

# Circuitos integrados bioinformadores bioluminiscentes (CIBB)

*Dianney Clavijo G.<sup>1</sup>*  
*Gregory García M.<sup>2</sup>*  
*Dianney Melissa Clavijo G.<sup>3</sup>*  
*Ciro A. Casadiego T.<sup>4</sup>*  
*Rafael Zamora<sup>5</sup>*  
*Ananías García<sup>6</sup>*  
*Ángela Rodríguez<sup>7</sup>*  
*Julio Alarcón<sup>8</sup>*

## RESUMEN

Los circuitos integrados bioinformadores bioluminiscentes (CIBB) son dispositivos que constan de una célula viva modificada por ingeniería genética para responder a un inductor determinado con luminiscencia, la cual es captada por un chip y convertida en una señal cuantificable. Se utilizaron inicialmente en la detección de agentes contaminantes, físicos o químicos, pero en la actualidad se realizan ensayos clínicos, en los cuales se utilizan linfocitos B para la detección de microorganismos patógenos y en la evaluación de la efectividad del tratamiento instaurado. Se plantea su posible uso en la detección precoz de células cancerosas y para monitorizar los niveles sanguíneos de sustancias útiles en el diagnóstico clínico.

**Palabras clave:** CIBB, biosensores, ensayo Canary.

## ABSTRACT

The bioluminescent bioinformator integrated circuits (BBIC) are dispositives composed of live cells modified by genetic engineering technics to response to an inductor determined with luminescence, that is captured for a chip and converted in to a quantifiable signal. Its initial use was in the detection of contaminants physical and chemical

pollutants agents, but, nowadays, it is used in clinical trials to detect pathogenic microorganisms and to evaluate the therapeutic efectivity. It has been established its possible use in the acute detection of neoplastic cells and in surveillance of sanguineous nivels of medical parameters in clinical practice.

**Key words:** biosensors, Canary assay.

- 1 Profesora distinguida, coordinadora, Área de Morfología, Instituto de Ciencias Básicas, Facultad de Medicina, Universidad del Rosario; profesora asistente, Departamento de Morfología, Universidad Nacional de Colombia.
- 2 Instructor asistente, Área de Morfología, Instituto de Ciencias Básicas, Facultad de Medicina, Universidad del Rosario.
- 3 Estudiante, Instituto Alberto Merani.
- 4 Profesor distinguido, Área de Morfología; director, Instituto de Ciencias Básicas, Facultad de Medicina, Universidad del Rosario; profesor, Departamento de Morfología, Universidad Nacional de Colombia.
- 5 Instructor asociado, Área de Bioquímica, Instituto de Ciencias Básicas, Facultad de Medicina, Universidad del Rosario.
- 6 Instructor asociado, Área de Morfología, Instituto de Ciencias Básicas, Facultad de Medicina, Universidad del Rosario.
- 7 Estudiante de Maestría en Ciencias Biológicas, con énfasis en Bioquímica, Pontificia Universidad Javeriana.
- 8 Instructor asociado, Área Morfología, Instituto de Ciencias Básicas, Facultad de Medicina, Universidad del Rosario.

## INTRODUCCIÓN

La mayoría de las células son hábiles en la detección de microambientes químicamente contaminados. Cuando entran en contacto con un agente químico lesivo, los genes promotores transcriben ARN mensajero de proteínas que ayudan a la célula a combatir la lesión o a adaptarse a la sustancia a la cual ha sido expuesta. Un bioinformador es una célula viva, manipulada por ingeniería genética, para producir una señal en respuesta a un agente ambiental químico o físico específico. En estas células parte de los genes promotores han sido reemplazados por genes de reporte que, de la misma manera, con activados en presencia del agente, lo que da lugar a la producción de proteínas informadoras que generan una señal detectable (figura 1)[1-3]. La señal emitida por el bioinformador es diversa: reacción enzimática, cambio en la coloración, fluorescencia, luminiscencia, señales quimioluminiscentes o electroquímicas. También han resultado atractivos los bioinformadores porque la proteína informadora se modifica para ser expresada en la superficie celular con el objeto de ser reconocida por un anticuerpo monoclonal específico. De esta forma, la presencia de un contaminante en el medio se traduce en una señal inmunológica[4-5]. En la mayoría de los casos, la señal se hace evidente utilizando algún sistema identificador, por ejemplo, al añadir un sustrato a la célula o al activar la señal con alguna fuente de luz externa específica. Sólo en pocos casos la señal es emitida por el bioinformador en sí. La tecnología genética disponible permite aumentar la sensibilidad del bioinformador hacia un cierto agente físico o químico. De la misma manera, la actividad de las proteínas informadoras se puede manipular con el objeto de ampliar su respuesta hacia un gran número de variantes estructurales de un contaminante o, por el contrario, restringir su especificidad hacia un espectro muy reducido.

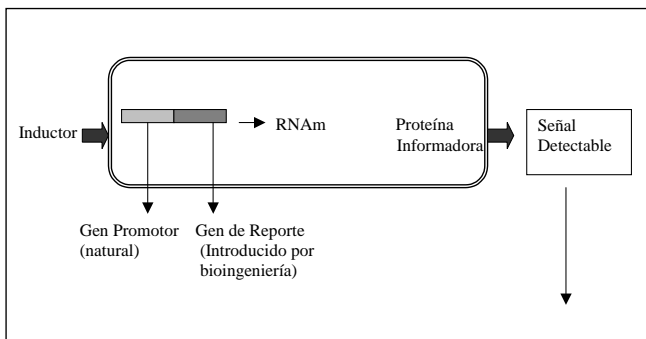


Figura 1. Representación esquemática del funcionamiento de un Bioinformador.

Inicialmente, los bioinformadores se aplicaron exclusivamente en la detección de contaminantes ambientales[ 2, 6], pero el hecho de que se puedan insertar genes de reporte en células bacterianas y de mamíferos, ha abierto la puerta para

su aplicación en múltiples áreas, incluido el diagnóstico médico[ 2, 7-9].

## Bioinformadores bioluminiscentes

Este tipo de bioinformadores emite una señal luminosa cuando se activa su gen de reporte. Actualmente, su uso es bastante amplio e incluye áreas de interés médico que se describen en el apartado final del artículo. A continuación se describen los genes de reporte de mayor interés[ 9, 10].

- Sistema genético *lux*: este sistema genético consiste en cinco genes (*luxA*, *luxB*, *luxC*, *luxD* y *luxE*) que codifican la proteína enzimática de la luciferasa, enzima que cataliza las reacciones de emisión de luz visible. De la combinación utilizada de los genes depende el sistema identificador de la señal que se utilice. Los bioinformadores *luxAB* requieren la adición de un sustrato para completar la reacción. Los bioinformadores *luxCDABE* poseen un sistema generador de luz completo que no requiere ni la adición de sustratos ni la excitación por una fuente luminosa externa. El más conocido de estos sistemas fue el utilizado para la detección de naftaleno en el medio ambiente. La proteína reguladora denominada NahR activa el promotor Pnah para la transcripción de los genes que codifican las enzimas implicadas en la ruta metabólica. Mediante manipulación genética fue posible construir un sistema en el que el mismo promotor Pnah dirige la expresión de los genes de reporte *lux* de la bacteria *Vibrio fischeri*. Mediante la utilización de esta bacteria como sistema sensor, la presencia de naftaleno en el medio se traduce en una emisión de luz.
- Sistema genético *luc*: la luciferasa cataliza una reacción que produce luz visible en el rango de 550 a 575 nm que requiere la adición de sustrato para que la reacción ocurra.
- Sistema aequorina: la aequorina es una proteína aislada de manera natural del pez *Aequorea victoria*. Con la adición de sustratos específicos es posible identificar la emisión de luz azul en el rango de 460 a 470 nm. Es el modelo más utilizado para la detección de virus y bacterias patógenas.
- Sistema GTP: la proteína fluorescente verde (GFP), aislada también del pez *Aequorea victoria*, produce una señal fluorescente de diversos colores, además del azul, sin adición de sustrato exógeno. Sus aplicaciones en las células de mamíferos ha permitido el avance en el conocimiento de la dinámica de varios procesos citoplasmáticos y de dinámica intracelular.

### Circuitos integrados bioinformadores bioluminiscentes (CIBB)

Una vez que el bioinformador ha identificado un agente físico o químico, ¿cómo “convencerlo” de que se comunique con nosotros? Investigadores de la NASA = National Aeronautics and Space Administration han unido los bioinformadores, bacterias en la mayoría de los casos, a circuitos electrónicos ensamblados en un chip especial de 2 x 2 mm que funcionan no sólo detectando la señal emitida por el bioinformador sino como transductor que convierte la señal biológica en una señal eléctrica cuantificable; esto ha dado lugar a los CIBB, sistemas de bajo costo, bajo gasto energético, muy resistentes y con la posibilidad de diseñarse para detectar casi todo: cadmio, cromo, cobalto, cobre, proteínas, plomo, mercurio, ultrasonido y radiación ultravioleta, por mencionar algunos[ 2, 5, 9-10).

Un CIBB consta básicamente de los siguientes elementos (figura 2):

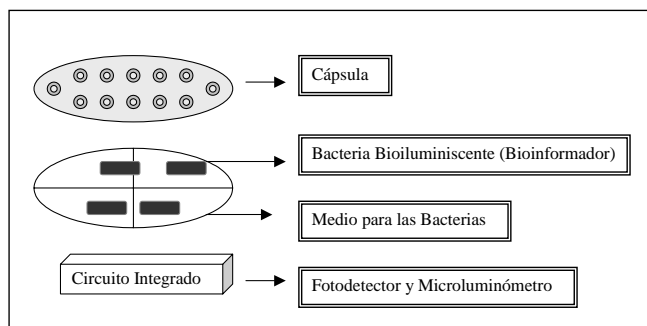


Figura 2. Esquema Básico de un Circuito Integrado Bioinformador Bioluminiscente (CIBB)

Un medio que brinde un adecuado suministro de nutrientes para mantener a las bacterias con vida pero que controle su proliferación (si cambia el número de células se modifica la cantidad de luz emitida que corresponde a cada nivel del compuesto detectado).

Bacterias bioluminiscentes encapsuladas en el medio antes mencionado para garantizar que sean inmovilizadas cerca al chip. La cápsula debe contener poros adecuados para que los agentes que se van a detectar puedan fluir hacia el interior y, de esta manera, sean detectados por el bioinformador y, además, tener buena transparencia óptica de modo que si las bacterias emiten luz, el chip pueda percibirla.

Chip que posee un circuito integrado microluminómetro que detectaría la señal luminosa y la procesaría para convertir la señal biológica en una señal cuantificable, al manejar y almacenar la información derivada de la bioluminiscencia. Se le puede incorporar un transmisor inalámbrico de frecuencia remota.

Para los investigadores de la NASA es vital el desarrollo de estos dispositivos. En una nave espacial herméticamente cerrada, las sustancias producidas en los experimentos científicos o bioproductos se pueden acumular y constituir un riesgo para los tripulantes. Además, se piensa que en el futuro se convertirán en el sistema más barato de inspección tanto en situaciones comunes, por ejemplo, hongos difíciles de percibir e implicados en el síndrome de edificios enfermos, así como en bioterrorismo[5].

### El ensayo CANARY, un ejemplo del uso médico de los CIBB

En el ensayo CANARY (Cellular Analysis and Notification of Antigen Risks and Yields), los linfocitos B fueron modificados genéticamente para expresar la proteína aequorina, proteína bioluminiscente dependiente del calcio, así como anticuerpos específicos para patógenos de interés. Cuando los linfocitos son expuestos a bajas concentraciones de antígenos del patógeno, en pocos segundos se elevan las concentraciones de calcio intracelular lo cual provoca la emisión de luz. Los linfocitos B como bioinformadores son extraordinariamente rápidos, sensibles y específicos; por ejemplo, las células diseñadas para la identificación de *Yersinia pestis* pudieron detectar menos de 50 unidades formadoras de colonias UFC, en un tiempo inferior a tres minutos, incluido el paso de concentración. La probabilidad de detección estuvo en el rango de 62% para 20 UFC a 99% para 200 UFC, donde la tasa de falsos positivos fue de 0,4%. Estos ensayos también se han utilizado para la detección de *Escherichia coli* en alimentos, detectando cantidades tan pequeñas como 500 UFC/g en menos de cinco minutos, incluido el tiempo inicial de preparación de la muestra. Esto es notable, sobre todo si se tiene en cuenta que el tiempo empleado en pruebas diagnósticas para esta bacteria con la técnica de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) es de 30 a 60 minutos; el límite de la detección habitual es de 10.000 UFC/g. De la misma manera, se han realizado ensayos para la detección de *Francisella tularensis*, el virus de la encefalitis equina venezolana, *Bacillus anthracis*, *Salmonella Typhimurium*, *Staphylococcus aureus*, y se considera que la posibilidad de crear bioinformadores específicos es infinita. Además de una favorable relación costo-beneficio, ya que las células pueden ser utilizadas para millones de ensayos y almacenadas indefinidamente en refrigeración, los linfocitos B como bioinformadores representan un método de diagnóstico muy rápido en pacientes que requieren un tratamiento inmediato[8].

### Posibilidades médicas de los CIBB

En la actualidad, se realizan ensayos clínicos utilizando bioinformadores con los genes de reporte *lux* que pueden ser utilizados en la evaluación de la efectividad del tratamiento

antibiótico, pruebas de mutagenicidad, detección de diversos patógenos, ultrasonido y radiación ultravioleta, relación de agentes que provocan daño en el ADN y su relación con lesiones cancerosas y ensayos de toxicidad.

Con el gen de reporte GFP las aplicaciones son bastante prometedoras. Se han realizado ensayos exitosos para evidenciar la respuesta de las neuronas del cordón espinal a varios estímulos; se ha monitorizado la liberación de medicamentos, incluso quimioterapéuticos, a tejidos y se ha observado la supervivencia de las células y las interacciones moleculares que se desencadenan después del tratamiento; se han identificado con mayor efectividad las células infectadas por el virus de la inmunodeficiencia humana, y se han estudiado las interacciones proteína-proteína en células vivas. Gracias a la identificación de

proteínas específicas secretadas por células preneoplásicas en fluidos corporales, se abre la posibilidad de desarrollar CIBB que emitan señales en respuesta a dichas proteínas. De esta manera, las células cancerosas se podrían detectar antes del desarrollo del tumor, se iniciaría el tratamiento médico y, además podría evaluarse la efectividad del mismo[ 2, 7, 11].

Finalmente, se encuentra en diseño experimental un CIBB que responde específicamente a la glucosa, con la idea de ser implantado en personas diabéticas para el seguimiento de los niveles sanguíneos de la misma. El chip incluye un radiotransmisor que permite una comunicación por control remoto a un sistema que recibiría la señal. Esta tecnología puede adaptarse a la detección de proteínas tumorales específicas[ 2, 7, 11].

## BIBLIOGRAFÍA

1. King JMH *et al.* *Rapid, sensitive bioluminescence report technology for naphthalene exposure and biodegradation.* Science 1990; 249: 778-81.
2. Flinn E. Silicon chips use bacteria to sense danger. Aerospace America 2004; 20-2.
3. Holmes D.S. *et al.* *Development of biosensors for the detection of mercury and copper ions.* Environ Geochem Health 1994; 16: 229-33.
4. Meighen E.A. Genetics of bacterial bioluminescence. Annu Rev Genet 1994; 28: 117-39.
5. Simpson M.L. *et al.* *An integrated CMOS microluminometer for low-level luminescence sensign in the bioluminescent bioreporter integrated circuit.* Sensors Actuator 2001; B72: 135-41.
6. Hermens J. *et al.* *Quantitative structure-activity relationships and mixture toxicity of organic chemicals in Photobacterium phosphoreum: the Microtox test.* Ecotoxiol Environ Saf 1985; 9: 17-25.
7. Contag C.H. *et al.* *Use of reporter genes for optical measurements of neoplastic disease in vivo.* Neoplasia 2000; 2: 41-52.
8. Rider T.H. *et al.* *A B cell-based sensor for rapid identification of pathogens.* Science 2003; 301: 213-5-
9. Francis K.P. *et al.* *Monitoring bioluminescent Staphylococcus aureus infections in mice using a novel luxABCDE construct.* Infect Immun 2000; 68: 3594-600.
10. Simpson M.L. *et al.* *Bioluminescent bioreporter integrated circuits (BBICs): whole-cell environmental monitoring devices.* Proceedings, 30<sup>th</sup> International Conference on Environmental Systems (Society of Automotive Engineers) 2000.
11. Legler J. *et al.* *Development of a stable transfected estrogen receptor-mediated luciferase reporter gene assay in the human T47D breast cancer cell line.* Toxicol Sci 1999; 48: 55-66.