutos a 11000 rpm. Descartar el sobrenadante con cuidado de no mover la pastilla formada..
3. Agregar 250 µL de Buffer P1 a 4°C con RNAsa A y resuspender la pastilla en vortex hasta que este completamente homogenizado
4. Agregar 250 µL de Buffer P2 mezclar por inversión 6 veces con cuidado y dejar la reacción durante 5 minutos. El color de la muestra cambia a azul.
5. Agregar 350 µL de Buffer N3, mezclar por inversion 6 veces, El color cambia de azul a transparente turbio.
6. Centrifugar a 13000 rpm 10 minutos.
7. Transferir sobrenadante a un columna de purificación.
8. Centrifugar a 13000 rpm durante 1 minuto. Descartar el eflujo.
9. Añadir 750 µL de Buffer PE con etanol.
10. Centrifugar a 13000 rpm durante 1 minuto. Descartar el eflujo.
11. Centrifugar a 13000 rpm durante 1 minuto.
12. Transferir la columna de purificación a un tubo polipropileno de 1.5 mL estéril.
13. Añadir 50 µl de dH<sub>2</sub>O. Dejar a temperatura ambiente durante 5 minutos.
14. Centrifugar a 13000 rpm durante 1 minuto. Descartar la columna de purificación.
15. Guardar el eflujo a -80°C

### Apéndice 5. Digestiones con enzimas de restricción

1. Tomar 250 ng del plásmido purificado a ser digerido y ajustar su volumen a 16  $\mu\text{L}$  con ddH<sub>2</sub>O.

*Se debe manejar los plásmidos y las enzimas en frío, sobre una charola con hielo*

2. Agregar 2.5  $\mu\text{L}$  de NEBuffer 2

3. Agregar 0.5  $\mu\text{L}$  de BSA

4. Agregar 0.5  $\mu\text{L}$  de EcoRI

5. Agregar 0.5  $\mu\text{L}$  de PstI

*El volumen final debe de ser de 20  $\mu\text{L}$*

6. Mezclar la reacción con ayuda de una pipeta

7.- Dar un spin rápido con ayuda de una centrifuga

8.- Dejar incubar la reacción a 37°C durante toda la noche

9.- Calentar la reacción en termoblock a 80°C durante 20 minutos

10. Realizar una electroforesis para comprobar que la digestión se realizo de manera exitosa

## Apéndice 6. Electroforesis en gel de agarosa y purificación de DNA

1. En 50 mL de Buffer TAE 1x (Tris 40 mM, ácido acético 20 mM, EDTA 1 mM) añadir 5 mg de agarosa.
2. En un horno de microondas calentar la mezcla en intervalos de 20 segundos hasta que la agarosa se encuentre totalmente fundida. Dejar enfriar unos minutos sin que se solidifique.
3. Armar el molde para el gel de agarosa procurando sellar las orillas del molde para evitar filtraciones y poner el peine antes del vaciado de la mezcla.
4. Vaciar la mezcla en el molde y esperar entre 20 y 30 minutos hasta que se solidifique
5. Armar la cámara de electroforesis con los pozos ubicados en el extremo negativo de la cámara.
6. Añadir Buffer TAE 1x a la cámara hasta que el gel quede totalmente cubierto. Dejar reposar unos minutos y retirar el peine con mucho cuidado de no dañar los pozos.
7. Añadir 10  $\mu$ L de cada una de las muestras en pozos distintos, Las muestras deben de estar mezcladas con buffer de carga para DNA 6x (30% glicerol, 0.25% azul de bromofenol) y GelRed 6x
- 8.- Cerrar la cámara de electroforesis, conectarlos los polos a la fuente de poder haciendo coincidir el polo negativo con la parte superior (donde se encuentran los pozos) y la positiva con la parte inferior.
- 9.- Prender la fuente de poder a 100 V durante 1 hora, hasta que distintas bandas sean visibles dentro del gel.
- 10.- Ubicar las bandas de interés en un transiluminador UV.
- 11.- Cortar con un bisturí, la banda de interés, este tiene que esterilizarse en alcohol previamente. Con mucho cuidado separamos el fragmento de agarosa que contiene el DNA y lo pasamos a un tubo polipropileno de 1.5 mL previamente pesado.
2. Pesamos el tubo de polipropileno de 1.5 mL y le restamos el peso del tubo vacío para tener únicamente el peso del fragmento de agarosa y agregamos Binding Buffer volumen 1:1 con respecto al peso del gel
3. Incubamos el tubo en el termoblock a una temperatura entre 50°C por 10 minutos, en este lapso de tiempo el gel debe disolverse perfectamente y adoptar un color amarillo pálido, esto indica que el PH es el óptimo si el color es anaranjado o violeta quiere decir que el PH es muy básico para corregir esta situación se debe adicionar 10  $\mu$ L de 3 M de acetato de sodio PH 5.2 y homogenizar cuidadosamente hasta obtener la mezcla en tono amarillo.
4. Transferir el contenido a una columna de purificación y centrifugar por un minuto, descartar el eflujo
5. Adicionar 700  $\mu$ L del Buffer de lavado, y centrifugar por un minuto, desechar los residuos nuevamente del tubo colector y repetir el mismo paso.

6. En este paso se debe transferir la columna con la membrana a un tubo polipropileno de 1.5 mL estéril, y eluir con 50  $\mu$ L del ddH<sub>2</sub>O, cualquiera que sea el líquido que se seleccione para eluir es necesario precalentar a 65°C por 10 minutos, dejar caer en el centro de la membrana los 50  $\mu$ L y reposar 6 minutos. Finalmente centrifugar 2 minutos a 16000 rpm.

## Apéndice 7. Ligación.

1. Se tomó una lectura en el nanodrop, el blanco que se utilizó fue agua ddH<sub>2</sub>O:

Inserto 9.4 ng/μL

Vector 10.5ng/μL

2. Se realizaron los siguientes cálculos para obtener el volumen en ng/μl que recomienda la hoja técnica del proveedor, como se detalla a continuación:

Concentración del Inserto = 9.4 ng/μL

Tamaño del inserto en pares de bases = 2006 pb

Tamaño del vector en pares de bases = 2070 pb

Proporción que deseo = 1:5 (uno de vector 5 de inserto)

Inserto (9.4 ng/μl) (2006 pb) = 18856.4

Vector (2070 pb) (5) = 10350

Cantidad de vector por inserto = 1.82 ng/μL

Hacemos el cálculo para diluir el vector a 1.82 ng/μL

1.73 μl de vector diluido en 10 μL

Aforamos 1.73 μL de vector en 10 μL de ddH<sub>2</sub>O para dejarlo en una concentración final de 1.82 ng/μL, para el mix de ligación tomo 1μL de vector y 1μL de inserto (sin diluir = 1.82 μL)

1.82 ng/μL \* 5 = 9.1ng/μL ≈ 9.4 ng/μL que es similar a la concentración del inserto sin diluir guardando una proporción 1:5 vector – inserto

Mix de ligación:

Vector de DNA _____	1μL
Inserto _____	1μL
10XT4 Ligasa Buffer _____	1μL
T4 DNA Ligasa _____	0.5μL
ddH <sub>2</sub> O _____	6.5μL
Total	10 μL

3. Hacer el mix de ligación un tubo de PCR y poner en termociclador con el siguiente programa:

1 hora a 22°C

20 minutos a 60°C (para desactivar la enzima).

Terminar la reacción y almacenar a 4°C.

4. Transformar la ligación inmediatamente.

Apéndice 8. Tabla de datos y rangos utilizados en la prueba *U* de Mann-Whitney

Aquí se presenta la tabla de valores utilizados en el análisis estadístico, corresponden a una fracción de los valores obtenidos de los histogramas de las imágenes ya procesadas.

Rangos	5 min, sin transformar	30 min sin transformar	60 min sin transformar	5min, 0mM	30min, 0mM	60 min, 0mM	5min, 25 mM	30min, 25 mM	25 60min, 25mM	5min, 40 mM	30 min, 40mM	60min, 40 mM
15	7	164	254	15941	14240	13686	2225	6328	5936	7605	22168	23563
16	8	162	89	10246	9624	9915	2095	5362	5437	6733	20288	21645
17	1	158	54	6715	7031	7857	1830	4675	4862	6154	18853	19540
18	6	154	20	4422	4978	6378	1626	4432	4300	5652	17482	17772
19	4	166	20	3152	4001	5533	1484	3859	3830	5205	15578	16075
20	3	144	17	2283	3177	4819	1350	3633	3436	4962	14430	14945
21	5	142	15	1753	2434	4315	1255	3280	3052	4535	13355	13764
22	2	134	14	1288	2198	3831	1054	2899	2633	4358	12578	13040
23	0	157	14	983	1784	3273	962	2451	2520	4146	12085	12277
24	2	156	11	854	1485	2902	801	2192	2306	3831	11273	11583
25	0	139	15	635	1236	2539	804	1775	2159	3711	10452	10827
26	1	146	13	511	1064	2204	728	1588	1915	3487	10083	10466
27	2	120	14	386	862	1867	671	1344	1759	3291	9632	10244
28	4	88	15	333	721	1565	655	1217	1623	3349	9072	9630
29	1	67	15	248	623	1400	633	1148	1505	3184	8371	8913
30	2	52	12	199	502	1155	549	989	1431	2998	7984	8479
31	2	35	10	172	400	890	535	890	1385	2799	7750	8364
32	1	34	22	150	371	797	480	750	1330	2714	7579	7849
33	2	28	14	133	299	653	494	638	1252	2695	7187	7534
34	1	11	6	120	258	490	465	534	1092	2537	6839	7242
35	2	9	3	96	178	388	455	424	1008	2423	6477	7107
36	0	10	8	75	148	317	359	344	907	2333	6316	6777
37	0	11	3	65	134	297	293	297	878	2337	5916	6407
38	1	6	4	60	111	187	298	313	746	2064	5805	6222
39	2	8	5	50	76	132	271	259	689	2117	5642	6138
40	0	7	7	41	77	97	262	246	653	1981	5265	5932
41	1	6	3	32	53	66	227	231	604	1936	5122	5814
42	1	11	5	20	47	39	239	233	542	1903	4910	5575
43	0	7	3	12	35	25	253	228	560	1811	4682	5377