

Un marco educativo en microbiología centrado en la

Visualización de superficies microbianas

Mamá, ¿los microbios son suaves como una pelota de playa o ásperos como una pelota de tenis?



Karen M. Polizzi

Departamento de Ingeniería Química, Imperial College London, Reino Unido

Un marco educativo en microbiología centrado en la

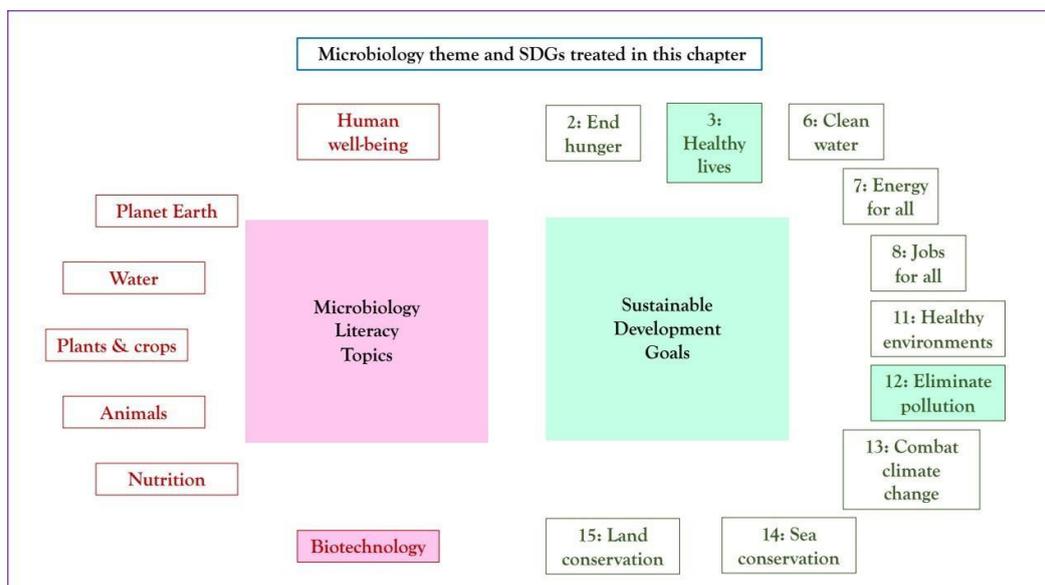
Visualización de superficies microbianas

Sinopsis

Las células están rodeadas por una membrana que separa el interior (**citoplasma**) del medio ambiente. La **membrana celular** está formada en gran parte por **lípidos**, pero también hay una serie de **proteínas** insertadas en ella que realizan diversas funciones para la célula. Estas proteínas pasan de forma natural del citoplasma celular a la membrana, donde decoran la superficie del microbio. Es posible fusionar una proteína pasajera de su elección a una de estas proteínas de membrana, de modo que la proteína pasajera se extienda hacia el exterior. Esto se denomina **exhibición de superficie** microbiana, porque la proteína se *exhibe* en la *superficie* del microbio. Es casi como si una parte de la célula se hubiera vuelto al revés. La visualización de la superficie microbiana tiene muchos usos en biotecnología, como los procesos de fabricación de **proteínas terapéuticas**, la mejora de **enzimas** y el desarrollo de pruebas de diagnóstico para identificar enfermedades y contaminantes. La razón por la que la visualización en superficie es útil es que la **actividad** de la proteína visualizada en superficie puede evaluarse más fácilmente que si la proteína está dentro de la célula. Por lo tanto, si se dispone de una población de células que cada una tiene una **variante** diferente de la proteína, se puede encontrar a la mejor de ellas mucho más rápidamente si esas proteínas se muestran en la célula. La visualización en superficie es una herramienta de investigación útil para acelerar proyectos biotecnológicos y tiene efectos positivos en la sociedad porque permite desarrollar soluciones de base biológica para la salud y el medio ambiente y, por tanto, contribuye a cumplir varios de los objetivos de desarrollo sostenible.

La microbiología y el contexto social

La microbiología: la visualización de superficies permite la biotecnología, los proyectos están relacionados en gran medida con la producción de medicamentos (bienestar humano), enzimas (planeta tierra mediante la reducción de la contaminación) y como sensores (bienestar humano por el diagnóstico de enfermedades y planeta tierra por la detección de la contaminación).
Objetivos de desarrollo sostenible: Vidas sanas (producción de nuevos medicamentos y vacunas, diagnóstico de enfermedades), Eliminar la contaminación (pruebas para detectar la contaminación en el agua, el suelo y el aire, identificar enzimas para sustituir la síntesis química).



Un marco educativo en microbiología centrado en la

Visualización de la superficie microbiana: La microbiología

1. *Las células están rodeadas por una membrana compuesta por una mezcla de lípidos y proteínas.* Las células están rodeadas por una membrana que separa el interior de la célula del medio que la rodea. La membrana celular está formada por una doble capa de lípidos que impide que el interior de la célula se filtre al exterior. Pero, para poder introducir alimentos en la célula y expulsar desechos, también hay algunas proteínas en la membrana que realizan funciones específicas. Debido a las proteínas, si pudiéramos acercarnos y observar una célula, lo que encontraríamos es que no tiene una superficie lisa como una pelota de playa, sino rugosa o peluda como una pelota de tenis. Esto se debe a que algunas proteínas sobresalen de la célula hacia el medio ambiente (Figura 2).

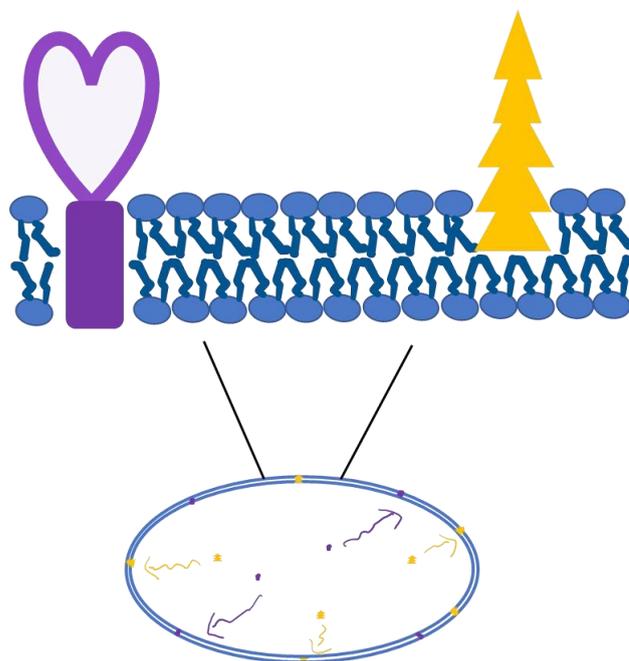


Figura 2. Dibujo animado de una membrana celular (azul) con proteínas incrustadas en ella (naranja, morado). Las proteínas se fabrican en el citoplasma y viajan hasta la membrana celular (flechas).

2. *En biotecnología, es posible poner "pasajeros" en las proteínas de membrana.*

Si estás interesado en estudiar una proteína, es posible pegarla a una de las proteínas de membrana como "pasajera". De este modo, cuando la proteína de membrana se desplace hacia la membrana, la proteína de su interés también la acompañará. La razón por la que podría interesarle hacer esto es porque es más fácil estudiar su proteína cuando está en el exterior de la célula que cuando está en el interior. Allí hay muchas menos proteínas y no es necesario abrir las células para realizar el estudio. Por lo tanto, fusionar su proteína a una proteína de membrana como pasajera le permite volver las células "al revés", al menos parcialmente. Los científicos llaman a este proceso "visualización superficial" porque la proteína de interés se muestra en la superficie de la célula. La principal ventaja de la visualización superficial es que acelera el proceso de estudio de las proteínas y puede permitirle encontrar la mejor proteína para su proyecto biotecnológico entre un gran número de posibilidades (lo que a veces se

Un marco educativo en microbiología centrado en la

denomina **biblioteca**).

En algunos casos, tener una proteína en el exterior de la célula también puede ser conveniente para realizar reacciones químicas o detectar la presencia de una molécula en el entorno, porque entonces las sustancias químicas no necesitan atravesar la membrana celular.

3. *Utilización de la visualización de superficies para aplicaciones médicas.* Una de las aplicaciones de la visualización superficial es encontrar nuevas proteínas terapéuticas. Las proteínas terapéuticas se utilizan para tratar enfermedades. Un ejemplo clásico de proteína terapéutica es la insulina, que se utiliza para tratar la diabetes mediante inyecciones diarias. También existen proteínas terapéuticas para el cáncer, la artritis y otras enfermedades de larga duración. También pueden utilizarse para tratar algunas infecciones. Un tipo de proteína terapéutica se denomina **anticuerpo**. Los anticuerpos son proteínas naturales que fabrica el sistema inmunitario para luchar contra las enfermedades. Los anticuerpos se unen a un objetivo y ayudan al organismo a eliminarlo. Los anticuerpos también pueden fabricarse fuera del organismo mediante biotecnología e inyectarse a los pacientes para ayudarles a combatir una enfermedad. Al principio, esto se hacía inyectando en animales, como conejos, el objetivo y recogiendo los anticuerpos generados por su sistema inmunitario. Una vez identificado el anticuerpo, puede producirse en masa mediante métodos biotecnológicos. En la medicina moderna, los anticuerpos de origen animal ya no se utilizan como terapia debido a la posibilidad de que el sistema inmunitario los reconozca como sustancias extrañas y desarrolle una respuesta no deseada contra la terapia. Por ello, han sido sustituidos en gran medida por **anticuerpos humanizados** o humanos. Sin embargo, los anticuerpos de origen animal siguen teniendo una amplia aplicación en el diagnóstico (véase más adelante).

En lugar de utilizar animales, la visualización de superficies puede emplearse para encontrar anticuerpos que se unan a un objetivo, lo que elimina la necesidad de experimentar con animales. Se crea una biblioteca de anticuerpos, cada uno de ellos ligeramente diferente, y cada uno se muestra en la superficie de una célula diferente. Los anticuerpos que mejor se unen al objetivo pueden identificarse capturando las células que los muestran con la proteína objetivo. Este proceso es muy rápido y permite clasificar un gran número de anticuerpos diferentes (véase la Caza del huevo de Pascua, más abajo). El hecho de que sea rápido significa que los nuevos tratamientos pueden llegar más rápidamente a los pacientes. Por ejemplo, en la **pandemia de SRAS-Cov-2**, se utilizó una forma de visualización de superficie para identificar anticuerpos contra el virus en cuestión de pocos meses. La rapidez también ayuda a reducir los costes de encontrar una nueva terapéutica porque se necesita menos tiempo y esfuerzo. Esto ayuda a mantener más bajo el coste de los medicamentos para que más pacientes puedan recibirlos. Por lo tanto, en general, el uso de la visualización de superficies para encontrar nuevas terapias proteicas tiene tres ventajas: 1) rapidez, 2) coste y 3) eliminación de la necesidad de utilizar animales en los experimentos.

Otra aplicación médica de la visualización de superficies es la creación de **vacunas**. Las vacunas son medicamentos que se utilizan para crear una respuesta inmunitaria capaz de prevenir infecciones. En este caso, se muestra una proteína pasajera en una célula que de otro modo sería inofensiva para imitar específicamente un agente causante de una enfermedad. El sistema inmunitario del paciente reconoce la proteína y desarrolla una respuesta inmunitaria, de modo que, si más adelante el paciente se encuentra con el agente patógeno real, ya está protegido contra la enfermedad. Una vacuna fabricada por visualización en superficie es segura, porque, aunque se parece al agente causante de la enfermedad desde el exterior, se basa en una célula inofensiva en el interior.

Un marco educativo en microbiología centrado en la

4. Utilización de la visualización de superficies para desarrollar rutas de síntesis biológica de sustancias químicas y productos de consumo. Otra aplicación de la visualización de superficies es la **biocatálisis**. La biocatálisis es el uso de **enzimas** o células enteras para realizar reacciones químicas. La biocatálisis suele ser una forma más respetuosa con el medio ambiente de producir sustancias químicas y materiales que la química tradicional, ya que puede llevarse a cabo a bajas temperaturas y en agua, lo que evita la necesidad de disolventes orgánicos contaminantes. Las enzimas son muy específicas y generan menos productos secundarios no deseados, por lo que, en general, los procesos enzimáticos generan menos residuos que muchos procesos químicos. La visualización de superficies puede utilizarse en biocatálisis de dos maneras. En primer lugar, de forma muy similar a la identificación de anticuerpos comentada anteriormente, la visualización superficial de bibliotecas de enzimas puede utilizarse para identificar enzimas con características mejoradas (velocidades más rápidas, mayor estabilidad o una combinación de éstas). En segundo lugar, las células con enzimas visualizadas en su superficie pueden utilizarse directamente en reacciones bioquímicas -la célula actúa como enzima- que son más "ecológicas" que los métodos puramente químicos. Esto es beneficioso porque significa que, para producir la enzima, basta con cultivar un lote de células, no es necesario ningún otro paso para purificar la enzima antes de utilizarla. Además, como la enzima está en la superficie, el reactivo no necesita atravesar la membrana celular para convertirse en producto. Por último, al final de la reacción bioquímica, se puede retirar la enzima más fácilmente si está unida a las células porque éstas son lo suficientemente pesadas como para sedimentar fuera de la reacción, en comparación con una enzima libre, que es demasiado pequeña y permanece en solución.

5. Aplicaciones de la visualización de superficies para hacer pruebas diagnósticas de detección de enfermedades o contaminantes. Una aplicación reciente de la visualización de superficies es la creación de pruebas capaces de detectar proteínas o sustancias químicas (también llamadas **analitos**) para ayudar a diagnosticar enfermedades o detectar la contaminación ambiental. En este caso, la proteína visualizada en la superficie celular puede unirse al analito. Como cada célula tiene muchas proteínas en su superficie y el analito puede unirse a más de una proteína, las células se agrupan cuando el analito está presente en concentraciones suficientemente altas. La agrupación de células es visible a simple vista y, por tanto, puede ser un indicador fácil de utilizar de la presencia del analito. La fabricación de este tipo de pruebas de diagnóstico es barata, ya que sólo es necesario cultivar un lote de células (como en el ejemplo anterior de la biocatálisis).

6. Si se puede hacer esto con cualquier tipo de célula, ¿por qué son útiles los microbios? Como todas las células tienen una membrana, la visualización de superficies podría, en teoría, basarse en cualquier **organismo**. Sin embargo, los microbios presentan algunas ventajas. Como organismos unicelulares con relativamente pocos requisitos para crecer, son una plataforma experimental de bajo coste y fácil de usar. Además, las técnicas de modificación genética necesarias para pegar la proteína pasajera a la proteína de membrana son más fáciles de realizar en microbios que en huéspedes celulares más complejos. Por último, para aplicaciones en vacunas, son buenos portadores de proteínas objetivo porque tienen el tamaño y la forma adecuados para imitar a los agentes causantes de enfermedades.

Un marco educativo en microbiología centrado en la

Relevancia para los Objetivos de Desarrollo Sostenible y los Grandes Retos

La visualización de superficies es un método experimental que acelera el desarrollo de nuevas biotecnologías. Por lo tanto, tiene amplias repercusiones en los objetivos de desarrollo en los que la biotecnología puede utilizarse para resolver grandes retos. El uso de la visualización de superficies nos permitirá encontrar soluciones a algunos de los grandes retos más rápidamente que con los métodos convencionales de ingeniería genética y selección. Algunos ejemplos son:

- **Objetivo 3. Garantizar una vida sana y promover el bienestar para todas las edades** (*poner fin a las muertes evitables de recién nacidos y niños menores de 5 años, poner fin a las epidemias de SIDA, tuberculosis, paludismo y enfermedades tropicales desatendidas y luchar contra la hepatitis, las enfermedades transmitidas por el agua y otras enfermedades transmisibles, reducir en un tercio la mortalidad prematura por enfermedades no transmisibles, reducir sustancialmente el número de muertes y enfermedades causadas por productos químicos peligrosos y por el aire, el agua y el suelo*) y *contaminación, apoyar la investigación y el desarrollo de vacunas y medicamentos para las enfermedades transmisibles y no transmisibles*). La visualización de superficies puede utilizarse para acelerar el desarrollo de nuevos medicamentos proteicos para diversas enfermedades transmisibles y no transmisibles, lo que aumenta la variedad de terapias disponibles y reduce los costes del descubrimiento de fármacos. La visualización en superficie también es una tecnología útil y rentable para la producción de vacunas contra enfermedades, en particular las que infectan a niños y recién nacidos. Por último, las células con proteínas en su superficie que pueden unirse a objetivos pueden utilizarse como base de una plataforma de pruebas rápidas para identificar contaminantes en el aire, el agua o el suelo y ayudar a dirigir los esfuerzos de remediación.

- **Objetivo 12. Garantizar pautas de consumo y producción sostenibles** (*consumo y producción sostenibles, gestión ecológicamente racional de los productos químicos y todos los residuos a lo largo de su ciclo de vida, reducir significativamente su liberación al aire, el agua y el suelo*). La visualización de superficies permite descubrir enzimas con velocidades de reacción más rápidas y mayor estabilidad, lo que contribuye a la identificación de rutas biosintéticas para obtener sustancias químicas, materiales y productos de consumo en sustitución de la síntesis petroquímica. Se espera que esto contribuya a la fabricación sostenible y a la reducción de la contaminación del aire, el agua y el suelo.

Posibles implicaciones para las decisiones

1. Individual

- a. Apoyo a empresas que venden productos que son fabricados sin experimentación animal.
- b. Apoyar a las empresas que venden productos fabricados por vías respetuosas con el medio ambiente.

2. Políticas comunitarias

- a. Apoyo a pruebas a gran escala del medio ambiente, el agua, el suelo o las poblaciones.

3. Políticas nacionales

- a. Limitar cuánto pagarán los servicios sanitarios por los medicamentos o alterar la

Un marco educativo en microbiología centrado en la

accesibilidad en función del coste.

- b. Limitar las emisiones de gases de efecto invernadero y otras emisiones de las industrias o establecer impuestos sobre dichas emisiones.

Participación de los alumnos

1. Debate en clase

- a. ¿Qué aspecto tiene la superficie de un microbio?
- b. ¿Cómo lo sabemos, es decir, qué tipo de experimentos utilizan los científicos para averiguarlo?
- c. Todas las células tienen cosas en su superficie, ¿a qué se deben las ventajas de utilizar microbios para mostrar la superficie frente a otros tipos de células?
- d. ¿Para qué sirven los microbios "de dentro afuera"?

2. Sensibilización de los alumnos

- a. Los medicamentos proteicos son muy caros de fabricar. ¿Quién los paga? ¿Cómo garantizar que todo el mundo pueda acceder a ellos en igualdad de condiciones?
- b. Las enzimas pueden sustituir a la síntesis química tradicional, con lo que a menudo se contamina menos y se reduce el impacto sobre el medio ambiente. Un ejemplo es el tinte de tus vaqueros, que puede producirse utilizando muchas enzimas seguidas. Sin embargo, hacerlo es más caro. ¿Cuánto más estarías dispuesto a pagar por algo fabricado con enzimas?

3. Ejercicios

- a. La visualización de la superficie microbiana puede utilizarse para crear pruebas de infección o contaminación que sean rápidas y fáciles de usar. Si pudieras hacer una prueba de este tipo, ¿qué querrías detectar? ¿Cómo la utilizarías, es decir, qué harías con la información?
- b. Diseña/dibuja un nuevo abrigo para tu microbio. (Comparar los dibujos de toda la clase da una idea de la diversidad de las bibliotecas de presentación).
- c. ¿Cuáles son los pros y los contras del uso de animales en la investigación?

4. Experimentos en clase

- a. Caza del huevo de Pascua: para ilustrar cómo colocar una proteína en el exterior de la célula puede ser útil para clasificar rápidamente un gran número de variaciones. Se necesitan huevos de Pascua (o similares) y objetos pequeños como canicas, figuras de plástico, de diferentes colores o formas, etc. (cuantos más, mejor). Ponga un objeto dentro de cada huevo y cronometree el tiempo que tardan los alumnos en encontrar uno concreto. A continuación, pídeles que imaginen cuánto más fácil sería la tarea si el objeto estuviera pegado en el exterior del huevo.

Base empírica, lecturas complementarias y material didáctico

1. http://www.biology4kids.com/files/cell_membrane.html
2. http://www.biology4kids.com/files/cell_membprot.html
3. http://autodisplay-biotech.com/html/cell_surface_display.html
4. https://en.wikipedia.org/wiki/Bacterial_display
5. <https://www.youtube.com/watch?v=GwQ51EMo62k> (Incluye demasiados detalles)

Un marco educativo en microbiología centrado en la

moleculares para los estudiantes y es bastante avanzado, pero no hay demasiadas opciones para este tipo de vídeos. Algunos elementos visuales útiles para profesores y personas con formación en biología).

6. Watson H. (2015). Membranas biológicas. *Essays Biochem.* **59**: 43-69. (fuente de acceso abierto con más detalles sobre la estructura de las membranas, su función y los métodos para analizarlas).
7. Jahns AC y Rehms BHA. (2012). Usos relevantes de las proteínas de superficie - visualización en estructuras biológicas autoorganizadas. *Microb. Biotechnol.* **5**: 188-202. (Acceso abierto, amplia revisión que incluye ejemplos).
8. <https://www.understandinganimalresearch.org.uk/animals/three-rs/>, Singh J. (2012). *J Pharmacol Pharmacother.* **3**: 87-89 (Ética del uso de animales en investigación y objetivos de reducción).
9. <https://www.economist.com/business/2014/12/30/going-large> (Costes de las terapias proteínicas y los retos que ello conlleva para el acceso a los medicamentos)
10. Daugherty PS. (2007). Protein engineering with bacterial display. *Curr Opin Structural Biol.* **17**: 474-480. (Revisión de la selección de anticuerpos mediante visualización en superficie)
11. Jegannathan KR y Neilsen PH. (2013). Environmental assessment of enzyme use in industrial production - a literature review. *Cleaner Production.* **42**:228-240. (Acceso abierto, discusión de cómo enzimas como respetuosas con el medio ambiente respetuosas con el medio ambiente alternativas), <https://en.engormix.com/poultry-industry/articles/the-use-enzymes-profitable-t44648.htm> (un ejemplo concreto de enzimas en la alimentación animal).
12. Shüürmann J, Quehl P, Festel G, y Jose J. (2014). Bacterial whole-cell biocatalysts by surface display of enzymes: toward industrial application. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **98**: 8031-8046. (Acceso abierto, revisión de la visualización de superficies para biocatálisis).
13. Kylilis N, Riangrunroj P, Lai HE, Salema V, Fernández LA, Stan GB, Freemont P, y Polizzi KM. (2019). Biosensor de células enteras con límite de detección sintonizable permite ensayos de aglutinación de bajo costo para aplicaciones de diagnóstico médico. *ACS Sensors.* **2**: 370-378. (Ejemplo de acceso abierto de detección mediante visualización superficial en bacterias)

Glosario

Analito: sustancia cuya concentración se mide en un ensayo analítico o de diagnóstico.

Anticuerpo: proteína natural del sistema inmunitario que reconoce y se une a sustancias extrañas. El reconocimiento da lugar a actividades posteriores en el sistema inmunitario que ayudan a eliminar la sustancia extraña.

Biocatálisis: uso de células enteras o enzimas para convertir un reactivo en un producto.

Membrana celular- Membrana biológica, compuesta de lípidos, que separa el interior de la célula del medio ambiente.

Citoplasma- El interior de una célula

Un marco educativo en microbiología centrado en la

Enzima- Proteína que puede acelerar una reacción química.

Anticuerpo humanizado: anticuerpo de una especie no humana que se ha modificado para hacerlo más similar al humano.

Biblioteca- Una gran colección de biomoléculas que difieren ligeramente en su secuencia.

Lípido- Grasas o aceites insolubles en agua. En una célula, son uno de los componentes primarios de la membrana celular

Organismo- entidad viva, como una célula, un animal o una planta.

Proteínas terapéuticas- proteínas que se administran para tratar enfermedades.

Pandemia de SARS-CoV-2- Brote de enfermedad vírica que comenzó a finales de otoño de 2019 y que provocó una propagación mundial a lo largo de 2019 y 2020.

Vacuna: sustancia que se administra a un paciente para simular una enfermedad y promover una respuesta inmunitaria que le proteja cuando se enfrente al agente patógeno real.

Variante- Algo que difiere ligeramente de otra cosa del mismo tipo. En biotecnología suele aplicarse a proteínas o ácidos nucleicos y se utiliza para describir a los miembros de una biblioteca.

Un marco educativo en microbiología centrado en la

Un marco educativo en microbiología centrado en la

Un marco educativo en microbiología centrado en la