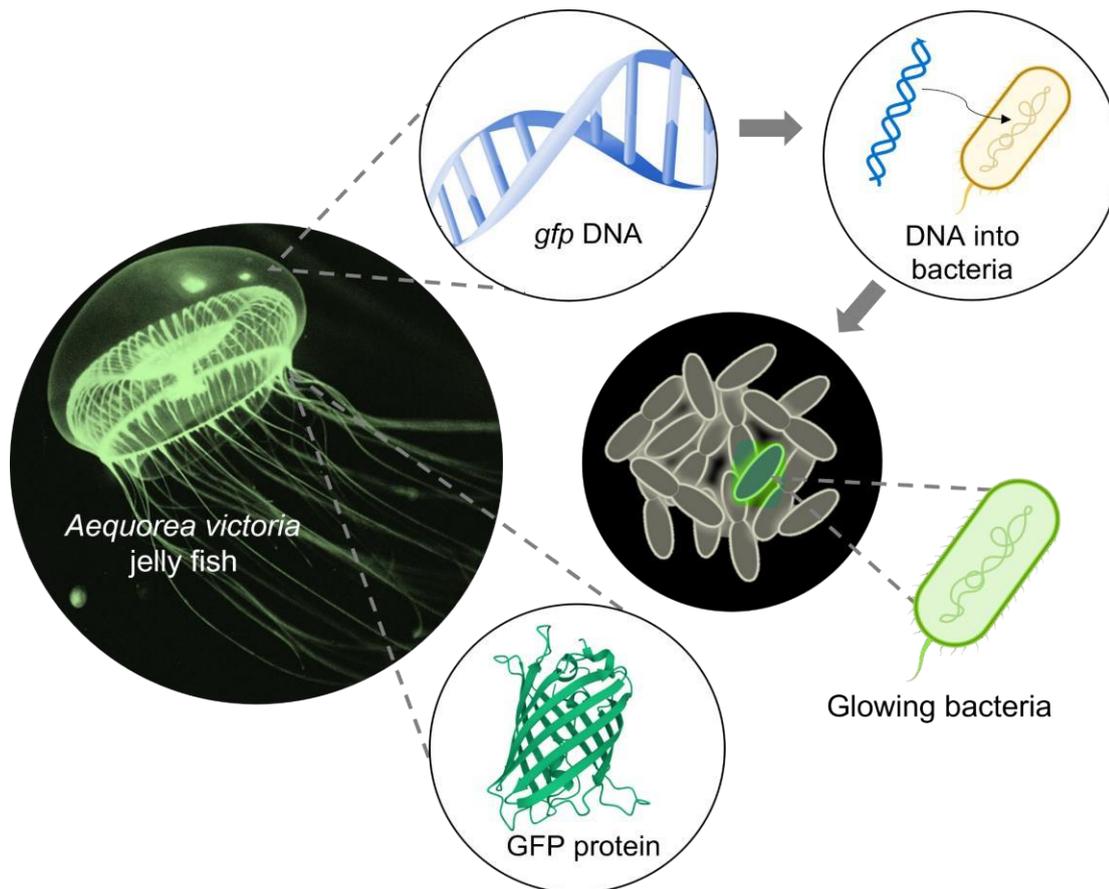


## Un marco educativo en microbiología

### Herramientas de estudio: proteínas brillantes y coloridas como ayuda a la visualización

*Abuelo, ¿es cierto que los científicos hacen que las bacterias brillen utilizando piezas de repuesto de una medusa?*



**La proteína verde fluorescente (GFP) tiene su origen en una medusa.** Originalmente, la proteína GFP se purificó a partir de la medusa *Aequorea victoria*. Más tarde, los científicos determinaron la secuencia de ADN de la proteína GFP y la capacidad de producir GFP se transfirió a bacterias. Al producir una proteína brillante como la GFP, las bacterias presentaban fluorescencia verde y, en presencia de otros microbios, podían reconocerse y distinguirse fácilmente. Foto de *Aequorea victoria* por Jonathan Diemel. La estructura cristalina de la proteína GFP 1EMA del Banco de Datos de Proteínas (PDB).

**Ida Lauritsen, Pernille O. Frenedorf y Morten H. H. Nørholm**

Centro de Biosostenibilidad de la Fundación Novo Nordisk, Universidad Técnica de Dinamarca, Kongens Lyngby, Dinamarca.

# Un marco educativo en microbiología

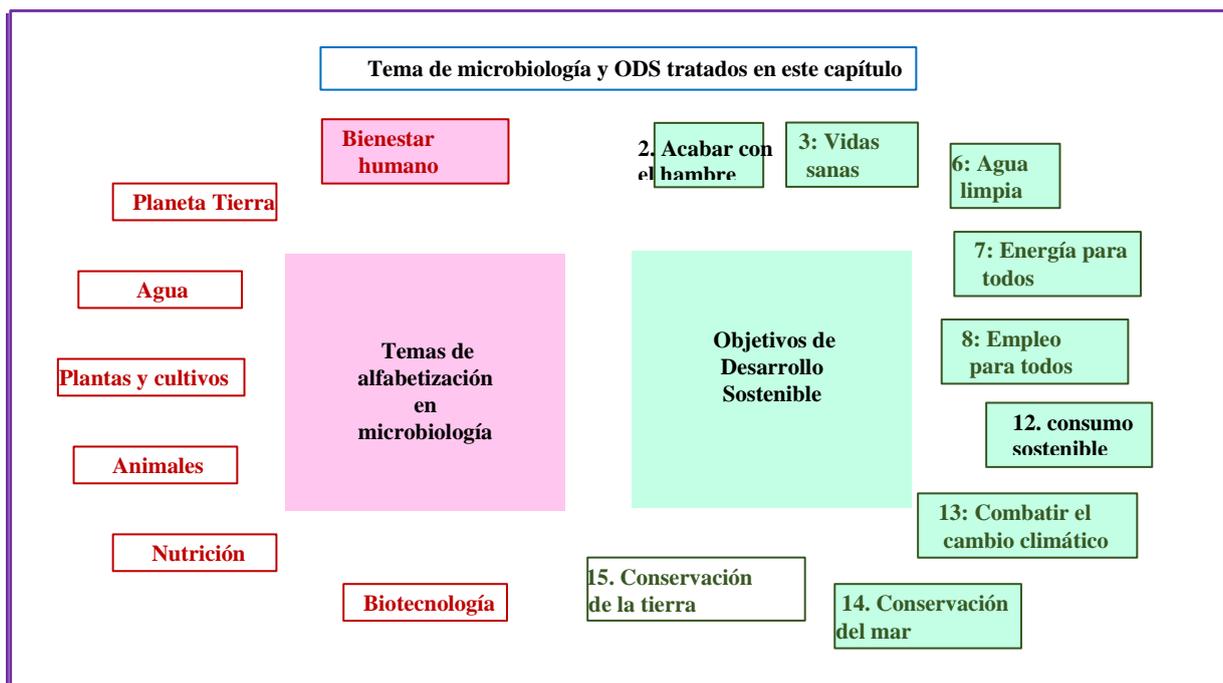
## Proteínas brillantes y coloridas como ayuda a la visualización

### Sinopsis

Las proteínas desempeñan algunas de las funciones más importantes de los organismos vivos, pero son pequeñas y difíciles de estudiar. Afortunadamente, algunas proteínas brillan o producen compuestos de colores y, por tanto, son fáciles de ver. Las proteínas con propiedades como la fluorescencia o la luminiscencia se encuentran en muchos organismos de la naturaleza y llevan décadas utilizándose en la investigación microbiológica. Estas *proteínas reporteras* pueden injertarse en otras proteínas de interés para ayudar a revelar los detalles de los microorganismos y la biología molecular, y permitir el diseño de biosensores para detectar sustancias químicas contaminantes o diagnosticar enfermedades.

### La microbiología y el contexto social

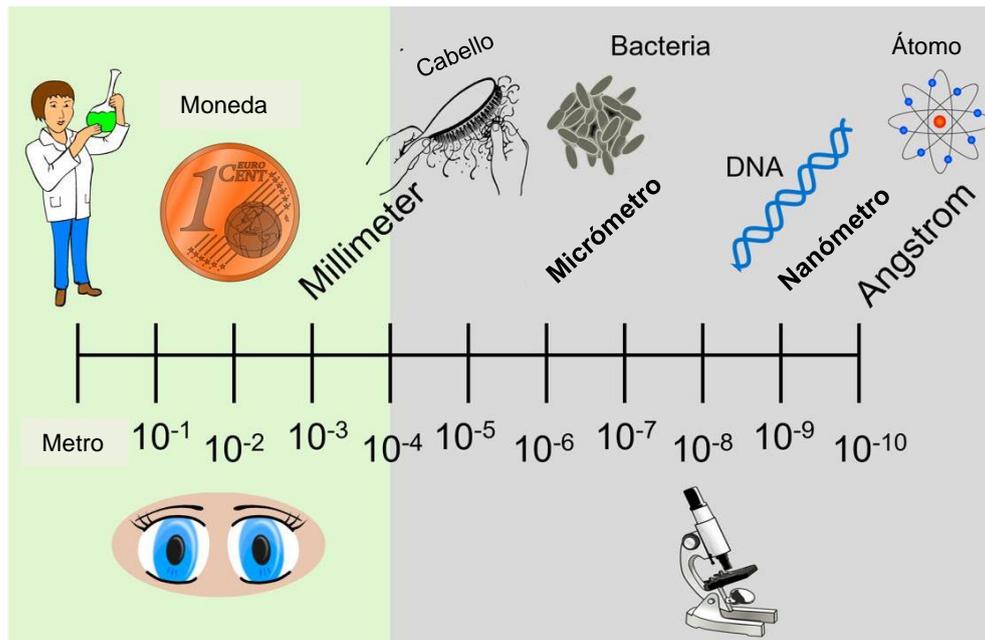
*La microbiología:* Proteínas reporteras nativas, historia de la microbiología, herramientas de estudio, visualización de interacciones moleculares, aplicaciones de las proteínas reporteras en investigación básica, biosensores, aplicaciones futuras de las proteínas reporteras en biotecnología. *Cuestiones de sostenibilidad:* Hambre, salud, educación, agua limpia, energía limpia, innovación, comunidades sostenibles, producción responsable.



# Un marco educativo en microbiología

## La importancia de las proteínas informadoras en microbiología

1. **¿Cómo trabajan los científicos con organismos microscópicos como las bacterias cuando no pueden verlos?** Estudiar microorganismos a escala micrométrica no es fácil. Los microorganismos y las bacterias son muy pequeños: son *micro*. Un microbio medio es un millón de veces más pequeño que un ser humano. Para ver el micromundo hay que utilizar gafas muy resistentes o instrumentos como un microscopio. Pero cuando se visualizan diferentes microorganismos, a menudo tienen el mismo aspecto. Con la ayuda de moléculas brillantes como la proteína verde fluorescente (GFP), podemos marcar nuestras bacterias, lo que nos permite distinguir un tipo o especie específica de otra.



**La escala de longitud de la biología.** A partir de un metro, cada elemento se hace 10 veces más pequeño. La parte verde de la imagen representa elementos que están desnudos a simple vista, mientras que los elementos de la parte gris requieren un microscopio para su visualización. Las bacterias y los microorganismos se encuentran en la microescala.

2. **La historia de la proteína verde fluorescente.** La historia de la GFP es un bello ejemplo de una pregunta científica básica y sencilla, impulsada por la curiosidad: *¿qué hace brillar a las medusas?* - y cómo la búsqueda de la respuesta con muchos enfoques diferentes provocó un cambio radical de paradigma en la ciencia.

La GFP fue descubierta por Osamu Shimomura a principios de los años sesenta. Durante años, Shimomura se embarcaba con su familia en expediciones de pesca para capturar miles de medusas, con el fin de tener material suficiente para poder aislar y purificar una cantidad suficiente de material fluorescente para estudiar las moléculas responsables del brillo verde.

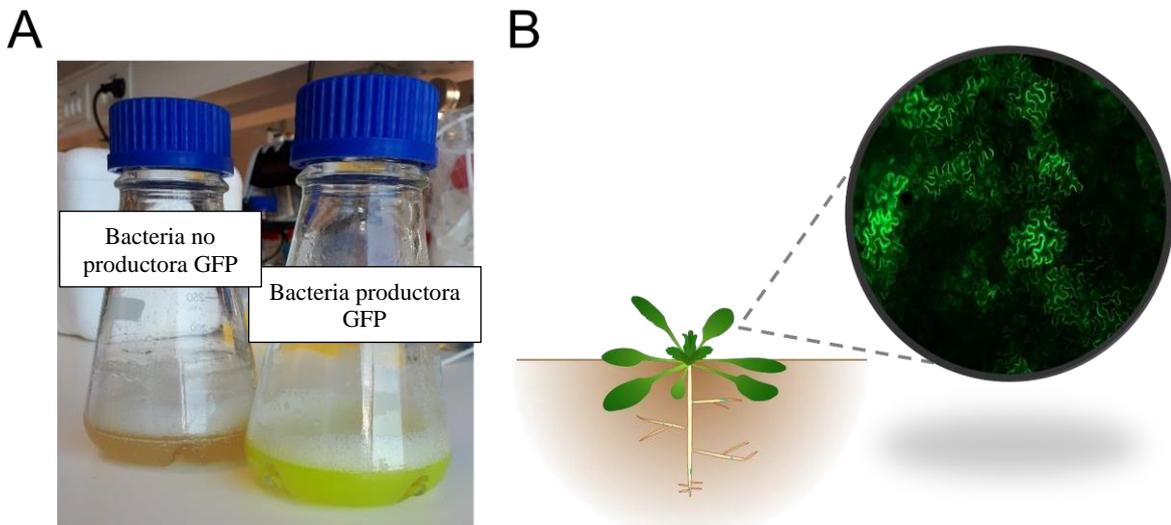
La historia de la GFP también tiene un "momento eureka" científico (se cuenta que el antiguo científico griego Arquímedes gritó "¡Eureka! Eureka!" después de meterse en el agua, lo que le hizo comprender el principio científico de que el volumen de agua desplazada es igual al volumen de un objeto sumergido). Del mismo modo, cuando se descubrió el gen que codifica la proteína del "resplandor verde", ahora denominada proteína verde fluorescente, se le dio el nombre de *gfp* y se determinó su secuencia, Martin Chalfie lo transfirió tanto a bacterias como a gusanos, lo que bastó para que estos organismos tan diferentes brillaran con luz verde: ¡Eureka!

## Un marco educativo en microbiología

En los años siguientes, Roger Tsien dirigió los esfuerzos de investigación que mejorarían considerablemente las propiedades de la GFP para convertirla en una herramienta de investigación universal. Por ejemplo, también fabricaron proteínas fluorescentes rojas. En conjunto, estos avances fueron reconocidos con el premio Nobel de Química en 2008, ya que la GFP cambió por completo la forma en que podemos estudiar los fenómenos microscópicos.

3. **Las bacterias son microorganismos y sus moléculas son mil veces más pequeñas.** Para que las bacterias produzcan proteínas brillantes tenemos que dotarlas de capacidad genética proporcionándoles el ADN que codifica la proteína brillante. El ADN es la receta molecular de todo lo vivo y puede cortarse y ensamblarse fácilmente en nuevas formas con tijeras genéticas y pegamento en el laboratorio de biología molecular, como los ladrillos de LEGO.

Además de marcar las bacterias, podemos controlar y observar cuándo se produce el crecimiento: cuando un microbio se convierte en dos y, con el tiempo, en millones. Y podemos estudiar una nueva proteína de función desconocida si la fusionamos con una proteína brillante y seguir cuándo se fabrica y cómo se mueve dentro de los compartimentos y espacios de una célula viva. Incluso podemos utilizar proteínas brillantes como la GFP en organismos más grandes y, por ejemplo, fabricar plantas fluorescentes parciales o completas.



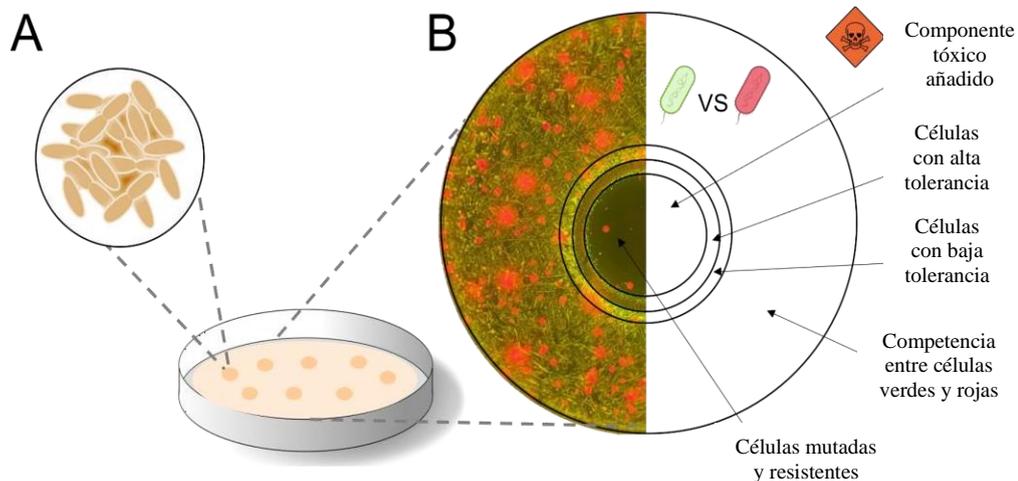
**Las proteínas brillantes ayudan a visualizar la biología.** A) Cuando millones de bacterias crecen juntas en un cultivo en el laboratorio es posible ver si producen GFP o no. Foto de Pernille Ott Frensdorf. B) Si sólo se dirige la producción de GFP a las células de las hojas de una planta en el laboratorio, se pueden observar patrones de rompecabezas fluorescentes. Fotografía de Morten H.H. Nørholm.

4. **¿Cómo mejoran nuestras vidas los reporteros fluorescentes?** Las bacterias viven muy unidas a sus vecinas en las llamadas "colonias", formadas por miles de millones de bacterias que son visibles a simple vista. Cuando se estudian las bacterias en el laboratorio, estas colonias se forman en medios de agar gelatinoso en pequeñas placas de Petri redondas que contienen nutrientes como azúcares, vitaminas y minerales. Al igual que muchos otros animales que viven en el mismo entorno en la naturaleza, las bacterias compiten por los nutrientes disponibles. Las bacterias tienen diferentes habilidades y talentos, como nosotros los humanos, por lo que a menudo un tipo o grupo de bacterias está mejor preparado y adaptado para vivir en un entorno específico que otros. Cultivando bacterias con distintos nutrientes o sustancias químicas tóxicas en placas de Petri es posible estudiar la competencia entre distintas cepas de bacterias haciéndolas producir proteínas brillantes de distintos colores, como el verde y el rojo, con las proteínas brillantes GFP y la proteína roja fluorescente (RFP).

Se pueden esparcir dos cepas diferentes de bacterias en igual número sobre una placa de agar y añadir una gota de un compuesto tóxico en el centro. Observando el crecimiento cerca

## Un marco educativo en microbiología

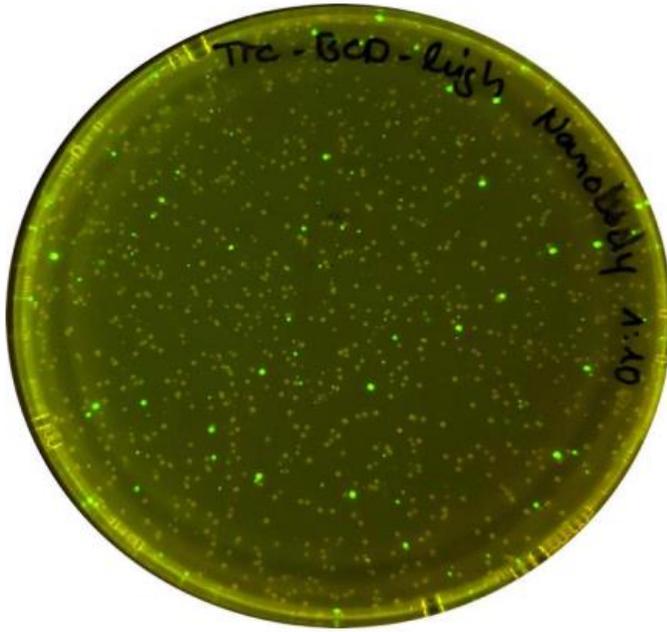
del lugar donde se añade el compuesto tóxico, podemos controlar la tolerancia: si las bacterias verdes crecen más cerca de la gota, tienen mayor tolerancia que las rojas. Investigar la tolerancia a los compuestos puede ser útil a la hora de buscar nuevos antibióticos para combatir las bacterias malas y patógenas que infectan a los humanos y nos hacen enfermar. Las bacterias tolerantes a sustancias químicas desagradables también pueden ser útiles, por ejemplo, limpiando la contaminación del medio ambiente.



**Competencia entre dos tipos de bacterias en placas de agar.** A) En el laboratorio, las bacterias se cultivan en placas de agar en placas de Petri. Forman colonias en las que millones de bacterias viven estrechamente unidas. Son genéticamente iguales. B) Añadiendo un compuesto tóxico a una placa de agar cubierta con cantidades iguales de dos bacterias es posible hacerlas competir entre sí e investigar la tolerancia al compuesto. Las células crecerán en función de su tolerancia al compuesto. En el medio pueden aparecer "escapes" genéticamente modificados (mutados) que son resistentes al compuesto tóxico. Foto de Ida Lauritsen.

Las bacterias brillantes también pueden ayudarnos a identificar las bacterias creadas para su uso en biotecnología y biomedicina. Uno de los métodos más sencillos para crear fábricas de células microbianas capaces de producir las proteínas que necesitamos se basa en bacterias que brillan en verde y se vuelven blancas cuando se modifican con nuevo ADN. La razón es que el gen de la proteína que necesitamos se inserta en medio del gen *gfp*, interrumpiendo así su secuencia e inactivando su capacidad para dirigir la producción de GFP, un proceso denominado *inactivación insercional*. Con este método, los investigadores sólo tienen que mezclar bacterias con ADN -por ejemplo, que codifique un fármaco como la insulina- y elegir las colonias blancas entre un fondo de colonias verdes fluorescentes normales que aparecen en placas de agar al día siguiente. Estas bacterias ya son capaces de producir insulina.

## Un marco educativo en microbiología



### Identificación de colonias bacterianas con un contenido genético modificado.

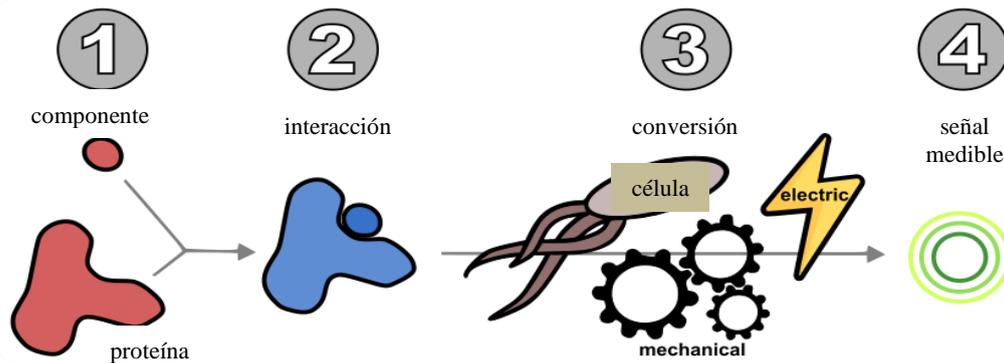
En esta placa de agar, las colonias bacterianas presentan fluorescencia verde a menos que su ADN haya sido modificado. De este modo, las bacterias con nuevo ADN insertado, como un gen que codifica insulina, se reconocen fácilmente. Fotografía de Anja Ehrmann y Carolyn Bayer.

5. **Las células sensores contribuyen a un mundo más sostenible.** La capacidad de los microorganismos para detectar compuestos en el medio ambiente es útil, no sólo para descubrir nuevos compuestos, sino también para detectar sustancias químicas u otros microorganismos. Los dispositivos derivados de sistemas biológicos que detectan tales condiciones se denominan biosensores, y convierten una interacción biológica, por ejemplo, entre proteínas y sustancias químicas, en una señal medible utilizando herramientas de estudio como las proteínas reporteras.

La mayoría de los biosensores pueden asignarse a uno de estos dos grupos: los que sólo utilizan piezas de repuesto de microorganismos, como ADN o proteínas, y los que utilizan una célula viva con su propio ADN y proteínas. Sin una célula, un biosensor requiere la ayuda de los seres humanos para convertir una interacción molecular en una señal. Estos convertidores pueden ser, por ejemplo, un componente eléctrico, que convierte la señal, o un colorante enzimático que sólo aparece cuando se une la proteína adecuada, como el que conocemos de las pruebas rápidas de COVID-19 o de embarazo de los supermercados. Aunque producen residuos plásticos, ayudan a los sistemas sanitarios y ahorran recursos que de otro modo se gastarían en médicos y hospitales.

Cuando se utilizan biosensores celulares, la propia célula convierte la actividad biológica en una señal detectable. Estas señales pueden ser, por ejemplo, la enzima  $\beta$ -galactosidasa, que puede producir un colorante azul, el brillo de la GFP o la luz producida por la enzima luciferasa bioluminiscente. Estas proteínas reporteras nos informan de lo que ocurre en el interior de la célula y pueden diseñarse para informar de muchos acontecimientos diferentes, decididos por el científico que las ha fabricado. Eligiendo cuidadosamente las combinaciones de secuencias de ADN, el científico puede combinar lo que detecta (la *parte sensora*) y cómo lo informa (la *parte señalizadora*). Esto permite a los científicos fabricar microorganismos que detectan la contaminación ambiental, ayudan a diagnosticar enfermedades y garantizan la calidad de los alimentos.

## Un marco educativo en microbiología



(1) Los biosensores detectan moléculas específicas, por ejemplo, sustancias químicas del medio ambiente o proteínas que causan enfermedades. (2) Algunas moléculas biológicas, como las proteínas, interactúan con otras moléculas o pueden diseñarse para hacerlo. (3) Para que una interacción de este tipo pueda ser observada por el ser humano, es necesario convertirla de interacciones microscópicas a una señal medible. Los biosensores mecánicos son pasivos y dan una respuesta, por ejemplo, mediante el color. Los biosensores eléctricos convierten las interacciones en señales eléctricas utilizando las propiedades físicas de las moléculas. Los biosensores celulares utilizan la célula y sus propios recambios para crear una señal. (4) Al final, la señal puede medirse. Algunas señales, como la electricidad o la luz, se convierten en un número para que los científicos puedan medir su fuerza, y otras señales, como el color, pueden ser lo suficientemente fuertes como para que los científicos vean el resultado con sus propios ojos.

6. *¿Sustituirán algún día las proteínas reporteras a las farolas?* Algunas proteínas reporteras tienen aplicaciones prácticas directas, concretamente las que producen luz (luminiscencia), como la enzima luciferasa. Las capacidades luminiscentes (bioluminiscencia) se encuentran en muchos organismos de la naturaleza, desde las algas unicelulares del océano hasta las luciérnagas del aire y los hongos que crecen en el suelo de los bosques. La capacidad de emisión de luz de las algas se ha utilizado para crear lámparas de algas, que proporcionan luz nocturna alternativa desde un frasco cuando se agita. Algunas de estas capacidades de emisión de luz también se han transferido a bacterias, creando bellas piezas de arte, y a plantas de escritorio, creando lámparas de escritorio naturales.

Esto permite hacer experimentos de reflexión sobre el futuro de la iluminación y nuestra dependencia de la electricidad y los combustibles fósiles: utilizando algas, los científicos han creado farolas que no necesitan electricidad e incluso absorben dióxido de carbono del aire mediante fotosíntesis. Con lo que hemos aprendido de las algas y de las plantas bioluminiscentes artificiales, es teóricamente posible crear alumbrado público utilizando árboles bioluminiscentes, y recientes investigaciones indican que la bioluminiscencia de los hongos podría dar lugar a plantas luminosas aún más potentes.

Sin embargo, aunque estas tecnologías son apasionantes y pueden proporcionar una alternativa a la iluminación sin dióxido de carbono, siempre es importante tener en cuenta las consecuencias de tales acciones. Dado que la bioluminiscencia formaría parte de los organismos artificiales que proporcionan la luz, habría que idear la forma de encender y apagar el alumbrado como se hace con la electricidad. Se ha demostrado que la luz de las farolas eléctricas tradicionales, que a veces se apagan durante las horas tranquilas del día, perturba los ritmos diarios de las aves. Estas consecuencias podrían agravarse con un alumbrado público constante y no apagable, con consecuencias imprevisibles para los ecosistemas afectados. Así pues: antes de explotar la iluminación biológica en nuestras calles, tenemos que averiguar cómo apagarla y encenderla.

# Un marco educativo en microbiología

## Relevancia para los Objetivos de Desarrollo Sostenible y Grandes Retos

El uso de herramientas de estudio como las proteínas reporteras está relacionado con varios ODS, entre ellos:

- **Objetivo 2: Poner fin al hambre, lograr la seguridad alimentaria y la mejora de la nutrición y promover la agricultura sostenible.** El uso de herramientas de estudio en biosensores y ensayos brinda la oportunidad de detectar contaminantes y polución en el suministro de alimentos.
- **Objetivo 3: Garantizar una vida sana y promover el bienestar para todos en todas las edades.** Las herramientas de estudio contribuyen a las tecnologías innovadoras dentro de la asistencia sanitaria y el diagnóstico.
- **Objetivo 4: Garantizar una educación de calidad inclusiva y equitativa y promover oportunidades de aprendizaje permanente para todos.** Las herramientas de estudio se desarrollaron a partir de proteínas reporteras nativas para facilitar ciertos aspectos de la investigación y, en este sentido, siguen contribuyendo sustancialmente a los esfuerzos de investigación. Además, también se incluyen en muchos kits experimentales educativos con el propósito de hacer la microbiología más accesible y entretenida para niños en edad escolar y adolescentes.
- **Objetivo 6: Garantizar la disponibilidad y la gestión sostenible del agua y el saneamiento para todos.** Como en el caso de los alimentos, el uso de herramientas de estudio en biosensores y ensayos brinda la oportunidad de detectar contaminaciones y polución en los suministros de agua.
- **Objetivo 7: Garantizar el acceso a una energía asequible, fiable, sostenible y moderna para todos.** Las proteínas reporteras nativas se están explotando en contextos microbiológicos con el fin de generar iluminación microbiana sostenible que no dependa de la electricidad.
- **Objetivo 9: Construir infraestructuras resilientes, promover la industrialización inclusiva y sostenible y fomentar la innovación.** El uso de herramientas de estudio en la investigación y su explotación en el desarrollo tecnológico contribuyen a la innovación de tecnologías dentro de las industrias de las ciencias de la vida y la atención sanitaria.
- **Objetivo 11: Hacer que las ciudades y los asentamientos humanos sean inclusivos, seguros, resilientes y sostenibles.** Las proteínas reporteras tienen funciones nativas que les permiten aplicarse en funciones necesarias para la sociedad, como la iluminación.
- **Objetivo 12: Garantizar modelos de consumo y producción sostenibles.** El uso de proteínas informadoras y biomarcadores en la bioproducción mejora el control de calidad y minimiza los residuos.

## Posibles implicaciones para las decisiones

### 1. Individual

- a. Proteínas reporteras fluorescentes para diagnosticar enfermedades y garantizar la calidad de los alimentos
- b. "Cortar y pegar" los componentes básicos para crear un organismo vivo

### 2. Políticas comunitarias

- a. El coste de la investigación podría utilizarse en otros sectores
- b. Eliminación adecuada de los residuos de OMG, sin contaminación ambiental,

# Un marco educativo en microbiología

por ejemplo, del agua.

## 3. *Políticas mundiales*

- a. Normativa sobre OMG
- b. Reducir la emisión de gases de efecto invernadero utilizando biosensores como farolas
- c. Utilización de reporteros de proteínas para ensayos de competencia que pueden facilitar la identificación de nuevos antibióticos para tratar infecciones.
- d. Proteínas informadoras en la mejora de las tecnologías de ensamblaje de ADN para la producción de medicamentos como la insulina.

## Participación de los alumnos

### 1. *Debates en clase*

- a. Desventajas y ventajas de utilizar herramientas de estudio como las buenas prácticas agrarias
- b. ¿Jugamos a ser "dioses" cuando eliminamos rasgos y damos nuevas habilidades a los seres vivos?
- c. ¿Es realmente más limpia la energía que se desarrolla en la investigación cuando estamos utilizando plástico de un solo uso en los laboratorios?
- d. ¿Existen otras características o rasgos que puedan tomarse de la naturaleza y aplicarse en un microorganismo para beneficio humano?

### 2. *Sensibilización de los alumnos*

- a. ¿Hay algún inconveniente en utilizar herramientas de estudio/proteínas fluorescentes para propósitos de investigación?
- b. ¿Puedes encontrar otros ejemplos en los que se utilice un color como indicador de algo? ¿O para marcar y detectar algo? ¿Y por qué es inteligente que el indicador sea un organismo vivo?
- c. ¿Podemos utilizar los microorganismos en nuestro beneficio?

### 3. *Ejercicios*

- a. Diseñe su propio sistema biosensor

## Base empírica, lecturas complementarias y material didáctico

Shimomura *et al.* (2017). *Luminous Pursuit: Jellyfish, Gfp, And The Unforeseen Path To The Nobel Prize*. World Scientific Publishing. ISBN: 9789813202160.

Zimmer, Mark. (2015). *Iluminando la enfermedad*. Oxford University Press Inc. ISBN: 9780199362813. Shimomura O., Johnson F.H., Saiga Y. Extraction, purification and properties of aequorin, a bioluminescent protein from the luminous hydromedusan, Aequorea. *J Cell Comp Physiol.* 1962 Jun;59:223-39. doi: 10.1002/jcp.1030590302. PMID: 13911999.

## Un marco educativo en microbiología

- Prasher DC, Eckenrode VK, Ward WW, Prendergast FG, Cormier MJ. Primary structure of the *Aequorea victoria* green-fluorescent protein. *Gene*. 1992 Feb 15;111(2):229-33. doi: 10.1016/0378-1119(92)90691-h. PMID: 1347277.
- Chalfie M, Tu Y, Euskirchen G, Ward WW, Prasher DC. La proteína verde fluorescente como marcador de la expresión génica. *Science*. 1994 Feb 11;263(5148):802-5. doi: 10.1126/science.8303295. PMID: 8303295.
- Bayer, C.N., Rennig, M., Ehrmann, A.K. *et al.* A standardized genome architecture for bacterial synthetic biology (SEGA). *Nat Commun* 12, 5876 (2021). <https://doi.org/10.1038/s41467-021-26155-5>
- Yagi, K. Applications of whole-cell bacterial sensors in biotechnology and environmental science. *Appl Microbiol Biotechnol* 73, 1251-1258 (2007). <https://doi.org/10.1007/s00253-006-0718-6>
- <https://portal.nifa.usda.gov/web/crisprojectpages/0206728-luminescence-probes-of-food-quality.html>
- <https://smartcampus.dtu.dk/cases/allumen-bioluminescent-algae>
- <https://www.sbs.com.au/topics/science/nature/article/2016/03/17/painting-bacteria-art-meets-glow-dark-microbes>
- <https://news.mit.edu/2017/engineers-create-nanobionic-plants-that-glow-1213>
- <https://www.smithsonianmag.com/innovation/can-an-algae-powered-lamp-quench-our-thirst-for-energy-3509307/?no-ist>
- <https://theweek.com/articles/763908/glowinthedark-trees-could-someday-replace-city-street-luces#:~:text=Investigadores%20en%20Dinamarca%20tienen%20un,en-laoscuridad%20árboles.&text=El%20objetivo%20es%20aislar,para%20hacer%20el%20mismo%20g>
- <https://www.eurekalert.org/news-releases/568664>
- <https://www.nationalgeographic.com/science/article/140904-loss-night-birds-hormone-sing-alas-ligeras-aviso>
- <https://askabiologist.asu.edu/bacteria-overview>
- <https://www.nobelprize.org/prizes/chemistry/2008/summary/>
- <https://www.bbc.co.uk/bitesize/guides/z243g82/revision/1>
- <https://www.sciencedaily.com/releases/2013/12/131202161952.htm>
- <https://cen.acs.org/pharmaceuticals/antibiotics/hunt-new-antibiotics-grows-harder/96/i49>
- <https://www.news-medical.net/health/What-are-Biosensors.aspx>
- <https://uk.clearblue.com/pregnancy-tests/hcg>

### Glosario

**Agar:** sustancia gelatinosa formada por polisacáridos obtenidos de algas que facilita el cultivo y la manipulación de bacterias.

**Luminiscencia:** emisión espontánea de luz por una sustancia no debida al calor

**Fluorescencia:** forma de luminiscencia en la que la emisión de luz por una sustancia es inducida por la absorción de luz u otra radiación electromagnética

**Proteína verde fluorescente (GFP):** proteína específica de la medusa *Aequorea victoria* que emite fluorescencia en el espectro verde de la luz.

**Proteína roja fluorescente (RFP):** se refiere a una proteína que emite fluorescencia en el espectro rojo de la luz **Colonias bacterianas:** miles de millones de bacterias que forman pequeñas estructuras en placas de agar visibles a simple vista.

## Un marco educativo en microbiología

**Escapadores bacterianos:** individuos de una población bacteriana que han adquirido una nueva capacidad para crecer mejor.

**Biosensor:** dispositivo basado directamente en células vivas o de origen biológico diseñado para detectar pistas químicas específicas, como moléculas contaminantes o relacionadas con enfermedades.