



UNIVERSIDAD REGIONAL AMAZÓNICA IKIAM

FACULTAD DE CIENCIAS DE LA VIDA

INGENIERÍA EN BIOTECNOLOGÍA

**PARTES BIOLÓGICAS Y ESTRATEGIAS EMPLEADAS EN EL
DESARROLLO DE BIOSENSORES PARA LA DETECCIÓN DE
CADMIO EN MUESTRAS AMBIENTALES**

Proyecto de investigación previo a la obtención del Título de:

INGENIERA EN BIOTECNOLOGÍA

AUTORA: MÓNICA PAOLA SÁNCHEZ PRADO

TUTORA: PhD. ERY ODETTE FUKUSHIMA

Napo-Ecuador

2022

DECLARACIÓN DE DERECHO DE AUTOR, AUTENTICIDAD Y RESPONSABILIDAD

Tena, 21 de junio de 2022

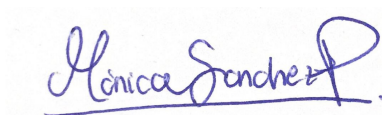
Yo, Mónica Paola Sánchez Prado con documento de identidad N°0106500606, declaro que los resultados obtenidos en la investigación que presento en este documento final, previo a la obtención del título de Ingeniera en Biotecnología, son absolutamente inéditos, originales, auténticos y personales.

En virtud de lo cual, el contenido, criterios, opiniones, resultados, análisis, interpretaciones, conclusiones, recomendaciones y todos los demás aspectos vertidos en la presente investigación son de mi autoría y de mi absoluta responsabilidad.

Por la favorable atención a la presente, suscribo de usted,

Atentamente,

Firma



Mónica Paola Sánchez Prado

0106500606

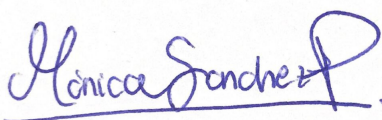
AUTORIZACIÓN DE PUBLICACIÓN EN EL REPOSITORIO INSTITUCIONAL

Yo, Mónica Paola Sánchez Prado con documento de identidad N° 0106500606, en calidad de autora y titular de los derechos morales y patrimoniales del trabajo de titulación: "Partes biológicas y estrategias empleadas en el desarrollo de biosensores para la detección de cadmio en muestras ambientales", de conformidad con el Art. 114 del CÓDIGO ORGÁNICO DE LA ECONOMÍA SOCIAL DE LOS CONOCIMIENTOS, CREATIVIDAD E INNOVACIÓN, reconozco a favor de la Universidad Regional Amazónica Ikiam una licencia gratuita, intransferible y no exclusiva para el uso no comercial de la obra, con fines estrictamente académicos.

Así mismo autorizo a la Universidad Regional Amazónica Ikiam para que realice la publicación de este trabajo de titulación en el Repositorio Institucional de conformidad a lo dispuesto en el Art. 144 de la Ley Orgánica de Educación superior.

Tena, 21 de junio de 2022

Firma



Mónica Paola Sánchez Prado

0106500606

Certificado de dirección de trabajo de integración curricular

Certifico que el trabajo de integración curricular titulado: “Partes biológicas y estrategias empleadas en el desarrollo de biosensores para la detección de cadmio en muestras ambientales”, en la modalidad de: artículo de revisión, fue realizado por: Mónica Paola Sánchez Prado, bajo mi dirección.

El mismo ha sido revisado en su totalidad y analizado por la herramienta de verificación de similitud de contenido; por lo tanto, cumple con los requisitos teóricos, científicos, técnicos, metodológicos y legales establecidos por la Universidad Regional Amazónica Ikiam, para su entrega y defensa.

Tena, 21 de junio de 2022

Firma:

Ery Odette Fukushima

C.I: 1759301714

ÍNDICE GENERAL

Introducción.....	1
Métodos.....	4
1. Generalidades sobre los biosensores.....	5
1.1. Biosensores de células enteras.....	6
1.2. Biología sintética.....	8
2. Partes biológicas y estrategias empleadas en el desarrollo de biosensores para la detección de cadmio.....	9
2.1. Partes biológicas.....	9
2.1.1. Genes de detección.....	10
2.1.2. Genes reporteros.....	13
2.1.3. Circuitos genéticos.....	16
2.1.4. Chasis del biosensor.....	20
2.2. Condiciones externas.....	22
2.2.1. Tipo de element analizado.....	22
2.2.2. Medio de cultivo	22
2.2.2. Sensibilidad y selectividad.....	22
3. Propuesta de Biosensor enfocado en el aumento de la sensibilidad.....	24
Conclusiones.....	27
Referencias	33

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1.	Detalles de partes biológicas, límites de detección, selectividad, medio de cultivo, tipo de cepa, estrategia y tipo de muestra analizada de los biosensores reportados en la literatura entre los años 2005 y 2021.....	28
Tabla 2.	Detalles de partes biológicas, límites de detección, selectividad, medio de cultivo, tipo de cepa, estrategia y tipo de muestra analizada de los biosensores reportados en la competencia iGEM entre los años 2009 y 2021.....	30

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1.	Esquema básico de un biosensor de célula completa.....	7
Figura 2.	Esquema del funcionamiento del circuito genético toggle switch....	17
Figura 3.	Esquema del funcionamiento del circuito genético AND gate.....	18
Figura 4.	Esquema del funcionamiento del sistema de transcripción T7 en presencia de cadmio.....	20
Figura 5.	Gráfico modelo del circuito para un biosensor enfocado en mejorar la sensibilidad.....	25
Figura 6.	Gráfico modelo del circuito para un biosensor enfocado en mejorar la selectividad.....	26

ÍNDICE DE ANEXOS

Imagen suplementaria 1. Plásmido pSB1C3V1.....	38
Imagen suplementaria 2. Plásmido pSB1C3V2.....	39

Resumen

La contaminación por cadmio proviene principalmente de fuentes naturales o antropogénicas. La minería ilegal y la explotación petrolera son dos de las actividades más contaminantes para la región de la Amazonía Ecuatoriana afectando a las comunidades cercanas. Para monitorear este problema se necesita de instrumentos económicos, sencillos, precisos y sensibles, como son los biosensores. Este instrumento compuesto por un sensor biológico, que reconoce un cambio químico o físico, acoplado a un elemento transductor que produce una señal medible en respuesta a la presencia del cadmio. Para obtener biosensores específicos para cadmio se usa la biología sintética, como una herramienta eficiente, que permite la modificación de genes para adquirir las características deseadas. Por lo cual, se realizó una recopilación de las partes biológicas (genes receptores, genes reporteros y chasis) y estrategias usadas en biosensores para la detección de cadmio de los artículos científicos y equipos de la competencia iGEM. Esta recopilación muestra que los genes más empleados como elementos de detección son los genes *cadR* y *cadC*, mientras que el gen más utilizado como elemento reportero es la proteína verde fluorescente y la bacteria más empleada como chasis es *Escherichia coli*. Entre las estrategias más novedosas fueron la creación de un toggle switch, de una puerta lógica AND y la implementación de la maquinaria de transcripción del bacteriófago T7. Con esta información se plantea dos estrategias que podrían mejorar la sensibilidad y selectividad de un biosensor para que sean la base de un sistema alternativo para la detección *in situ* de cadmio en muestras ambientales locales.

Palabras claves: iGEM, biología sintética, monitoreo, gen reportero, gen de detección, cadmio

Abstract

Cadmium contamination comes mainly from natural or anthropological sources. Illegal mining and oil exploitation are two of the most contaminating activities for the Ecuadorian Amazon region, affecting nearby communities. To monitor this problem, simple, inexpensive, precise and sensitive instruments are needed, such as biosensors. This instrument is composed of a biological sensor, which recognizes a chemical or physical change, coupled to a transducer element that produces a measurable signal in response to cadmium. To obtain specific biosensors for cadmium, synthetic biology is used as an efficient tool that allows the modification of genes to acquire the desired characteristics. Therefore, a compilation of the biological parts (receptor genes, reporter genes and chassis) and strategies used in biosensors for the detection of cadmium from scientific articles and iGEM competition teams was carried out. This compilation shows that the most used genes as detection elements are the *cadR* and *cadC* genes, while the most used gene as reporter element is the green fluorescent protein and the most used bacterium as chassis is *Escherichia coli*. Among the most novel strategies were the creation of a toggle switch, an AND logic gate and the implementation of the transcription machinery of bacteriophage T7. Based on the previous information, two are proposed for the development of cadmium biosensor with improved sensitivity and selectivity, these could be the basis of an alternative system for the *in situ* detection of cadmium in local environmental samples.

Keywords: iGEM, synthetic biology, monitoring, reporter gene, detection gene, cadmium

Introducción

A lo largo del tiempo, la contaminación por parte de los metales pesados ha tenido gran relevancia para el planeta, estos no se biodegradan y al no metabolizarse en ningún organismo se bioacumulan en diversas especies (Cerminati et al., 2015; Verma & Singh, 2005). Dentro de los diferentes metales pesados, el cadmio es liberado al ambiente por fuentes naturales como la geogénesis o por fuentes antropogénicas como las emisiones industriales, la explotación minera y petrolera, la eliminación inadecuada de residuos y la aplicación de fertilizantes fosfatados (Argüello et al., 2019; Chavez et al., 2015; Järup, 2003). Siendo la explotación minera y la producción de petróleo las actividades que más aporta con metales pesados en la Amazonía Ecuatoriana debido a los residuos de hidrocarburos y relaves mineros (Rivera-Parra et al., 2021).

Los depósitos de petróleo pueden contener metales pesados como cadmio o litio en su composición, que al estar en contacto con el agua se transportan fácilmente, infiltrándose en el suelo y contaminando los cuerpos de agua cercanos (Rivera-Parra et al., 2021). Entre 2015 y 2021 se registraron cerca de 900 derrames de petróleo en Ecuador, de los cuales algunos no llegaron a ser noticia (Rojas-Sasse, 2022). En el 2020 se produjo un derrame en la provincia de Napo de aproximadamente 15.800 barriles afectando al Río Coca y por ende a las comunidades adyacentes (España, 2022; Rojas-Sasse, 2022). El 28 de enero del 2022, se reportó una ruptura del Oleoducto de Crudos Pesados (OCP), debido a la caída de rocas, derramándose aproximadamente 6.300 barriles, afectando a un área del Parque Nacional Cayambe Coca (España, 2022; Rojas-Sasse, 2022; Vásconez, 2022). Varias comunidades indígenas de la zona fueron afectadas, quedándose sin agua limpia, ni alimentos por al menos tres días, debido a esto, el Gobierno de Ecuador ordenó de manera urgente acciones de limpieza y remediación (España, 2022).

Aunque la Amazonia ecuatoriana se conoce históricamente por su explotación de petróleo, recientemente la actividad minera ha aumentado en esta región, principalmente en las provincias de Sucumbíos, Orellana, Napo, Morona Santiago y Zamora Chinchipe (Mestanza-Ramón et al., 2022). En general, los depósitos de oro son ricos en arsénico y cadmio (Rivera-Parra et al., 2021), así, la contaminación proviene principalmente de la minería ilegal, ya que no se utilizan métodos tecnificados para la extracción. Como consecuencia, la contaminación química se produce en las riberas de las masas de agua que atraviesan las zonas mineras, liberando sustancias como

mercurio, cianuro, ácido nítrico, zinc, plomo, arsénico, cadmio y manganeso (Mestanza-Ramón et al., 2021).

Actualmente, se ha registrado gran cantidad de yacimientos de minería en al menos seis parroquias (Puerto Napo, Chonta Punta, Ahuano, Misahuallí, Pano y Talag) de Tena, Napo, interviniendo al menos 70 hectáreas (Notimundo al Día, 2022; Torres, 2022). En febrero del 2022, se reportó actividades de minería ilegal en el sector Yutzupino (Puerto Napo) (Holguin, 2022), lo cual provocó que cientos de habitantes, organizaciones indígenas y colectivos a favor del ambiente protestaran en la ciudad de Tena contra estas actividades (El Comercio, 2022a). Gracias a aquello, 1.500 uniformados de las Fuerzas Armadas y Policía Nacional participaron en un operativo contra la minería ilegal en este sector, decomisando en este operativo cerca de 100 excavadoras y 8.000 galones de combustible, limitando así la continuación de esta explotación (El Comercio, 2022b; El Universo, 2022; Holguin, 2022).

La explotación minera y petrolera afectan a las comunidades adyacentes, generando exposición al cadmio principalmente por el consumo de alimentos y agua contaminados. El cadmio contenido en el agua y suelo es absorbido por ciertos cultivos y organismos acuáticos, siendo bioacumulado y bioamplificado en la cadena alimentaria (World Health Organization, 2010). La reactividad del cadmio con componentes celulares y su acumulación en las células tiene una vida media de 25 años, causando daños en el ADN y a su vez, generando estrés oxidativo severo en los organismos (Kim et al., 2018; Tirado et al., 2015). Todo ello genera efectos tóxicos sobre el riñón, el sistema óseo y el sistema respiratorio (World Health Organization, 2010).

Debido a la amenaza que supone para los ecosistemas y la salud humana, la rápida detección y cuantificación de los contaminantes con herramientas analíticas rápidas, sencillas, precisas e *in situ* en el sitio de afectación son esenciales para aplicar con éxito estrategias eficaces de biorremediación (Bereza-Malcolm et al., 2015; Kim et al., 2018). Actualmente, hay métodos físicos y químicos que pueden monitorear cadmio de forma precisa y sensible. Los métodos más usados son los instrumentos analíticos convencionales (Gui et al., 2017; Tao et al., 2013), tales como: cromatografía de gases (GC), cromatografía líquida de alto rendimiento (HPLC), espectrometría de masas con plasma acoplada inductivamente (ICP/MS), espectrometría de absorción atómica (AAS), espectroscopia de emisión atómica (AES), electrodos selectivos de iones (ISE) y variaciones de estos métodos (Asif et al., 2016; Bereza-Malcolm et al., 2015; Kim et al.,

2018; Verma & Singh, 2005). Éstos, a pesar de tener gran precisión, tienen diversas desventajas como su alto costo, la necesidad de personal entrenado y laboratorios especializados, el tiempo de preparación de muestras y obtención de resultados, la limitación de realizar múltiples análisis, la generación de subproductos nocivos y la falta de portabilidad (Belkin, 2003; Eltzov & Marks, 2011; Gui et al., 2017; Kim et al., 2018; Prabhakaran et al., 2018; Tao et al., 2013; Verma & Singh, 2005). Además, estas tecnologías pueden no ser accesibles en todo el mundo, especialmente en los países en desarrollo, lo que limita su potencial para vigilar las zonas con mayor probabilidad de estar contaminadas debido a la falta de marcos normativos gubernamentales (Bereza-Malcolm et al., 2015). Por lo cual, con el fin de desarrollar métodos confiables para un control de la biodisponibilidad y toxicidad de los metales, los últimos avances científicos han recurrido a soluciones derivadas de la biotecnología, como son los biosensores (Duval & Pagnout, 2019).

El término biosensor se refiere a un dispositivo que incluye un elemento de detección biológica capaz de reconocer e interactuar con un analito de interés y un sistema que permite procesar la señal, ya sea cuantitativa o cualitativa producida por esta interacción (Teo & Wong, 2014; Vigneshvar et al., 2016). Estos instrumentos tienen la ventaja de poseer alta especificidad, bajo costo, facilidad de uso, portabilidad y la habilidad de proporcionar señales continuas en tiempo real (Asif et al., 2016; Teo & Wong, 2014; Verma & Singh, 2005). Este método se destaca por su capacidad de informar acerca de la presencia de la fracción del metal que está disponible para interactuar con la biota (la forma libre del metal), proporcionando una estimación directa de la toxicidad, en contraste con otras técnicas analíticas que cuantifican la cantidad total de metal presente en la muestra (Bousse, 1996; Cerminati et al., 2015).

En el presente trabajo se recopila la información reportada sobre las partes biológicas (genes para la detección de cadmio, genes reporteros y chasis) y estrategias usadas en el desarrollo de biosensores de célula completa para la detección de cadmio en muestras ambientales para determinar las variaciones más eficientes que pueden usarse para la creación de nuevos biosensores para la detección de cadmio en muestras ambientales. Con esta información se plantean dos estrategias para el posible aumento de la sensibilidad y selectividad de un biosensor para la detección de cadmio.

Métodos

Recolección de datos

Se realizó una búsqueda entre los años 2005 y 2021 en base de datos como Google Scholar, PubMed y ScienceDirect, también se usó la página de International Genetically Engineered Machine Foundation (iGEM). Para la búsqueda se utilizó la combinación de las siguientes palabras claves: whole cell, biosensor, cadmium, bacterial, bioreporter, CadR, CadC.

Los criterios de inclusión a considerar fueron: (1) estudios de biosensores que detecten únicamente cadmio, (2) investigaciones originales, (3) capítulos de libros, artículos de investigación y proyectos presentados en la competencia iGEM y (4) documentos en español o inglés. Por otro lado, los criterios de exclusión fueron: (1) artículos de revisión, patentes e investigaciones no originales, (2) estudios de biosensores que detecten múltiples metales pesados a la vez, (3) estudios que no contengan información necesaria (elementos de detección, muestra ambiental analizada; y especie de bacteria usada).

Análisis de datos

Para la selección de datos, los resultados de la búsqueda se analizaron mediante una revisión del texto completo incluida una revisión de las referencias citadas en los estudios para poder identificar otros estudios relacionados. A continuación, se extrajo elementos necesarios para la comparación como es el elemento biológico de detección, el gen reportero, la forma de respuesta del biosensor, el límite de detección, medio usado para la medición, tipo de cepa usada como chasis del biosensor, tiempo de respuesta del biosensor y por último tipo de muestra analizada. Toda esta información se recopiló en una tabla.

Diseño del biosensor

Para el diseño de los circuitos se usó el software TinkerCell (Chandran & Sauro, 2012), a continuación, se obtuvo las secuencias de las biopartes necesarias (elementos de detección, genes reporteros y elementos extras) de la base de datos Registry of Standard Biological Parts (parts.igem.org) o de los artículos enlistados en las tablas.

Una vez conseguidas todas las secuencias se usó la plataforma en línea Benchling (Benchling, 2022), unir todas las biopartes mediante digestión *in silico* para tener un plásmido resultante que conferirá las características del biosensor.

1. Generalidades sobre los biosensores

El primer biosensor fue desarrollado por Clark y Lyon en 1962 para medir la glucosa en muestras biológicas utilizando la estrategia de detección electroquímica de oxígeno (Saini et al., 2019; Vigneshvar et al., 2016). A partir de este, la investigación en biosensores ha cobrado un gran impulso en las últimas cinco décadas debido a sus aplicaciones en muchos campos de estudio como la monitorización medioambiental, el diagnóstico clínico, la seguridad alimentaria, la geoexploración, descubrimiento de fármacos, etc. (Gupta et al., 2019; Turner, 2013)

Según la definición de la IUPAC, un biosensor es “un dispositivo que utiliza reacciones bioquímicas específicas mediadas por enzimas aisladas, inmunosistemas, tejidos o células enteras para detectar compuestos químicos, generalmente mediante señales eléctricas, térmicas u ópticas” (Nagel et al., 2007). Este está compuesto por un componente o sensor biológico, que reconoce un cambio químico o físico, acoplado a un elemento transductor que produce una señal medible en respuesta al cambio ambiental (Bereza-Malcolm et al., 2015; Daunert et al., 2000). Indica si una determinada sustancia está presente, y en qué concentración se encuentra aportando información cuantitativa o semi cuantitativa (Bousse, 1996; Eltzov & Marks, 2011). Los biosensores ofrecen un amplio rango de detección, se puede usar *in situ* y en tiempo real, lo que los hace flexibles para ser empleados como sistema de alerta temprana en la evaluación de contaminantes ambientales (Singh & Kumar, 2021; Wan Jusoh & Wong, 2014).

Los sistemas de biosensores pueden clasificarse en tres tipos básicos en función del componente sensor: molecular, celular y tisular (Daunert et al., 2000; Gui et al., 2017). Los biosensores moleculares son sistemas libres de células que usan aptámeros, enzimas, ácidos nucleicos, péptidos, anticuerpos o proteínas aislados y purificados para la detección (Daunert et al., 2000; Gui et al., 2017). Entre sus principales características están su selectividad, especificidad y su rapidez en la reacción en condiciones óptimas y agentes detectores inmovilizados (Bilal & Iqbal, 2019; Kim et al., 2018). Su función se basa en la activación o la inhibición de sus actividades en presencia de metales pesados se activa o inhiben el funcionamiento de un sistema como es el caso de las

metaloproteínas que actúan como cofactor en las enzimas (Verma & Singh, 2005). Sin embargo, debido al costo de aislamiento, la reducida vida útil de las moléculas y su sensibilidad a los cambios en parámetros físicos como la temperatura o el pH, tales biosensores no siempre son ideales para aplicaciones en campo (Bereza-Malcolm et al., 2015; Bilal & Iqbal, 2019; Daunert et al., 2000; Saini et al., 2019). Por otro lado, los biosensores basados en tejidos se componen de varios tipos de células que proporcionan datos funcionales; sin embargo, este tipo de sensor suelen ser menos estables y, por tanto, su aplicabilidad como biosensores es limitada (Daunert et al., 2000). Por todas las desventajas mencionadas anteriormente, los biosensores más usados son los de tipo celular o también llamados biosensores de células completa.

1.1. Biosensores de células enteras

Algunos parámetros como la biodisponibilidad, la toxicidad, la genotoxicidad (daños al material genético) y el daño proteico no pueden ser investigados con el reconocimiento molecular o el análisis químico, únicamente pueden ser ensayados utilizando células enteras (Belkin, 2003; Eltzov & Marks, 2011). Así que, cuando se usan células como biosensores, las enzimas y otras moléculas necesarias para la detección están presentes en su entorno nativo y, por lo tanto, muestran una actividad y especificidad óptimas frente al analito objetivo (Gupta et al., 2019).

Comúnmente se emplean microorganismos unicelulares, en especial bacterias, ya que son la entidad más simple que puede reflejar los efectos fisiológicos reales del analito en un organismo vivo (Teo & Wong, 2014). Estos microorganismos diseñados artificialmente constan de genes introducidos que presenta afinidad por metales pesados para así, usando las vías metabólicas del microorganismo, permitir la transcripción de un gen produciendo proteínas reporteras (Cerminati et al., 2015; Duval & Pagnout, 2019; Vigneshvar et al., 2016). Asimismo, se utilizan organismos eucariotas como algas, protozoos, hongos, levaduras e incluso células vegetales o animales, siendo el elemento reportero la determinación de su estado metabólico general (Bilal & Iqbal, 2019; Singh & Kumar, 2021; Teo & Wong, 2014).

El uso de biosensores con base en células enteras, presenta varias ventajas como su facilidad y bajo costo de cultivo, su fácil autoreplicación (gran tamaño de población), sobreviven en condiciones adversas (temperatura, salinidad, pH y metales pesados), no requieren ninguna técnica especial para el análisis, se puede obtener información sobre

la toxicidad celular de los analitos y se pueden modular aún más mediante la manipulación genética (Belkin, 2003; Eltzov & Marks, 2011; Kim et al., 2018; Teo & Wong, 2014). Por otro lado, están limitados por su menor sensibilidad a las señales ambientales en comparación a los biosensores moleculares (Bilal & Iqbal, 2019), su falta de estabilidad genética, su corta vida útil, su necesidad de mantenimiento de la actividad celular, su necesidad de un largo periodo de contacto con los analitos para producir respuestas significativas, su limitación en las condiciones experimentales y su falta de selectividad sobre los analitos (Bilal & Iqbal, 2019; Teo & Wong, 2014).

Un biosensor ideal debe cumplir dos condiciones: sensibilidad (respuesta a una baja concentración de analitos) y especificidad (capacidad de discriminar entre especies de analitos según los elementos de biorreconocimiento) (Eltzov & Marks, 2011). Su funcionamiento general consta de genes reporteros introducidos, por lo general en forma de plásmidos, que se fusionan con un gen receptor, comúnmente se trata de su promotor, cuya expresión se debe a una fuerte afinidad con el elemento metálico a detectar (**Figura 1**). El promotor cuando está unido con el ion metálico, permite la expresión de genes reporteros y la subsecuente producción de proteínas reporteras (por ejemplo, proteína verde fluorescente o luciferasa) (Duval & Pagnout, 2019; Vigneshvar et al., 2016).

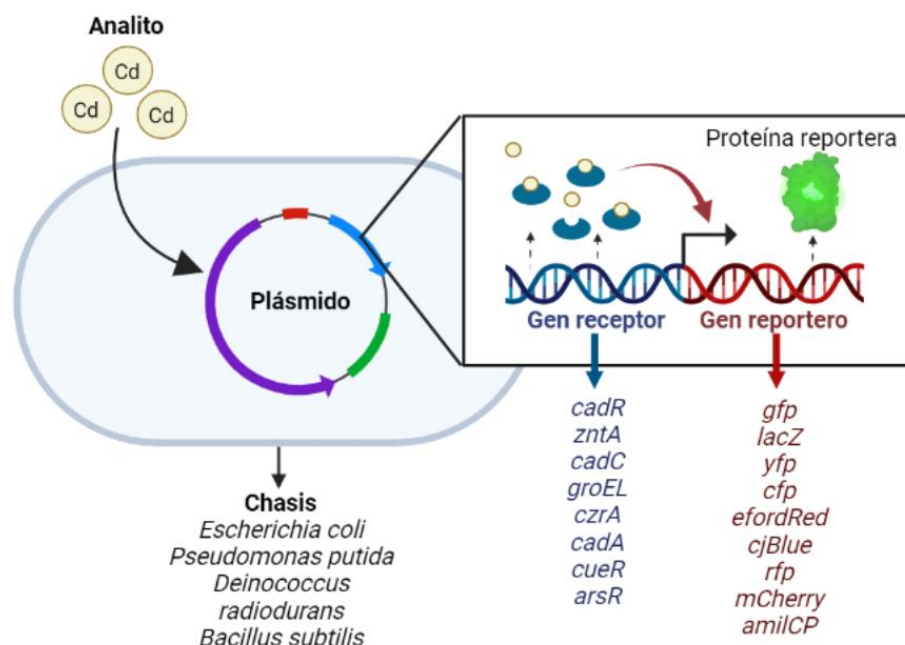


Figura 1. Esquema básico de un biosensor de célula completa.

Realizado por: Sánchez, 2022

1.2 Biología sintética

Dado que un solo tipo de célula es incapaz de responder a todo tipo de contaminantes, es necesario desarrollar un sistema combinatorio para lograr una respuesta rápida contra una amplia gama de analitos (Saini et al., 2019). Uno de los métodos para superar este problema es el uso de la biología sintética, esta disciplina ha crecido en las últimas dos décadas como la ingeniería sistemática y racional de sistemas biológicos, con el objetivo de generar dispositivos biológicos diseñados genéticamente con funcionalidades novedosas o aspirando a imitar comportamientos similares a la vida cotidiana en nuevos sistemas biológicos (Jainarayanan et al., 2021).

Recientemente, la biología sintética ha permitido el diseño de una amplia gama de biosensores de células enteras, basados en el concepto de modularidad para programar microorganismos con señales de salidas de forma selectiva, específica y rangos dinámicos prolongados requeridos para la detección en el mundo real (Kim et al., 2018; Vigneshvar et al., 2016). Los genes recombinantes resultantes pueden entonces clonarse en el huésped microbiano, ya sea por integración directa en el cromosoma o mediante un plásmido apropiado (Bilal & Iqbal, 2019). Los nuevos desarrollos en el diseño de biosensores se han producido, en parte, a la promoción del concurso International Genetically Engineered Machine (iGEM) (Bereza-Malcolm et al., 2015).

En esta competencia, los proyectos de biología sintética se han convertido en una amplia variedad de experiencias educativas y de formación (Kelwick et al., 2015). iGEM es una plataforma en la que los estudiantes de secundaria, pregrado y posgrado siguen enfoques de “diseño y prueba” basados en ingeniería para abordar problemas globales a través de soluciones centradas en sistemas biológicos sintéticos (Jainarayanan et al., 2021; Kelwick et al., 2015). El objetivo principal es educar a los estudiantes en biología sintética, para que puedan contribuir a los avances en esta disciplina (Kelwick et al., 2015), con el fin de entregar al menos el 10 % de sus proyectos como una solución del mundo real fácilmente aplicable, alineados con los Objetivos de Desarrollo Sostenible (ODS)(Jainarayanan et al., 2021; Vilanova & Porcar, 2014). Los elementos de la competencia se juzgan según criterios específicos y los equipos pueden ganar medallas y premios en varias categorías en función de la calidad del proyecto (Kelwick et al., 2015). La competencia iGEM y la biología sintética no solo han crecido y madurado al mismo tiempo, sino también de forma cooperativa. De hecho, la competencia ha impulsado a la biología sintética no solamente a través de ideas y proyectos innovadores

y visionarios, algunos han encontrado caminos para convertirse en empresas emergentes y también ha fomentado la generación de jóvenes científicos (Jainarayanan et al., 2021).

La competencia se basa en una idea simple: los principios de estandarización, abstracción y modularidad de la ingeniería de biología sintética para crear nuevas funciones (Vilanova & Porcar, 2014). Siendo el centro, la publicación de las secuencias y estándares técnicos usados en forma de piezas denominadas como 'BioBricks' (Goodman, 2008). Todas las construcciones de ADN sintetizadas por los equipos de iGEM están disponibles para todos los investigadores a través del Registro de Partes Biológicas Estándar (Kelwick et al., 2015). En los últimos años, el concurso ha puesto un mayor énfasis en asegurar que las piezas sometidas al registro sean de buena calidad y estén bien caracterizadas. Debido a esto, el número de piezas enviadas a iGEM se ha estabilizado desde 2010 en aproximadamente 1600 piezas (Kelwick et al., 2015).

iGEM se lleva a cabo en un marco pedagógico, por lo cual se ha producido muy pocas publicaciones científicas (Jainarayanan et al., 2021). Menos de la mitad de los proyectos finalistas se han publicado hasta ahora y la tasa de publicaciones no ha aumentado según el crecimiento de la competencia, esto debido a que, los proyectos aún requieren más tiempo para desarrollarse y converger en una publicación concisa mediante la verificación experimental (Jainarayanan et al., 2021; Vilanova & Porcar, 2014). Actualmente, no se encuentra información compilada de todos los elementos usados en la literatura y en otras fuentes como iGEM que permita la comparación entre partes usadas para el desarrollo de biosensores de célula completas.

2. Partes biológicas y estrategias empleadas en el desarrollo de biosensores para la detección de cadmio

2.1. Partes biológicas

Los iones metálicos desempeñan papeles críticos en el crecimiento celular y las funciones metabólicas de los microorganismos (Daunert et al., 2000), por lo cual estos han desarrollado vías de regulación genética implicadas en la desintoxicación metabólica y la homeostasis en presencia de estos elementos tóxicos (Kim et al., 2018). Los mecanismos que les permiten enfrentarse a altas concentraciones de metales

tóxicos son: (1) desarrollo de barreras selectivas, (2) eliminación continua de tóxicos de la célula, (3) transformación de los metales pesados a formas menos tóxicas, (4) secuestro intracelular y extracelular, y (5) reducción de la sensibilidad a los metales de los objetivos celulares (Singh & Kumar, 2021).

Los determinantes genéticos necesarios para la maquinaria de resistencia contra los metales pesados se organizan en operones, conformados por factores de transcripción, quinasas sensoras o elementos reguladores, que codifican proteínas o enzimas que realizan las funciones necesarias para que las células sean tolerantes a los iones metálicos y estos se encuentran regulados por la presencia o ausencia del ion metálico (Kim et al., 2018). Esto desencadena la expresión de los genes de resistencia para ayudar al microorganismo a sobrevivir (Daunert et al., 2000). En consecuencia, se han extraído diversas biopartes de los genomas de varios microbios que permite la detección de metales pesados que actualmente se encuentran disponibles en diferentes bases de datos de genomas microbianos o metagenomas (Kim et al., 2018). Por lo cual, la mayoría de los biosensores para la detección de metales pesados simulan el mecanismo de resistencia a metales (Singh & Kumar, 2021).

2.1.1. Genes de detección

Los módulos sensores pueden construirse a partir de elementos como factores de transcripción (activadores/represores) o quinasas sensoras, junto con elementos reguladores como promotores, operadores y sitios de unión a ribosomas (RBS)(Daunert et al., 2000; Kim et al., 2018; Ramamurthy et al., 2021). Estos elementos reguladores suelen responder intrínsecamente a compuestos estructuralmente idénticos que encajan en sus sitios de unión a efectores, lo cual la mayoría de los elementos de detección no son selectivos hacia un solo metal naturalmente (Bilal & Iqbal, 2019; Singh & Kumar, 2021).

Los parámetros de biosensores, como el tiempo de respuesta, la sensibilidad y la especificidad, están determinados por el tipo de elemento de detección utilizado en un biosensor (Gupta et al., 2019). Esta parte biológica consta de genes que pueden depender en gran medida del contexto, por lo cual se necesita de muchos intentos de diseño antes de identificar un conjunto óptimo de piezas (Rogers et al., 2016). En los casos en los que no se han encontrado partes biológicas sensoriales naturales, o aún no han evolucionado, la ingeniería mediante la evolución dirigida o el diseño

computacional puede ampliar o alterar la especificidad molecular de los sensores existentes, o incluso crear otros *de novo* (Rogers et al., 2016).

Al existir varios genes reguladores para cadmio se ha propuesto diferentes tipos de biosensores con diferentes partes biológicas, como se muestra, en la Tabla 1 y Tabla 2, la lista de biosensores propuestos en artículos de investigación y proyectos de iGEM que se registraron entre el 2005 y 2021. Los elementos de detección que más frecuentemente se usa son los genes *cadR* (Guo et al., 2021; He et al., 2021; Tao et al., 2013; The Stony Brook School NY, 2019; Wu et al., 2009), *cadC* (Colorado School of Mines, 2019; Kim et al., 2016; Liao et al., 2006), *zntA* (Elcin & Öktem, 2020; Yoon et al., 2016), *cadA* (FDR-HB Peru, 2019; Peshawar, 2017; SCUT, 2015; UPNAvarra, 2019), *czrA* y *arsR* (Cornell, 2009; Gaston Day School, 2013, 2019; Newcastle University, 2009), estos genes se destacan debido a que son los encargados a generar resistencia al cadmio en varias especies de bacterias.

Los genes *cadR* y *cadC* se aislaron de la bacteria *Pseudomonas aeruginosa*, que es resistente a los metales pesados aislada de aguas residuales de la industria, y que posee una alta resistencia al cadmio (Prabhakaran et al., 2018). El gen *cadR* codifica una proteína reguladora de la transcripción que actúa para controlar la expresión de un promotor (*PcadA*), da respuesta mayormente a cadmio, con respuestas menores a zinc, mercurio, cobre, níquel y cobalto (Brocklehurst et al., 2003). Aunque la capacidad de detección y unión de metales de *cadR* son muy poco conocidas (Prabhakaran et al., 2018). Por otro lado, el gen *cadC* forma parte del operón de resistencia al cadmio *CadA*, que es responsable de la salida de los iones de cadmio de la célula, en general da respuesta no solamente a cadmio, sino también plomo, manganeso, mercurio, antimonio, zinc y estaño (Bereza-Malcolm et al., 2015).

A lo largo de la evolución, la especificidad de los factores de transcripción para los metales pesados se ha visto alterada por cambios en ciertos residuos de aminoácidos (Kim et al., 2018). Así pues, en todos los biosensores estudiados se ha usado ciertas modificaciones para adquirir una especificidad únicamente hacia el cadmio. Por ejemplo, en el estudio de Tao et al. (Tao et al., 2013) se compararon dos biosensores con truncaciones en los aminoácidos c-terminal a los 10 y 21 aminoácidos del gen *cadR* para así mejorar la especificidad y la sensibilidad. Como resultado se obtuvo que al truncar en el aminoácido 21 mejoraba la selectividad al cadmio, pero se disminuía su sensibilidad a este metal, es decir, se obtuvo un límite de detección mayor. Además, en

los últimos años se ha desarrollado el diseño y predicción de la selectividad al cadmio mediante herramientas bioinformáticas, como en el caso del estudio de He et al. (He et al., 2021), en donde realizan un análisis filogenético comparando todas las secuencias variantes de gen *cadR* que se encontraban en la base de datos de National Center for Biotechnology Information (NCBI). Una vez analizados obtuvieron que la variante denominada CadR.10 era la mejor opción a pesar de que aún podía detectar iones de zinc, por lo cual decidieron efectuar una sobreexpresión de un gen exportador de iones de zinc (*zitB*) permitiendo el ingreso únicamente de cadmio hacia la célula, pero no lograron una diferencia significativa a la mejora de la selectividad.

El gen *zntA*, homólogo más cercano de CadA, codifica una ATPasa de tipo T que es responsable de la resistencia al cadmio al catalizar la salida activa de metal (Rensing et al., 1997). De manera que es posible usarlo como elemento de detección para cadmio, como en el estudio de Elcin & Öktem (Elcin & Öktem, 2020) que proponen un biosensor con este gen como el elemento de detección. En este artículo afirman que este gen es 30 veces más sensible (en términos de molaridad) al cadmio que otros metales. Otro gen utilizado como elemento de detección es *czrA* que proviene de la bacteria *Bacillus subtilis*, cuya función es reprimir la ATPasa de salida de CadA en ausencia de zinc, cadmio, cobalto, níquel y cobre, así se libera de su sitio operador en respuesta a la unión del metal (Moore et al., 2005). A su vez, la mayoría de los proyectos sugeridos por los equipos de iGEM emplean este gen, así como el equipo de Gaston Day School en 2019 (Gaston Day School, 2019), que construyeron un dispositivo flotante alimentado por energía solar que envía una señal cuando detecte un contaminante del agua.

Los biosensores con elemento de detección menos común son: (1) El biosensor de Tra-ngan et al. (Tra-ngan et al., 2019) usa el promotor del gen *groEL* que viene de la bacteria *Cupriavidus taiwanensis*, esta bacteria fue aislada de un arrozal altamente contaminado con cadmio por esta razón muestra especificidad para este metal. Sin embargo, ocurrió que a medida que aumentaba la concentración del metal disminuía la sensibilidad debido a que no se puede compensar la toxicidad, afectando la actividad del elemento reportero. (2) El biosensor de Joe et al. (Joe et al., 2012) utiliza como elemento detector el promotor DR_0659, extraído de la bacteria *Deinococcus radiodurans*, en el artículo no mencionan de que gen de resistencia al cadmio es tomado, pero demuestra una alta selectividad y esto posiblemente se debe a que puede ser uno de los factores de transcripción de la familia MerR la misma a la que pertenece el gen *cadR*.

2.1.2. Genes reporteros

Actualmente, se puede emplear una amplia gama de moléculas como salida en el diseño de biosensores (Bereza-Malcolm et al., 2015), la elección de estos mecanismos de transducción depende a menudo de la estrategia funcional y de los tipos de células utilizados para la detección (Gupta et al., 2019). Un gen reportero genera una respuesta biológica frente al analito contaminante creando una señal medible que puede distinguirse fácilmente de las proteínas endógenas y se permite correlacionar la señal con la concentración del analito (Daunert et al., 2000; Saini et al., 2019).

Hay algunos genes reporteros ampliamente utilizados que han demostrado incorporarse con éxito a los biosensores de células enteras. Estos incluyen *lux* (luciferasa bacteriana), *luc* (luciferasa de luciérnaga), *gfp* (proteína verde fluorescente) y *lacZ* (B-galactosidasa) (Gui et al., 2017; Saini et al., 2019). En la actualidad existen dos métodos diferentes de información: (1) el gen reportero codifica una enzima que puede catalizar la formación de un producto medible. Por ejemplo, la galactosidasa y la luciferasa catalizan la generación de un producto coloreado y de luz, respectivamente, y (2) el gen reportero produce la propia proteína, es el producto que se mide, por ejemplo, la proteína verde fluorescente (Kim et al., 2018).

a. Fluorescencia

En los últimos años, a medida que los genes de proteínas fluorescentes han sido estudiados, han encontrado aplicaciones cada vez más versátiles, lo que les han puesto más disponibles para su uso general, en especial como elemento reportero en biosensores (Belkin, 2003). Se utiliza ampliamente debido a su gran estabilidad y facilidad de medición mediante un fluorómetro, sin necesidad de sustratos exógenos (Kim et al., 2018). Como se puede observar en la Tabla 1 y 2 el elemento reportero más usado en general es GFP (Gaston Day School, 2013; Guo et al., 2021; He et al., 2021; Tao et al., 2013; The Stony Brook School NY, 2019), que es una fotoproteína que ha sido aislada y clonada de la medusa *Aequorea victoria* (Daunert et al., 2000).

La principal ventaja de la GFP como proteína reportera es su autofluorescencia, por lo tanto, su uso no requiere la adición de cofactores, ATP o sustratos exógenos para producir luz (Daunert et al., 2000; Gui et al., 2017). En consecuencia, no participan en el metabolismo celular y son fluorescentes también en células no viables (Hakkila et al.,

2002). Otras ventajas de la GFP son su gran estabilidad a pH biológico, la simplicidad del ensayo y la falta de homólogos endógenos en la mayoría de los organismos objetivo (Daunert et al., 2000). Su principal desventaja es que la fluorescencia intrínseca de ciertas células huésped generalmente aumenta la fluorescencia de fondo y esto puede causar interferencia en la señal, por lo cual se necesita más expresión de la proteína para evitar la autofluorescencia (Gui et al., 2017; Hakkila et al., 2002). En consecuencia, los biosensores basados en la GFP no suelen ser capaces de detectar con tanta sensibilidad como otros biosensores basados en bioluminiscencia (Gui et al., 2017). Así mismo, este mecanismo requiere de mucho tiempo de respuesta que puede variar desde unos minutos hasta horas en algunos casos, lo que reduce su actividad máxima de detección (Gui et al., 2017; Singh & Kumar, 2021). Para superar este problema, pueden ser útiles los biosensores basados en el metabolismo celular, en los que los cambios pueden producirse en menor tiempo (Singh & Kumar, 2021).

Recientemente, se han comercializado GFP mutantes con una mayor intensidad de la señal, una mayor estabilidad y una intensidad espectral alterada, mejorando la fluorescencia, por lo cual podrían mostrar una gran perspectiva para las aplicaciones de biosensores (Bilal & Iqbal, 2019; Hakkila et al., 2002). Esto gracias a la identificación de la estructura tridimensional de la GFP que indica que esta proteína tiene un patrón de plegado único, por lo que es posible cambiar su estabilidad y sus propiedades a través de alteraciones estructurales de la proteína en la región del fluoróforo (Daunert et al., 2000). Así como en el caso de la proteína verde fluorescente mejorada (eGFP)(Kim et al., 2016; Wu et al., 2009; Yoon et al., 2016), que es una variante de GFP contiene mutaciones en sus aminoácidos 64 y 65 (Li et al., 1998), presenta una fluorescencia mucho más intensa que la GFP original y se puede detectar fácilmente mediante citometría de flujo (Gambotto et al., 2000). Existen diferentes genes mutados de *gfp* como *gfpuv* (Elcin & Öktem, 2020), *rs-gfp* (Liao et al., 2006), *gfpmut3a* (Colorado School of Mines, 2019), entre otros.

Además de GFP, existe otras proteínas que producen fluorescencia que son la proteína roja fluorescente (RFP)(FDR-HB Peru, 2019; Gaston Day School, 2019; SCUT, 2015) y la proteína amarilla fluorescente (phiYFP)(Cornell, 2009) que presentan problemas similares a la GFP como el tiempo relativamente largo que se requiere para la expresión de la proteína y la necesidad de distinguir la autofluorescencia o la fluorescencia de fondo de la señal real en las células durante la medición (Kim et al., 2018). Aunque en el caso de la RFP presenta una autofluorescencia celular menor, lo que debería dar

lugar a una señal de fondo menor a comparación con la GFP, además para que pueda alcanzar la máxima fluorescencia se necesita de días a temperatura ambiente, por lo cual tiene un tiempo de respuesta más lenta (Hakkila et al., 2002). Por otro lado, *phiYFP* es más estable durante fluctuaciones de pH en el medioambiente, aparte se expresa a niveles más bajos y más rápidamente que la producción de GFP, lo que ayuda a un análisis más rápido (Bereza-Malcolm et al., 2015). Además, existe otras opciones de elementos reporteros, como la proteína fluorescente cian (*cfp*), que son menos usados en la literatura (Cornell, 2009).

b. Colorimetría

Algunos genes reporteros codifican enzimas que catalizan reacciones colorimétricas fácilmente medibles, así como es, *lacZ* de *E. coli*, que codifica una enzima β -galactosidasa que rompe los enlaces β -galactosa del X-galactopiranosido, y la reacción puede ser fácilmente observada visualmente (Bilal & Iqbal, 2019). Además del método visual, existen otros métodos de detección como histoquímico, fluorescente, luminiscente y electroquímico, cada una de estos métodos dependen principalmente de los sustratos utilizados (Daunert et al., 2000).

Las ventajas de la detección mediante los métodos colorimétricos es que su uso es sencillo y rápido, no es necesario de un elemento extra para medición, lo cual ayuda para la detección cualitativa o semi cuantitativa de metales pesados (Daunert et al., 2000), además proporciona una sensibilidad ultra-alta con un bajo límite de detección (Gui et al., 2017). Por otro lado, existen ciertas desventajas como que tiene un estrecho rango dinámico, lo que han llevado a su sustitución por otros métodos de detección (Daunert et al., 2000).

Tra-ngan et al. (Tra-ngan et al., 2019) utilizaron el reportero *lacZ* que actuó sobre el sustrato X-gal dando lugar a productos que se dimerizan para dar un color azul en presencia de cadmio. Adicionalmente, puede dar información cualitativa de la detección, como en el caso de la propuesta de Joe et al. (Joe et al., 2012) que se produce un pigmento visible a simple vista, lo cual puede ayudar solamente a ver la presencia o ausencia de este metal. Aparte de *lacZ* existen otros reporteros colorimétricos como la cromoproteína roja (*efordRed*) (UPNAvarra, 2019), cromoproteína verde (*cjBlue*) (SCUT, 2015) y cromoproteína azul (*amilCP*) (Peshawar, 2017).

c. Bioluminiscencia

Los reporteros de bioluminiscencia pueden clasificarse en dos grupos según el tipo de luciferasa (Kim et al., 2018): (1) luciferasa de luciérnaga (lucFF) de *Photinus pyralis* y (2) luciferasa bacteriana (luxCDABE) que proceden de las bacterias marinas *Vibrio fischeri* y *Vibrio harveyi* (Hakkila et al., 2002). Las proteínas luminiscentes pueden medirse a bajas concentraciones, debido a la insignificante luminiscencia de fondo, a comparación del uso de proteínas fluorescentes (Hakkila et al., 2002). Además, permite una detección mucho más rápida y sensible del analito objetivo que la fluorescencia, ya que la bioluminiscencia es una medida de la actividad enzimática, mientras que la fluorescencia cuantifica la presencia de la proteína (Belkin, 2003). En específico lux es termolábil (Kim et al., 2018) y no requerir la adición de un sustrato lo cual le vuelve la más usada (Daunert et al., 2000). Cabe destacar que ocurre una reacción que requiere energía del metabolismo celular (ATP), por lo tanto, el estado metabólico de las células puede afectar a la bioluminiscencia (Bilal & Iqbal, 2019; Hakkila et al., 2002). Además, estos genes son menos estables cuando se realiza un seguimiento en tiempo real, por lo cual se emplea las proteínas fluorescentes que puede resultar mucho más fiable (Belkin, 2003).

2.1.3. Circuitos genéticos

Generalmente, un biosensor se conforma de un módulo sensor (responsable de la identificación de los metales pesados) y el módulo reportero (responsable de la generación de una señal de salida); sin embargo, los dos pueden ser mediados con circuitos genéticos para mejorar los diversos parámetros de este sistema (Singh & Kumar, 2021). Los circuitos genéticos se describen como una serie de modificaciones genéticas y estrategias que mejoran la especificidad molecular para disminuir drásticamente las tasas de falsos positivos del biosensor (Rogers et al., 2016).

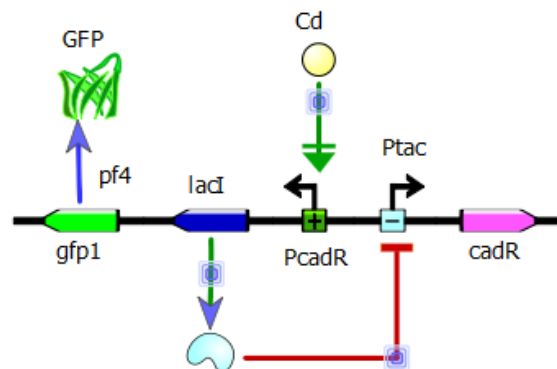
Los circuitos pueden estar formados por interruptores de palanca, puertas lógicas (AND, NOT, OR, NAND y NOR) o circuitos de amplificación (Kim et al., 2018; Mukherjee & Singh, 2011). En la última década, se ha producido una evolución continua en las estrategias para mejorar los parámetros de los biosensores, como el límite de detección, el rango de detección y la sensibilidad de los sistemas. Estas estrategias incluyen principalmente el ajuste de la concentración de la proteína receptora, el ajuste de la densidad del ligando intercelular y la reducción de las fugas genéticas (Singh & Kumar,

2021). Estas estrategias son inteligentes y prometedoras, pero aún no están listas para su uso industrial (Rogers et al., 2016), debido a que los circuitos genéticos diseñados pueden resultar muy robustos para la célula y dificulta su metabolismo y crecimiento (Singh & Kumar, 2021).

a. Toggle switch

Los primeros intentos de construcción de circuitos genéticos sintéticos para *E. coli* fueron un toggle switch (interruptor de palanca) y un oscilador (Atkinson et al., 2003). La estrategia de toggle switch está compuesta por dos represores y dos promotores constitutivos, su funcionamiento consta de un promotor que es inhibido por el represor que es transcrito por el promotor opuesto, generando un comportamiento biestable robusto (Gardner et al., 2000). Este switch se usa para reducir la fluorescencia de fondo e incrementar drásticamente el límite de detección y así mejorar el rendimiento de los biosensores (Kim et al., 2018).

A.



B.

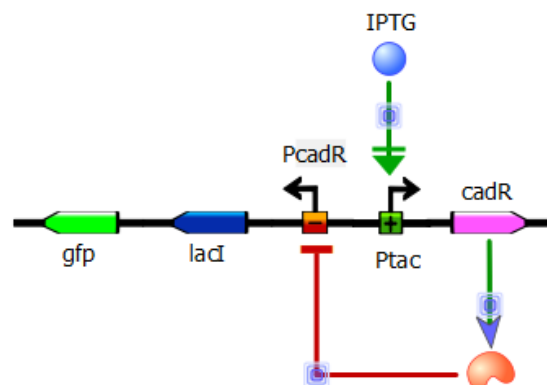


Figura 2. Esquema del funcionamiento del circuito genético toggle switch

Realizado por: Sánchez, 2022

En un estudio de Wu et al. (Wu et al., 2009), propusieron un biosensor usando un toggle switch que constaba de un promotor inducible por cadmio PcadR fusionado a los genes *lacIq* y *gfp*, y un promotor Ptac inducible por IPTG unido al gen *cadR*. Por lo cual, en presencia de IPTG, induce la codificación de Ptac, que a su vez codifica a *cadR* que reprime fuertemente al promotor PcadR (**Figura 2A**). Cuando el biosensor se encuentra en presencia de cadmio activa el PcadR que permite la codificación de *lacIq* y *gfp*, posteriormente *lacIq* reprime el promotor Ptac y disminuye la expresión del gen *cadR* dando lugar a una mayor expresión de *gfp* (**Figura 2B**).

b. Puerta lógica AND

AND es una puerta lógica que integra dos señales de entrada para hacer una sola salida con una mayor relación señal/fondo, se puede utilizarse como filtro o amplificador de señales biológicas para aumentar la sensibilidad y selectividad de los biosensores (Kim et al., 2018). Aunque depende el aumento de copias del plásmido, ya que puede dar lugar a cambios de comportamiento en la composición de la puerta lógica, lo que lleva al desequilibrio de las entradas y a interrupciones indeseables (Singh & Kumar, 2021).

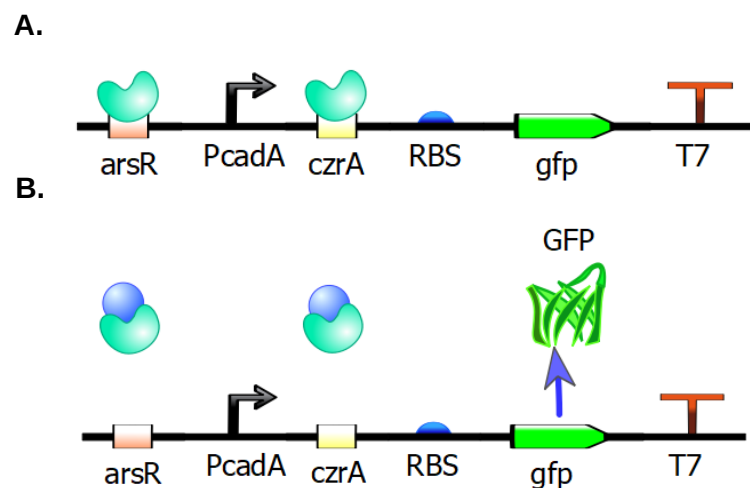


Figura 3. Esquema del funcionamiento del circuito genético
AND gate

Realizado por: Sánchez, 2022

Un ejemplo del uso de esta puerta lógica es en el proyecto llamado Water, Water Everywhere propuesto por Gaston Day School en iGEM 2019 (Gaston Day School, 2019), en donde el objetivo fue crear un dispositivo flotante alimentado por energía solar

que enviaría una señal cuando detecte un contaminante del agua. Usaron los sitios de unión de dos represores que se sabe que responden al cadmio como *arsR* y *czrA*, en donde *arsR* también detecta arsénico y *czrA* detecta además zinc y cobre. Cuando no hay presencia de cadmio estos sitios de unión interrumpen la expresión del promotor PcadA (**Figura 3A**), mientras que cuando hay presencia de cadmio estos sitios no son interrumpidos y se permite la expresión del promotor y así la expresión del gen *gfp* (**Figura 3B**).

c. Sistema de transcripción T7

Una estrategia para la amplificación de la señal del biosensor es el uso de un sistema de transcripción que proviene del bacteriófago T7, consta de un promotor que es reconocido por la ARN polimerasa específica (RNAP T7) pero no por la ARN polimerasa de *E. coli* (Kim et al., 2018). Esta es una de las herramientas más utilizadas por la biología sintética para el diseño de circuitos genéticos debido a que posee propiedades valiosas como: (1) una alta procesabilidad, (2) una alta especificidad, (3) independencia de los factores de transcripción y (4) permite transcripciones largas (W. Wang et al., 2018). Un ejemplo del uso de esta estrategia es en el artículo de Kim et al. (Kim et al., 2016), donde se combinó un módulo sensor conformado por el promotor y gen *cadC* (PcadC-cadC) con el gen T7 RNAP en el cromosoma, y en el plásmido se juntó el promotor T7 con el reportero *egfp* en el plásmido. Este sensor cuando se encuentra en presencia de cadmio, la RNAP T7 se expresa, activando inmediatamente el promotor T7 y codificando el gen reportero generando la señal (**Figura 4**).

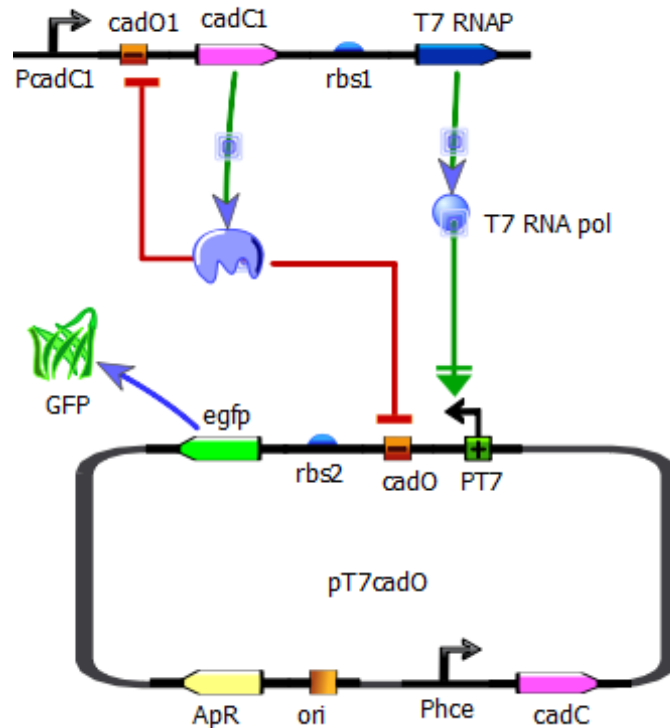


Figura 4. Esquema del funcionamiento del sistema de transcripción T7 en presencia de cadmio
Realizado por: Sánchez, 2022

2.1.4. Chasis del biosensor

Una de las partes cruciales para el desarrollo del biosensor es la selección de la célula huésped (Saini et al., 2019). Los biosistemas artificiales compuestos por partes y módulos de diversos microorganismos deben funcionar correctamente en una célula huésped (chasis) específica (Kim et al., 2018). La especificidad, la sensibilidad y la respuesta temporal de un biosensor pueden verse bastante influenciadas por el tipo de células huésped utilizadas como vehículo para la detección (Gui et al., 2017). El principal requerimiento para elegir una célula chasis es que las biopartes insertadas puedan funcionar correctamente sin interferencias del huésped, por lo cual las biopartes o los genes con potencial de reactividad cruzada deben ser eliminados del genoma de las células chasis (Kim et al., 2018).

El uso de procariotas (~ 85%) es significativamente superior al de células eucariotas (~ 15%). Esto se debe a la facilidad de cultivo y mantenimiento en el laboratorio, su adaptabilidad para sobrevivir en condiciones inadecuadas con un mínimo de nutrientes y su capacidad para servir como una buena célula de chasis para los circuitos genéticos

desarrollados por la biología sintética (Kim et al., 2018; Singh & Kumar, 2021). Por ello, las células eucariotas no son usadas debido a que se dispone de pocas biopartes sensoras para metales pesados y por esta razón el desarrollo de biosensores con este tipo de células es bastante raras (Kim et al., 2018).

Muchos investigadores han informado del uso de diferentes tipos de biosensores basados en células enteras en función de sus propiedades para la detección de contaminantes (Saini et al., 2019). Se ha utilizado una variedad de células para la expresión de plásmidos de ingeniería genética; sin embargo, la elección de *E. coli* es más frecuente en la literatura que cualquier otra célula. Esto se debe a que ya existe la secuencia completa del genoma, lo que permite a los investigadores atribuir las observaciones y el rendimiento de las secuencias ya existentes (Singh & Kumar, 2021). Además, que naturalmente son tolerantes a altos niveles de zinc y cadmio (Rensing et al., 1997).

En general, la elección de la célula chasis suele ser una bacteria gram negativa, ya que estos microorganismos están bien equipados para tolerar el estrés. Sin embargo, ocasionalmente se usa modelos de bacterias grampositivas, como el *Bacillus subtilis*, han mostrado una capacidad de detección igualmente eficaz para la detección de metales pesados (Singh & Kumar, 2021). Esto ha llevado a que sea usado como chasis en diferentes proyectos de iGEM como el de Cornell en 2009 (Cornell, 2009), Gaston Day School en 2013 (Gaston Day School, 2013) y Newcastle en 2009 (Newcastle University, 2009). Además, que han demostrado que la estabilidad de los sensores con esta bacteria puede mantenerse en las esporas durante más de 12 meses; sin embargo, es necesario investigar más en esta aplicación (Singh & Kumar, 2021).

Por otro lado, *Pseudomonas putida* se han empleado como células chasis debido a la abundancia de varios factores de transcripción que responden a metales pesados en esta especie, incluyendo *cadR*, *czcR* y *cueR* (Kim et al., 2018) el cual fue utilizado en el estudio de Wu et al. (Wu et al., 2009). También se ha usado *Deinococcus radiodurans*, una bacteria aislada del medioambiente que tolera la desecación y la radiación (Kim et al., 2018), como en el estudio de Joe et al. (Joe et al., 2012). En estos dos casos las bacterias son propias de los elementos de detección lo que permite mejor funcionamiento del sistema y aparte garantiza la resistencia de estas bacterias al metal pesado.

2.2. Condiciones externas

2.2.1. Tipo de elemento analizado

Se sabe que los metales pesados existen en múltiples formas, incluyendo formas iónicas libres, formas complejas y formas compuestas (Singh & Kumar, 2021). La mayoría de los biosensores de célula entera para la detección de cadmio usan CdCl_2 como elemento de detección en las pruebas de medición de Cd, esto debido a que en la naturaleza este metal se encuentra comúnmente en un solo estado de oxidación (+II). Aun así, el trabajo propuesto por Tra-ngan et al. (Tra-ngan et al., 2019) prueban diferentes formas de cadmio, obteniendo así que su biosensor puede detectar exitosamente CdSO_4 , además de CdCl_2 , pero no puede detectar otros compuestos como CdCO_3 debido a su baja solubilidad.

2.2.2 Medio de cultivo

Para desarrollar biosensores de células enteras, debemos tener en cuenta varios aspectos de los métodos de cultivo (Kim et al., 2018). Por lo tanto, el medio que es empleado para el crecimiento de los biosensores y para la medición con la muestra ambiental es un factor importante. De los ejemplos de la Tabla 1 y 2 el medio más utilizado fue LB seguido por el medio M9. Se resalta la importancia porque el medio puede influir en la biodisponibilidad del metal para ser detectado. Por lo cual, el medio LB presenta diversos problemas debido a la presencia de fosfatos inorgánicos o carbono orgánico disuelto que pueden actuar como quelantes disminuyendo la disponibilidad de cadmio y a su vez disminuyendo la sensibilidad de la medición. La mejor elección son los medios con menor cantidad de polifosfatos inorgánicos como los medios M9 o MOPS (Elcin & Öktem, 2020).

2.2.3. Sensibilidad y selectividad

Las principales cuestiones relativas al rendimiento de un biosensor basado en células enteras son: (1) la selección del gen reportero, así como (2) la selectividad y sensibilidad del reconocimiento molecular que se produce cuando las proteínas reguladoras se unen a sus analitos objetivo (Gui et al., 2017). Generalmente, la especificidad viene dado por el elemento de detección, mientras que la proteína informadora determina la sensibilidad y los límites de detección del biosensor (Daunert et al., 2000). Tanto la especificidad

como la sensibilidad de los biosensores construidos deben ser verificadas por varios métodos experimentales debido a que no es muy fácil obtener resultados reproducibles por la heterogeneidad de las células en la población (Kim et al., 2018).

Llegar a la especificidad completa hacia el cadmio en un biosensor de célula completa se ve afectada debido a la similitud estructural entre los iones de otros metales pesados lo cual puede dar lugar a una unión no específica en los sitios de unión del ligando (Bereza-Malcolm et al., 2015). Por lo cual, las proteínas que detectan cadmio también son capaces de reaccionar con otros metales pesados, como zinc y mercurio (Bilal & Iqbal, 2019). Cuando los biosensores detectan niveles bajos de otros compuestos pueden dar falsos positivos dificultando la eficiencia del sensor (Bereza-Malcolm et al., 2015).

La sensibilidad del biosensor como ya se mencionó viene determinada por el límite de detección, es decir la cantidad mínima que el dispositivo puede registrar. En los sistemas de la Tabla 1 el límite de detección es menor a 3 µg/mL, de modo que los biosensores propuestos por He et al. (He et al., 2021), Elcin & Öktem (Elcin & Öktem, 2020) y Wu et al. (Wu et al., 2009) son capaces de detectar el nivel mínimo propuesto por Organización Mundial de la Salud (0,003 µg/mL) (World Health Organization (WHO), 2011). El biosensor que tiene menor límite de detección es el presentado por Liao et al. (Liao et al., 2006), en este trabajo su límite de detección es de 1×10^{-5} µg/mL pero solamente de forma cualitativa. Aun así, los autores argumentaron que pasando de 83 µg/mL se puede obtener una señal cuantitativa. El siguiente en tener el menor límite de detección es de Wu et al. (Wu et al., 2009) el cual es de 0,0011 µg/mL, en este estudio mejoran la sensibilidad del biosensor gracias a la estrategia toggle switch. De la misma manera, en los sistemas de la Tabla 2 el límite de detección más alto es de 45,83 µg/mL del proyecto de Gaston Day School presentado en el concurso iGEM 2019 (Gaston Day School, 2019), mientras que el sensor más sensible fue el del proyecto de SCUT (SCUT, 2015) con un límite de detección de 1,67 µg/mL aunque exhibió limitaciones para su uso en monitoreo de cadmio en muestras de agua.

Otro parámetro útil para el estudio de biosensores es el rango operativo que consta de las concentraciones en el que el biosensor muestra un cambio en la salida, este se determina midiendo las concentraciones a partir de las cuales el biosensor muestra un cambio gradual y dependiente a la concentración del analito. Este parámetro es importante

debido a que ayuda a la cuantificación de la relación entre señal y ruido (Rogers et al., 2016)

Tomando en cuenta todas las propuestas de biosensores existentes en la literatura y en los registros de la competencia iGEM, se puede modificar diferentes propuestas y hallazgos para encontrar nuevos biosensores más sensibles o selectivos. De esta manera, con las estrategias ya planteadas se puede proponer dos biosensores para la detección de cadmio. Para la primera propuesta se puede usar el promotor divergente usado como región regulatoria del biosensor por Hui et al.(Hui et al., 2021) y Guo et al.(Guo et al., 2021) y un gen *MntH* usado para la importación de cadmio a la célula mejorando así la sensibilidad. Para la segunda propuesta se puede usar la puerta lógica AND con los genes *asrR* y *cadR* para generar un biosensor selectivo solamente a cadmio.

3. Propuesta de Biosensor enfocado en el aumento de la sensibilidad

Un promotor divergente se encarga de la expresión de dos genes o dos conjuntos de genes adyacentes en direcciones opuestas a partir de una única región de control (Beck & Warren, 1988; Yamada et al., 2003). Estos promotores existen en la naturaleza lo que se ha inspirado para el uso en organismos modelos como *E. coli* y *Saccharomyces cerevisiae*, incluso se ha empleado en plantas y mamíferos (Vogl et al., 2018). El uso de estos promotores en el campo de la biología sintética ha sido clave para la co-expresión génica eficiente (Vogl et al., 2018).

Cuando se expresa múltiples proteínas, por la expresión recombinante, las cargas excesivas pueden generar una sobrecarga de la maquinaria celular, siendo el empleo de estos promotores una de las soluciones para evitar la sobrecarga (Vogl et al., 2018). Además, ayuda a mantener las proporciones de expresión evitando la toxicidad de las células (Fages-Lartaud et al., 2022; Vogl et al., 2018), ofrece la reducción del número de partes genéticas necesarias (Fages-Lartaud et al., 2022), mantiene una expresión coordinada y controlada de dos genes preservando así una expresión en una proporción dada (Beck & Warren, 1988; Vogl et al., 2018) y simplifica los experimentos de cribado (Fages-Lartaud et al., 2022). Finalmente, otra de sus ventajas es que la transcripción divergente puede ser más estable, evitando mutaciones, que otras unidades de genes en la recombinación y la translocación de la información genética mejorando la estabilidad evolutiva de los circuitos genéticos sintéticos, es decir no pierde su

autonomía porque el promotor o promotores son internos (Beck & Warren, 1988; Yang et al., 2013). De esta forma el promotor divergente *cadR* es una de las mejores opciones como elemento de detección para un biosensor para cadmio, ya que presenta más ventajas que un promotor normal.

El cadmio es captado gracias al gen *mntH* en las *E. coli*, este gen tiene como función fisiológica la captación de manganeso como protección contra el peróxido de hidrógeno (Rensing & Mitra, 2007). De esta manera si se da la sobreexpresión de este gen será mejor la captación de cadmio y así mejorará la sensibilidad del biosensor, pero se debe de tener en cuenta que grandes cantidades de cadmio intracelular puede generar daño a la célula por la generación de especies reactivas de oxígeno (ROS) causando alteraciones en el metabolismo energético y dañando e interrumpiendo la síntesis de ADN y proteínas (A. Wang & Crowley, 2005). Otro mecanismo es que el cadmio compite con los receptores de zinc generando una condición de falta de este metal, también interfiere en la homeostasis de otros metales esenciales como cobre, hierro y manganeso (Ammendola et al., 2014; Ron et al., 1992). Entonces este sería una limitante para el desarrollo del biosensor, pero se ha demostrado que suplementando el medio de crecimiento con zinc mejora la condición de toxicidad debido a que este metal es necesario para hacer frente al estrés inducido por cadmio (Ammendola et al., 2014).

Entonces, al unir las dos estrategias se puede generar un circuito completo para la detección de cadmio con una sensibilidad mejorada. Como se muestra en la **Figura 5** la propuesta consta del uso de un promotor *cadR* bidireccional que es inducido por cadmio, una vez activado este empieza la transcripción, por un lado, se da la sobreexpresión *MntH*, mientras que el lado contrario se transcribe una *gfp*.

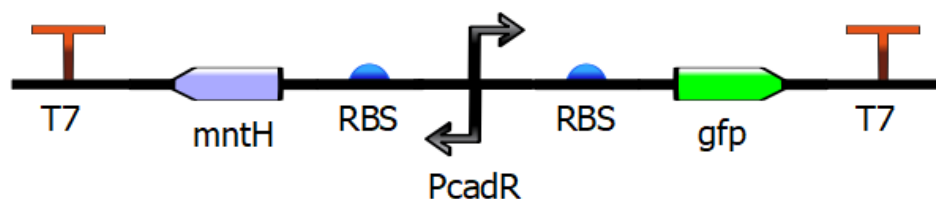


Figura 5. Gráfico modelo del circuito para un biosensor enfocado en mejorar la sensibilidad

Realizado por: Sánchez, 2022

Biosensor enfocado en el aumento de la selectividad

Como ya se mencionó anteriormente, el ensamblaje de una puerta lógica AND permite integrar dos señales de entrada para obtener una sola salida de forma selectiva, por lo cual se propone el uso del gen *arsR* y *cadR*. En este caso se pretende usar el homólogo de *cadR* elegido por He et al. (He et al., 2021) nombrado como CadR.10 que muestra una selectividad alta a Cd y una muy baja a Zn a comparación al *cadR* convencional. Estos dos genes se complementan debido a que la selectividad de *arsR* que responde a arsénico, plata, cobre y cadmio, teniendo como elemento en común al cadmio. El diseño del circuito se puede observar en la **Figura 6**, este diseño se diferencia del ejemplo ya mencionado anteriormente del equipo Gaston Day School (Gaston Day School, 2019), por el reemplazo del promotor *cadC* por el promotor de CadR.10 (*PcadR.10*) debido a que este es más sensible a cadmio mejorando así la selectividad tanto para la propuesta de He et al. como la de equipo de iGEM.

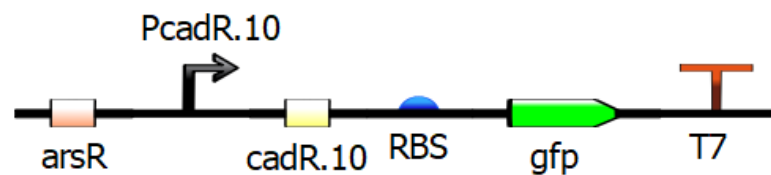


Figura 6. Gráfico modelo del circuito para un biosensor enfocado en mejorar la selectividad

Realizado por: Sánchez, 2022

Para la aplicación de las dos estrategias propuestas es necesario que estas se acoplen a un plásmido para que se genere su expresión. Para los dos casos es recomendable el uso del plásmido pSB1C3, que se caracteriza por ser un vector estandarizado que se usa para el ensamblaje de BioBricks además que genera gran cantidad de copias (Shetty et al., 2011). Las dos propuestas ensambladas con el plásmido se pueden ver en la **Imagen suplementaria 1** y en la **Imagen suplementaria 2**.

La mayoría de los biosensores desarrollados en los últimos años han reportado buenos límites de detección y sensibilidad; sin embargo, el estudio de la robustez del sistema en múltiples ambientes naturales es poco realizado (Singh & Kumar, 2021). Debido a que es un campo emergente, la mayoría de los estudios han sido pruebas de concepto (Rogers et al., 2016). El desarrollo de biosensores robustos de células enteras sería

muy beneficioso en lugares aislados donde no es necesario el transporte de las muestras (Bereza-Malcolm et al., 2015).

Aún quedan muchos problemas importantes por superar como la degradabilidad y la naturaleza aislante de las matrices de cultivo celular, inestabilidad genética, fuga de los biosensores al medioambiente, fugas de plásmidos, falta de construcción genética de amplio alcance y los altos costes de instrumentación (Eltzov & Marks, 2011; Gupta et al., 2019). El tema de más preocupación son las mutaciones y transferencia de genes horizontales que siguen siendo elevados y pueden conducir a la alteración de la biota (Singh & Kumar, 2021). Además, se aumenta el riesgo de exposición de los microorganismos manipulados genéticamente, lo que conduce a efectos ecológicos y medioambientales perjudiciales (Teo & Wong, 2014). Aunque los biosensores han mostrado un rendimiento superior al de sus homólogos químicos convencionales, su realización comercial sigue siendo un gran reto debido a sus problemas de conservación. La reproducibilidad y la estabilidad durante el almacenamiento y el transporte de los biosensores aún no son lo suficientemente eficaces como para satisfacer las exigencias de su fabricación a gran escala (Gui et al., 2017; Singh & Kumar, 2021).

Conclusiones

En conclusión, todos los biosensores son herramientas que pueden ayudar para la detección de cadmio *in situ*. Las diferentes propuestas de biosensores revisadas en este trabajo pueden detectar cadmio de manera selectiva, pero solamente tres de estos son útiles para el monitoreo de cadmio en muestras de agua siguiendo los lineamientos de la OMS. Aun así, no se puede definir cuál es el mejor biosensor debido a que hay varios factores como el medio de cultivo, el chasis, la proteína reportera, el elemento de detección, etc. que determinan la sensibilidad y selectividad del biosensor. Tomando en cuenta todo ello, se propone el diseño de dos biosensores usando las partes biológicas y estrategias recopiladas. La primera propuesta es usar un promotor divergente CadR que, al ser inducido por cadmio, permite la co-expresión del gen MntH (importador de cadmio) y *gfp* (como gen reportero). La segunda propuesta es utilizar una puerta lógica AND con los genes *asrR* y *cadR* para generar un biosensor selectivo solamente a cadmio. Se espera que estos biosensores puedan ser la base para una alternativa de la detección *in situ* de cadmio en muestras ambientales locales que se ven afectados por los yacimientos de minería y la explotación petrolera.

Tabla 1: Detalles de partes biológicas, límites de detección, selectividad, medio de cultivo, tipo de cepa, estrategia y tipo de muestra analizada de los biosensores reportados en la literatura entre los años 2005 y 2021

Autor	Elemento biológico de detección	Gen Reportero	Forma de respuesta	Límite de detección (µg/mL)	Selectividad	Medio de cultivo	Tipo de cepa usada	Tiempo de respuesta (horas)	Tipo de muestra analizada	Referencia
Liao et al.	Promotor de CadC	<i>rs-gfp</i> (red-shifted GFP)	Fluorescencia	1x10 ⁻⁵	CdCl ₂	LB	<i>E. coli</i> DH5α	2	Sedimentos y suelos	(Liao et al., 2006)
Wu et al.*	Promotor <i>cadR</i> del operón <i>cad</i>	<i>egfp</i>	Fluorescencia	0,0011	CdCl ₂	M9	<i>P.putida</i> 06909	4	Agua	(Wu et al., 2009)
Joe et al.	Promotor DR_0659 (<i>Deinococcus radiodurans</i>)	<i>lacZ</i>	Colorimétrico (Producción de pigmento rojo)	0,006	CdCl ₂	TGY	<i>Deinococcus radiodurans</i>	24	Agua	(Joe et al., 2012)
Tao et al.	Promotor <i>cadR</i>	<i>gfp</i>	Fluorescencia	0,145	CdCl ₂ y HgCl ₂	M9	<i>E. coli</i> Top 10	4	Agua	(Tao et al., 2013)
Kim et al.†	Gen <i>cadC</i>	<i>egfp</i>	Fluorescencia	0,56	—	LB	<i>E. coli</i> DH5α	2	Agua	(Kim et al., 2016)
Yoon et al.	<i>zntAp</i>	<i>egfp</i> y <i>mcherry</i>	Fluorescencia	0,1	CdCl ₂	LB	<i>E. coli</i> DH5α	3	Suelo	(Yoon et al., 2016)
Tra-ngan et al.	Promotor del gen <i>groEL</i>	<i>lacZ</i>	Colométrico	3	CdCl ₂ y CdSO ₄	LB	<i>E. coli</i> NovaBlue	3,5	Suelo y agua	(Tra-ngan et al., 2019)
Elcin & Öktem	Promotor del gen <i>zntA</i>	<i>gfpuv</i> (variante de <i>gfp</i>)	Fluorescencia	0,002	CdCl ₂	M9 Y MOPS	<i>E. coli</i> MG1655	Según el medio: M9: 3,5 MOPS: 1,5	Agua	(Elcin & Öktem, 2020)

Hui et al.	<i>cadR</i> y <i>cadC</i>	<i>gfp</i> y <i>mCherry</i>	Fluorescencia	0,00917	CdCl ₂	LB	<i>E. coli</i> Top 10	12	Agua de lago y de grifo	(Hui et al., 2021)
He et al.	<i>cadR</i>	<i>gfp</i>	Fluorescencia	0,003	3CdSO ₄ ·8H ₂ O	LB	<i>E. coli</i> MG1655	2,5	Agua de riego y orina humana	(He et al., 2021)
Guo et al.	<i>cadR</i>	<i>gfp</i> , <i>mCherry</i> y <i>lacZ</i>	Fluorescencia y colométrico	0,021	CdCl ₂	M9	<i>E. coli</i> Top 10	20	Agua	(Guo et al., 2021)

* Este biosensor tiene como estrategia un circuito genético palanca (toggle switch)

† Este biosensor tiene como estrategia un circuito genético T7

Realizado por: Sánchez, 2022

Tabla 2: Detalles de partes biológicas, límites de detección, selectividad, medio de cultivo, tipo de cepa, estrategia y tipo de muestra analizada de los biosensores reportados en la competencia iGEM entre los años 2009 y 2021

Equipo	Nombre del proyecto	Elemento biológico de detección	Elemento Reportero	Forma de respuesta	Límite de detección	Selectividad	Medio de cultivo	Tipo de cepa usada	Tiempo de respuesta (horas)	Tipo de muestra analizada	Referencia
Cornell	Engineering the Bacillus Subtilis Metal Ion Homeostasis System to Serve as a Cadmium Responsive Biosensor	CzrA (<i>Bacillus subtilis</i>)	<i>cfp</i> (Cyan Fluorescent Protein)	Fluorescencia	35 Miller units B-Galactosidase en 5 μ M Ca^{2+}	$CdCl_2$	LB	<i>Bacillus subtilis</i>	—	Agua	(Cornell, 2009)
Newcastle	Bac -Man: Sequestering Cadmium into Bacillus Spores	ArsR y CzrA	—	—	—	$CdCl_2$	LB	<i>Bacillus subtilis</i>	—	Agua	(Newcastle University, 2009)
Gaston Day School*	Fluorescent Detection of Cadmium in Water Supplies	ArsR y CzrA	<i>gfp</i>	Fluorescencia	458,3 μ g/mL	—	—	<i>Bacillus subtilis</i>	—	Agua	(Gaston Day School, 2013)

South China University of Technology	Super-Cadmium Ion Killer	Promotor del gen <i>cadA</i>	<i>cjBlue</i> (cromoproteína verde) y <i>rfp</i> (proteína fluorescente roja)	Fluorescencia y colométrico	2,085x10 ⁻⁹ (<i>cjBlue</i>) y 1,68 (RFP)	CdCl ₂	LB	<i>E. coli</i> Top 10	24 (<i>cjBlue</i>) 3 (RFP)	Agua	(SCUT, 2015)
Peshawar	Project F	Promotor del gen <i>cadA</i>	<i>amilCP</i> (cromoproteína azul)	Colométrico	—	CdCl ₂	LB	<i>E. coli</i> DH5α	—	Agua	(Peshawar, 2017)
FDR-HB Peru	Fishing for CD: Making a bioassay to be used by Peruvian fishermen on site	Promotor del gen <i>cadA</i>	<i>rfp</i>	Fluorescencia	-----	CdCl ₂	—	<i>E. coli</i> DH5α	—	Anchoas	(FDR-HB Peru, 2019)
Gaston Day School*	Water, Water Everywhere	ArsR y CzcA (<i>Bacillus subtilis</i>)	<i>rfp</i>	Fluorescencia	45,83 µg/mL	CdCl ₂	LB	<i>E. coli</i> DH5α	24	Agua	(Gaston Day School, 2019)
Mines	Molecular Mining of Cadmium: Detecting and Binding Cadmium for Bioremediation	Promotor del gen <i>cadC</i> (<i>Staphylococcus aureus</i>)	<i>gfpmut3a</i>	Fluorescencia	1,83 µg/mL	CdCl ₂	LB	<i>E. coli</i> DH5α	9	Agua	(Colorado School of Mines, 2019)

SBS NY	Tackling heavy metal pollution by the expression of MerR-like receptors and CapB in E.coli	<i>cadR</i>	<i>gfp</i>	Fluorescencia	—	CdCl ₂	LB	<i>E. coli</i> DH5α	—	Suelo	(The Stony Brook School NY, 2019)
UPNAvarra	Color is the new sensor	Promotor del gen <i>cadA</i>	<i>efordRed</i> (cromoproteína roja/rosa)	Colométrico	0,002 µg/mL	CdCl ₂	LB	<i>E. coli</i> Top 10	24	Agua	(UPNAvarra, 2019)

* Este biosensor tiene como estrategia un circuito genético de forma de puerta lógica

Realizado por: Sánchez, 2022

Referencias

- Ammendola, S., Cerasi, M., & Battistoni, A. (2014). Deregulation of transition metals homeostasis is a key feature of cadmium toxicity in Salmonella. *BioMetals*, 27(4). <https://doi.org/10.1007/s10534-014-9763-2>
- Argüello, D., Chavez, E., Lauryssen, F., Vanderschueren, R., Smolders, E., & Montalvo, D. (2019). Soil properties and agronomic factors affecting cadmium concentrations in cacao beans: A nationwide survey in Ecuador. *Science of the Total Environment*. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2018.08.292>
- Asif, S., Chaudhari, A., Gireesh-Babu, P., Roy Chaudhuri, P., & Sen, R. (2016). Immobilization of fluorescent whole cell biosensors for the improved detection of heavy metal pollutants present in aquatic environment. *Materials Today: Proceedings*, 3(10). <https://doi.org/10.1016/j.matpr.2016.10.032>
- Atkinson, M. R., Savageau, M. A., Myers, J. T., & Ninfa, A. J. (2003). Development of genetic circuitry exhibiting toggle switch or oscillatory behavior in Escherichia coli. *Cell*, 113(5). [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(03\)00346-5](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(03)00346-5)
- Beck, C. F., & Warren, R. A. (1988). Divergent promoters, a common form of gene organization. In *Microbiological reviews* (Vol. 52, Issue 3). <https://doi.org/10.1128/mmbr.52.3.318-326.1988>
- Belkin, S. (2003). Microbial whole-cell sensing systems of environmental pollutants. In *Current Opinion in Microbiology*. [https://doi.org/10.1016/S1369-5274\(03\)00059-6](https://doi.org/10.1016/S1369-5274(03)00059-6)
- Benchling. (2022). *Benchling* (p. Biology Software).
- Bereza-Malcolm, L. T., Mann, G., & Franks, A. E. (2015). Environmental Sensing of Heavy Metals Through Whole Cell Microbial Biosensors: A Synthetic Biology Approach. *ACS Synthetic Biology*. <https://doi.org/10.1021/sb500286r>
- Bilal, M., & Iqbal, H. M. N. (2019). Microbial-derived biosensors for monitoring environmental contaminants: Recent advances and future outlook. In *Process Safety and Environmental Protection* (Vol. 124). <https://doi.org/10.1016/j.psep.2019.01.032>
- Bousse, L. (1996). Whole cell biosensors. *Sensors and Actuators, B: Chemical*. [https://doi.org/10.1016/S0925-4005\(96\)01906-5](https://doi.org/10.1016/S0925-4005(96)01906-5)
- Brocklehurst, K. R., Megit, S. J., & Morby, A. P. (2003). Characterisation of CadR from Pseudomonas aeruginosa: a Cd(II)-responsive MerR homologue. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 308(2), 234–239. [https://doi.org/10.1016/S0006-291X\(03\)01366-4](https://doi.org/10.1016/S0006-291X(03)01366-4)
- Cerminati, S., Soncini, F. C., & Checa, S. K. (2015). A sensitive whole-cell biosensor for the simultaneous detection of a broad-spectrum of toxic heavy metal ions. *Chemical Communications*. <https://doi.org/10.1039/c5cc00981b>
- Chandran, D., & Sauro, H. M. (2012). Hierarchical modeling for synthetic biology. *ACS Synthetic Biology*, 1(8). <https://doi.org/10.1021/sb300033q>
- Chavez, E., He, Z. L., Stoffella, P. J., Mylavarapu, R. S., Li, Y. C., Moyano, B., & Baligar, V. C. (2015). Concentration of cadmium in cacao beans and its relationship with soil cadmium in southern Ecuador. *Science of the Total Environment*. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2015.06.106>
- Colorado School of Mines. (2019). *Molecular Mining of Cadmium: Detecting and Binding Cadmium for Bioremediation*.
- Cornell. (2009). *Engineering the Bacillus Subtilis Metal Ion Homeostasis System to Serve as a Cadmium Responsive Biosensor*.
- Daunert, S., Barrett, G., Feliciano, J. S., Shetty, R. S., Shrestha, S., & Smith-Spencer, W. (2000). Genetically engineered whole-cell sensing systems: coupling biological recognition with reporter genes. *Chemical Reviews*, 100(7). <https://doi.org/10.1021/cr990115p>

- Duval, J. F. L., & Pagnout, C. (2019). Decoding the Time-Dependent Response of Bioluminescent Metal-Detecting Whole-Cell Bacterial Sensors. *ACS Sensors*. <https://doi.org/10.1021/acssensors.9b00349>
- El Comercio. (2022a, February 10). Masiva protesta contra la minería ilegal se realizó en Tena, Napo. *El Comercio*.
- El Comercio. (2022b, February 14). Ministerio de Energía suspenderá actividad minera en Napo. *El Comercio*.
- El Universo. (2022, February 15). Gobierno suspenderá temporalmente toda actividad minera en Napo, luego del operativo contra la extracción ilegal de oro en Yutzupino. *El Universo*.
- Elcin, E., & Öktem, H. A. (2020). Inorganic Cadmium Detection Using a Fluorescent Whole-Cell Bacterial Bioreporter. *Analytical Letters*, 53(17), 2715–2733. <https://doi.org/10.1080/00032719.2020.1755867>
- Eltzov, E., & Marks, R. S. (2011). Whole-cell aquatic biosensors. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 400(4), 895–913. <https://doi.org/10.1007/s00216-010-4084-y>
- España, S. (2022, February 1). Un derrame de petróleo contamina la Amazonia ecuatoriana. *El País*.
- Fages-Lartaud, M., Prone, W., Mueller, Y., & Lale, R. (2022). Method for engineering artificial bidirectional promoters. *Scientific Reports*.
- FDR-HB Peru. (2019). *Fishing for CD: Making a bioassay to be used by Peruvian fishermen on site*.
- Gambotto, A., Dworacki, G., Cicinnati, V., Kenniston, T., Steitz, J., Tüting, T., Robbins, P. D., & DeLeo, A. B. (2000). Immunogenicity of enhanced green fluorescent protein (EGFP) in BALB/c mice: Identification of an H2-Kd-restricted CTL epitope. *Gene Therapy*, 7(23). <https://doi.org/10.1038/sj.gt.3301335>
- Gardner, T. S., Cantor, C. R., & Collins, J. J. (2000). Construction of a genetic toggle switch in *Escherichia coli*. *Nature*. <https://doi.org/10.1038/35002131>
- Gaston Day School. (2013). *Fluorescent Detection of Cadmium in Water Supplies*.
- Gaston Day School. (2019). *Water, Water Everywhere*.
- Goodman, C. (2008). Engineering ingenuity at iGEM. In *Nature Chemical Biology* (Vol. 4, Issue 1). <https://doi.org/10.1038/nchembio0108-13>
- Gui, Q., Lawson, T., Shan, S., Yan, L., & Liu, Y. (2017). The application of whole cell-based biosensors for use in environmental analysis and in medical diagnostics. In *Sensors (Switzerland)*. <https://doi.org/10.3390/s17071623>
- Guo, Y., Hui, C. Y., Zhang, N. X., Liu, L., Li, H., & Zheng, H. J. (2021). Development of Cadmium Multiple-Signal Biosensing and Bioadsorption Systems Based on Artificial Cad Operons. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, 9. <https://doi.org/10.3389/fbioe.2021.585617>
- Gupta, N., Renugopalakrishnan, V., Liepmann, D., Paulmurugan, R., & Malhotra, B. D. (2019). Cell-based biosensors: Recent trends, challenges and future perspectives. In *Biosensors and Bioelectronics* (Vol. 141). <https://doi.org/10.1016/j.bios.2019.111435>
- Hakkila, K., Maksimow, M., Karp, M., & Virta, M. (2002). Reporter genes lucFF, luxCDABE, gfp, and dsred have different characteristics in whole-cell bacterial sensors. *Analytical Biochemistry*, 301(2). <https://doi.org/10.1006/abio.2001.5517>
- He, M. Y., Lin, Y. J., Kao, Y. L., Kuo, P., Grauffel, C., Lim, C., Cheng, Y. S., & Chou, H. H. D. (2021). Sensitive and Specific Cadmium Biosensor Developed by Reconfiguring Metal Transport and Leveraging Natural Gene Repositories. *ACS Sensors*. <https://doi.org/10.1021/acssensors.0c02204>
- Holguin, J. C. (2022, February 13). Operativo contra la minería ilegal en Napo deja decomiso de maquinaria y combustible. *El Comercio*.

- Hui, C.-Y., Guo, Y., Wu, J., Liu, L., Yang, X.-Q., Guo, X., Xie, Y., & Yi, J. (2021). Detection of Bioavailable Cadmium by Double-Color Fluorescence Based on a Dual-Sensing Bioreporter System. *Frontiers in Microbiology*, 12, 696195. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2021.696195>
- Jainarayanan, A. K., Galanis, A., Nakara, A. M., Kundlatsch, G. E., & Rubio-Sánchez, R. (2021). iGEM comes of age: trends in its research output. *BioRxiv*, 2021.01.21.424716. <https://doi.org/https://doi.org/10.1101/2021.01.21.424716>
- Järup, L. (2003). Hazards of heavy metal contamination. In *British Medical Bulletin*. <https://doi.org/10.1093/bmb/ldg032>
- Joe, M. H., Lee, K. H., Lim, S. Y., Im, S. H., Song, H. P., Lee, I. S., & Kim, D. H. (2012). Pigment-based whole-cell biosensor system for cadmium detection using genetically engineered *Deinococcus radiodurans*. *Bioprocess and Biosystems Engineering*. <https://doi.org/10.1007/s00449-011-0610-3>
- Kelwick, R., Bowater, L., Yeoman, K. H., & Bowater, R. P. (2015). Promoting microbiology education through the iGEM synthetic biology competition. *FEMS Microbiology Letters*, 362, 129. <https://doi.org/10.1093/femsle/fnv129>
- Kim, H. J., Jeong, H., & Lee, S. J. (2018). Synthetic biology for microbial heavy metal biosensors. In *Analytical and Bioanalytical Chemistry*. <https://doi.org/10.1007/s00216-017-0751-6>
- Kim, H. J., Lim, J. W., Jeong, H., Lee, S. J., Lee, D. W., Kim, T., & Lee, S. J. (2016). Development of a highly specific and sensitive cadmium and lead microbial biosensor using synthetic CadC-T7 genetic circuitry. *Biosensors and Bioelectronics*. <https://doi.org/10.1016/j.bios.2015.12.101>
- Li, X., Zhao, X., Fang, Y., Jiang, X., Duong, T., Fan, C., Huang, C. C., & Kain, S. R. (1998). Generation of destabilized green fluorescent protein as a transcription reporter. *Journal of Biological Chemistry*, 273(52). <https://doi.org/10.1074/jbc.273.52.34970>
- Liao, V. H. C., Chien, M. Te, Tseng, Y. Y., & Ou, K. L. (2006). Assessment of heavy metal bioavailability in contaminated sediments and soils using green fluorescent protein-based bacterial biosensors. *Environmental Pollution*. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2005.09.021>
- Mestanza-Ramón, C., Cuenca-Cumbicus, J., D'Orio, G., Flores-Toala, J., Segovia-Cáceres, S., Bonilla-Bonilla, A., & Straface, S. (2022). Gold Mining in the Amazon Region of Ecuador: History and a Review of Its Socio-Environmental Impacts. *Land*, 11(2). <https://doi.org/10.3390/land11020221>
- Mestanza-Ramón, C., Paz-Mena, S., López-Paredes, C., Jimenez-Gutierrez, M., Herrera-Morales, G., D'orio, G., & Straface, S. (2021). History, current situation and challenges of gold mining in ecuador's litoral region. *Land*, 10(11). <https://doi.org/10.3390/land10111220>
- Moore, C. M., Gaballa, A., Hui, M., Ye, R. W., & Helmann, J. D. (2005). Genetic and physiological responses of *Bacillus subtilis* to metal ion stress. *Molecular Microbiology*, 57(1). <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2005.04642.x>
- Mukherjee, G., & Singh, S. K. (2011). Purification and characterization of a new red pigment from *Monascus purpureus* in submerged fermentation. *Process Biochemistry*, 46(1). <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2010.08.006>
- Nagel, B., Dellweg, H., & Gierasch, L. M. (2007). Glossary for chemists of terms used in biotechnology (IUPAC Recommendations 1992). *Pure and Applied Chemistry*, 64(1). <https://doi.org/10.1351/pac199264010143>
- Newcastle University. (2009). *Bac -Man: Sequestering Cadmium into Bacillus Spores*.
- Notimundo al Día. (2022, February 9). De octubre a diciembre de 2021, se ampliaron 70 hectáreas para la minería ilegal en Napo, según Sylvia Villacís. *Notimundo*.
- Peshawar. (2017). *Project F*.

- Prabhakaran, R., Rajkumar, S. N., Ramprasath, T., & Selvam, G. S. (2018). Identification of promoter P cadR, in silico characterization of cadmium resistant gene cadR and molecular cloning of promoter P cadR from *Pseudomonas aeruginosa* BC15. *Toxicology and Industrial Health*.
<https://doi.org/10.1177/0748233718795934>
- Ramamurthy, P. C., Singh, S., Kapoor, D., Parihar, P., Samuel, J., Prasad, R., Kumar, A., & Singh, J. (2021). Microbial biotechnological approaches: renewable bioprocessing for the future energy systems. In *Microbial Cell Factories* (Vol. 20, Issue 1). <https://doi.org/10.1186/s12934-021-01547-w>
- Rensing, C., & Mitra, B. (2007). Zinc, Cadmium, and Lead Resistance and Homeostasis. In *Molecular Microbiology of Heavy Metals*. https://doi.org/10.1007/7171_2006_083
- Rensing, C., Mitra, B., & Rosen, B. P. (1997). The zntA gene of *Escherichia coli* encodes a Zn(II)-translocating P-type ATPase. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 94(26). <https://doi.org/10.1073/pnas.94.26.14326>
- Rivera-Parra, J. L., Beate, B., Diaz, X., & Ochoa, M. B. (2021). Artisanal and small gold mining and petroleum production as potential sources of heavy metal contamination in Ecuador: A call to action. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 18(6).
<https://doi.org/10.3390/ijerph18062794>
- Rogers, J. K., Taylor, N. D., & Church, G. M. (2016). Biosensor-based engineering of biosynthetic pathways. In *Current Opinion in Biotechnology*. <https://doi.org/10.1016/j.copbio.2016.03.005>
- Rojas-Sasse, E. (2022). Derrames de petróleo en Ecuador: un mal crónico. *DW Noticias*.
- Ron, E. Z., Minz, D., Finkelstein, N. P., & Rosenberg, E. (1992). Interactions of bacteria with cadmium. *Biodegradation*, 3(2–3). <https://doi.org/10.1007/BF00129081>
- Saini, R., Hegde, K., Brar, S. K., & Verma, M. (2019). Advances in whole cell-based biosensors in environmental monitoring. In *Tools, Techniques and Protocols for Monitoring Environmental Contaminants*. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-814679-8.00013-3>
- SCUT. (2015). *Super Cadmium Ion Killer*.
- Shetty, R., Lizarazo, M., Rettberg, R., & Knight, T. F. (2011). Assembly of BioBrick standard biological parts using three antibiotic assembly. In *Methods in Enzymology* (Vol. 498).
<https://doi.org/10.1016/B978-0-12-385120-8.00013-9>
- Singh, A., & Kumar, V. (2021). Recent advances in synthetic biology-enabled and natural whole-cell optical biosensing of heavy metals. In *Analytical and Bioanalytical Chemistry* (Vol. 413, Issue 1).
<https://doi.org/10.1007/s00216-020-02953-6>
- Tao, H. C., Peng, Z. W., Li, P. S., Yu, T. A., & Su, J. (2013). Optimizing cadmium and mercury specificity of CadR-based *E. coli* biosensors by redesign of CadR. *Biotechnology Letters*.
<https://doi.org/10.1007/s10529-013-1216-4>
- Teo, S. C., & Wong, L. S. (2014). Whole Cell-based Biosensors for Environmental Heavy Metals Detection. *Annual Research & Review in Biology*. <https://doi.org/10.9734/arrb/2014/9472>
- The Stony Brook School NY. (2019). *Tackling heavy metal pollution by the expression of MerR-like receptors and CapB in E.coli*.
- Tirado, L., Gonzales, F., Martínez, L., Wilches, L., & Celedón, J. (2015). Niveles de metales pesados en muestras biológicas y su importancia en salud. *Revista Nacional de Odontología*.
<https://doi.org/10.16925/od.v11i21.895>
- Torres, W. (2022). Ministerio de Energía suspenderá actividad minera en Napo. *Primicias Ecuador*.
- Tra-ngan, S., Siripornadulsil, S., Thanwisai, L., & Siripornadulsil, W. (2019). Potential application of a recombinant bacterial strain carrying a groEL promoter as a whole-cell microbial biosensor for

- detecting bioavailable cadmium. *Environmental Technology & Innovation*, 15, 100375.
<https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.eti.2019.100375>
- Turner, A. P. F. (2013). Biosensors: Sense and sensibility. *Chemical Society Reviews*.
<https://doi.org/10.1039/c3cs35528d>
- UPNAvarra. (2019). *Color is the new sensor*.
- Vásconez, L. (2022, January 28). Rotura del OCP y derrame de petróleo se registra en el sector de Piedra Fina. *El Comercio*.
- Verma, N., & Singh, M. (2005). Biosensors for heavy metals. In *BioMetals*. <https://doi.org/10.1007/s10534-004-5787-3>
- Vigneshvar, S., Sudhakumari, C. C., Senthilkumaran, B., & Prakash, H. (2016). Recent Advances in Biosensor Technology for Potential Applications – An Overview. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*. <https://doi.org/10.3389/fbioe.2016.00011>
- Vilanova, C., & Porcar, M. (2014). IGEM 2.0 - Refoundations for engineering biology. In *Nature Biotechnology* (Vol. 32, Issue 5). <https://doi.org/10.1038/nbt.2899>
- Vogl, T., Kickenweiz, T., Pitzer, J., Sturmberger, L., Weninger, A., Biggs, B. W., Köhler, E. M., Baumschlager, A., Fischer, J. E., Hyden, P., Wagner, M., Baumann, M., Borth, N., Geier, M., Ajikumar, P. K., & Glieder, A. (2018). Engineered bidirectional promoters enable rapid multi-gene co-expression optimization. *Nature Communications*, 9(1). <https://doi.org/10.1038/s41467-018-05915-w>
- Wan Jusoh, W. N. A., & Wong, L. S. (2014). Exploring the Potential of Whole Cell Biosensor : A Review in Environmental Applications. *International Journal of Chemical, Environmental & Biological Sciences*, 2(1).
- Wang, A., & Crowley, D. E. (2005). Global gene expression responses to cadmium toxicity in *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology*, 187(9). <https://doi.org/10.1128/JB.187.9.3259-3266.2005>
- Wang, W., Li, Y., Wang, Y., Shi, C., Li, C., Li, Q., & Linhardt, R. J. (2018). Bacteriophage T7 transcription system: an enabling tool in synthetic biology. In *Biotechnology Advances* (Vol. 36, Issue 8). <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2018.10.001>
- World Health Organization. (2010). Exposure to cadmium: a major public health concern. *Preventing Disease Through Healthy Enviroments*, 3–6.
- World Health Organization (WHO). (2011). *Guidelines for Drinking-water Quality* (4th ed.).
- Wu, C. H., Le, D., Mulchandani, A., & Chen, W. (2009). Optimization of a whole-cell cadmium sensor with a toggle gene circuit. *Biotechnology Progress*. <https://doi.org/10.1002/btpr.203>
- Yamada, M., Kabir, M. S., & Tsunedomi, R. (2003). Divergent promoter organization may be a preferred structure for gene control in *Escherichia coli*. *Journal of Molecular Microbiology and Biotechnology*, 6(3–4). <https://doi.org/10.1159/000077251>
- Yang, S., Sleight, S. C., & Sauro, H. M. (2013). Rationally designed bidirectional promoter improves the evolutionary stability of synthetic genetic circuits. *Nucleic Acids Research*, 41(1). <https://doi.org/10.1093/nar/gks972>
- Yoon, Y., Kim, S., Chae, Y., Kang, Y., Lee, Y., Jeong, S. W., & An, Y. J. (2016). Use of tunable whole-cell bioreporters to assess bioavailable cadmium and remediation performance in soils. *PLoS ONE*. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0154506>

Anexos

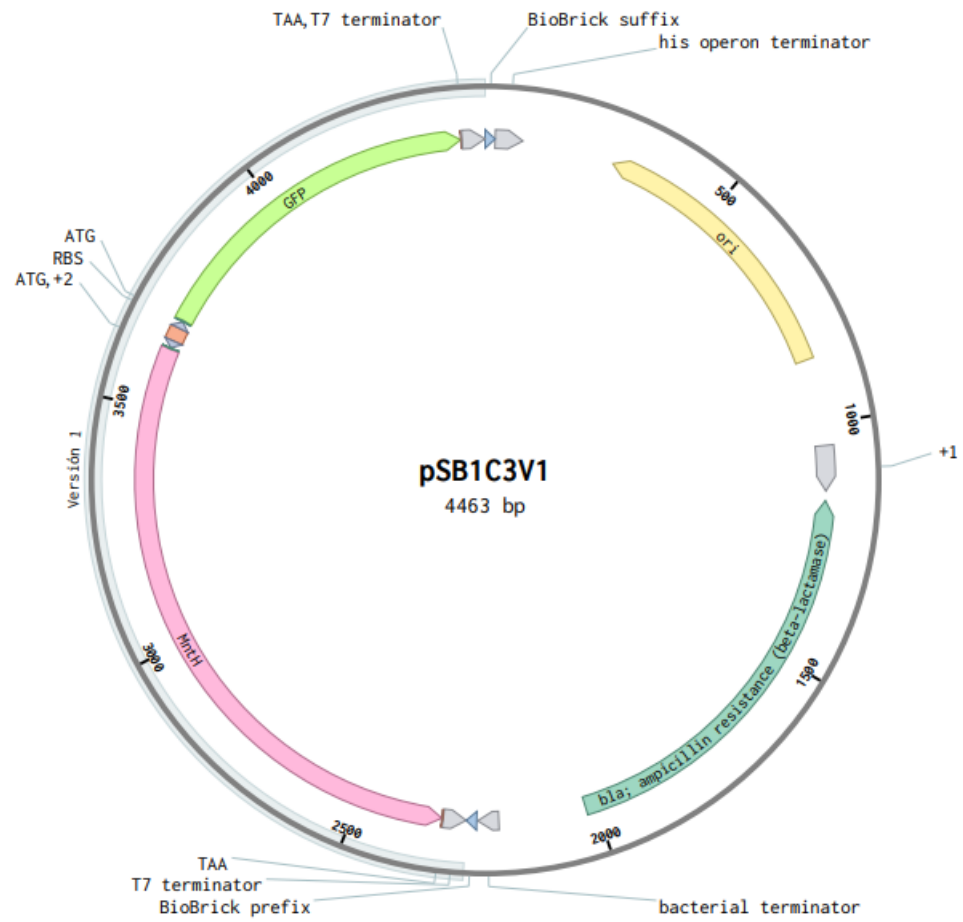


Imagen suplementaria 1. Plásmido pSB1C3V1. Este plásmido consta del circuito detallado en la Figura 5 insertado al plásmido pSB1C3.

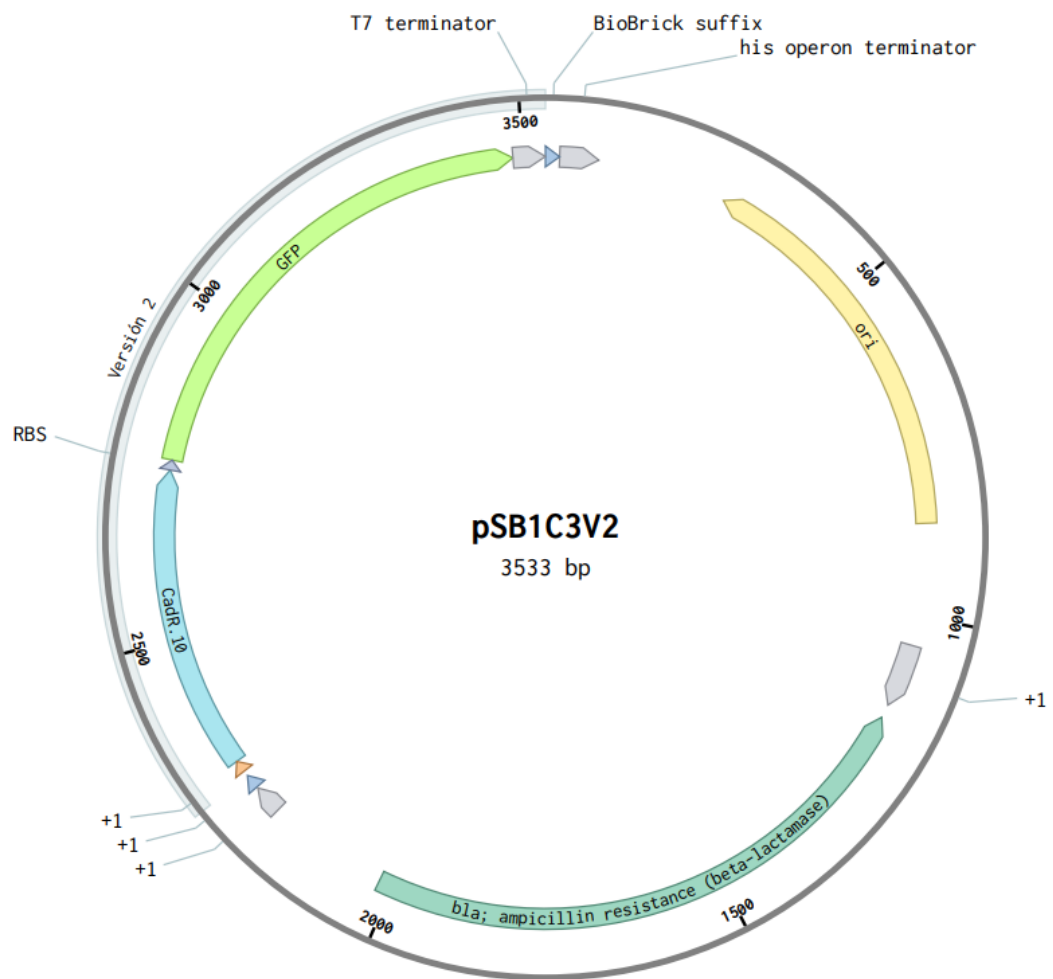


Imagen suplementaria 2. Plásmido pSB1C3V2. Este plásmido consta del circuito detallado en la Figura 6 insertado al plásmido pSB1C3.