

## Gas del esquisto bituminoso (shale gas)

Beatriz S. Méndez

*Departamento de Química Biológica. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. Buenos Aires, Argentina*

[bea@qb.fcen.uba.ar](mailto:bea@qb.fcen.uba.ar)

Los hidrocarburos que se hallan en rocas se originaron a partir de fuentes acuosas que contenían plantas y animales y que a lo largo de siglos se transformaron en gas y petróleo. Roturas naturales en las rocas permitieron que estos compuestos subieran hacia la superficie y fuesen extraídos por los métodos convencionales. Sin embargo hubo otros hidrocarburos cuya extracción presentó dificultades.

De acuerdo a la definición de la Real Academia Española esquisto es una roca de color negro azulado que se divide con facilidad en hojas. En el esquisto llamado bituminoso estas hojas contienen gas y/o petróleo. El gas del esquisto bituminoso es conocido mundialmente como *shale gas*. La extracción de hidrocarburos a partir de dichas rocas es dificultosa ya que presentan pocas fisuras. La técnica que se utiliza en este caso, llamada fractura hidráulica, consiste en la inyección a presión de agua y arena con algunos aditivos en muy baja proporción. La arena impide, que una vez producida la rotura, esta se vuelva a cerrar y el gas entonces fluye hacia los equipos de extracción. Los líquidos utilizados para la fractura hidráulica provienen de aguas corrientes, fuentes naturales (i.e. lagos) y líquidos usados en fracturas previas [1].

La producción comercial de *shale gas*<sup>1</sup> se da actualmente en Estados Unidos, Canadá, China y Argentina siendo la de Estados Unidos la única con niveles significativos. Por este hecho es que la mayoría de los escasos estudios físicos, químicos y biológicos sobre los efectos de la fractura hidráulica en el subsuelo terrestre se hayan hecho en ese país.

La existencia de vida bajo la superficie terrestre ha sido demostrada, ejemplos conocidos las chimeneas hidrotermales y el vulcanismo. Una pregunta plausible es si hay vida microbiana en el esquisto bituminoso antes de la fractura inducida y la respuesta es que puede tener lugar ya que se encuentra materia orgánica en las rocas y por lo tanto sustrato para distintas funciones microbianas. En esos ambientes los microorganismos se detectaron en baja cantidad, del orden de  $10^{-1}$  a  $10^{-5}$  células por g<sup>-1</sup>[2]

Dada la ubicuidad de los microorganismos, era esperable también su presencia en los lugares sometidos a fractura hidráulica. A pesar de la diversidad de los sitios de extracción, así como de los materiales utilizados, hay cierta constancia tanto en las especies como en los géneros microbianos presentes en los fluidos tratantes, medidos según datos publicados de 16SrRNA. Comúnmente, se encuentran especies de *Pseudomonas*, *Acinetobacter* y *Thermoanaerobacterium* en los primeros días de la fractura hidráulica, mientras que en los días finales se detectan microorganismos halotolerantes y termófilos. Si bien especies con estas características constituyen alrededor del 2% en los líquidos iniciales, en las etapas finales componen cerca del 86% de los microorganismos detectados [3-5].

En un trabajo reciente realizado en dos yacimientos situados en la cuenca de los Apalaches, la reconstrucción de los genomas microbianos a partir de muestras de los líquidos tratantes tomadas en los tiempos iniciales y hacia el fin del proceso, como asimismo la detección de productos de su metabolismo, permitieron obtener un amplio panorama del ecosistema sometido a fractura hidráulica en el profundo subsuelo terrestre[6].

Las muestras analizadas cubrían un amplio espectro temporal, 0 a 328 días. El análisis metagenómico a los distintos tiempos mostró la preponderancia de los géneros *Pseudomonas*, *Cobetia* y *Marinobacterium* en los líquidos iniciales. Las tomas de material a los 82 y 328 días señalaron la presencia de *Halanaerobium*, *Halomonadaceae*, *Marinobacter*, *Methanohalophilus*, *Methanolobus*, de los que se pudo reconstruir genomas representativos, y a la vez dos genomas incompletos de Halobacteroidaceae. Todos ellos con la característica de ser termófilos y/o halotolerantes. También se detectó la presencia de metanógenos. Resultados coincidentes con los obtenidos en otros reservorios como se indicó anteriormente.

El análisis de los genomas de los miembros de la familia Halobacteroidaceae indicó la ausencia de similitud con respecto a los depositados en los bancos de datos. Por lo cual siguiendo recomendaciones para nombrar genomas no completos obtenidos a partir de datos metagenómicos [7] los autores propusieron un nuevo género, *Candidatus Frackibacter*, el primero en detectarse en ese particular ambiente.

Dado su origen, el cloruro de sodio cristalizado es abundante en el esquisto bituminoso. La adición de grandes masas de agua conduce a su solubilización aumentando por lo tanto la salinidad en el sitio de extracción. Los datos obtenidos a partir de la secuenciación genómica de los microorganismos presentes hacia el final de la fractura, dio importantes conclusiones tanto sobre sus capacidades metabólicas como sobre la interacción entre los mismos. Frente a la salinidad los autores observaron la capacidad de producción de metabolitos osmo-protectores en los genomas analizados. Uno de ellos, la glicina betaína, se detectó en los líquidos. La fermentación de la glicina betaína, llevada a cabo por especies de *Halanaerobium* y *Candidatus Frackibacter* conduce a metanol, sustrato de los metanógenos como *Methanolobus* y *Methanohalophilus* con la probable consecuencia de producción adicional de metano en la sub superficie terrestre. En genomas de *Halanaerobium* se detectó la capacidad de producir biopelículas, ácidos orgánicos e H<sub>2</sub> como así también la de reducir tiosulfato a sulfuro por lo cual se transformaría en un activo degradador del acero utilizado en los instrumentos que llevan a la superficie el *shale gas*.

Otra particularidad observada fue la presencia de virus (fagos), de algunos de los cuales se obtuvo su genoma completo, y en consecuencia fue posible detectar en una gran parte de los genomas bacterianos totales analizados la presencia del sistema CRISPR-Cas [8], al punto tal que está presente en la totalidad de los genomas estudiados en la muestra final indicando probablemente que su presencia es esencial para la supervivencia bacteriana.

Los resultados obtenidos en todos los trabajos citados coinciden en la detección de microorganismos con características similares.

Vemos entonces un paisaje alterado del más profundo subsuelo terrestre por la presencia y acción de las bacterias, sus metabolitos y sus fagos. Y es así que estamos enfrentados a un ambiente microbiológico, creado por el sistema de extracción, que parece indicar una posible capacidad de corrosión en el sitio con su correlativa implicancia en la sostenibilidad del proceso.

Eso en primera instancia...

## Nota al pie

1.Nombre que le daremos en este texto

## Referencias:

1. **Shale Argentina Instituto Argentino del Petróleo y del Gas** (2018) Hidrocarburos no convencionales.
2. **Mouser PJ, Borton M, Darrah TH, Hartsock A, Wrighton, KC** (2016) Hydraulic fracturing offers view of microbial life in the deep terrestrial subsurface. *FEMS Microbiology Ecology* 92: 1-18 doi: 10.1093/femsec/fiw166.
3. **Cluff MA, Hartsock A, MacRae J et al.** (2014) Temporal changes in microbial ecology and geochemistry in produced water from hydraulically fractured Marcellus shale gas wells. *Environmental Science and Technology* 48:6508-6517.

4. **Wuchter C, Banning E, Mincer TJ et al.** (2013) Microbial diversity and methanogenic activity of Antrim shale formation waters from recent fractured wells. *Frontiers in microbiology* 4: 1-14
5. **Akob DM, Cozzarelli IM, Dunlap DS et al.** (2015) Organic and inorganic composition and microbiology of produced waters from Pennsylvania shale gas wells. *Applied Geochemistry* 60:116-25
6. **Daly RA, Borton MA, Wilkins MJ, Hoyt TW et al.** (2016) Microbial metabolisms in 2.5-km-deep ecosystem created by hydraulic fracturing in shales. *Nature Microbiology* DOI: 10-1038/MMICROBIOL.2016.146
7. **Konstantinidis KT, Rosselló-Móra R** (2015) Classifying the uncultivated microbialmajority: A place for metagenomic data in the Candidatus proposal. *Systematic and Applied Microbiology* 38: 223–230
8. **Pettinari MJ** (2016) La revolución de los CRISPR, o cómo nuevamente una rareza microbiana se convierte en una herramienta revolucionaria que permite editar cualquier genoma. *QuímicaViva* 15(3)



ISSN 1666-7948

[www.quimicaviva.qb.fcen.uba.ar](http://www.quimicaviva.qb.fcen.uba.ar)

**Revista QuímicaViva**

Número 3, año 17, Diciembre 2018

[quimicaviva@qb.fcen.uba.ar](mailto:quimicaviva@qb.fcen.uba.ar)

# El espermatozoide: algo más que un paquete de lujo para entregar DNA

Maite Yael Cambiasso<sup>1</sup>, Camila Galotto<sup>1</sup>, Melisa Celeste Sánchez<sup>1</sup>, Vanina Fontana<sup>2,3</sup>, Lucrecia Piñeiro<sup>1</sup>, Marina Romanato<sup>1</sup> y Juan Carlos Calvo<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>*Instituto de Biología y Medicina Experimental (IBYME), CONICET,* <sup>2</sup>*Departamento de Química Biológica, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad de Buenos Aires,* <sup>3</sup>*IQUIBICEN, CONICET, Buenos Aires, Argentina.*

[juacalvo@gmail.com](mailto:juacalvo@gmail.com)

## Resumen

Durante la formación del espermatozoide, en la última etapa de la espermatogénesis, llamada espermiogénesis, hay un recambio de histonas por protaminas (P1 y P2). Estas proteínas básicas empaquetan la cromatina modificando los nucleosomas por estructuras de toroides. Esto significa una condensación mucho mayor que la de una célula somática, haciendo esta cromatina transcripcionalmente inactiva, pero mucho más resistente a daños físicos y por especies reactivas de oxígeno. Luego de la penetración del espermatozoide al ovocito, el primer paso hacia la formación del pronúcleo masculino es la descondensación de esta cromatina. Este proceso se lleva a cabo con la acción del glutatión que reduce los puentes disulfuro intra e inter protaminas, como también de una molécula con alta carga negativa que permite el remplazo de las protaminas por las histonas ovocitarias. Hemos estudiado este proceso y demostrado que esa molécula es el heparán sulfato ovocitario. También estudiamos el papel de otro glicosaminoglicano con cierta capacidad descondensante, el dermatán sulfato, en espermatozoides de donantes y pacientes, en particular con respecto a la proporción de protaminas presentes en esos núcleos, demostrando una relación P1/P2 disminuida y con posibilidad de impactar en la descondensación diferencial usando dermatán sulfato o heparina (como equivalente molecular del heparán sulfato, por similitud de estructura, carga y potencia descondensante).

**Palabras clave:** espermatozoide; cromatina; descondensación; protaminas; glicosaminoglicanos

## Summary

During the formation of the sperm, in the last stage of the spermatogenesis, called spermiogenesis, there is a replacement of histones by protamines (P1 and P2). These basic proteins package chromatin by modifying the nucleosomes by toroid structures. This means a much larger condensation than a somatic cell, making this chromatin transcriptionally inactive, but much more resistant to physical damage and reactive oxygen species. After the penetration of the sperm to the oocyte, the first step towards the formation of the male pronucleus is the decondensation of this chromatin. This process is carried out with the action of glutathione that reduces disulfide bridges intra and inter protamines, as well as a molecule with high negative charge that allows the replacement of protamines by oocyte histones. We have studied this process and demonstrated that this molecule is the oocyte heparan sulfate. We also studied the role of another glycosaminoglycan with a certain decondensing capacity, dermatan sulfate, in sperm of donors and patients, in particular with respect to the proportion of protamines present in those nuclei, demonstrating a decreased P1/P2 relationship and with the possibility of a differential decondensation using dermatan sulfate or heparin (as the molecular equivalent of heparan sulfate, by similarity of structure, negative charge and decondensing power).

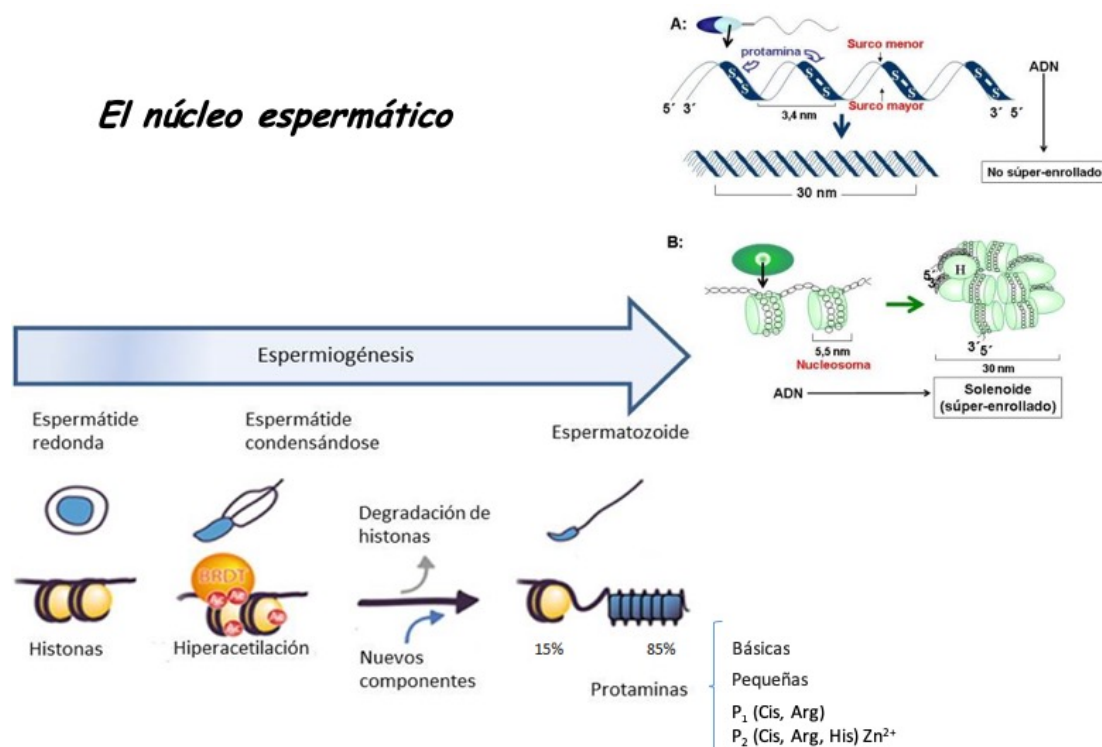
**Keywords:** spermatozoa; chromatin; decondensation; protamines; glycosaminoglycans

## Introducción

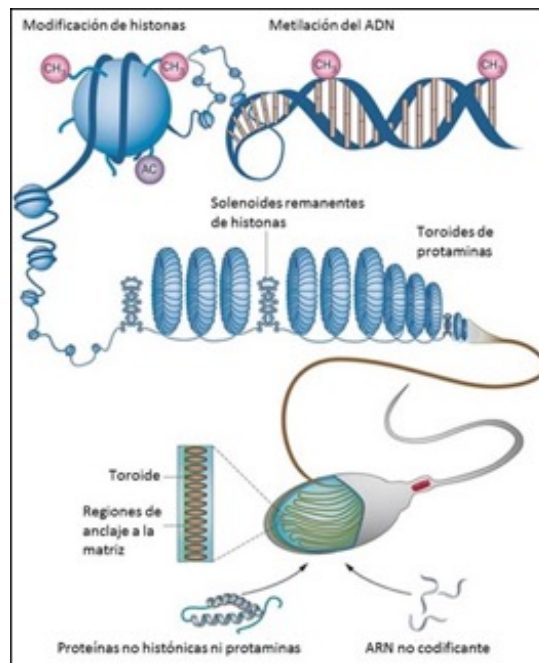
En el camino de la evolución, la separación de los sexos permitió una reproducción más eficiente desde el punto de vista de herencia genética, al combinar los caracteres hereditarios del varón y la mujer en un núcleo nuevo generado a partir del proceso de fecundación entre un espermatozoide y un ovocito. Esta fecundación permite que, al ingresar la totalidad del espermatozoide al interior (ooplasma) del ovocito, una vez desaparecidas sus membranas, el material genético pueda combinarse con la contraparte femenina y así organizar el núcleo del embrión [1].

Pero, desde el punto de vista molecular, este proceso (singamia) no es tan simple dada la compleja condensación de la cromatina espermática (de 6 a 8 veces más compacta que la cromatina de cualquier célula somática), ocurrida durante la última fase de la espermatogénesis: espermiogénesis (Fig. 1) [2]. En esta etapa, las histonas que comúnmente organizan la cromatina en unidades nucleosomales, son remplazadas por otras proteínas básicas, más pequeñas, llamadas protaminas. Estas protaminas condensan la cromatina en forma de toroide, a diferencia del solenoide generado por la interacción con las histonas, confiriendo más resistencia frente a daños por especies reactivas de oxígeno, a expensas de hacer a esta cromatina transcripcionalmente inactiva [3]. Aproximadamente, dependiendo de la especie, entre un 85 y 90% de las histonas [4] son remplazadas por protaminas lo que deja a esta cromatina en un estado condensado que presenta zonas nucleosomales (solenoides) con toroides donde se encuentran las protaminas (Fig. 2).

La condensación diferencial hace suponer que la descondensación no ocurra en todo el cromosoma de igual manera, sino que, dependiendo de la presencia de histonas o protaminas, pueda haber zonas que descondensen antes que otras.



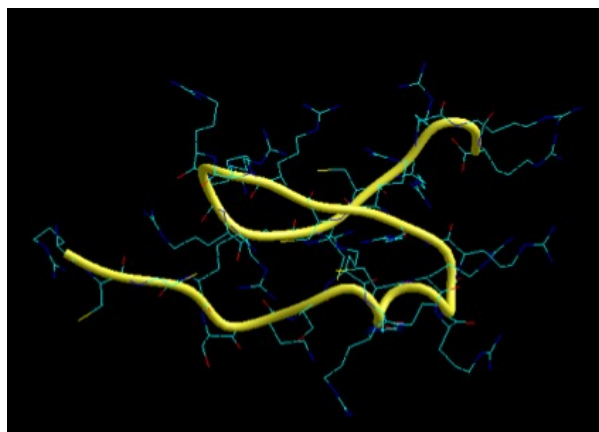
**Figura 1:** Condensación de la cromatina espermática. Representación gráfica de las etapas involucradas indicando la presencia de protaminas y el remplazo de las histonas por estas proteínas.



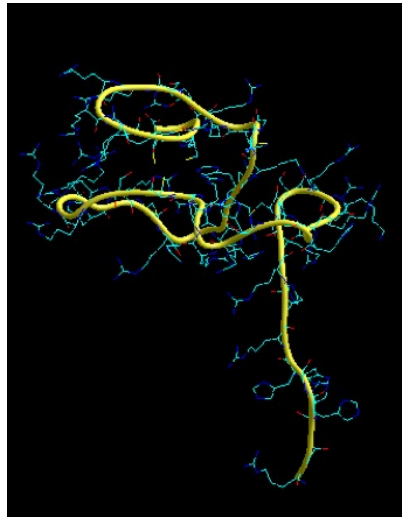
**Figura 2:** Ubicación de las protaminas en la cromatina espermática. En el esquema se indica su ubicación junto con los nucleosomas remanentes.

## Las protaminas

Las protaminas [5] comprenden una familia de proteínas pequeñas (aproximadamente entre 50 y 110 aminoácidos) y ricas en arginina, sintetizadas en la etapa final de espermatidas, encontradas en muchos animales y plantas, que se unen al DNA, condensando el genoma de esas células a un estado genéticamente inactivo. La comparación de secuencias sugiere que han evolucionado desde histonas especializadas hasta protaminas, pasando por un estado de proteínas símil protaminas. Los elementos estructurales que están presentes en todas las protaminas maduras, comprenden dominios ricos en arginina que serían responsables de la unión al DNA, con múltiples sitios de fosforilación potencial. Encontramos dos protaminas, presentes diferencialmente en las distintas especies: P1 y P2. De estas, P1 (Fig. 3) se encuentra empaquetando el DNA espermático en todos los mamíferos, mientras que P2 (Fig. 4) está presente en los espermatozoides de primates, algunos roedores y un grupo de mamíferos placentarios [6, 7]. P2 se sintetiza a partir de un precursor que sufre procesamiento proteolítico luego de unirse al DNA y que, además, tiene la capacidad de unir Zn<sup>2+</sup>, aunque no se conoce bien la función de este último [7]. Si bien, P1 y P2 pueden ser fosforiladas inmediatamente a su síntesis, luego de unirse al ácido nucleico la mayoría de los grupos fosfato son eliminados y los residuos cisteína son oxidados, permitiendo la formación de enlaces disulfuro que une a las protaminas entre sí, como también formar puentes disulfuro intramoleculares [8, 9]. Se ha demostrado que ambas, P1 y P2, son esenciales para la función espermática normal, encontrándose en una relación 1:1 en humanos y 2:1 en ratones, siendo P1 la única protamina presente en espermatozoides de rata [10].



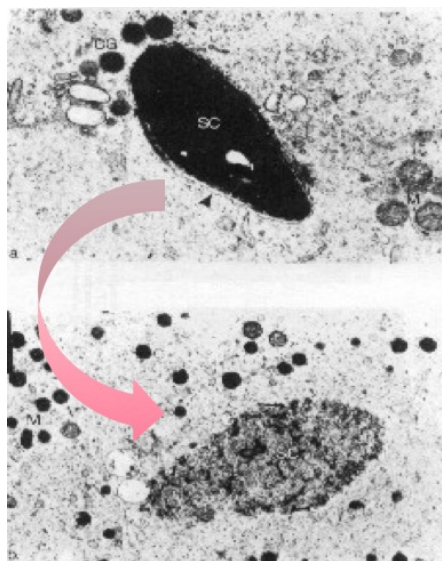
**Figura 3:** Modelado por similitud de la protamina P1. Se toma como molde el dominio de reconocimiento de heparina en una isoforma alternativa del VEGF-A (el VEGF55) [11]



**Figura 4:** Modelado por similitud de la protamina P2. Se utiliza como molde el "RINGdomain" de la "synaptotagmin-likeprotein 4" [12].

### El proceso de descondensación

El primer paso hacia la formación del pronúcleo masculino consiste en la descondensación de la cromatina espermática [13] (Fig. 5).



**La  
descondensación  
es fundamental  
para que ocurra la  
formación de  
pronúcleo  
masculino y  
posterior singamia.**

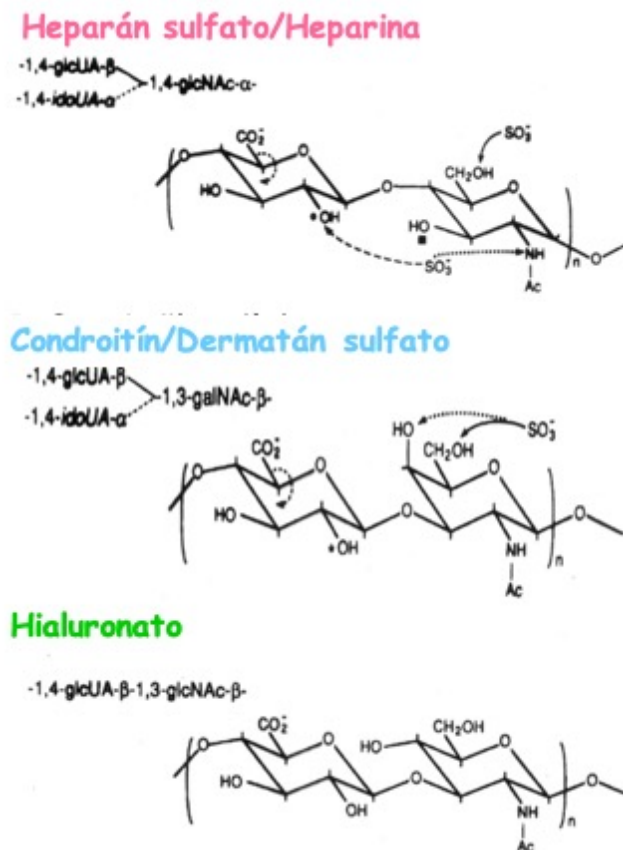
**Figura 5:** Microfotografía electrónica del estado de un núcleo. Con su cromatina condensada (imagen superior) o descondensada (imagen inferior).

Debido a la interacción entre las protaminas y el DNA, fundamentalmente a través de las cargas negativas en el ácido nucleico y las positivas de las protaminas, como también entre las bases nitrogenadas del DNA y los aminoácidos de las proteínas, es lógico pensar en la existencia de alguna molécula cargada negativamente que "compita" con el DNA por estas protaminas. A esta competición se le suma una reducción en los puentes disulfuro entre protaminas e intraprotaminas para hacer más lábil a la estructura tan compacta. En este proceso, la reducción de los puentes disulfuro está a cargo del glutatión (GSH) ovocitario [14, 15]. Según nuestros resultados experimentales, la reducción sería sinérgica con la remoción de las protaminas, al menos en el modelomurino. En otras especies animales, la nucleoplasmina parece ser la molécula que interviene en el intercambio protaminas:histonas [16]. Sin embargo, en mamíferos y roedores, no pareciera ser esta la molécula involucrada [17].

En ensayos in vitro, esta descondensación puede obtenerse utilizando heparina o un detergente como el SDS, en conjunto con GSH. Pero ninguno de estos agentes se encuentra fisiológicamente dentro del ovocito, por lo que no podrían ser las moléculas relevantes en dicho proceso.

### Papel de los glicosaminoglicanos en la descondensación de la cromatina.

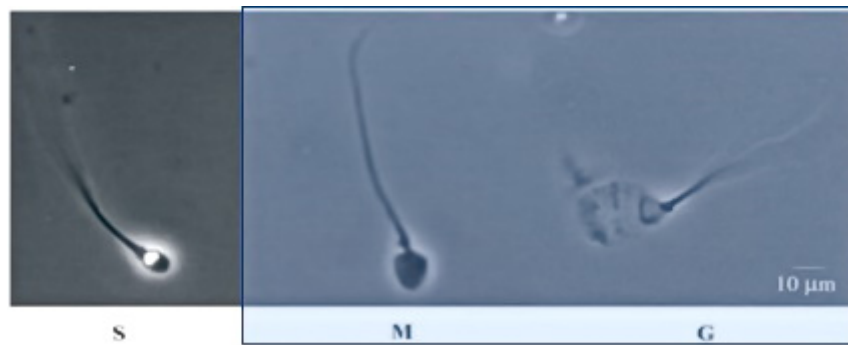
Teniendo en cuenta los resultados in vitro con moléculas cargadas negativamente, los candidatos más lógicos por presencia local (fluido folicular) y carga son los glicosaminoglicanos (GAGs) [18, 19]. Entre ellos, salvo el ácido hialurónico, la mayoría posee una importante carga negativa producto de la presencia de ácido urónico y la sulfatación de los azúcares. Todos están constituidos por repeticiones disacarídicas con mayor o menor sulfatación y de longitudes muy variables. Esto llevó a probar la descondensación de la cromatina espermática en presencia de GSH y uno o varios de estos GAGs: ácido hialurónico, condroitín sulfato, heparán sulfato, dermatán sulfato o heparina con diversas modificaciones estructurales (acetilaciones, desulfataciones, etc.) (Fig. 6).



**Figura 6:** Estructura de los diversos glicosaminoglicanos que fueron utilizados para analizar la descondensación de la cromatina espermática.

El resultado de la descondensación puede seguirse en el tiempo, observando al microscopio óptico con contraste de fase la presencia de, por lo menos, tres formas espermáticas: con la cabeza condensada (S: sin descondensar), es decir pequeña y refringente; con la cabeza medianamente descondensada (M), es decir más redondeada, grande y con poca o casi nada de refringencia o, groseramente descondensada (G), es decir sin refringencia, muy grande y, a veces, muy poco visible al microscopio salvo por la presencia del flagelo que permite observar una especie de “fantasma” de cabeza en el extremo (Fig. 7).





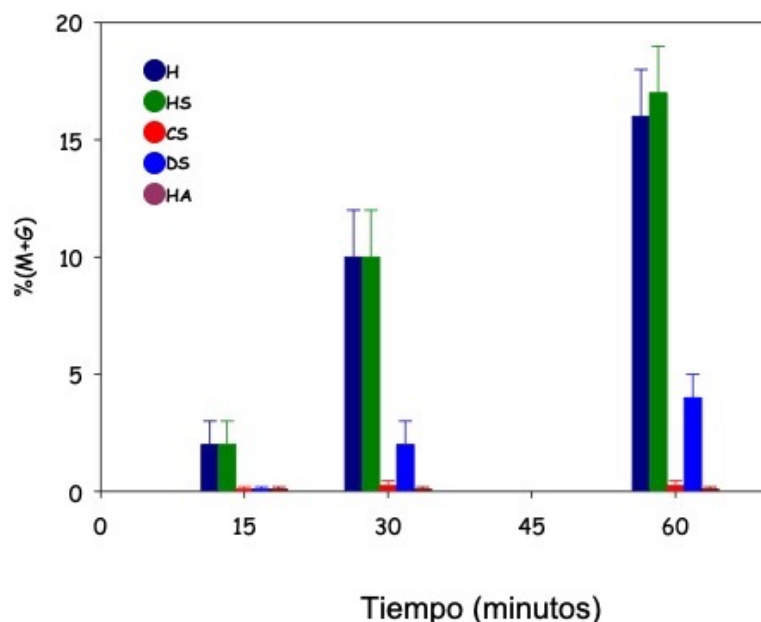
**Figura 7:** Distintas formas de los espermatozoides según el estado de descondensación de la cromatina. S (sin descondensar), M (medianamente descondensada), G (groseramente descondensada). Metodología microscopía óptica con contraste de fase

Como criterio de descondensación, se considera la suma porcentual de formas M+G habiendo contado, al menos, unos 200 espermatozoides.

La mezcla descondensante consiste en GSH 10 mM y alguno de los GAGs en concentración 46 µM. Normalmente, se evalúa la descondensación a los 15, 30 y 60 minutos, a 37°C.

### ¿Quién es el GAG candidato para la descondensación?

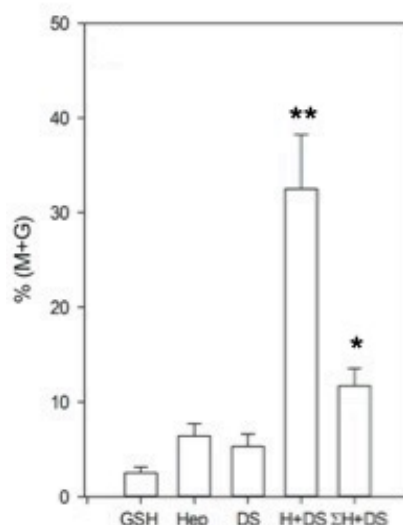
El análisis de la descondensación, luego de 60 minutos, en presencia de los diversos GAGs indicó que, para espermatozoides humanos, los candidatos eran el heparán sulfato (HS) y su análogo estructural, la heparina (Hep) [20]. Dado que la heparina es un producto exclusivo de mastocitos, la molécula de elección resultó el HS. De los otros GAGs, solamente el dermatán sulfato (DS) mostró una cierta capacidad descondensante, aunque mucho menor que la del HS (Fig. 8).



**Figura 8:** Descondensación obtenida en la cromatina de espermatozoides humanos, en presencia de diversos GAGs. Heparina (H), Heparán sulfato (HS) y, en menor medida, Dermatán sulfato (DS) fueron capaces de descondensar el DNA. El resto de los GAGs: ácido hialurónico (HA) y condroitín sulfato (CS) no presentaron actividad descondensante.

Analizando el sistema con espermatozoides murinos, el resultado fue similar, aunque el DS mostró una mejor capacidad descondensante comparada con los humanos y, además, un efecto sinérgico cuando

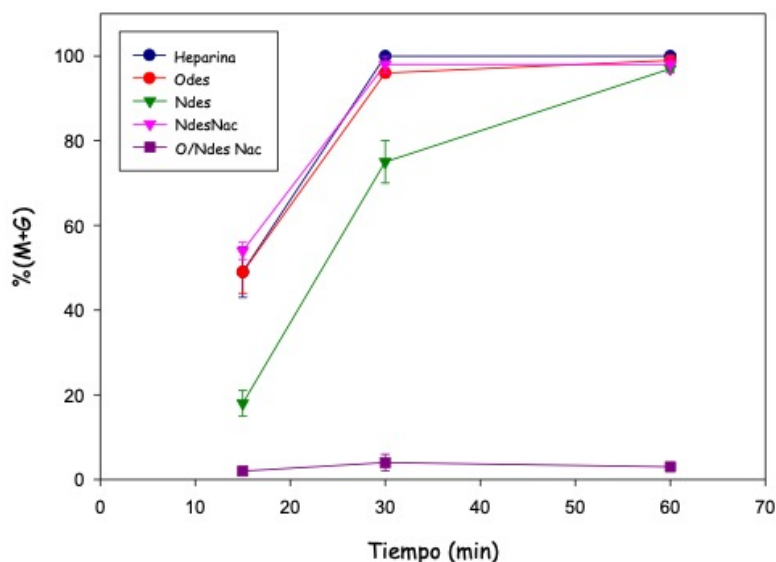
se utilizaba una mezcla de HS y DS en concentraciones subóptimas para ambas por separado, evento no observado en la cromatina humana [21] (Fig. 9).



**Figura 9:** Descondensación de la cromatina espermática murina. En presencia de Heparina (Hep/H), Dermatán sulfato (DS), la combinación de ambos y la sumatoria algebraica de los efectos independientes. El tiempo de descondensación es de 15 minutos. (\*)  $p < 0.05$  vs H±DS, (\*\*)  $p < 0.01$  vs GSH/Hep/DS

Dado que la posible explicación para la actividad descondensante parecía radicar en la carga de estas moléculas, se estudió el efecto con moléculas químicamente modificadas.

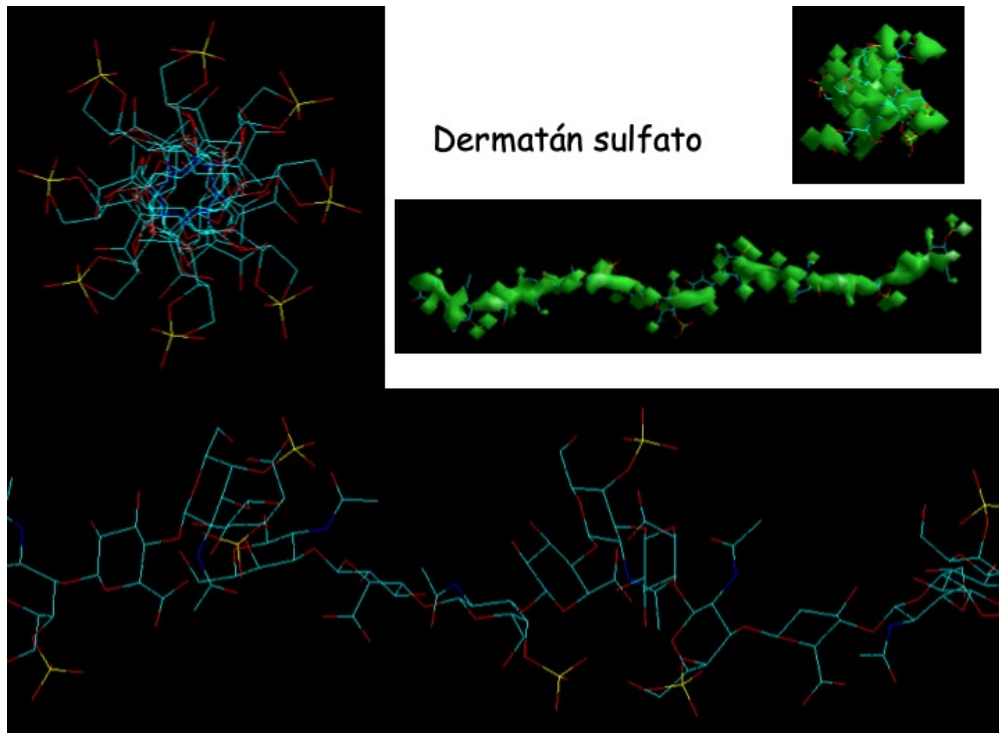
Los resultados permitieron definir que no parecía ser simplemente la carga neta sino la distribución espacial de la misma la que podría dar cuenta de la efectividad de estos GAGs [20] (Fig. 10).



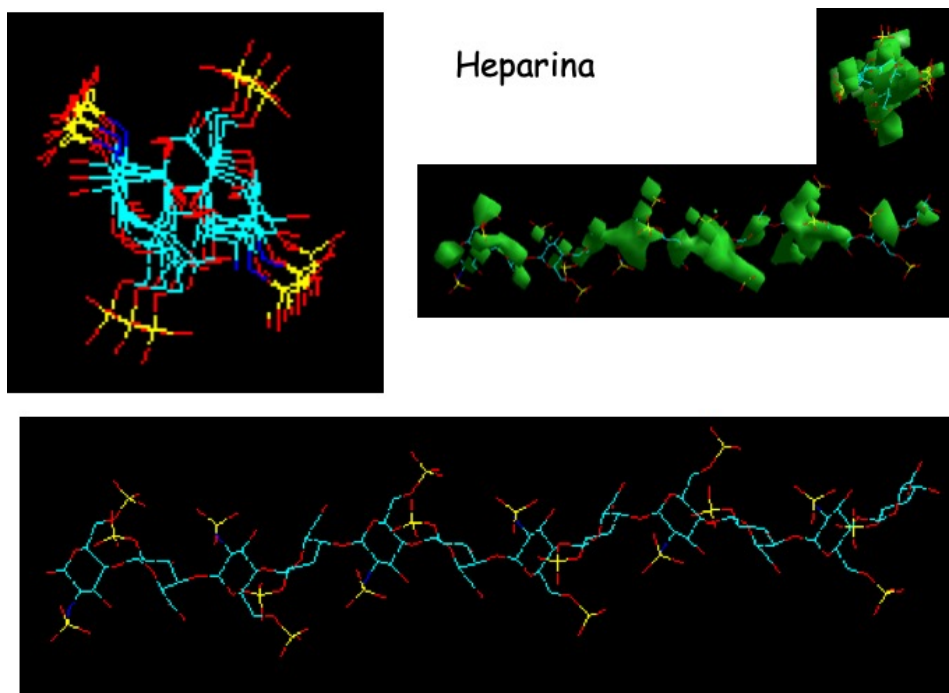
**Figura 10:** Descondensación obtenida en presencia de heparinas modificadas para cambiar la carga total o su distribución. Odes: O desulfatada, N des: N desulfatada, NdesNac: N desulfatada N acetilada, O/NdesNac: O/N desulfatada N acetilada. La desulfatación elimina carga negativa y la acetilación elimina carga positiva del grupo amino-azúcar.

Con esto en consideración, se hizo un modelo de distribución de carga (utilizando el programa Hyperchem 8.0, HyperCube) comparando el heparán sulfato con el dermatán sulfato, dos únicos GAGs (además de la heparina) con capacidad descondensante.

El resultado indicó que el dermatán sulfato muestra una distribución homogénea de cargas similar a la observada en la doble hélice de DNA (Fig. 11), mientras que para el heparán sulfato la distribución resulta mucho más dirigida en forma de X (Fig. 12). Esto permitiría suponer que la capacidad diferencial de descondensación que muestran ambas moléculas es resultado de esta distribución de cargas y que, tal vez, la combinación de ambos GAGs en la mezcla descondensante permitiría diferenciar muestras de espermatozoides con una cantidad y/o relación diferente entre P1 y P2, resultando en una compactación global diferente [22]. Podría especularse con que el DS descondense zonas más próximas a los nucleosomas, mientras que el HS/Hepdescondense zonas más alejadas.



**Figura 11:** Distribución de cargas negativas en la molécula del dermatán sulfato. En verde se muestra la superficie cargada de la molécula y, hacia la izquierda y arriba, la orientación de las cargas negativas, similar a lo que se observa en una doble hélice de DNA.



**Figura 12:** Distribución de cargas negativas en la molécula de heparina/heparán sulfato. En verde se muestra la superficie cargada de la molécula y, hacia la izquierda y arriba, la orientación de las cargas negativas, de manera mucho más localizada que lo observado para dermatán sulfato.

Debido a la similitud de acción con respecto a la descondensación, para los experimentos se utilizó heparina (por su menor costo y mayor accesibilidad) y solamente heparán sulfato cuando fue necesario.

### El heparán sulfato, presente en el ovocito.

Para corroborar esta posibilidad de que el heparán sulfato fuese la molécula descondensante, estudiamos la presencia de este en el ooplasma utilizando un anticuerpo específico contra el glicosaminoglicano.

Pudimos observar su presencia en ovocitos murinos y humanos, en distintas etapas de su maduración [23, 24] (Figs. 13, 14, 15).

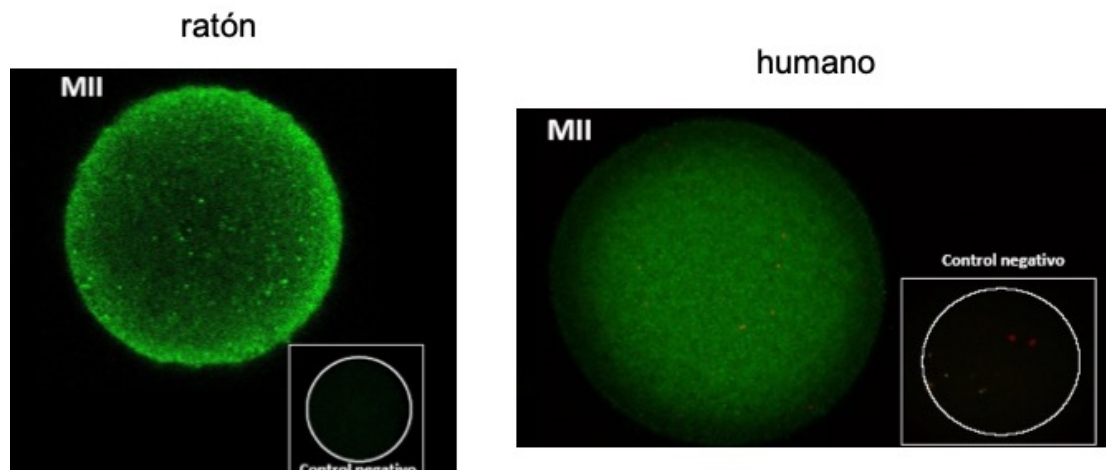


Figura 13: Heparán sulfato en el interior de ovocitos en metafase II.

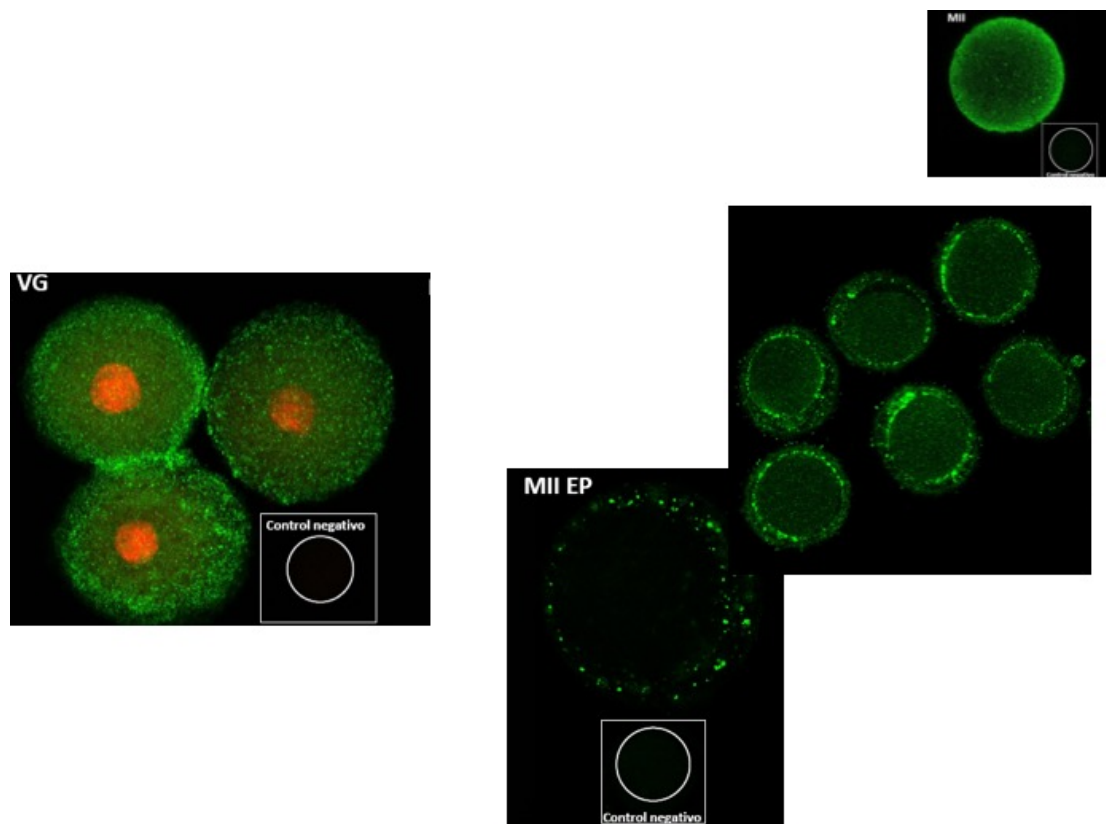
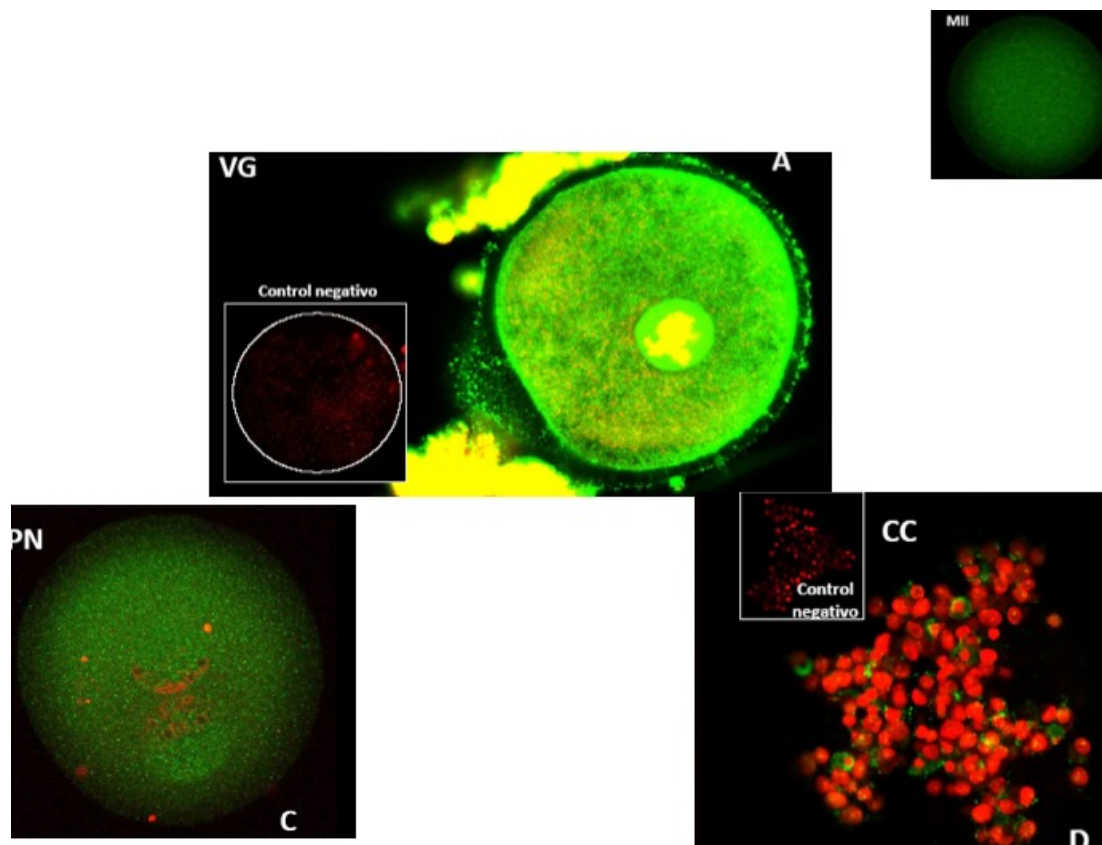


Figura 14: Ovocitos murinos. En estadio de vesícula germinal (VG), metafase II (MII) y, en este estadio discriminando el espacio perivitelino (EP) o el conjunto de espacio perivitelino y ooplasma.



**Figura 15:** Heparán sulfato en ovocitos humanos y células de la granulosa. La imagen A muestra un ovocito en estadio de vesícula germinal, la imagen C en condición de pronúcleo (ovocito arrestado espontáneamente) y, la imagen D, en las células del cúmulo.

Más aún, utilizando ovocitos tanto murinos como humanos que fueron aplastados para liberar su contenido, se demostró que el heparán sulfato era necesario mediante el uso de heparinasa, enzima específica que degrada este glicosaminoglicano [25].

#### **Cociente de velocidades de descondensación.**

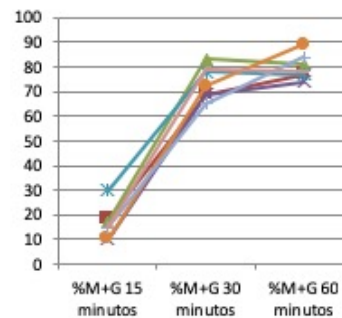
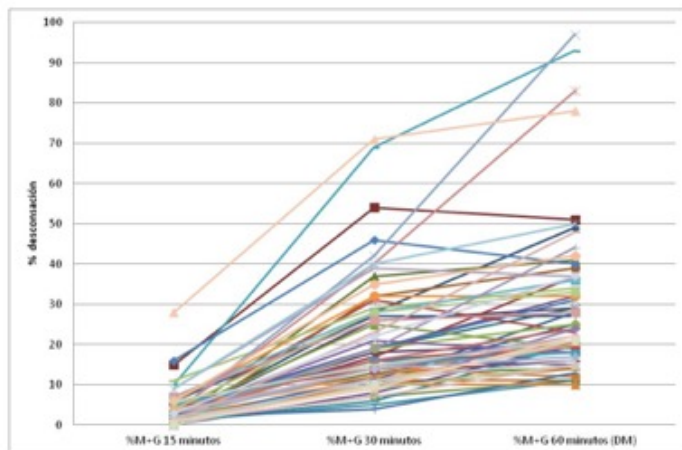
El análisis de la descondensación de muestras de espermatozoides de donantes voluntarios sanos (normozoospermicos y, preferentemente, de fecundidad comprobada) a diversos tiempos (15, 30 y 60 minutos), permitió definir un cociente entre lo observado a los 30 y 60 minutos como índice de velocidad de descondensación [ $V_{60}/V_{30} = \%(M+G)_{60}/\%(M+G)_{30}$ ]. Este valor de corte sería de utilidad, en su traslado a la clínica de fecundidad, para comparar con las muestras de pacientes que consultan por problemas de fertilidad y cuya causa, principalmente, se deba a factores masculinos.

De acuerdo con lo que se observa en la figura 16, los donantes mostraron un perfil muy similar de descondensación en presencia de heparina, con un valor promedio de  $1.05 \pm 0.20$  y permitiendo calcular un punto de corte en 1.45 (Media  $\pm$  2 DEM) ( $V_{60}/V_{30}$ ), siendo el correspondiente a la descondensación en presencia de DS de  $1.30 \pm 0.27$  y resultando en un valor de corte de 1.84 (Media  $\pm$  2 DEM).

## Velocidad de descondensación D60/D30

< 1.45 **descondensadores rápidos** ~ donantes  
(n=61)

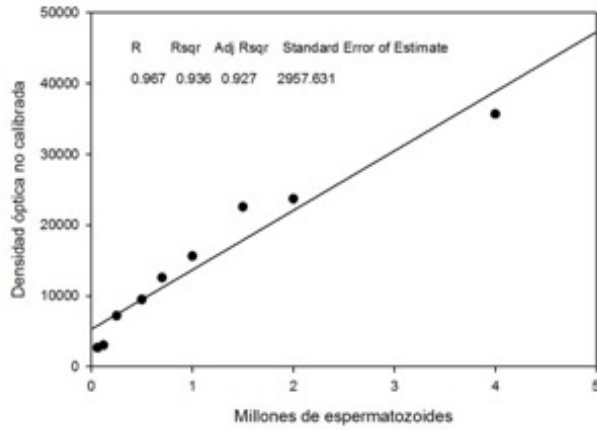
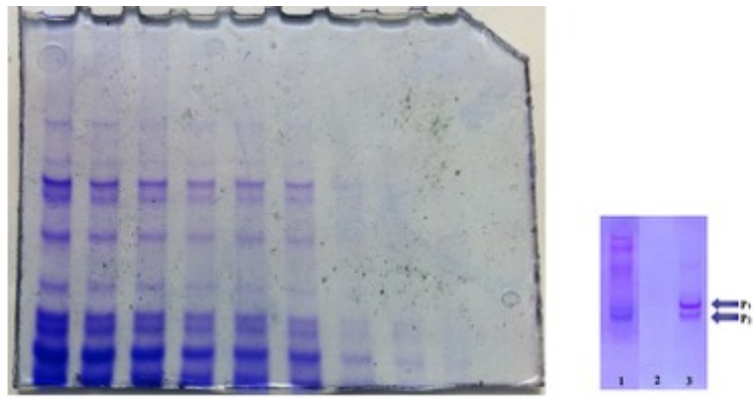
≥ 1.45 **descondensadores lentos** (n=29)



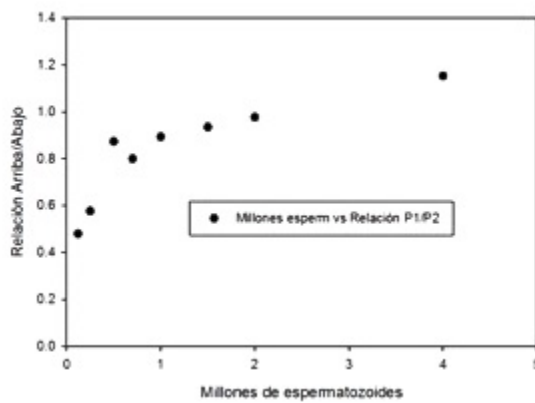
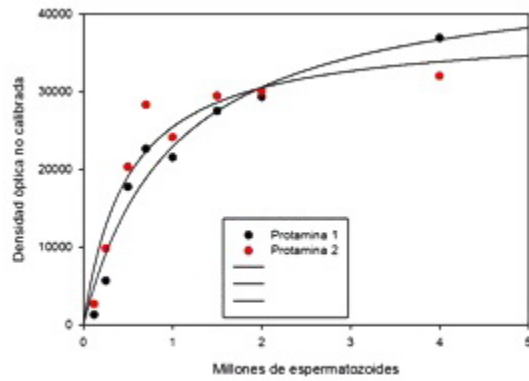
**Figura 16:** Comportamiento de los donantes respecto a la descondensación de la cromatina espermática en presencia de GSH y heparina. Puede verse que la mayoría presenta una descondensación máxima a los 30 minutos, mientras que algunos ese máximo lo tienen a los 60 minutos.

### Extracción de protaminas y cuantificación.

Con el objetivo de poder correlacionar la presencia y relación de protaminas presentes en la cromatina de espermatozoides obtenidos de donantes o pacientes que concurren a consultar por problemas de fecundidad, se aislaron las protaminas a partir de muestras de semen y se analizaron por electroforesis en géles ácidos con urea. Dada la carga positiva neta de estas proteínas, la corrida electroforética se realiza en ácido acético con urea y las mismas migran hacia el polo negativo (Figs. 17, 18).



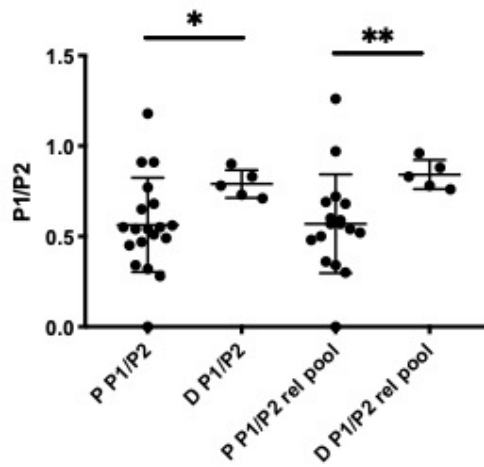
**Figura 17:** *Posición de las protaminas.* En un gel ácido de poliacrilamida se muestran diluciones sucesivas de un extracto obtenido a partir de donantes (Panel superior). El panel inferior muestra la calibración en función de la cantidad de espermatozoides sembrados, para fijar la cantidad adecuada a partir de la cual extraer las protaminas.



**Figura 18:** *Relación de densidad óptica obtenida a partir de los geles ácidos.* De aquí se determina que una cantidad entre 1 – 2 millones de espermatozoides es la indicada para obtener la relación esperada 1:1 para muestras humanas.

## Relación de protaminas en muestras de pacientes.

Cuando se realizó la descondensación, extracción de protaminas y su análisis electroforético, a partir de muestras de pacientes que recurren a clínicas de reproducción asistida, pudo observarse una relación P1/P2 alterada, aunque no se detectó una cantidad total significativamente diferente de la de los donantes (Fig. 19).

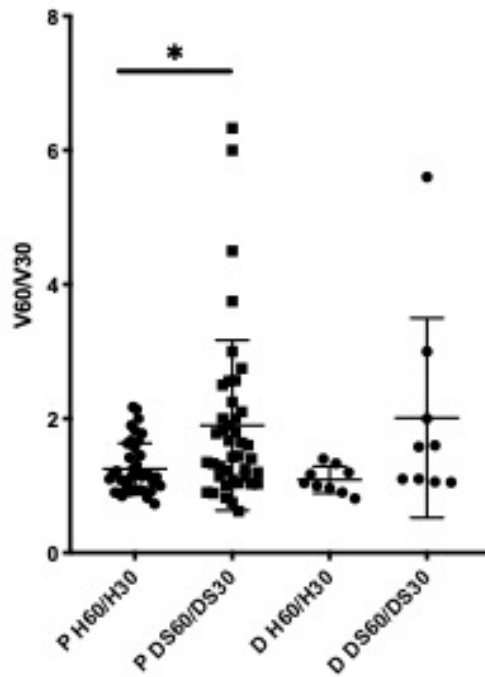


**Figura 19:** Relación entre las protaminas P1 y P2 para muestras de pacientes y donantes normozoospermicos. La diferencia entre ambos grupos es significativa (\*  $p= 0.0282$  y \*\* $p= 0.0082$  para la relación relativa a un pool de protaminas constituido por proteínas extraídas de 8 donantes).

Comparación en las velocidades de descondensación en presencia de heparina o dermatán sulfato, para muestras de pacientes y donantes.

Una vez determinado que en las muestras proveniente de los pacientes se encontró una relación P1/P2 disminuida con respecto a los controles, se analizó la relación de velocidades de descondensación tal como se indicara previamente, utilizando tanto heparina como dermatán sulfato como agentes descondensantes, además de GSH. Pudo observarse que la relación de descondensación entre 60 y 30 minutos, fue significativamente diferente para los pacientes, cuando se comparó el efecto de heparina y dermatán sulfato (Fig. 20). Para los donantes, esa relación no fue significativamente diferente al comparar ambos glicosaminoglicanos. Esta observación permitiría suponer que en los pacientes, con una relación menor de protaminas P1/P2, la utilización de uno u otro glicosaminoglicano en la descondensación podría servir como una herramienta que permitiese demostrar una condensación diferencial de la cromatina.





**Figura 20:** *Velocidad de descondensación.* Determinada como la relación de descondensación a 30 y 60 minutos, en presencia de heparina o dermatán sulfato, tanto en muestras obtenidas de pacientes o donantes normozoospermicos. \*  $p = 0.0168$

### Perspectivas futuras

Dada la importancia de una buena relación entre el contenido de protaminas para una actividad fecundante eficiente, desde el punto de vista del espermatozoide, parece razonable estudiar un poco más en detalle el impacto de esta relación en el proceso de descondensación cromatínico, como también en otros aspectos que tienen un peso relevante en el resultado de una fecundación, como por ejemplo motilidad, hipermotilidad, exocitosis acrosomal. No menos importante resulta profundizar en el posible papel del heparán sulfato presente en la superficie del espermatozoide, en los diversos puntos de encuentro de este con: epitelio endometrial, epitelio oviductal, células de la granulosa, oolema.

Asimismo, y por razones de espacio, no se mencionó la importancia de la epigenética en cromatina espermática en todo este proceso. Situaciones ambientales (agroquímicos y otros productos), como también hábitos alimentarios (dieta con exceso de azúcares o grasas) o situaciones de abuso de sustancias tales como alcoholismo, pueden incidir en la cromatina espermática modificando la metilación/acetilación de histonas remanentes, de protaminas, metilación de bases en el DNA, con una posible translación a la salud embrionaria. Todo esto está en estudio en nuestro laboratorio [26, 27].

### Referencias:

1. Chan RC, Severson AF, Meyer BJ (2004) Condensin restructures chromosomes in preparation for meiotic divisions. *The Journal of Cell Biology* 167: 613–625.
2. Griswold MD (2016) Spermatogenesis: The Commitment to Meiosis *Physiological Reviews* 96: 1–17
3. Brewer L, Corzett M, Balhorn RJ (2002) Condensation of DNA by spermatid basic nuclear proteins. *Biological Chemistry* 277:38895-38900
4. Champroux A, Cocquet J, Henry-Berger J, Drevet JR, Kocer A (2018) A Decade of Exploring the Mammalian Sperm Epigenome: Paternal Epigenetic and Transgenerational Inheritance *Frontiers in Cell and Developmental Biology* 6: 1-50
5. Balhorn R (2007) The protamine family of sperm nuclear proteins *Genome Biology* 8: 227
6. Balhorn R (1989) Mammalian protamines: structure and molecular interactions. In: Adolph KW, editor. *Molecular Biology of Chromosome Function* pp. 366–395 New York: Springer-Verlag
7. Lee CH, Cho YH (1999) Aspects of mammalian spermatogenesis: electrophoretic analysis of protamines in mammalian species *Molecular Cell* 9: 556–559
8. Calvin HI, Bedford JM (1971) Formation of disulphide bonds in the nucleus and accessory structures of mammalian spermatozoa during maturation in the epididymis *Journal of Reproduction and Fertility* 13 (Supp): 65–75.
9. D'Occhio MJ, Hengstberger KJ, Johnston SD (2007) Biology of sperm chromatin structure and relationship to male fertility and embryonic survival *Animal Reproduction Science* 101: 1– 17

10. **Corzett M, Mazrimas J, Balhorn R** (2002) Protamine 1: Protamine 2 stoichiometry in the sperm of eutherian mammals *Molecular Reproduction and Development* 61: 519–527
11. **Zhao W, McCallum SA, Xiao Z, Zhang F, Linhardt RJ** (2012) Binding affinities of vascular endothelial growth factor (VEGF) for heparin-derived oligosaccharides *Biosciences Report* 32: 71–81
12. **Tarantini F, LaVallee T, Jackson A, Gamble S, MoutaCarreira C, Garfinkel S, Burgess WH, Maciag T** (1998) The Extravesicular Domain of Synaptotagmin-1 Is Released with the Latent Fibroblast Growth Factor-1 Homodimer in Response to Heat Shock. *Journal of Biological Chemistry* 273: 22209–22216
13. **Perreault SD, Wolff RA, Zirkin BR** (1984) The role of disulfide bond reduction during mammalian sperm nuclear decondensation in vivo *Developmental Biology* 101: 160–167
14. **Zirkin BR, Soucek DA, Chang TJK, Perreault SD** (1985) In vitro and in vivo studies of mammalian sperm nuclear decondensation *Gamete Research* 11: 349–365
15. **Onikubo T, Nicklay JJ, Xing L, Warren C, Anson B, Wang WL, Burgos ES, Ruff SE, Shabanowitz J, Cheng RH, Hunt DF, Shechter D** (2015). Developmentally Regulated Post-translational Modification of Nucleoplasmin Controls Histone Sequestration and Deposition *Cell Reports* 10: 1735–1748
16. **Burns KH, Viveiros MM, Ren Y, Wang P, DeMayo FJ, Frail DE, Eppig JJ, Matzuk MM** (2003) Roles of NPM2 in chromatin and nucleolar organization in oocytes and embryos *Science* 300: 633–636
17. **Delgado NM, Reyes R, Huacuja L, Merchant H, Rosado A** (1982) Heparin binding sites in the human spermatozoa membrane. *Archives of Andrology* 8: 87–95
18. **Carrell DT, Liu L** (2002) Heparin binding sites are present at a higher concentration on sperm of subfertile men than donors of known fertility. *Archives of Andrology* 48: 147–154
19. **Romanato M, Cameo MS, Bertolesi G, Baldini C, Calvo JC, Calvo L** (2003) Heparan sulphate: a putative decondensing agent for human spermatozoa in vivo. *Human Reproduction* 18: 1868–1873
20. **Sanchez MC, Sedo CA, Julianelli VL, Romanato M, Calvo L, Calvo JC, Fontana VA** (2013) Dermatan sulfate synergizes with heparin in murine sperm chromatin decondensation. *Systems Biology in Reproductive Medicine* 59: 82–90
21. **Perreault SD, Naish SJ, Zirkin BR** (1987) The timing of hamster sperm nuclear decondensation and male pronucleus formation is related to sperm nuclear disulfide bond content. *Biology of Reproduction* 36: 239–244
22. **Romanato M, Regueira E, Cameo MS, Baldini C, Calvo L, Calvo JC** (2005) Further evidence on the role of heparan sulfate as protamine acceptor during the decondensation of human spermatozoa. *Human Reproduction* 20: 2784–2789
23. **Julianelli V, Farrando B, Alvarez Sedó C, Calvo L, Romanato M, Calvo JC** (2012) Heparin enhances protamine disulfide bond reduction during in vitro decondensation of human spermatozoa *Human Reproduction* 27: 1930–1938
24. **Romanato M, Julianelli V, Zappi M, Calvo L, Calvo JC** (2008) The presence of heparan sulfate in the mammalian oocyte provides a clue to human sperm nuclear decondensation in vivo. *Human Reproduction* 23: 1145–1150
25. **Sánchez MC, Alvarez Sedó C, Chaufan GR, Romanato M, Da Cuña R, Lo Nostro F, Calvo JC, Fontana V** (2017) In vitro effects of endosulfan-based insecticides on mammalian sperm *Toxicology Research (Camb)* 7:117–126
26. **Sánchez MC, Fontana VA, Galotto C, Cambiasso MY, Sobarzo CMA, Calvo L, Calvo JC, Cebal E** (2018) Murine sperm capacitation, oocyte penetration and decondensation following moderate alcohol intake. *Reproduction* 155:529–541



ISSN 1666-7948

[www.quimicaviva.qb.fcen.uba.ar](http://www.quimicaviva.qb.fcen.uba.ar)

*Revista Química Viva*

Número 3, año 17, Diciembre 2018

[quimicaviva@qb.fcen.uba.ar](mailto:quimicaviva@qb.fcen.uba.ar)

# Diversidad microbiana: en el límite de lo imaginable

Mariana Lozada y Hebe Dionisi

*Laboratorio de Microbiología Ambiental, CESIMAR-CONICET, Puerto Madryn, Chubut, Argentina*

[lozada@cenpat-conicet.gob.ar](mailto:lozada@cenpat-conicet.gob.ar) | [hdionisi@cenpat-conicet.gob.ar](mailto:hdionisi@cenpat-conicet.gob.ar)



## Resumen

Los últimos avances en el estudio de los microorganismos ambientales han echado luz sobre su enorme diversidad, la cual aún no se ha abarcado en su totalidad. Las técnicas basadas en el estudio de biomoléculas tales como el DNA han demostrado la existencia de ramas del árbol de la vida completamente desconocidas y muy divergentes de los conocimientos hasta el momento. El análisis de grandes volúmenes de datos a partir de iniciativas internacionales de exploración de la diversidad microbiana, y su correlación con patrones ambientales, están logrando responder preguntas fundamentales sobre los procesos ecológicos y evolutivos que han moldeado estas comunidades en el ambiente. En este contexto, desde Argentina se han analizado sedimentos costeros de ambientes subantárticos, alcanzando un nivel de resolución inédito, y contribuyendo a paliar el desvío existente en contra del Hemisferio Sur. Además, se están realizando avances en el aprovechamiento del potencial biotecnológico de microorganismos ambientales no cultivados.

**Palabras clave:** comunidades microbianas, diversidad, ómicas

## Summary

Recent advances in the study of environmental microorganisms have uncovered the enormous diversity and complexity of microbial communities, much of which has not yet been fully covered. Molecular techniques, based on the study of biomolecules such as DNA have demonstrated the existence of branches of the tree of life that are completely unknown and divergent from what is known so far. The analysis of large volumes of data within major international diversity surveys, and their correlation with environmental patterns are shedding light on the ecological and evolutionary processes that have shaped these communities in the environment. In Argentina, we have analyzed Sub-Antarctic coastal sediments with an unprecedented level of resolution, helping to alleviate the bias existing against the Southern Hemisphere. In addition, advances are being made in harnessing the biotechnological potential of non-cultivated environmental microorganisms.

**Keywords:** microbial communities, diversity, omics

## Introducción

Los avances metodológicos de las últimas décadas en el estudio de los microorganismos ambientales han permitido demostrar que el planeta Tierra es en realidad un “planeta microbiano” [1]. Los microorganismos son su forma de vida más abundante, tanto en número como en distribución, y representan engranajes fundamentales para la integridad y funcionamiento de la biósfera. Los microorganismos, especialmente los procariotas, son responsables de una gran parte de las transformaciones que sufren el carbono y los nutrientes en el ambiente natural, mediante su exquisita maquinaria celular adaptada a llevar a cabo virtualmente cualquier reacción química posible [2,3]. Componentes esenciales de los ciclos biogeoquímicos, sus actividades afectan a todos los niveles tróficos. También juegan un rol primordial en la salud humana, así como en la de otros organismos esenciales para el ser humano, como las plantas terrestres [4,5]. A pesar de su extrema importancia, nuestra comprensión del mundo microbiano natural y de los principios y mecanismos que lo gobiernan es aún limitada. En el ambiente, los microorganismos se ensamblan en comunidades microbianas que presentan alta diversidad, y exhiben complejas interacciones. Estas *comunidades microbianas* son además altamente variables, tanto en el tiempo como en el espacio, por lo que se necesita un gran número de muestras para lograr la descripción exhaustiva de dichas comunidades. La mayor dificultad para estudiar a los microorganismos ambientales radica en la imposibilidad o dificultad para cultivar la mayoría de ellos, lo que atenta contra una comprensión global de estos sistemas [6]. La ecología microbiana está comenzando a echar luz sobre dicha complejidad, brindando repuestas sobre las leyes que gobiernan la distribución y las funciones de los microorganismos en los ecosistemas que conforman la biósfera. Dicha información es fundamental para tener una visión más integrada de los mismos, así como para la resolución de acuciantes problemas de nuestro siglo relacionados con energía, salud y cambio climático, entre otros. Esta disciplina ha tomado gran impulso en los últimos años, recibiendo aportes de la química, la ecología teórica, la biología molecular y las ómicas, la bioinformática y las ciencias ambientales.

### **Catálogos de diversidad microbiana a escala planetaria: ¿solo coleccionando estampillas?**

Desde el trabajo pionero de Carl Woese [7,8], el análisis de biomoléculas de los microorganismos (la más utilizada es el DNA) amplió enormemente nuestro conocimiento sobre la biodiversidad, y aún hoy sigue modificando nuestra concepción del árbol de la vida. Los estudios se basan mayormente en la extracción de DNA directamente a partir la muestra ambiental, obteniéndose una mezcla de fragmentos de los genomas de los distintos microorganismos que componen la comunidad microbiana en estudio. Este DNA puede ser analizado por medio de la amplificación de fragmentos de genes marcadores filogenéticos (el más conocido es el que codifica para la subunidad pequeña del RNA ribosomal, (*SSU rRNA* por sus siglas en inglés), utilizando las regiones altamente conservadas para el diseño de los cebadores, tratando de cubrir la mayor diversidad posible de microorganismos. Los fragmentos amplificados son luego secuenciados utilizando tecnologías de secuenciación en gran escala, que permiten obtener decenas de miles de secuencias por muestra, correspondientes al gen seleccionado. Esta estrategia simplifica el análisis de comunidades complejas, si bien solo permite estimar la estructura y diversidad de la comunidad microbiana en estudio (contestando la pregunta ¿quién está allí?), sin aportar información sobre su potencial metabólico. Alternativamente, se pueden secuenciar al azar “todos” los genes de la comunidad (si bien no es posible por el momento alcanzar altas coberturas de análisis de comunidades complejas), lo cual sí permite estudiar los procesos metabólicos representados en los genomas de los microorganismos ambientales (contestando la pregunta, ¿qué pueden hacer?). La estrategia, denominada metagenómica, ha permitido además ensamblar los genomas de los microorganismos ambientales, sin un paso de cultivo. Como consecuencia, además de la genómica de células individuales (*single-cell genomics*), se ha expandido el catálogo de grupos taxonómicos (*taxa*) en órdenes de magnitud, lo que ha llevado al descubrimiento de nuevos grupos microbianos que opacaron rápidamente el conocimiento adquirido hasta el momento [9–11].

Debido a las diferencias fundamentales de los microorganismos con respecto a los macroorganismos, incluyendo tipos diferentes de reproducción y un rol importante de la transferencia horizontal de genes, los microorganismos han presentado limitaciones teóricas y prácticas para su estudio. En algunos casos,

estas han dado origen a un largo debate en la comunidad científica, especialmente en lo que se refiere al concepto de especie microbiana, así como a los mecanismos que llevan a la especiación [12–14]. Las especies microbianas han sido definidas de una forma pragmática, incluyendo líneas de evidencias genotípicas, tal como poseer menos del 97% de identidad en el gen *SSU rRNA*, o menos de 94% de identidad promedio en sus genes compartidos (ANI, *average nucleotide identity of shared genes*), y/o fenotípicas (como un rasgo diagnóstico clave) [15]. Más recientemente, el análisis de un número creciente de genomas de microorganismos filogenéticamente divergentes y de organismos no cultivados (genomas ensamblados a partir de metagenomas o secuenciación de células individuales), ha mostrado cada vez más evidencias de que existirían discontinuidades génicas significativas en las poblaciones microbianas naturales, por lo que los microorganismos podrían ser alcanzados por una definición biológica de especie basada en aislamiento genético [16–18].

Difícilmente se pueda negar la importancia de los ambientes marinos en estos estudios. La mitad de la producción primaria global ocurre en los océanos, y se estima que los microorganismos marinos procesan alrededor de la mitad del flujo global de elementos de importancia clave para la vida tales como carbono, nitrógeno, fósforo, azufre y hierro [6,19]. El mar posee una enorme variedad de nichos para los microorganismos, tales como aguas a diferentes profundidades, temperaturas y salinidades, sedimentos de composiciones diferentes, ambientes costeros y oceánicos, y hospedadores evolutivamente divergentes tales como algas, corales, esponjas y peces. Todo esto significa una fuente inagotable de biodiversidad microbiana y lo convierten un atractivo blanco, pero también en una enorme desafío para su estudio [20,21]. Una serie de ambiciosas iniciativas, entre las que se encuentran las campañas globales marinas (ej. Tara Ocean Expedition, <https://www.embl.de/tara-oceans/start/index.html>, el Sorcerer II Global Ocean Sampling (GOS) expedition (<https://www.jcvi.org/gos>), el Ocean Sampling Day <http://www.assembleplus.eu/research/ocean-sampling-day-2018>) y otras grandes iniciativas internacionales de biodiversidad microbiana tales como el International Census of Marine Microbes (<http://icomm.mbl.edu/>), han permitido incrementar nuestro conocimiento de las comunidades microbianas marinas en una escala geográfica global. Los proyectos han brindado el impulso necesario para analizar una enorme cantidad de muestras y datos obtenidos de forma estandarizada, y poner a prueba hipótesis ecológicas y biogeográficas a escala planetaria. Algunas de ellas se focalizaron en los posibles mecanismos de distribución global de microorganismos [22–24], o en demostrar la existencia de reservorios genéticos en lo que constituiría la “biósfera rara” [25]. También se ha expandido significativamente el catálogo de genes y funciones mediante la colección de datos metagenómicos, permitiendo identificar los factores ambientales más importantes para la estructuración de las comunidades planctónicas [26].

Con respecto a las comunidades microbianas que nos habitan, el Proyecto Microbioma Humano (*Human Microbiome Project*, HMP, <https://hmpdacc.org/hmp/>), abarcó el análisis de la biodiversidad filogenética (mediante la secuenciación de genes *SSU rRNA*) y en una segunda etapa, funcional (secuenciación de los metagenomas) en diferentes regiones del cuerpo humano y bajo diferentes condiciones. La realización de este tipo de estudios ha permitido un avance en la comprensión de los factores que afectan la distribución y abundancia de diferentes microorganismos en nuestro cuerpo, y cómo el microbioma puede afectar la fisiología, el sistema inmune, la predisposición a enfermedades, etc., proveyendo una efectiva unión entre la microbiología médica y ambiental [27].

## **El Microbioma de la Tierra**

En nuestra meta de comprender el planeta microbiano, el proyecto Microbioma de la Tierra (*Earth Microbiome Project*, EMP, [www.earthmicrobiome.org](http://www.earthmicrobiome.org)) fue un hito fundamental. La iniciativa fue lanzada en 2010 con el objetivo de caracterizar las comunidades microbianas de los diferentes ambientes de nuestro planeta, por medio de la participación de cientos de científicos de todo el mundo para construir la mayor base de datos de biodiversidad microbiana conocida hasta el momento [28]. El proyecto significó la coordinación de diversos proyectos de investigación, cada uno con sus propias preguntas, y la información generada permitió también realizar un meta-análisis global. El diseño básico involucró la

colección coordinada de muestras y la estandarización de adquisición metadatos (ubicación geográfica, datos físico-químicos y ambientales, etc.), extracción de DNA, amplificación por PCR del gen *SSU rRNA*, y secuenciación en gran escala de dichos productos de amplificación (<http://www.earthmicrobiome.org/emp-standard-protocols/>). Este enfoque permitió reducir la variabilidad técnica en los datos, y junto con el alto número de muestras analizadas, facilitó la detección de patrones biológicos emergentes. La generación de una plataforma de acceso abierto a los datos y resultados (QIITA, <https://qiita.ucsd.edu/emp/>) aseguró a su vez el retorno de los esfuerzos de la comunidad científica de una forma coordinada. A su vez, se lograron desarrollar herramientas analíticas de alto impacto, tales como nuevos y más eficientes formatos de almacenamiento de datos, y una actualización en la forma de analizar la información a partir de los análisis moleculares.

El análisis de un primer conjunto de datos [29] incluyó 27.751 muestras de 97 estudios independientes, abarcando 7 continentes, 43 países y 17 “ambientes microbianos”. Los ambientes fueron clasificados dentro de un nuevo sistema ontológico (Earth Microbiome Project Ontology, EMPO, <http://www.earthmicrobiome.org/protocols-and-standards/emp/>), el cual los categoriza en 3 niveles jerárquicos. En un primer nivel, por ejemplo, se diferencian los ambientes de vida libre de aquellos que se asocian a un hospedador. En un segundo nivel, se consideran ambientes salinos y no salinos para microorganismos de vida libre, y en su asociación a animales, plantas u hongos en el segundo caso. Un tercer nivel involucra el hábitat específico para cada uno de ellos, como por ejemplo sedimento o la rizósfera de una planta. La estructura fue diseñada para capturar los dos ejes que se sabe que más influyen sobre la (beta) diversidad microbiana: salinidad y coevolución con un hospedador. La utilización de amplicones del gen *SSU rRNA* permitió el análisis en forma rápida y coordinada de miles de muestras y un nivel de cobertura importante dado por la secuenciación Illumina HiSeq (~80.000 secuencias por muestra). Se amplificó la región hipervariable V4, utilizando primers universales [30] los cuales fueron optimizados sucesivamente en función de la información emergente en las bases de datos.

El análisis de datos de genes *SSU rRNA* utilizó históricamente un enfoque de agrupamiento de secuencias en “unidades taxonómicas operativas” (*operational taxonomic units*, OTUs), en base a un nivel umbral más o menos arbitrario de identidad genética, el cual parece estar asociado con la distancia genética que existiría entre especies microbianas [31][32]. En el caso del *Earth Microbiome Project* (EMP) para el gran volumen de datos obtenido se aplicó un método diferente a los OTUs, llamado Deblur, el cual lleva a cabo la remoción directa de errores de secuenciación. Este método tiene mayor especificidad (por ejemplo, puede distinguir microorganismos que difieren en un nucleótido en este gen), y tiene la ventaja de ser trazable/reproducibile y comparable entre estudios (ya que se basa en secuencias únicas y no en grupos de secuencias). Otra ventaja de este método es que reduce significativamente la demanda computacional para su análisis, lo cual lo hace muy prometedor para los conjuntos de datos cada vez más abultados de la secuenciación en gran escala [33].

El aporte del mencionado estudio a la descripción de la diversidad global de microorganismos se hace evidente con la siguiente información: en este set de datos que incluyó menos de 100 proyectos se recapturó casi la mitad de las secuencias presentes en las bases de datos actuales (Greengenes y SILVA). Sin embargo, estas secuencias ya previamente identificadas representaban solo el 10% del set de datos generado en el EMP, indicando una enorme fuente de biodiversidad nueva descubierta en este proyecto. Además, se avanzó en el conocimiento de cómo los factores ambientales estructurarían a las comunidades microbianas y su composición. Como consecuencia se lograron avances en nuestra capacidad de predicción; mediante análisis automatizados (*supervised machine learning*) se pudo distinguir a las muestras como asociadas a animales, plantas, de vida libre salinas o no salinas con 91% de exactitud, solo basándose en datos de la comunidad microbiana. Dichos logros tienen importantes aplicaciones, por ejemplo en el campo forense. Por otro lado, preguntas fundamentales, tales como si existe un efecto de la latitud sobre la diversidad microbiana o qué rangos de temperatura y pH seleccionan una mayor riqueza de organismos, pudieron ser respondidas con un set de datos amplio y transversal a una variedad de ambientes.

## Mirando al Sur: comunidades microbianas de ambientes costeros patagónicos

A pesar de la gran cantidad de información de secuencias ambientales depositada en bases de datos públicas, existe un importante desvío a favor de los ambientes del Hemisferio Norte. Esto impacta directamente tanto en la construcción del conocimiento global sobre el microbioma de nuestro planeta, como sobre las preguntas específicas que nos atañen a los países del Hemisferio Sur. Por ejemplo, de acuerdo a una base de datos que mantiene un registro de la información generada (*Genomes on Line Database*, GOLD, <https://gold.jgi.doe.gov>, consultada en noviembre de 2018), de un total de 23.160 muestras ambientales (*Biosamples*, definidas como el sitio original de donde fue tomada la muestra), correspondientes a 853 estudios metagenómicos públicos, solo 3.512 (aproximadamente el 15%) eran del Hemisferio Sur. De éstos, solo 1.555 pertenecían a sitios de latitudes mayores a los 42°S. Teniendo en cuenta la importancia que las comunidades de los ambientes fríos representan en la biósfera [34], generar información sobre las comunidades microbianas de áreas más remotas del sur es una tarea urgente, para poder conocer sus aportes a estos ambientes vulnerables, así como al ecosistema global total.

En este contexto, en el Laboratorio de Microbiología Ambiental (CESIMAR, CONICET) desde hace una década utilizamos herramientas moleculares, como la secuenciación en gran escala de genes *SSU rRNA* y las estrategias metagenómicas, para caracterizar la estructura y potencial metabólico de las comunidades microbianas de sedimentos costeros de la Patagonia. Los ambientes costeros son de extrema importancia para el ser humano, ya que proveen servicios eco- sistémicos tales como la formación de hábitats, el ciclado de agua y nutrientes, la provisión de stocks de especies comestibles, la detoxificación de contaminantes, la regulación del clima, etc., que a su vez se traducen en beneficios directos para el ser humano. La mayoría de estos estudios se centraron en Bahía Ushuaia, un ambiente sub-antártico impactado por las actividades humanas, mayormente debidas a los efluentes no tratados de la ciudad de Ushuaia, y a la contaminación crónica por hidrocarburos [35–39].

Los ecosistemas costeros de altas latitudes se consideran especialmente vulnerables, ya que las poblaciones humanas continúan desplazándose hacia a los polos, generando un impacto cada vez mayor en las costas de regiones frías del globo. Si bien existen varios estudios llevados a cabo en agua de mar, las comunidades microbianas de sedimentos de altas latitudes impactados por actividades humanas se encontraban poco caracterizadas. Para suplir esta falta de información, se conformó un consorcio de investigadores de Argentina, Estados Unidos, Suecia y Noruega, a fin de caracterizar dichas comunidades en ambientes similares de ambos hemisferios. El proyecto fue financiado por un programa del Joint Genome Institute del Departamento de Energía de los Estados Unidos (*Community Science Program*, JGI, DOE), el cual resultó en la generación de 0.2 Terabases ( $10^{12}$  bases) de información genética de los metagenomas de estos sedimentos. Además, en el marco del Proyecto Microbioma de la Tierra descrito en la sección anterior, se obtuvieron más de 100.000 secuencias del gen *SSU rRNA* por muestra, resultando en coberturas de más del 95% de la biodiversidad microbiana de estos ambientes, lo cual representa una cantidad de información nunca obtenida hasta el momento sobre las comunidades microbianas de ambientes patagónicos.

El estudio mostró la impresionante diversidad microbiana presente en los sedimentos costeros fríos, en particular en Bahía Ushuaia. En los sitios se detectaron alrededor de 5.000 OTUs por muestra, y se estimaron índices de diversidad (Shannon) de 9, lo cual los ubica entre las comunidades más diversas del mundo, incluso dentro de las microbianas (ver [29]). También se pudieron inferir los factores ambientales que más contribuyen en la estructuración de dichas comunidades microbianas: la temperatura, la salinidad y en menor escala la contaminación orgánica [40]. Los análisis también mostraron que, a pesar de sus importantes diferencias a nivel de la estructura de la comunidad (menos del 19 % de las familias de microorganismos eran compartidos entre las muestras), las funciones de los sedimentos estudiados eran remarcablemente constantes, y eran más similares a otros ambientes diversos y estructurados tales como suelos, que a las columnas de agua [40]. Interesantemente, el análisis de los metagenomas permitió descubrir que las comunidades microbianas de Bahía Ushuaia,

impactada por contaminación orgánica y descarga de nutrientes [41], son un importante reservorio de potencial genético para la denitrificación, incluyendo más de 200 variantes diferentes del gen *nosZ*, el único conocido en la naturaleza que cataliza la reducción del gas invernadero N<sub>2</sub>O al inerte N<sub>2</sub> [42].

En resumen, el análisis de datos metagenómicos obtenidos por primera vez de ambientes fríos de nuestro país nos permitieron analizar el potencial de las comunidades microbianas de sedimentos costeros para proveer servicios ecosistémicos claves, así como contribuir a un mayor conocimiento de la biodiversidad microbiana global.

### **Potencial biotecnológico de los microorganismos ambientales**

Los microorganismos exhiben una vasta biodiversidad y versatilidad metabólica, por lo que las comunidades microbianas de los variados hábitats naturales y artificiales son a menudo el punto de partida para la búsqueda de nuevos compuestos químicos, genes, proteínas, microorganismos u otros productos de interés biotecnológico, actividad denominada bioprospección microbiana [43]. A pesar de los grandes avances metodológicos de las últimas décadas para el estudio de dichas comunidades, se estima que aún resta por descubrir más del 90% de la diversidad microbiana que existe en nuestro planeta [44], por lo que el potencial biotecnológico de los microorganismos ambientales se encuentra aún mayormente inexplorado. Esto ocurre en particular en hábitats de difícil acceso, como por ejemplo en sedimentos a grandes profundidades o en los ambientes menos habitados del planeta, como los polos.

La metagenómica ha facilitado enormemente el acceso al potencial biotecnológico de los microorganismos. Existen dos estrategias posibles para capturar el potencial de las comunidades microbianas o enriquecimientos generados a partir de ellas [20]. El DNA purificado a partir de las comunidades puede ser secuenciado al azar utilizando tecnologías de secuenciación en gran escala, las lecturas resultantes ensambladas, y la información genética resultante anotada y utilizada para identificar secuencias de interés por comparaciones con bases de datos existentes. Este método de bioprospección es muy poderoso, dado que permite analizar una gran cantidad de información de forma rápida, incluso datos generados con otro fin, depositados en bases de datos públicas [45]. Sin embargo, en general esta estrategia no permite identificar familias novedosas de proteínas, dado que depende de información previamente conocida. Un segundo tipo de estrategia, denominada metagenómica funcional, permite la identificación de actividades enzimáticas o metabolitos sin necesidad de contar con información previa y puede resultar en la detección de biomoléculas más novedosas. La estrategia involucra el clonado del DNA ambiental en vectores adecuados, como plásmidos, fósidos o cromosomas artificiales, construyéndose de esta manera una biblioteca metagenómica en el hospedador seleccionado. Luego, las actividades de interés son detectadas en los clones de la biblioteca, ya sea en ensayos en placas de Petri o por medio del análisis de extractos celulares, con una mayor sensibilidad. La metagenómica funcional es más laboriosa que la secuenciación al azar, y requiere del uso de equipamiento de alto costo para la automatización de la búsqueda de las actividades de interés, dado que se analizan decenas o cientos de miles de clones. Sin embargo, es una estrategia que continúa avanzando gracias al desarrollo de nuevos sistemas de expresión de vectores y la utilización de otros hospedadores, además de *Escherichia coli* [46].

Los microorganismos que habitan ambientes extremos [47] y los microbiomas de macroorganismos como esponjas [48] o termitas [49] resultan de particular interés para la prospección de biomoléculas, debido a las adaptaciones específicas que han desarrollado para sobrevivir en estos hábitats. Por ejemplo, las enzimas de microorganismos adaptados a vivir a bajas temperaturas, como aquellos que habitan los sedimentos a altas profundidades o ambientes polares, pueden ser la base para el desarrollo de productos y procesos biotecnológicos sostenibles, capaces de operar a bajas temperaturas y con menor demanda de energía [50]. Microorganismos adaptados a las altas temperaturas, como aquellos que habitan las fuentes hidrotermales, contienen enzimas que resultan de utilidad en procesos industriales que requieren del uso de enzimas con una alta estabilidad térmica [47]. Otro ejemplo son las



enzimas de microorganismos marinos, que son de particular interés para su uso en procesos industriales donde se requiere la presencia de solventes, dado que existe una relación entre la tolerancia a la salinidad y los solventes orgánicos [51].

Además de la bioprospección de enzimas con aplicaciones en múltiples industrias, otras posibles contribuciones de la biodiversidad microbiana a la biotecnología incluyen la obtención de ácidos grasos, antioxidantes, pigmentos, biopolímeros y biomateriales de utilidad para la industria, el desarrollo de medicamentos, de tratamientos médicos, de polímeros de uso biomédico, de métodos de diagnóstico y de productos de cuidado personal con aplicación en salud humana, el desarrollo de protocolos de biorremediación, de biosensores, y de antiincrustantes no tóxicos y biosurfactantes con aplicación en biotecnología ambiental, y el desarrollo nutraceuticos, alimentos funcionales y productos que favorezcan la salud animal, como así también el desarrollo de biocombustibles, entre otros [43,44,52]. Las potenciales aplicaciones biotecnológicas derivadas de la biodiversidad microbiana son múltiples, pudiendo influir positivamente en casi todos los aspectos de la vida y la sociedad e impulsar el desarrollo de la bioeconomía, o economía basada en el conocimiento y aplicación de procesos y productos biológicos [53].

## Referencias:

1. **National Research Council** (2007) *The New Science of Metagenomics: Revealing the Secrets of Our Microbial Planet*. Washington DC:National Academies Press.
2. **Strous, M, Fuerst JA, Kramer EH, Logemann S, Muyzer G, van de Pas-Schoonen KT et al.** (1999) Missing lithotroph identified as new planctomycete. *Nature* 400: 446–449. DOI: 10.1038/22749
3. **Falkowski PG, Fenchel T, DeLong TF** (2008) The Microbial engines that drive earth's biogeochemical cycles. *Science* 320: 1034–1039. DOI: 10.1126/science.1153213
4. **Sonnenburg ED, Sonnenburg JL** (2014) Starving our microbial self: the deleterious consequences of a diet deficient in microbiota-accessible carbohydrates. *Cell Metabolism* 20: 779–786. DOI: 10.1016/j.cmet.2014.07.003
5. **van der Heijden MGA, Hartmann M** (2016) Networking in the plant microbiome. *PLOS Biology* 14: e1002378. DOI: 10.1371/journal.pbio.1002378
6. **Fuhrman JA, Cram D, Needham M** (2015) Marine microbial community dynamics and their ecological interpretation. *Nature Reviews Microbiology* 13: 133–147. DOI: 10.1038/nrmicro3417
7. **Woese CR, Fox GE** (1977) Phylogenetic structure of the prokaryotic domain: the primary kingdoms. *Proceedings of the National Academy of Science USA* 74: 5088–5090. DOI: 10.1073/pnas.74.11.5088
8. **Woese CR, Kandler O, Wheelis ML** (1990) Towards a natural system of organisms: proposal for the domains Archaea, Bacteria, and Eucarya. *Proceedings of the National Academy of Science USA* 87: 4576–4579. DOI: 10.1073/pnas.87.12.4576
9. **Pace NR** (2009) Mapping the tree of life: progress and prospects. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 73: 565–576. DOI: 10.1128/MMBR.00033-09
10. **Hug LA, Baker BJ, Anantharaman K, Brown CT, Probst AJ, Castelle CJ et al.** (2016) A new view of the tree of life. *Nature Microbiology* 1: 16048. DOI: 10.1038/nrmicrobiol.2016.48
11. **Parks DH, Rinke C, Chuvochina M, Chaumeil PA, Woodcroft BJ, Evans PN et al.** (2017) Recovery of nearly 8,000 metagenome-assembled genomes substantially expands the tree of life. *Nature Microbiology* 2: 1533. DOI: 10.1038/s41564-017-0012-7
12. **Gevers D, Cohan FM, Lawrence JG, Spratt BG, Coenye T, Feil EJ et al.** (2005) Opinion: Re-evaluating prokaryotic species. *Nature Reviews Microbiology* 3: 733–739. DOI: 10.1038/nrmicro1236
13. **Achtman M, Wagner M** (2008) Microbial diversity and the genetic nature of microbial species. *Nature Reviews Microbiology* 6: 431–440. DOI: 10.1038/nrmicro1872
14. **Doolittle WF, Papke RT** (2006) Genomics and the bacterial species problem. *Genome Biology* 7: 116. DOI: 10.1186/gb-2006-7-9-116
15. **Richter M, Rosselló-Móra R** (2009) Shifting the genomic gold standard for the prokaryotic species definition. *Proceedings of the National Academy of Science USA* 106: 19126–19131. DOI: 10.1073/pnas.0906412106
16. **Caro-Quintero A, Konstantinidis KT** (2012) Bacterial species may exist, metagenomics reveal. *Environmental Microbiology* 14: 347–355. DOI: 10.1111/j.1462-2920.2011.02668.x
17. **Bobay LM, Ochman H** (2017) Biological species are universal across life's domains. *Genome Biology and Evolution* 9: 491–501. DOI: 10.1093/gbe/evx026
18. **Jain C, Rodriguez-R LM, Phillippy AM, Konstantinidis KT, Aluru S** (2017) High-throughput ANI Analysis of 90K Prokaryotic genomes reveals clear species boundaries. *BioRxiv* 225342. DOI: 10.1101/225342
19. **Azam F, Malfatti F** (2007) Microbial structuring of marine ecosystems. *Nature Reviews Microbiology* 5: 782–791. DOI: 10.1038/nrmicro1747
20. **Lozada M, Dionisi H M** (2015) Microbial Bioprospecting in Marine Environments. In: Springer Handbook of Marine Biotechnology, pp. 307–326 *Basel: Springer*
21. **Salazar G, Sunagawa S** (2017) Marine microbial diversity. *Current Biology* 27: R489–R494. DOI: 10.1016/j.cub.2017.01.017

22. Sul WS, Oliver TA, Ducklow HD, Amaral-Zettler LA, Sogin ML (2013) Marine bacteria exhibit a bipolar distribution. *Proceedings of the National Academy of Science USA* 110: 2342–2347. DOI: 10.1073/pnas.1212424110
23. Ghiglione JF, Galand PE, Pommier T, Pedrós-Alió C, Maas EW, Bakker K, et al. (2012) Pole-to-pole biogeography of surface and deep marine bacterial communities. *Proceedings of the National Academy of Science USA* 201208160. DOI: 10.1073/pnas.1217767110
24. Amend AS, Oliver TA, Amaral-Zettler LA, Boetius A, Fuhrman JA, Horner-Devine MC et al. (2013) Macroecological patterns of marine bacteria on a global scale. *Journal of Biogeography*. 40: 800–811. DOI: 10.1111/jbi.12034
25. Gibbons SM, Caporaso JG, Pirrung M, Field D, Knight R, Gilbert JA (2013) Evidence for a persistent microbial seed bank throughout the global ocean. *Proceedings of the National Academy of Science USA* 201217767. DOI: 10.1073/pnas.1217767110
26. Bork P, Bowler C, Vargas C de, Gorsky G, Karsenti E, Wincker P (2015) Tara Oceans studies plankton at planetary scale. *Science* 348: 873–873. DOI: 10.1126/science.aac5605
27. Lloyd-Price J, Mahurkar A, Rahnavaard G, Crabtree J, Orvis J, Hall AB, et al. (2017) Strains, functions and dynamics in the expanded Human Microbiome Project. *Nature* 550: 61–66. DOI: 10.1038/nature23889
28. Gilbert JA, Jansson JK, Knight R (2014) The Earth Microbiome project: successes and aspirations. *BMC Biology* 12: 69. DOI: 10.1186/s12915-014-0069-1
29. Thompson LR, Sanders JG, McDonald D, Amir A, Ladau J, Locey KJ et al. (2017) A communal catalogue reveals Earth's multiscale microbial diversity. *Nature* 551: 457–463. DOI: 10.1038/nature24621
30. Caporaso JG, Lauber CL, Walters WA, Berg-Lyons D, Lozupone CA, Turnbaugh PJ et al. (2011) Global patterns of 16S rRNA diversity at a depth of millions of sequences per sample. *Proceedings of the National Academy of Science USA* 108: 4516. DOI: 10.1073/pnas.1000080107
31. Rodriguez-R LM, Castro JC, Kyrpidis NC, Cole JR, Tiedje JM, Konstantinidis KT (2018) How much Do rRNA gene surveys underestimate extant bacterial diversity? *Applied and Environmental Microbiology* AEM.00014-18 DOI: 10.1128/AEM.00014-18
32. Rideout JR, He Y, Navas-Molina JA, Walters WA, Ursell LK, Gibbons SM et al. (2014) Subsampled open-reference clustering creates consistent, comprehensive OTU definitions and scales to billions of sequences. *PeerJ* 2: e545. DOI: 10.7717/peerj.545
33. Callahan BJ, McMurdie PJ, Holmes SP (2017) Exact sequence variants should replace operational taxonomic units in marker-gene data analysis. *ISME Journal*. 11: 2639–2643.
34. D. F. Rodrigues, J. M. Tiedje (2008) Coping with our cold planet. *Applied and Environmental Microbiology* 74: 1677–1686. DOI: 10.1128/AEM.02000-07
35. Guibert LM, Loviso CL, Borglin S, Jansson JK, Dionisi HM, Lozada M (2016) Diverse bacterial groups contribute to the alkane degradation potential of chronically polluted subantarctic coastal sediments. *Microbial Ecology* 71: 100–112. DOI: 10.1007/s00248-015-0698-0
36. Lozada M, Mercadal JPR, Guerrero LD, Di Marzio WD, Ferrero MA, Dionisi HM (2008) Novel aromatic ring-hydroxylating dioxygenase genes from coastal marine sediments of Patagonia. *BMC Microbiology* 8: 50. DOI: 10.1186/1471-2180-8-50
37. Dionisi HM, Lozada M, Marcos MS, Di Marzio, WD, Loviso CL (2011) Aromatic hydrocarbon degradation genes from chronically polluted Subantarctic marine sediments. In: *Handbook of Molecular Microbial Ecology II - Metagenomics in Different Habitats*, pp. 461–473. *Indianapolis: Wiley*
38. Guibert LM, Loviso CL, Marcos MS, Commendatore MG, Dionisi HM, Lozada M (2012) Alkane biodegradation genes from chronically polluted subantarctic coastal sediments and their shifts in response to oil exposure. *Microbial Ecology* 64: 605–616. DOI: 10.1007/s00248-012-0051-9
39. Marcos MS, Lozada M, Di Marzio WD, Dionisi HM (2012) Abundance, dynamics, and biogeographic distribution of seven polycyclic aromatic hydrocarbon dioxygenase gene variants in coastal sediments of Patagonia. *Applied and Environmental Microbiology* 78: 1589–1592. DOI: 10.1128/AEM.06929-11
40. Espínola F, Dionisi HM, Borglin S, Brislawn CJ, Jansson JK, Mac Cormack WP et al. (2018) Metagenomic analysis of subtidal sediments from polar and subpolar coastal environments highlights the relevance of anaerobic hydrocarbon degradation processes. *Microbial Ecology* 75: 123–139. DOI: 10.1007/s00248-017-1028-5
41. Gil MN, Torres AI, Amin O, Esteves JL (2011) Assessment of recent sediment influence in an urban polluted subantarctic coastal ecosystem. Beagle Channel (Southern Argentina). *Marine Pollution Bulletin* 62: 201–207. DOI: 10.1016/j.marpolbul.2010.10.004
42. Calderoli P, Espínola F, Dionisi H, Gil MN, Jansson J, Lozada M (2018) Predominance and high diversity of genes associated to denitrification in metagenomes of subantarctic coastal sediments exposed to urban pollution. *PLOS ONE in press*. DOI: 10.1371/journal.pone.0207606
43. Dionisi HM, Lozada M, Olivera NL (2012) Bioprospection of marine microorganisms: biotechnological applications and methods. *Revista Argentina de Microbiología* 44: 49–60.
44. Sanchez-Andrea I, Jetten M (2018) Editorial overview: Microbial environmental biotechnology. *Current Opinion in Biotechnology* 50: vii–ix. DOI: 10.1016/j.copbio.2018.03.004
45. Musumeci MA, Lozada M, Rial DV, Mac Cormack WP, Jansson JK, Sjöling S et al. (2017) Prospecting biotechnologically-relevant monooxygenases from cold sediment metagenomes: an in silico approach. *Marine Drugs* 15: 114. DOI: 10.3390/md15040114
46. Charles TC, Liles MR, Sessitsch A (2017) *Functional Metagenomics: Tools and Applications*. Basel: Springer.
47. Dumorne K, Córdova DC, Astorga-Eló M, Renganathan P (2017) Extremozymes: a potential source for industrial applications. *Journal of Microbiology and Biotechnology* 27: 649–659. DOI: 10.1016/j.jmb.1611.1100
48. Bramhachari PV, Mutyala S, Bhatnagar I, Pallela R (2016) Novel Insights on the Symbiotic Interactions of Marine Sponge-Associated Microorganisms: Marine Microbial Biotechnology Perspective. In: *Marine Sponges: Chemicobiological and Biomedical Applications*, pp. 69–95 Basel: Springer

49. **Rashamuse K, Sanyika Tendai W, Mathiba K, Ngcobo T, Mtimka S, Brady D** (2017) Metagenomic mining of glycoside hydrolases from the hindgut bacterial symbionts of a termite (*Trinervitermes trinervoides*) and the characterization of a multimodular  $\beta$ -1, 4-xylanase (GH11). *Biotechnology and Applied Biochemistry* 64: 174–186. DOI: 10.1002/bab.1480
50. **Barroca M, Santos G, Gerday C, Collins T** (2017). Biotechnological aspects of cold-active enzymes. In *Psychrophiles: From Biodiversity to Biotechnology*, pp. 461–475 *Basel: Springer*.
51. **Trincone A**. Biocatalytic processes using marine biocatalysts: ten cases in point. *Current Organic Chemistry* 17: 1058–1066. DOI: 10.1007/978-3-319-57057-0\_19
52. **Perfumo A, Banat IM, Marchant R** (2018) Going green and cold: biosurfactants from low-temperature environments to biotechnology applications. *Trends Biotechnology* 36: 277-289. DOI: 10.1016/j.tibtech.2017.10.016
53. **Timmis K, De Lorenzo V, Verstraete W, Ramos JL, Danchin A, Brüssow H et al.** (2017) The contribution of microbial biotechnology to economic growth and employment creation. *Microbial Biotechnology* 10: 1137–1144. DOI: 10.1111/1751-7915.12845



ISSN 1666-7948

[www.quimicaviva.qb.fcen.uba.ar](http://www.quimicaviva.qb.fcen.uba.ar)

**Revista QuímicaViva**

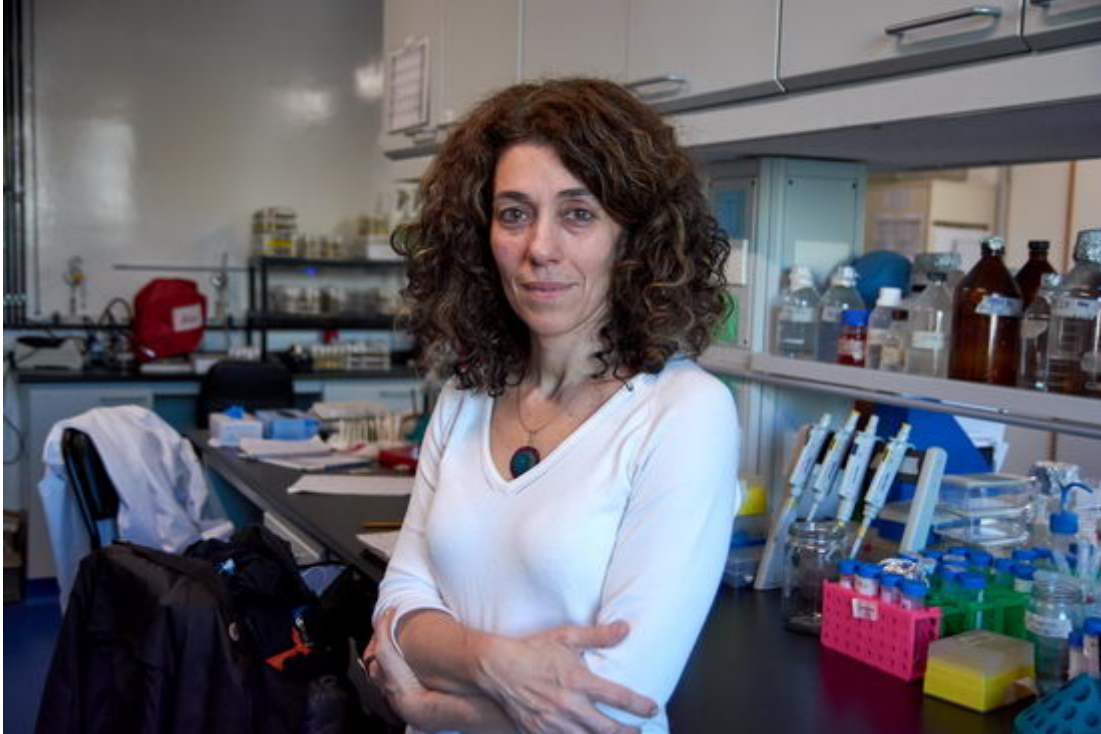
Número 3, año 17, Diciembre 2018

[quimicaviva@qb.fcen.uba.ar](mailto:quimicaviva@qb.fcen.uba.ar)

## Entrevista

### Dra. Maria Fernanda Ceriani

Texto: Erina Petrera Fotos: Esteban Grasso



María Fernanda Ceriani es bióloga recibida en Exacta, investigadora principal del CONICET y dirige el laboratorio de Genética del comportamiento en la Fundación Instituto Leloir.

#### **QV ¿Cómo llegaste a estudiar Biología?**

MFC Me entusiasmé por la biología en el secundario, particularmente cuando me obligaron a estudiar lo que era una célula. No podía creer ese nivel de complejidad, me maravilló y al año siguiente cuando aprendí las leyes de Mendel y algunos rudimentos de lo que era la inmunología también, francamente me parecía maravilloso.

#### **QV ¿Siempre pensaste en seguir la carrera académica?**

MFC Cuando yo empecé a estudiar biología no había tantas opciones como ahora. Básicamente podías trabajar haciendo investigación o haciendo docencia pero olvidate de las múltiples opciones que hay hoy que van desde el mundo empresarial o la divulgación o el periodismo científico. Hubo épocas donde la gente terminaba el seminario de licenciatura y se iba a hacer el doctorado afuera, después otras épocas en las que nadie se iba a hacer ni siquiera un posdoc afuera

#### **QV Vos te fuiste.**

MFC Sí, comencé a hacer el doctorado en el Instituto de Biotecnología en el INTA Castelar con Esteban Hopp y luego empecé a salir con alguien que estaba haciendo su doctorado fuera de la Argentina, justo en la ciudad donde estaba el laboratorio que estaba haciendo lo mismo que yo en la Argentina. Así que fue sencillo y lo que eran unos meses terminó siendo un par de años. Cuando volví escribí la tesis, la defendí y me volví a hacer un posdoc.

#### **QV ¿Y luego volviste a la Argentina?**

MFC Sí, después de 5 años, nos volvimos en abril del 2002, una época bastante complicada. Justo se abrieron los concursos en Leloir, y ambos ganamos el concurso separadamente. Además me había presentado a un subsidio muy competitivo y me lo dieron, entonces había tanto compromiso establecido que no podíamos pensar en no hacerlo. Los primeros meses fueron difíciles sobre todo por el desconsuelo de la gente por la calle, pero a pesar del entorno jamás me arrepentí.

#### **QV Contanos cuál es tu tema de investigación**

MFC Desde hace 20 años trato de entender los mecanismos del reloj biológico, particularmente el reloj circadiano, y trabajo explícitamente en *Drosophila melanogaster* que se usa como un modelo para entender cómo funciona el reloj biológico en animales en general. Está ultra conservado y *Drosophila* es “el modelo” para tratar de encontrar los genes asociados. Tal es así, que el año pasado le dieron el premio Nobel a tres investigadores americanos que hicieron su carrera en *Drosophila*, y en el escrito que hacen los Nobeles citan dos de mis papers o sea que no puedo ser más feliz.

#### **QV ¿Qué técnicas utilizan?**

MFC Estudiamos cómo las neuronas reloj del cerebro de *Drosophila* coordinan su actividad, porque son 150 neuronas para controlar los patrones de acción y reposo, sueño y vigilia de la mosca. Para eso hacemos cambios genéticos y después vemos cómo impactan en su comportamiento. A su vez estudiamos como impactan en el circuito en sí. La gente de mi laboratorio diseña el cerebro de esas pequeñas moscas y hace inmunohistoquímica. Ocasionalmente alguien tiene que diseñar una construcción para después hacer una mosca transgénica pero lo que más se hace en el laboratorio son experimentos de inmunohistoquímica y comportamiento. También trabajamos buscando genes que en animales jóvenes no tengan efecto pero que la misma desregulación en animales más viejos afecte el comportamiento, que sean un factor común con enfermedades neurodegenerativas como el Parkinson y el Alzheimer.



Zona de “crianza” y experimentación de las moscas

### **QV ¿Algunos de esos genes están relacionados con el reloj biológico?**

MFC De los genes que encontramos algunos afectan al reloj, son vías de señalización que terminan afectando los niveles de los genes del reloj y causan estos efectos dependientes del envejecimiento o aumentan con el envejecimiento. Esto está publicado, otras cosas todavía no. Hay un proyecto en el que hace 10 años que trabajamos y recién ahora vamos a mandar el primer paper. Espero que lo publiquemos muy bien para justificar los 10 años de trabajo.

### **QV ¿Cómo inciden en el comportamiento de las moscas?**

MFC En general les apagamos la luz para que pierdan todas las claves ambientales, lo que se pone de manifiesto es el proceso endógeno. Entonces ese animal sabe todos los días a qué hora despertarse y a qué hora irse a dormir a pesar de que no haya luz. Además cuando le activas este sistema genéticamente todos los días se va a dormir un poco más tarde y por lo tanto se despierta un poco más tarde, hay un cambio de periodo muy grosero de la desregulación de una vía de señalización que la encontramos como mutante en el screen.

### **QV Ese tipo de resultado ¿se puede extrapolar a lo que se llama los búhos y las alondras?**

MFC En realidad los búhos y las alondras son las dos colas de una distribución normal, esto está mucho más allá porque los búhos y las alondras en teoría tienen un periodo parecido, lo que pasa es que tienen propiedades de su comportamiento que los hace estar un poquito corrido, que quizás tienen un ligero periodo corto pero no son tan distintos. Esto es mucho peor en cuanto a diferencias.

### **QV ¿Uds. pueden ver cuáles son las neuronas que se prenden?**

MFC Marcando las membranas terminales de esas neuronas con GFP, se pueden estudiar los cambios que se dan lugar allí, las imágenes obtenidas a la mañana y a la noche son muy distintas. Ese proceso lo descubrimos nosotros, se sabía que había cambios en neuropéptidos y vimos que había cambios en la remodelación de las terminales. Todavía estamos estudiando porque es un proceso que ocurre en los adultos y se pensaba que los cerebros adultos eran bastante invariables.



Microfotografías de fluorescencia de las terminales nerviosas

**QV Teniendo en cuenta que estuviste 10 años para poder escribir uno de los papers, ¿qué opinas de la importancia que se le da al factor de impacto de las revistas en cuanto a la evaluación del**

## **científico?**

MFC Es una pregunta importante y fuerte, estoy en una de las comisiones de CONICET y discutimos eso todo el tiempo. Obviamente que todas las métricas tienen errores porque imponen un sesgo y no se puede decidir si un científico es bueno o es malo en virtud de números. Pero pienso que hay que hacer el esfuerzo de publicar en revistas de mayor impacto porque el impacto está dado por la cantidad de gente que accede a esa información. Esto no habla necesariamente de que todos los papers publicados en revistas de mayor impacto sean mejores, pero en general son historias más completas que cuando las lees decís acá hubo un delta entre lo que se sabía y lo que se sabe ahora.

## **QV Querés que la gente conozca tu trabajo, ¿qué opinas de la divulgación científica?**

MFC Me parece fundamental. Necesitamos a la gente que está entrenada para comunicar porque los científicos estamos acostumbrados a hablar en otra jerga.

## **QV A veces lo que les preocupa a los científicos con respecto a la divulgación es que el divulgador trabaja la información para que la gente lo pueda entender y el científico dice: no, no es así.**

MFC Claro, a mí me parece que hay muchas cosas que se pueden divulgar sin cruzar barreras éticas y hay otras cosas que habría que pensar dos veces como uno las dice. El punto crucial es justamente lo que más le interesa a la gente que es: ¿cómo curo tal enfermedad? Y en ese punto empezás a jugar con los sentimientos de las personas. Me ha pasado que después de una entrevista radial recibo llamados telefónicos de gente que me empieza a contar disfunciones de sueño, de hijos con tumor cerebral, o con problemas de sueño y yo soy bióloga, no es ni siquiera ético que hable de lo que tiene que hacer. Entonces, creo que hay que comunicar todo lo que se pueda comunicar y usar el lenguaje adecuado para que se interprete adecuadamente y también los científicos tenemos que tolerar la imprecisión que hay en ese proceso porque es parte de la generalización que es lo que más nos molesta. Tenemos que aprender a comunicar de la manera más interesante y cuidadosa porque el producto tiene que despertar interés sin mentir y ese punto es difícil.

## **QV En el año 2011 recibiste el premio L'Oréal Unesco a las mujeres en la ciencia, ¿cómo te sentiste al recibir ese reconocimiento?**

MFC La verdad me sorprendió mucho, me hizo sentir muy bien y me estresó bastante porque tuve un año muy particular ya que L'Oréal hizo mucha prensa y salí en todas las revistas. Me sirvió enormemente, la gente de la escuela de mis hijos me reconocía, todos sabían quién era. Fue un espaldarazo al laboratorio, aprendí a hablar en las entrevistas radiales, fue increíble, muy divertido y gracias a esos fondos compramos parte de los muebles de este laboratorio. Pero es a corto plazo, se termina y tenés que seguir logrando que te den subsidios, que te los financien, que acepten los papers y que la gente quiera trabajar con vos.

## **QV Para terminar, ¿crees que es complicado hacer ciencia siendo mujer?**

MFC Creo que para la mujer ser profesional es un desafío. Por suerte los padres están más involucrados y comparten la responsabilidad de ir a las reuniones del colegio, etc. Definitivamente recae un peso mayor en las mujeres y eso es justo entre los 30 y los 40, cuando se espera que te estabilices profesionalmente y dispares. Hay un problema coyuntural que no es responsabilidad de nadie. Ni hablar de todos los cambios fisiológicos que ocurren en las mujeres que acompañan al embarazo y posparto y todo lo que implica los primeros años de vida de ese bebé que claramente afecta el funcionamiento del cerebro.

## **QV ¿Te referís a las diferencias en el ritmo circadiano?**

MFC No dormir no le hace bien a nadie, tampoco le hace bien al hombre por supuesto pero por lo general es la mujer la que da de mamar y es la que tiene esa responsabilidad como adicional. Además los cambios fisiológicos son muchos, así es nuestra especie y tenemos que tolerarla. Creo que para evitar que eso implique una trayectoria profesional con desventajas, habría que empezar a pensar qué se puede hacer para ayudar a esas mujeres o parejas que deciden tener hijos. Pero además están las otras cuestiones que son muy complejas. El mundo científico es un mundo muy de hombres, no necesariamente en la Argentina pero en el mundo es así. Le presto mucha atención a las cuestiones de género y cuando armo simposios en el congreso internacional de ritmos me cuesta más encontrar mujeres, siempre son las mismas las que están ahí y de hecho a mí me invitan porque soy latinoamericana, soy minority en muchos espacios. Hay trabajos publicados que muestran que los mismos CVs evaluados por hombres y por mujeres cuando se perciben de hombres se evalúan mejor y los hombres terminan en mayores posiciones de jerarquía, con mejores salarios. Hay un problema que es cultural y hay un problema que es específico de la disciplina que en el momento en que vos deberías estar casi obsesivamente pensando en tus proyectos es el momento en que tenés que preocuparte por reproducirte. Hay un conflicto que se subsana con políticas activas, con cuidados especiales.

#### **QV Veremos cómo sigue la lucha feminista...**

MFC Sí, ha habido algunos foros donde se discute esto y yo siempre pienso tengo que participar, tengo que ir, pero no podés todo, hay una cantidad de cosas que podés hacer en un día de 24 horas y en una semana de 7 días.



ISSN 1666-7948

[www.quimicaviva.qb.fcen.uba.ar](http://www.quimicaviva.qb.fcen.uba.ar)

*Revista **QuímicaViva***

*Número 3, año 17, Diciembre 2018*

[quimicaviva@qb.fcen.uba.ar](mailto:quimicaviva@qb.fcen.uba.ar)



# La importancia cualitativa de los números en la enseñanza de la Biología. Aprendizaje sustentable del potencial de acción

Nazira Píriz Giménez<sup>1,2</sup>, Jerónimo Tucci<sup>1,3</sup> y María Noel López<sup>2,4,5</sup>

<sup>1</sup> Instituto de Profesores "Artigas", Consejo de Formación en Educación; <sup>2</sup> Profesorado Semipresencial, Consejo de Formación en Educación; <sup>3</sup> Liceo N°25, Consejo de Educación Secundaria; <sup>4</sup> Centro Regional de Profesores del Centro, Consejo de Formación en Educación; <sup>5</sup> Escuela Integral de Montevideo. Montevideo. Uruguay

[nazirapiriz@gmail.com](mailto:nazirapiriz@gmail.com)

Recibido: 9/10/2018 - Aceptado: 19/10/2018

## Resumen

La enseñanza de la membrana celular, como vínculo entre los medios intracelular y extracelular, y en particular los mecanismos de transporte de solutos, constituye un contenido esencial dentro del estudio de la Biología celular. Una de las dificultades que desde la enseñanza de la Biofísica hemos tenido históricamente ha sido la función de la bomba de sodio y potasio. Especialmente, la adjudicación a dicho transportador, de la responsabilidad de la fase de repolarización en el potencial de acción. En un segundo lugar y de menor gravedad, suele no relacionarse a dicho transportador con el mantenimiento del volumen en células animales. El primero de dichos obstáculos constituye un problema relevante que hemos analizado, encontrando que el mismo se origina en la creencia de que durante el potencial de acción, las concentraciones de sodio y potasio se modifican sustancialmente en las células. Para atender esta problemática hemos elegido estrategias diferentes en cursos de grado y de formación continua, en tanto que aún persiste en textos o páginas web. La estrategia didáctica utilizada radica en generar conceptos de sostén correctos para lograr un aprendizaje sustentable. En este trabajo describimos nuestra propuesta y explicamos su fundamentación.

**Palabras clave:** bomba de sodio y potasio; potencial de acción; enseñanza de la Biología; concepto sostén; aprendizaje sustentable.

## Summary

The teaching of the cell membrane, as a link between the intracellular and extracellular media, and in particular the mechanisms of solute transport, constitutes an essential content in the study of cellular biology. One of the difficulties that the teaching of biophysics has had historically has been the function of the sodium and potassium pump. On one hand, it is a mistake to consider that this transporter is responsible for the repolarization phase in the action potential. In a second place, other problem is not to relate this transporter with the maintenance of volume in animal cells. The first obstacle would originate the belief that the concentrations of sodium and potassium are substantially modified in the cells during the action potential. To address these problems we have chosen different didactic strategies to be implemented in courses, although they still persist in texts or web pages. The used didactic strategy has considered construct proper support concepts to achieve sustainable learning. In this paper we describe our proposal and explain its rationale.

**Keywords:** sodium/potassium pump; action potential; Biology teaching; support concept; Sustainable Learning

## Introducción

Las membranas biológicas delimitan y vinculan compartimentos con diferente composición manteniendo así el "orden" característico de los seres vivos. Dicha vinculación incluye el pasaje de solutos a través de las membranas celulares y de organelos, procesos que son de gran relevancia para el mantenimiento de funciones vitales.

El pasaje de solutos a través de las membranas biológicas se da o bien a través de la bicapa lipídica (en el caso de solutos liposolubles), o bien a través de proteínas transportadoras de diverso tipo (en el caso de solutos hidrosolubles, tales como iones inorgánicos pequeños).

Los iones inorgánicos de mayor relevancia biológica son:  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ ,  $\text{Ca}^{++}$  y  $\text{Cl}^-$ . Dentro de las proteínas transportadoras que hacen posible su pasaje a través de membranas, se encuentran: a.- los canales iónicos (permiten únicamente el transporte pasivo de iones, es decir que utilizan la energía provista por el gradiente electroquímico del ión<sup>1</sup>) y lo realizan con alta especificidad (de manera que no permiten el pasaje de cualquier ión, sino únicamente aquél del que toman su nombre); b.- las bombas (permiten el transporte activo de iones y por ende en contra de gradiente electroquímico; en las que casi siempre la energía es provista por la hidrólisis del ATP); c.- los transportes acoplados (hacen posible el transporte activo de un soluto por una proteína que permite el pasaje pasivo simultáneo de un segundo soluto, sin consumo directo de ATP). Dichos mecanismos difieren también considerablemente en la rapidez con la que hacen posible el pasaje de iones a su través (Fig. 1).

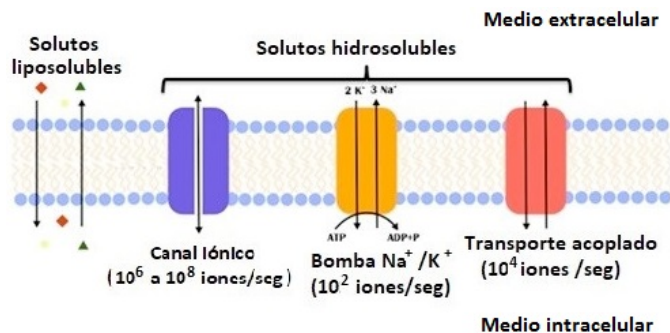


Figura 1: Representaciones gráficas sobre mecanismos de transporte de solutos a través de membranas biológicas.

Con respecto a las bombas, una de las más conocidas y presente en las células animales, es la "bomba de sodio y potasio", que saca 3 iones sodio al medio extracelular e ingresa 2 iones potasio al medio intracelular, por cada molécula de ATP que hidroliza (Fig. 1). Hay acuerdo en el ámbito científico en que la relevancia fisiológica de este mecanismo de transporte radica en el mantenimiento del equilibrio osmótico y el volumen en células animales [1,2]. Es decir, que permite en condiciones fisiológicas el mantenimiento constante del volumen celular. Sin embargo, la bomba de sodio y potasio tiene muy escasa participación en el potencial de membrana de reposo (menos del 10% de su valor), y ninguna participación en respuestas eléctricas de las membranas celulares<sup>2</sup>.

Por otra parte, los canales iónicos adoptan en condiciones fisiológicas, diversas configuraciones denominadas "estados". A modo de ejemplo, los canales de sodio pueden estar abiertos, inactivos o cerrados, en tanto que los de potasio pueden estar únicamente abiertos o cerrados, tal como se representa gráficamente en la

figura 2. Cabe considerar que el único estado que permite el pasaje de iones a su través es el estado "abierto", no así los estados "cerrado" o "inactivo". Una diferencia relevante entre estos dos últimos, radica en que mientras el canal cerrado puede abrirse, el canal inactivo debe cerrarse en primer lugar para luego estar en condiciones de abrirse.

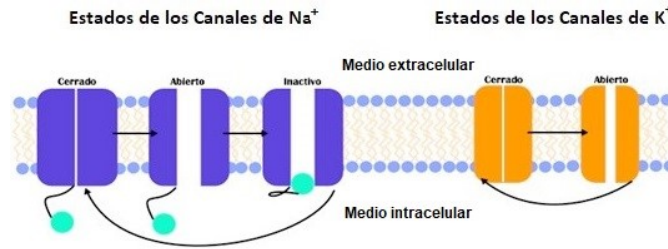


Figura 2: Representación gráfica de los estados de los canales de sodio y potasio. Con flechas se indica la secuencia de sus cambios.

### Respuestas eléctricas de la membrana celular: el caso del potencial de acción neuronal

El transporte de iones a través de las membranas celulares constituye un pasaje de cargas eléctricas por unidad de tiempo, por lo que puede medirse como una "corriente eléctrica". Dicha corriente modifica el valor del potencial de membrana ( $V_m$ ), definido como la diferencia entre los voltajes intracelular ( $V_i$ ) y extracelular ( $V_e$ ):  $V_m = V_i - V_e$ . Todas las células vivas tienen un valor de  $V_m$  que cuando permanece estable se denomina "potencial de membrana de reposo". Este queda determinado por la diferente distribución de iones a ambos lados de la membrana celular y especialmente por la alta permeabilidad al potasio, siendo esta última responsable de la cercanía entre el valor de  $V_m$  y el valor del potencial de equilibrio electroquímico de dicho ión. Cuando el valor de  $V_m$  "sale del reposo", se produce una "respuesta eléctrica" de la membrana celular. Una de ellas es el potencial de acción, denominado así porque se propaga en forma "activa", lo que significa que se autorregenera. Es decir, la zona de la membrana celular en la que tiene lugar un potencial de acción, modifica las zonas vecinas despolarizándolas y determinando que en ellas se alcance un umbral tal que dispare también un potencial de acción, y así, sucesivamente. El potencial de acción más conocido en la enseñanza de la Biología, es el que se produce en neuronas y al que suele denominársele "impulso nervioso".

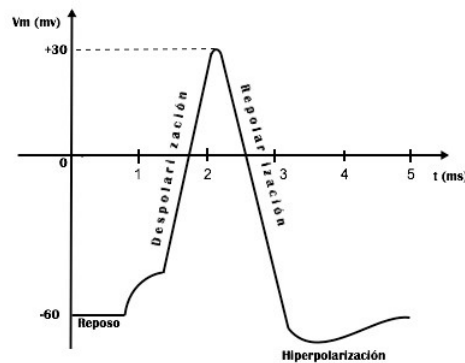


Figura 3: Potencial de acción neuronal "típico" y sus fases.

Durante dicha respuesta, el valor de  $V_m$  cambia desde un valor negativo "de reposo" (-60 mV en la Fig. 3), hacia valores más positivos durante la fase de despolarización, alcanzando un pico en los 30mV aproximadamente, y luego volviendo hacia el valor de reposo (fase de repolarización). En algunas neuronas la fase de repolarización es seguida de una reducción a valores de  $V_m$  por debajo del valor de reposo que se denomina hiperpolarización. Este potencial de acción es generado por corrientes de  $\text{Na}^+$  y  $\text{K}^+$  a través de canales específicos. La corriente entrante de  $\text{Na}^+$  se activa en un  $V_m$  dado "umbral" y dispara la fase de despolarización. Dicho "disparo" es consecuencia de una retroalimentación positiva en la que la despolarización abre canales y el ingreso de  $\text{Na}^+$  produce mayor despolarización y apertura de canales. En menos de 0,5 mseg, la conductancia<sup>3</sup> (permeabilidad) al ión sodio pasa de un valor casi nulo (en el reposo), a 30 mmho/cm<sup>2</sup> en el pico del potencial de acción. También en el umbral pero con una cinética más lenta, se abren canales de  $\text{K}^+$  que permiten una corriente saliente de dicha especie iónica. La inactivación de los canales de  $\text{Na}^+$ , en conjunto con el aumento en la corriente de  $\text{K}^+$ , determinan el cese de la despolarización y el inicio de la repolarización. El mantenimiento de la corriente saliente de potasio origina la fase de hiperpolarización (el  $V_m$  se hace más negativo que el valor de reposo) en ciertas neuronas [1, 2, 3, 4, 5].

El potencial de membrana es un fenómeno local (se da en las inmediaciones de la membrana celular) y los flujos iónicos (sumamente rápidos) que lo determinan, no alteran las concentraciones iónicas intra y extracelulares<sup>5</sup>.

Enfatizamos aquí, por lo tanto, que los mecanismos moleculares que determinan el potencial de acción, no incluyen a la bomba de sodio y potasio.

### La bomba de sodio y potasio:

Antes de que se descubriera la bomba de sodio y potasio [6], ya se infería algún mecanismo activo responsable del mantenimiento de los gradientes electroquímicos de sodio y potasio en las células vivas. La bomba de sodio y potasio transporta en contra de gradiente electroquímico (y por ende en forma activa), 3 iones  $\text{Na}^+$  y 2 iones  $\text{K}^+$ , por cada molécula de ATP que hidroliza, manteniendo los gradientes electroquímicos de ambos iones. Sin dudas, el mantenimiento de los gradientes electroquímicos resulta esencial en la señalización celular eléctrica, ya que la existencia de dichos gradientes determina el pasaje pasivo de iones (que tiende a disminuir cada gradiente electroquímico) durante las respuestas eléctricas como el potencial de acción.

Es conocida la distribución "universal" de la bomba de sodio y potasio en la enorme mayoría de las células animales, incluso en aquellas que no son excitables (es decir que no disparan potenciales de acción). Cabe considerar también, que otras células, no animales también son excitables y sin embargo no cuentan en sus membranas con bombas de sodio y potasio (organismos unicelulares como *Paramecium*, células de plantas que responden con el movimiento de sus hojas como *Mimosa pudica*, entre otros). Puede inferirse entonces que este transportador no es el único responsable del mantenimiento de gradientes electroquímicos en las células vivas, que hacen posible la señalización eléctrica.

En las células animales la actividad de la bomba de sodio y potasio no sólo mantiene los gradientes de ambos iones, sino que dado que por cada molécula de ATP que hidroliza, saca 3 partículas e ingresa 2, contribuye a la disminución de la osmolaridad intracelular, y, por lo tanto, al mantenimiento del volumen celular [1,2].

La actividad de la bomba de sodio y potasio se mantiene inalterada en tanto disponga de ATP, pero es independiente del valor de  $V_m$  y por ende de que la membrana se encuentre o no en reposo.

## El mito de la bomba de sodio y potasio

En el imaginario de docentes y estudiantes de Ciencias, es frecuente detectar que la bomba de sodio y potasio es considerada como la responsable de la repolarización del potencial de acción. Este concepto a modo de ejemplo en la webgrafía). La bomba de sodio y potasio permite – erróneo coincide con información provista en diferentes fuentes, especialmente internet (se citan páginas como se mencionó previamente– que por cada molécula de ATP que hidroliza, salgan tres iones  $\text{Na}^+$  de la célula y entren dos  $\text{K}^+$  (Fig.1), dando en balance una corriente catiónica saliente que hace más negativo al potencial de membrana. A esto se debe el carácter electrogénico de la bomba de sodio y potasio. No obstante, dicho carácter contribuye escasamente al valor de  $V_m$  (menos del 10% del potencial de reposo) [1,2,4,5]. Quienes atribuyen la responsabilidad de la bomba de  $\text{Na}^+$  y  $\text{K}^+$  a la repolarización del potencial de acción, consideran erróneamente que éste sería el mecanismo compensatorio de la fase de despolarización en la que ocurre la entrada masiva de iones  $\text{Na}^+$ . Pero esta hipótesis es errónea [2,3] pues la bomba de sodio y potasio está distribuida en toda la membrana celular, y no es responsable de reestablecer las concentraciones iónicas que acompañarían la vuelta del  $V_m$  al valor de reposo, ya que tales cambios transitorios en las concentraciones intra y extracelulares son mínimos y microlocalizados [7].

El mito de la implicancia de la bomba de  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  durante el proceso de potencial de acción podría provenir de una cierta lógica de compensación de procesos, mediante la sentencia errónea que sostiene que “las concentraciones iónicas se modificarían drásticamente durante el potencial de acción, y la bomba de sodio y potasio resolvería dicho cambio durante la fase de repolarización”; y, también, encontraría refuerzos visuales en imágenes o representaciones gráficas erróneas, como las que se muestran en la Figura 4.

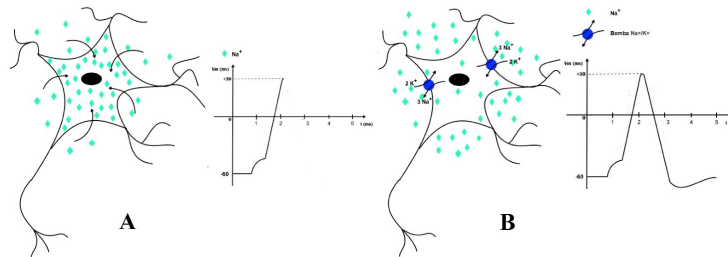


Figura 4: Representaciones gráficas erróneas asociadas al mito de la bomba de sodio y potasio

La Figura 4 remite claramente a los dos errores conceptuales que conducirían a un aprendizaje erróneo del potencial de acción. **A:** Concepto erróneo respecto a un incremento en la concentración de  $\text{Na}^+$  intracelular, que ocurriría durante la despolarización. **B:** Concepto erróneo respecto a cómo la bomba de  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  revertiría el incremento en la concentración de  $\text{Na}^+$  intracelular, durante la fase de repolarización. Ilustran estos conceptos erróneos las siguientes informaciones tomadas de internet:

(1) “Date cuenta de que el sodio está ahora dentro de la célula y el potasio fuera, esto es, están en los lugares equivocados. Por lo tanto, las bombas de sodio-potasio vuelven a trabajar y bombean el sodio fuera y el potasio dentro, y las cosas vuelven a donde empezaron.” (tomado de [http://webspace.ship.edu/cgboer/genesp/potencial\\_accion.html](http://webspace.ship.edu/cgboer/genesp/potencial_accion.html)).

(2) “(...) el potencial de reposo se alcanza al expulsar el sodio la bomba de  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ ” (tomado de <http://recursos.nice.mec.es/biosfera/alumno/1bachillerato/animal/contenidos16.htm>).

### Conceptos sostén para un aprendizaje apropiado

Analizando esta situación desde la perspectiva del Modelo de Aprendizaje Cognitivo Conciente Sustentable (MACCS) [8,9] es posible plantear que un aprendizaje erróneo tendría su origen en **conceptos inclusores equívocos** tales como:

- Que la actividad de la bomba de sodio y potasio revertiría la despolarización provocada por corrientes a través de canales iónicos, con una eficacia similar, en un intervalo de tiempo similar. Este concepto implicaría una rapidez semejante para el pasaje de iones a través de mecanismos de transporte, sin considerar que el flujo iónico a través de proteínas canal es entre  $10^4$  y  $10^6$  veces mayor que el flujo a través de bombas.
- Que la actividad de la bomba de sodio y potasio aumentaría durante la fase de repolarización, es decir que al final de la despolarización se incrementaría su función, lo que implicaría una actividad modulada por el potencial de membrana, no conocida hasta el momento.

Siguiendo las sugerencias del MACCS, nos propusimos abordar esta problemática mediante la realización de diversas actividades que contemplaran los conceptos sostén definidos como relevantes, y permitieran derribar el “mito de la bomba de sodio y potasio”, contribuyendo a un aprendizaje sustentable del potencial de acción. Esta propuesta fue desarrollada en un curso de formación continua para docentes, en el Instituto de Profesores “Artigas” de Montevideo [9] A continuación, relatamos las ideas centrales de la propuesta, así como los principales resultados y reflexiones.

En la propuesta desarrollada definimos un concepto sostén central y conceptos sostén complementarios.

El primero de ellos consiste en que la rapidez con que pasan los iones a través de las membranas celulares permite que un número escaso de iones sea suficiente para determinar un cambio en el potencial de membrana biológicamente sustantivo.

Dentro de los conceptos sostén complementarios identificamos:

- Durante un potencial de acción nervioso es muy escasa la cantidad de carga y por ende la cantidad de iones transportada a través de la membrana celular, y dadas las concentraciones iónicas habituales, éstas no son modificadas por dichos flujos;
- El pasaje de iones a través de canales es entre  $10^4$  y  $10^6$  veces más rápido que el pasaje de iones a través de bombas;
- Las duraciones de las fases de despolarización y repolarización del potencial de acción son muy similares, por lo que no es posible que si la primera queda determinada por el pasaje de iones a través de canales, la segunda quedara determinada por un mecanismo entre  $10^4$  y  $10^6$  veces más lento;
- Una hipotética actividad de la bomba de sodio y potasio durante la fase de repolarización que pudiera contrarrestar lo ocurrido durante la despolarización, implicaría que dicha bomba aumentara su actividad en la segunda fase del potencial de acción, y posiblemente que se activara por despolarización. En cambio, la bomba de sodio y potasio mantiene una actividad constante, e independiente del valor de  $V_m$ ;

### Cuando los números importan en la enseñanza de la Biología

Dentro de las actividades desarrolladas para el logro de los conceptos sostén relatados, las que mostraron mayor impacto en la población destinataria fueron las que permitieron comparar la rapidez de la actividad de la bomba de sodio y potasio, con la de los canales iónicos. Llevar esta comparación a ejemplos cotidianos permitió dimensionar con claridad dos conceptos:

- Que no es posible que durante un potencial de acción las concentraciones iónicas cambien sustancialmente;

2. Que aún en el caso de que esos cambios se dieran, es inviable que la bomba de sodio y potasio revierta los efectos en el valor de  $V_m$  determinados por el pasaje de iones a través de canales, en un intervalo de tiempo similar.

A modo ilustrativo, lo descrito es comparable a la diferencia de velocidad entre una sonda espacial y una persona que trota. Se estima que la sonda Juno alcanzó a pasar por Júpiter velocidades superiores a los 240.000 Km/h. Si consideramos que una persona puede trotar a 6 Km/h, la sonda supera en 40.000 veces la rapidez de la persona. Si a la sonda Juno le llevó 5 años viajar desde la Tierra a Júpiter, ¿cuánto le llevaría a una persona trotando? Dejando de lado aspectos como el tiempo de vida de las personas y la imposibilidad de recorrer esa distancia en el espacio, la comparación permite dimensionar las diferencias. Actividades formuladas en base a estas ideas y representadas en la Figura 5, causaron sorpresa en los destinatarios del curso descrito y permitieron comprender con claridad, los conceptos sostén elegidos.

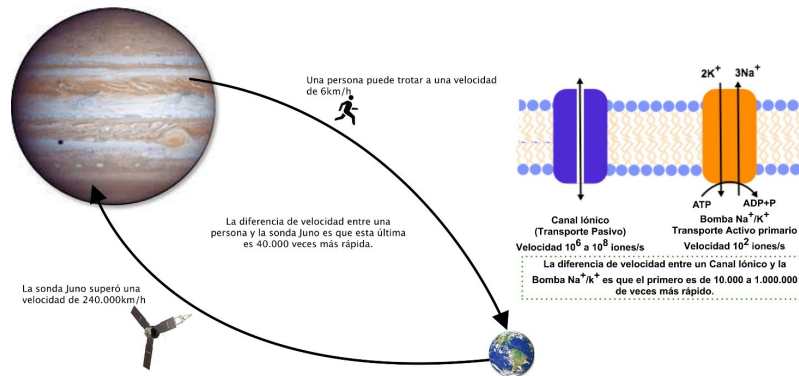


Figura 5: La diferencia de velocidad entre un canal iónico y la bomba  $Na^+/K^+$ , puede ser aún mayor que la diferencia de velocidad entre la sonda Juno y una persona que trota.

### A modo de síntesis

Este artículo plantea una vieja problemática en la enseñanza del potencial de acción, constituida por la conceptualización errónea de que la bomba de sodio y potasio participa en la generación de potenciales de acción. Consideramos que el problema de fondo está en la omisión de una valoración cualitativa de “números” a los que solemos no prestar atención cuando enseñamos: ¿Cuánto cambia el valor de  $V_m$  durante un potencial de acción?, ¿el pasaje de cuánta carga, a través de las membranas celulares permite dicho cambio?, ¿con qué rapidez atraviesa las membranas esa carga eléctrica?, ¿cuánto valen las concentraciones iónicas en los medios intracelular y extracelular?, ¿cambian esas concentraciones por el pasaje de unos pocos iones?, ¿con qué rapidez pasan los iones a través de bombas?, ¿pueden las bombas “corregir” cambios en el  $V_m$  producidos por canales iónicos, en un intervalo de tiempo similar? Entendemos que en este caso, la omisión de datos numéricos y especialmente de su valoración cualitativa, es el origen de conceptos erróneos vinculados con cierta lógica que da coherencia a un aprendizaje que es significativo pero no sustentable del potencial de acción en neuronas. El Modelo de Aprendizaje Cognitivo Consciente Sustentable como marco teórico para analizar la problemática de enseñanza de estos temas nos permitió elegir conceptos sostén variados y abordar desde ellos una perspectiva didáctica para usar con docentes. Los conceptos sostén que permitieron valorar cualitativamente y comparar, determinados números que con frecuencia descuidamos en la enseñanza de la Biología fueron de impacto muy positivo y permitieron a los participantes de cursos una reflexión comprensiva del origen de sus propias concepciones erróneas.

### Notas al pie

- 1 Cabe destacar que el gradiente electroquímico no es sinónimo de gradiente químico. Es decir, cuando el soluto a considerar es un ión, no es correcto hacer deducciones sobre su tendencia al escape únicamente a partir de datos de su concentración, sino que dicha deducción podrá ser correcta únicamente al considerar el potencial de equilibrio electroquímico del ión calculado por la ley de Nernst.
- 2 Las respuestas eléctricas incluyen potenciales de acción y respuestas electrotónicas (también denominadas pasivas, graduadas, subumbrales). Ejemplos de estas últimas son: potenciales postsinápticos y potenciales receptor y generador.
- 3 Conductancia es la magnitud inversa a la resistencia. La unidad de resistencia es ohm, y de la conductancia mho.
- 4 Puede apreciarse cómo pequeños cambios eléctricos desde el punto de vista físico (cambios de potencial eléctrico en el orden de los milivoltios y de conductancias en el orden de los milimho), tienen relevancia biológica en tanto determinan “señales” que modifican respuestas fisiológicas.
- 5 La concentración de sodio extracelular es aproximadamente 145 mM, en tanto que la intracelular es cercana a 4mM. Las concentraciones de potasio en los medios intracelular y extracelular son de 140 mM y 4 mM, respectivamente.

### Referencias:

1. Latorre R, López Barneo J, Bezanilla F, Llinás R (eds) (1996). Biofísica y fisiología celular. Sevilla: Universidad de Sevilla. Secretariado de Publicaciones.
  2. Piriz Giménez, N (2016) Biofísica para la formación del Profesorado. Montevideo: Ediciones Ciencia. 2a edición.
  3. Silverthorn, DU (2008) Fisiología humana. Un enfoque integrado. Buenos Aires: Editorial Médica Panamericana. 4a edición.
  4. Cingolani, HE, Houssay, AB (2006) Fisiología humana. Buenos Aires: El Ateneo. 7ª edición.
  5. Hille, B. (2001) Ion Channels of Excitable Membranes. Massachusetts: Sinauer Associates Inc. 3a edición
  6. Skou, JC (1957) The influence of some cations on an adenosine triphosphatase from peripheral nerves. *Biochimica et Biophysica Acta* 23: 394–401
  7. Piriz Giménez N, Añón JT, Balsas JL, Rattín E, & López MN (2016). Analysis and methodological approach to addressing the “myth of the sodium/potassium pump” when teaching the nerve impulse. *International Educational Scientific Research Journal*, 2(6): 104-106.
  8. Galagovsky L (2004a). Del aprendizaje significativo al aprendizaje sustentable. Parte 1: el modelo teórico. *Enseñanza de las Ciencias*, 22(2): 229-240.
  9. Galagovsky L (2004b) Del aprendizaje significativo al aprendizaje sustentable. Parte 2: derivaciones comunicacionales y didácticas. *Enseñanza de las Ciencias*, 22(3):349-364.
  10. Piriz Giménez N, Terevinto Zizianas E, Tucci Añón J, y Lezama Balsas J (2011) “NTICs en la Enseñanza de la Biología: una propuesta para el estudio del potencial de acción nervioso en formación terciaria y secundaria”. (En Saravay, M, Oroño, SU, Vieira, S. Actividades prácticas en la enseñanza de Biología para la formación de docentes: Una sistematización reflexiva. Disponible [https://www.researchgate.net/profile/Silvia\\_Umpierrez\\_Orono3/publication/235970428\\_Actividades\\_practicas\\_en\\_la\\_ensenanza\\_de\\_la\\_Biologia\\_para\\_la\\_formacion\\_de\\_docentes\\_una\\_sistematizacion\\_reflexiva](https://www.researchgate.net/profile/Silvia_Umpierrez_Orono3/publication/235970428_Actividades_practicas_en_la_ensenanza_de_la_Biologia_para_la_formacion_de_docentes_una_sistematizacion_reflexiva))
- Webgrafía
1. [http://webspace.ship.edu/cgboer/genesp/potencial\\_accion.html](http://webspace.ship.edu/cgboer/genesp/potencial_accion.html) (fecha de acceso: 1/8/18)
  1. <http://recursos.cnice.mec.es/biosfera/alumno/1bachillerato/animal/contenidos16.htm> (fecha de acceso: 1/8/18)
  2. <http://www.hablemosdeneurociencia.com/conexion-neuronal-potencial-accion/> (fecha de acceso: 1/8/18)
  3. <https://prezi.com/wzjinhfgk3vg/bomba-sodio-potasio-y-potencial-de-accion/> (fecha de acceso: 1/8/18)
  4. <https://es.slideshare.net/lorenijiu/3-potenciales-de-membrana-y-potenciales-de-accin> (fecha de acceso: 1/8/18)
  5. [https://www.youtube.com/watch?v=\\_FzAJMapHYE](https://www.youtube.com/watch?v=_FzAJMapHYE) (fecha de acceso: 1/8/18)
  6. <https://www.youtube.com/watch?v=77wDRHpGay0> (fecha de acceso: 1/8/18)
  7. <https://www.youtube.com/watch?v=txGi8j5bvds> (fecha de acceso: 1/8/18)
  8. <https://www.youtube.com/watch?v=fNrsxekCsnI> (fecha de acceso: 1/8/18)
  9. [https://www.youtube.com/watch?v=KPAG\\_34Yh\\_o](https://www.youtube.com/watch?v=KPAG_34Yh_o) (fecha de acceso: 1/8/18)



ISSN 1666-7948

[www.quimicaviva.qb.fcen.uba.ar](http://www.quimicaviva.qb.fcen.uba.ar)

Revista **QuímicaViva**

Número 3, año 17, Diciembre 2018

[quimicaviva@qb.fcen.uba.ar](mailto:quimicaviva@qb.fcen.uba.ar)

# Prácticas de laboratorio para futuros científicos: trabajo en equipo interdisciplinar con alumnos de diferentes grados universitarios guiados por WebQuest AICLE

Ángel Serrano-Aroca<sup>1</sup>, Belén Frígols<sup>1</sup>, Miguel Martí<sup>1</sup>, Sofía Ingesa-Capaccioni<sup>1</sup>, Victoria Moreno-Manzano<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup> Facultad de Veterinaria y Ciencias Experimentales, Universidad Católica de Valencia San Vicente Mártir, 46001 Valencia, España; <sup>2</sup> Laboratorio de Regeneración Tisular y Neuronal, Centro de Investigación Príncipe Felipe, 46012 Valencia, España

[angel.serrano@ucv.es](mailto:angel.serrano@ucv.es)

Recibido: 14/11/2018 - Aceptado: 23/11/2018

## Resumen

El trabajo en equipo interdisciplinar constituye hoy en día una práctica común en el mundo científico. Cada vez resulta más importante la colaboración entre expertos de diferentes áreas científicas para resolver problemas multidisciplinares. De este modo, en este trabajo, se han realizado prácticas de laboratorio transversal de alto nivel científico agrupando alumnos de diferentes cursos académicos de cuatro grados universitarios científicos del área de biomedicina impartidos en castellano: Biotecnología, Ciencias del Mar, Veterinaria, Odontología y un grado impartido en inglés: *Dentistry*. Las asignaturas, en los correspondientes grados, que participaron en el estudio fueron: Biorreactores, Cultivos Celulares, Microbiología Marina, Microbiología Veterinaria, Microbiología de Odontología y *Microbiology* del grado *Dentistry* en inglés. Se constituyeron equipos de trabajo con conocimientos multidisciplinares abordando un tema científico de interés actual como es las síntesis química y por impresión 3D de biomateriales, su caracterización antimicrobiana por tres métodos complementarios (difusión en agar, contacto y formación de biofilm en biorreactor) y repoblación por cultivo con células madre adultas. Para guiar su aprendizaje, se diseñó una *WebQuest* con todas las instrucciones, laboratorio virtual y guías de prácticas en formato digital para su utilización en tableta, móvil u ordenador. Con motivo de llevar a cabo un Aprendizaje Integrado de Contenido y de Lenguas Extranjeras (AICLE), se empleó el inglés por ser el idioma universal empleado en el ámbito científico por excelencia, fomentando así la formación del futuro investigador de los estudiantes. La *WebQuest* fue diseñada en inglés y los participantes realizaron una exposición en inglés al finalizar la experiencia. Las prácticas de laboratorio fueron realizadas en los laboratorios de la Universidad Católica de Valencia San Vicente Mártir y en el Centro de Investigación Príncipe Felipe por cuatro grupos de 6 alumnos de los cinco grados. La efectividad de este procedimiento fue evaluado mediante experimentación directa, una encuesta constituida por un cuestionario de 14 preguntas, y evaluación mediante dos rúbricas para las memorias y exposiciones. Los resultados de este estudio muestran un gran éxito de la metodología didáctica desarrollada. Sin embargo, este estudio revela la necesidad de tomar medidas educativas que potencien el sistema AICLE desde niveles educativos inferiores que pueda facilitar el proceso de aprendizaje de nuestros futuros científicos.

**Palabras clave:** *WebQuest*, AICLE, trabajo interdisciplinar, grados universitarios, prácticas de laboratorio, laboratorio virtual.

## Summary

Interdisciplinary team work is now a very common practice in scientific research. Collaboration between experts from different scientific areas to solve multidisciplinary problems is becoming more and more important. Thus, in this work, transversal laboratory sessions of high scientific level have been carried out by students from different academic courses of four different university scientific bachelor's degrees in the area of biomedicine taught in Spanish: Biotechnology, Marine Sciences, Veterinary, Dentistry and a degree taught in English: Dentistry. The subjects that participated in the study were: bioreactors, cell cultures, marine microbiology, veterinary microbiology and microbiology (at both dentistry degrees) respectively. Working teams were formed with multidisciplinary knowledge, addressing a scientific topic of current interest such as chemical synthesis and 3D printing of biomaterials, their antimicrobial characterization by three complementary methods (diffusion in agar, contact and biofilm formation in bioreactor) and repopulation by adult stem cell culture. A WebQuest was designed to guide their learning with all the instructions, virtual laboratory and laboratory sessions' guides in digital format to be used on tablet, mobile or computer. In order to carry out a Content and Language Integrated Learning (CLIL), English was used because it is the universal language used in the scientific field and it is very important for the training of future researchers. Thus, the WebQuest was designed in English and the participants made a presentation in English at the end of this experience. The laboratory sessions were carried out in the laboratories of the Catholic University of Valencia San Vicente Mártir and in the Príncipe Felipe Research Center by four groups of 6 students from the five grades. The effectiveness of this procedure was evaluated through direct experimentation, a survey consisting of a questionnaire of 14 questions, and evaluation by means of two rubrics used for the reports and expositions. The results of this study showed a great success of the didactic methodology developed. However, this study reveals the urgent need of taking educational measures that could enhance the CLIL education from lower educational levels to facilitate the learning process of our future scientists.

**Keywords:** WebQuest, CLIL, STSE, interdisciplinary team work, bachelor studies, laboratory sessions, virtual laboratory

## 1. Introducción

Hoy en día, el trabajo científico está siendo llevado a cabo cada vez más por equipos de trabajo interdisciplinar donde expertos de varios centros de investigación, que trabajan en áreas científicas totalmente diferentes, colaboran para resolver problemas multidisciplinares [1].

La competencia de trabajo en equipo se define como la disposición personal y la colaboración con otros para realizar actividades y lograr objetivos comunes, intercambiando información, asumiendo responsabilidades, resolviendo problemas y contribuyendo al desarrollo colectivo [2]. En la actualidad, dentro del aprendizaje colaborativo destaca el aprendizaje que hace uso de las tecnologías de la información y comunicación, que es una herramienta que consigue que los estudiantes adquirieran competencias digitales de gran utilidad, tanto en entornos universitarios como profesionales [3]. Los grandes avances informáticos han conseguido conectar a personas sin barreras temporales ni geográficas [4]. De este modo, cada vez resulta más frecuente que muchos proyectos industriales y de investigación sean desarrollados por equipos multidisciplinares de profesionales localizados en zonas geográficas diferentes, trabajando juntos de forma virtual [5]. Por tanto, es muy importante que los estudiantes universitarios no solamente sean competentes en el área científica de estudio elegido, sino también adquieran experiencia de trabajo online en grupos multidisciplinares y con miembros de diferentes localidades y países [6,7].

Los entornos virtuales como complemento de prácticas de laboratorio son utilizados cada vez más porque proporcionan una plataforma de aprendizaje que refuerzan los fundamentos principales de los experimentos. De este modo se ha demostrado que se produce una mejora considerable en el desarrollo de las prácticas de laboratorio y son de gran utilidad para el alumnado [8,9]. Además, la integración de la

experimentación real con la simulación virtual por ordenador puede contribuir a un aprendizaje activo más efectivo [10, 11].

### 1.1 *WebQuest*

La metodología *WebQuest* fue inventada en 1995 por Bernie Dodge en la Universidad Estatal de San Diego. Esta herramienta consiste en un formato tipo página web en el cual la mayoría de la información con la que los estudiantes trabajan proviene de la web. Este modelo ha sido de gran utilidad para miles de personas de todo el mundo desde su invención y ha tenido mayor éxito en Brasil, España, China, Australia y Holanda [12].

Esta metodología permite organizar el proceso de aprendizaje del alumnado [13] y se suelen diseñar para que el alumno se centre en utilizar la información en vez de buscarla. Además, esta herramienta resulta de gran utilidad tanto para los alumnos como para el profesorado debido a que proporciona estructura y orientación [14]. La *WebQuest* permite al alumno construir a partir de información obtenida de Internet [15].

Dodge [16], se refiere a la teoría dimensional de aprendizaje de Marzano, que se basa en la taxonomía de Bloom de los objetivos educativos [17], con sus raíces en la ciencia cognitiva como la teoría que subyace al concepto de *WebQuest*. La taxonomía de Bloom de los objetivos educativos describe seis niveles de procesos cognitivos: conocimiento, comprensión, aplicación, análisis, síntesis y evaluación. Las habilidades mentales de orden superior involucran a los últimos tres procesos cognitivos y está asumido que son estimulados por la mayoría de *webquest* [18]. Sin embargo, las actividades relacionadas con la web que apelan solamente a los tres primeros procesos cognitivos se consideran ejercicios web [19].

### 1.2 *AICLE*

Actualmente en Europa existe una creciente implementación de una lengua diferente como medio de enseñanza de asignaturas no lingüísticas. Esta metodología de enseñanza se denomina Aprendizaje Integrado de Contenidos y Lenguas Extranjeras (AICLE) o CLIL de sus siglas en inglés y permite el aprendizaje de materias e idiomas al mismo tiempo con el objetivo de la Unión Europea de conseguir que todos los ciudadanos puedan comunicarse en al menos dos lenguas.

La resolución del Consejo de 1995 puso de manifiesto la importancia de la mejora de la calidad y la diversificación del aprendizaje y de la enseñanza de las lenguas en los sistemas educativos de la Unión Europea para impartir una enseñanza bilingüe de asignaturas distintas de las lenguas.

Está demostrado que mediante AICLE los alumnos aprenden más y están más motivados que en la enseñanza tradicional de materias específicas [20]. Además, esta metodología potencia la autonomía del alumno [21] y ofrece muchas ventajas tanto a estudiantes como a docentes, ya que el alumno procesa la lengua extranjera de forma más profunda e intensa y con mayor nivel cognitivo.

La realización de actividades AICLE en estudios superiores universitarios es fundamental, sobre todo en grados científicos donde la mayoría de libros y publicaciones se realizan en inglés. De este modo, con la metodología AICLE se puede conseguir que los estudiantes aprendan contenidos muy importantes del tema abordado y al mismo tiempo competencia lingüística en lengua inglesa aprendiendo vocabulario y expresiones especializadas de su área de conocimiento.

La unión de la *WebQuest* con AICLE permite potenciar la docencia AICLE ya que se establecen pautas precisas e instrumentos para implementar la lengua extranjera de forma adecuada [22-24].

El objetivo del presente proyecto se enmarca dentro de línea de mejora de adquisición de competencias de carácter transversal. De este modo, se pretende realizar un trabajo de innovación docente coordinado desde la dirección del departamento basado en la realización de prácticas de laboratorio de



investigación puntera, denominadas *para futuros científicos*, de carácter interdisciplinar y que agrupe a alumnos de cuatro grados universitarios científicos impartidos en castellano: Biotecnología, Ciencias del Mar, Veterinaria y Odontología, y un grado impartido en inglés: *Dentistry*. Además, este proyecto de innovación docente será llevado a cabo con el apoyo de las metodologías AICLE y WebQuest.

El éxito del presente proyecto puede traducirse en una mejora considerable de la competencia de trabajo transversal multidisciplinar de los alumnos participantes. El trabajo de esta competencia es fundamental para la formación de futuros científicos y profesionales que al terminar la carrera van a necesitar cada vez más saber trabajar en entornos multidisciplinarios utilizando la lengua inglesa como medio de comunicación. Además, este proyecto pretende impulsar el interés por la investigación desde los primeros cursos de los grados universitarios de ciencias.

## **2. Metodología**

### *2.1 Participantes*

#### *2.1.1. Alumnos*

La metodología de este trabajo fue aplicada a 24 estudiantes de la Universidad Católica de Valencia San Vicente Mártir. El proyecto estuvo abierto a cualquier alumno matriculado independientemente de su expediente académico, ya que la selección de los alumnos se realizó mediante sorteo de los alumnos voluntarios inscritos para participar. Estos alumnos fueron de edades comprendidas entre 18 y 22 años. Se formaron cuatro grupos de 6 alumnos con un alumno de cada asignatura participante en el proyecto: Biorreactores de 3er curso de Biotecnología, Cultivos Celulares de 3er curso de Biotecnología, Microbiología Veterinaria de 2º curso de Veterinaria, Microbiología Marina de 2º curso de Ciencias del Mar, Microbiología de 1º de Odontología y *Microbiology* de 1º curso de *Dentistry*. Con la práctica de laboratorio planteada se pretende ofrecer a los alumnos la posibilidad de iniciarse en investigación desde los primeros cursos de su carrera.

#### *2.1.2. Profesores*

Cinco profesores universitarios con diferentes estudios científicos participaron en el proyecto. Tres de los profesores son doctores en Veterinaria especializados en microbiología, una profesora doctora en farmacia especializada en cultivos celulares y un doctor en ingeniería química especializado en biomateriales. El profesor de la asignatura de Biorreactores del grado de Biotecnología realizó la parte de la práctica de síntesis química e impresión 3D de los biomateriales y diseño de la WebQuest. El profesor de la asignatura de Microbiología Marina del grado de Ciencias del Mar se encargó de la parte de la práctica de estudio de la capacidad antimicrobiana por difusión en agar de los biomateriales. El profesor de la asignatura de Microbiología Veterinaria del grado de Veterinaria impartió la parte de estudio de la capacidad antimicrobiana por contacto de los biomateriales. El profesor de la asignatura de Cultivos Celulares del grado de Biotecnología realizó la parte de cultivos celulares en los biomateriales y su observación al microscopio confocal. El profesor de la asignatura de Microbiología y *Microbiology* del grado de Odontología y *Dentistry*, respectivamente, realizó la parte de estudio de la formación de biofilm en los biomateriales con biorreactor. Entre los cinco profesores participantes, se realizaron diversas reuniones en las diferentes fases del proyecto para coordinar las cinco partes de la práctica de laboratorio mencionadas.

### *2.2. Prácticas de laboratorio: trabajo en equipo interdisciplinar.*

Las prácticas de laboratorio se realizaron de forma presencial en los laboratorios de la Facultad de Veterinaria y Ciencias Experimentales de la Universidad Católica de Valencia San Vicente Mártir y en el Laboratorio de Regeneración Tisular y Neuronal del Centro de Investigación Príncipe Felipe. Se realizaron prácticas de laboratorio de alto nivel científico interdisciplinares utilizando tecnologías avanzadas existentes como la impresión 3D, la síntesis de scaffolds con biomateriales de origen natural o el empleo de células madre adultas desde cultivos primarios. Toda esta experiencia científica fue

guiada por internet a través de la WebQuest AICLE. En la práctica de laboratorio, los alumnos de la asignatura de Biorreactores prepararon biomateriales avanzados mediante síntesis química y por impresión 3D en el laboratorio y los alumnos de Cultivos Celulares estudiaron las propiedades biológicas de estos materiales en contacto con las células troncales. Los alumnos de Ciencias del Mar estudiaron en la asignatura de Microbiología Marina la capacidad antimicrobiana mediante el método de difusión en agar de estos materiales frente a bacterias importantes como *Staphylococcus aureus* y buscaron información en artículos científicos recientes de alto impacto, con la ayuda del profesor, para poder proponer la utilización alternativa de biomateriales antimicrobianos de origen marino. Finalmente, los alumnos de Veterinaria estudiaron en la asignatura de Microbiología Veterinaria las propiedades antimicrobianas de estos biomateriales mediante otra técnica denominada de contacto. Los alumnos de Odontología estudiaron las propiedades antimicrobianas de formación de biofilm mediante un biorreactor para bacterias. Ambos alumnos de Veterinaria y Odontología buscaron información en artículos científicos recientes, con la ayuda del profesorado, para poder proponer la implantación de estos biomateriales en animales para regeneración tisular ósea, prótesis, etc. para odontología de acuerdo con los resultados obtenidos por los alumnos de Biotecnología y Ciencias del Mar en los ensayos de cultivos celulares y antimicrobianos.

Una vez finalizadas las prácticas, los seis alumnos de cada grupo se reunieron para discutir y elaborar una memoria conjunta que presentaron siguiendo las instrucciones indicadas en la WebQuest. Este trabajo finalizó con la exposición de los resultados y sus potenciales aplicaciones en las diferentes disciplinas asociadas a sus grados, en inglés en una presentación de máximo 2 minutos por alumno (12 minutos en total) por grupo.

### *2.3. Aspectos de bioética*

Debido a que la experimentación con animales requiere de la aprobación previa por un comité ético, los alumnos de cada grupo se encargaron de buscar toda la información requerida para solicitar la futura implantación de los biomateriales desarrollados en animales.

### *2.4. Evaluación de la metodología docente*

Para poder evaluar esta metodología de enseñanza-aprendizaje, se realizaron encuestas a todos los alumnos participantes en el proyecto y se calificaron las memorias y exposiciones en inglés mediante rúbrica de evaluación para poder disponer de más resultados que permitan cuantificar el nivel de enseñanza y motivación logrado. Estos sistemas de evaluación estuvieron disponibles en la WebQuest desde el comienzo del proyecto para que los alumnos supieran de antemano cómo iban a ser calificadas sus memorias y exposiciones. Las memorias de prácticas en inglés y exposiciones fueron evaluadas por los cinco profesores participantes en el proyecto para determinar una calificación media representativa evaluando por puntos criterios consensuados sobre la calidad, forma y contenido de la memoria escrita (Tabla 1) y de la presentación oral (Tabla 2). Todos los alumnos que participaron en el proyecto de innovación docente recibieron un certificado de participación como reconocimiento de su trabajo realizado.

### *2.5. WebQuest con enfoque AICLE*

En la introducción de la WebQuest diseñada [25] se expone una pequeña introducción en inglés a la síntesis de los biomateriales, la ingeniería tisular, el cultivo celular y los tres métodos de caracterización antimicrobiana de biomateriales por difusión en agar, contacto y formación de biofilm en cultivo bacteriano en biorreactor. En el apartado correspondiente a las prácticas de laboratorio a realizar (Laboratory Sessions) se indica la experimentación a realizar con un enlace a los manuales de instrucciones en archivo pdf descargable mediante Tablet, Smartphone u ordenador [26]. La WebQuest dispone también de unas prácticas virtuales. (Virtual Laboratory) para realizar el alumno en el ordenador desde casa o con un ordenador portátil en la Universidad para completar los conocimientos adquiridos en el laboratorio y potenciar el trabajo autónomo. Esta experiencia virtual [27] aborda en inglés

conceptos relativos a material general de laboratorio, manejo del microscopio óptico, impresión 3D, cultivo celular y biofilm bacteriano. Además, la WebQuest consta de un penúltimo apartado (Reports&Presentations) con toda la información al respecto de las exposiciones en inglés a realizar por cada grupo y en cuanto a la elaboración de la memoria indicando claramente su estructura y contenidos que deben contener [28]. Finalmente, se indica cómo serán evaluados los alumnos en las memorias y las exposiciones [29] mostrando las dos rúbricas de evaluación (ver Tabla 1 y 2 respectivamente), que otorgan un conjunto de criterios y estándares, generalmente relacionados con objetivos de aprendizaje, que se utilizan para evaluar un nivel de desempeño o tarea [30].

## *2.6. Evaluación*

Para evaluar el conocimiento adquirido por los alumnos se realizó como tarea la de presentar una memoria de prácticas por grupo y una exposición en grupo final en inglés en el Salón de Actos de la Facultad de Veterinaria y Ciencias Experimentales de la Universidad Católica de Valencia San Vicente Mártir. La nota de las memorias y de las exposiciones se determinó mediante dos rúbricas de evaluación que otorgan una calificación total de 0 a 10 (ver tabla 1 y 2 respectivamente). En cuanto a la memoria, se evalúa tanto la calidad del contenido como la calidad de su presentación evaluando cada uno de los indicadores que se indican en la rúbrica.

**Tabla 1:** *Rúbrica de evaluación de las memorias de prácticas.*

INDICADOR	Nivel 1	Nivel 2	Nivel3	Nivel 4	Puntos
<b>EXTENSIÓN</b>	Extensión inferior de la adecuada del 50% al 100% menor.	Extensión inferior de la adecuada del 25% al 50% menor.	Extensión inferior de la adecuada hasta un 25% menor.	Extensión adecuada: memoria de prácticas (unas 23 páginas o más).	0-2
<b>CALIDAD DEL CONTENIDO</b>	Realiza una descripción de las prácticas reales insuficiente en cuanto a desarrollo y contenido. No incluye fotografías. El anexo de prácticas virtuales es muy deficiente.	Introducción no muy adecuadamente desarrollada. Describe de forma pobre todo el procedimiento experimental realizado, mostrando de forma pobre los resultados obtenidos en las prácticas. Discusión y redacción de las conclusiones pobre de acuerdo a las prácticas realizadas incluyendo de 0 a 4 fotografías. El anexo de prácticas virtuales está regular.	Introducción bastante completa. Describe bastante bien todo el procedimiento experimental realizado, mostrando de forma adecuada y correcta los resultados obtenidos en las prácticas. Discusión y redacción de las conclusiones bastante completa. Se incluye de 5 a 7 fotografías. El anexo de prácticas virtuales está bastante bien.	Introducción completa, describe perfectamente todo el procedimiento experimental realizado, mostrando de forma excelente y correcta los resultados obtenidos en las prácticas. Discusión y redacción de las conclusiones completa. Se incluye de 8 o más fotografías. El anexo de prácticas virtuales está muy bien (en caso de haberse realizado en inglés se valorará positivamente subiendo la nota final un punto).	0-3
<b>ESTRUCTURA Y FORMATO</b>	Documento sin formato que no respeta las indicaciones dadas en la WebQuest. Aspecto descuidado. Uso continuo de la primera persona para redactar. Partes del texto con redacción incomprendible. Muchas faltas de ortografía y lenguaje coloquial. No incluye todos los apartados o está mal estructurado.	El trabajo tiene formato y pocas faltas de ortografía, gramática o puntuación. Puede mejorarse el estilo (utiliza la primera persona en alguna ocasión). Incluye todos los apartados. Existe desorden respecto a la estructura propuesta en la WebQuest. Hay coherencia pero falta cohesión entre los apartados.	Trabajo con formato y sin errores pero podría mejorarse el estilo o la redacción. Se adecua la forma de expresión habitual de un trabajo académico: sin lenguaje coloquial. Incluye todos los apartados indicados en la WebQuest y están desarrollados, pero falta continuidad entre ellos.	Formato y estilo de redacción elegante y sin errores que facilita la lectura. Incluye todos los apartados y existe coherencia y un desarrollo lógico y continuo entre ellos.	0-2
<b>FIGURAS NUMERADAS Y CON TÍTULO EN EL PIE DE LAS FOTOGRAFÍAS.</b>	Ninguna figura se encuentra como en el Nivel 4 se indica, o menos o igual a un 25%.	Menos o igual a un 50% de las figuras se encuentran como en el Nivel 4 se indica.	Menos o igual a un 75% de las figuras se encuentran como en el Nivel 4 se indica.	Todas o el 75% o más de las figuras se encuentran numeradas y con título en el pie de las fotografías.	0-0,5
<b>REFERENCIAS EN TEXTO</b>	No dispone de referencias en el texto o de menos o igual a un 25%.	Dispone de menos o igual a un 50% de referencias en el texto.	Dispone de menos o igual a un 75% de referencias en el texto.	Dispone de todas las referencias en el texto o el 75% o más.	0-0,5
<b>REFERENCIAS EN FIGURAS</b>	No dispone de referencias en las figuras o de menos o igual a un 25%.	Dispone de menos o igual a un 50% de referencias en las figuras.	Dispone de menos o igual a un 75% de referencias en las figuras.	Dispone de todas las referencias en las figuras o el 75% o más.	0-0,5
<b>LISTA DE REFERENCIAS</b>	No dispone de lista de referencias o si dispone pero con menos o igual a un 25% de referencias.	Dispone de lista de referencias con menos o igual a un 50% de referencias.	Dispone de lista de referencias con menos o igual a un 70% de referencias.	Dispone de lista de referencias con todas, el 75%, o más de referencias.	0-0,5
<b>PÁGINAS NUMERADAS E ÍNDICE AUTOMÁTICO NUMERADO</b>	No dispone de páginas numeradas ni de índice automático numerado.	Dispone de páginas numeradas pero el índice no es automático numerado.	-	Dispone de páginas numeradas y de índice automático numerado.	0 o 1

Tabla 1: Rúbrica de evaluación de las exposiciones.

Criterio	Muy Satisfactorio (1 punto)	Aceptable (0.5 puntos)	No Aceptable (0 puntos)	% de la nota	Puntos
Trabajo en Equipo 1	Es muy notorio el trabajo en equipo realizado por todos los integrantes.	Algunos de los integrantes del grupo no se les ve conectividad con los demás del grupo.	Los integrantes del grupo han trabajado por separado cada tema o subtema.	10	
Trabajo en Equipo 2	El PowerPoint elaborado es de muy buena calidad.	El PowerPoint elaborado es regular.	El PowerPoint elaborado es de muy baja calidad.	10	
Volumen de voz	El volumen es lo suficientemente alto para ser escuchado.	El volumen es cambiante a medida que avanza en la presentación.	El volumen no es aceptable, es muy débil para ser escuchado.	10	
Postura del cuerpo y contacto visual	Todos los miembros tienen buena postura y se proyectan seguros de sí mismo. Establecen contacto visual con todos en el salón durante la presentación.	Casi siempre tienen buena postura y establecen contacto visual con todos en el salón durante la presentación.	Tienen mala postura y/o no miran a las personas durante la presentación.	10	
Habla claramente	Hablan claramente y de forma muy entendible.	Hablan claramente pero mientras avanza se pierde la claridad.	A menudo hablan entre dientes o no se les puede entender.	10	
Conocimiento del tema	Han preparado muy bien la presentación.	Han preparado bien la presentación.	No han preparado bien la presentación.	30	
Uso del tiempo	Utilizan el tiempo adecuadamente (12 minutos totales) hablando todos los miembros un tiempo similar.	Emplean 12 minutos totales o más para exponer el trabajo pero algunos miembros hablan más que otros.	Emplean menos tiempo de los 12 minutos totales para exponer hablando tiempos diferentes cada miembro.	10	
Organización	Se presenta la información de forma lógica e interesante que la audiencia puede seguir.	Se presenta la información utilizando una secuencia lógica que la audiencia puede seguir.	La audiencia no puede entender la presentación debido a que no sigue un orden adecuado.	10	
<b>NOTA</b>					

## 2.7. Encuesta

Se ha realizado una encuesta a través de un cuestionario de catorce preguntas formuladas por los cinco profesores universitarios (ver Tabla 3).

**Tabla 3:** Encuesta de catorce preguntas sobre la metodología de prácticas para futuros científicos realizada mediante webquestAICLE.

Nº	PREGUNTA
1	La realización de prácticas de laboratorio para futuros científicos unidas a través de la página web te ha ayudado a entender mejor los conceptos abordados.
2	Te has sentido más motivado al realizar prácticas de laboratorio científicas formando parte de un equipo de trabajo interdisciplinar.
3	Te ha parecido una forma más motivante de realizar prácticas de laboratorio al ser temas de investigación puntera.

4	La estructura de la actividad te ha parecido lógica y bien organizada.
5	El desarrollo de la actividad te ha facilitado la comprensión y aprendizaje de la materia tratada.
6	Piensas que tu participación en la búsqueda de artículos científicos en lengua inglesa para la preparación de las presentaciones en inglés te ha hecho consciente de la necesidad de conseguir un gran dominio del inglés en el campo científico.
7	Te ha resultado útil para tu aprendizaje que el mismo tema se haya abordado desde distintas perspectivas profesionales.
8	Creer que has aprendido más con esta metodología <i>webquest</i> con prácticas para futuros científicos con contenidos en inglés que con la llevada a cabo de forma tradicional.
9	Cómo valoras la parte de prácticas de laboratorio del proyecto (de 1 a 6).
10	Cómo valoras la parte de realización de la memoria de prácticas y preparación de las exposiciones en el equipo interdisciplinar del proyecto (de 1 a 6)
11	Cómo valoras la parte de las presentaciones en inglés del proyecto (de 1 a 6)
12	Nivel global de satisfacción del proyecto (de 1 a 6)
13	Recomendarías esta actividad a otros estudiantes de tu grado.
14	Creer que se deberían realizar más actividades de este tipo entre diferentes grados de una misma Universidad.

### 3. Resultados y discusión

En este estudio, el tipo de metodología de prácticas de laboratorio, se ha empleado *lawebquest* como herramienta de guía del proceso de enseñanza-aprendizaje. Se ha optado por esta herramienta para poder crear mayor interés entre el alumnado y así poder abarcar con las nuevas tecnologías conceptos científicos muy importantes utilizando los recursos avanzados que ofrece hoy en día internet para poder conectar los alumnos participantes de los diferentes grados universitarios.

Actualmente existen una amplia gama de páginas web gratuitas o de pago para crear típicas *webquest* [12]. Sin embargo, en el presente proyecto se ha optado por el portal de diseño de páginas web gratuitas Webs (2018) debido a su manejo intuitivo y cómodo que permite infinidad de diseños.

El desarrollo de *lawebquest* de este trabajo ha cumplido los máximos ítems de la rúbrica de evaluación de *webquest* [31]. *Lawebquest* normalmente consta de una serie de seis páginas web: introducción, tarea, proceso, recursos, evaluación y conclusión. La introducción proporciona a los alumnos información acerca del tema a trabajar con la finalidad de hacer la actividad más atractiva y entretenida y se mantenga el interés por el tema a lo largo de la actividad. Las siguientes páginas tratan de la tarea a realizar al finalizar y el proceso describe de forma breve los pasos que el alumnado debe seguir para realizarla. La cuarta página proporciona los enlaces a páginas web necesarias como instrumento de información. La penúltima página expone el modo de evaluar y finalmente *lawebquest* suele contener una última página que presenta una conclusión que resume la experiencia de aprendizaje [16]. Sin embargo, el tipo de *webquest* diseñada en el presente estudio ha tomado como modelo *lawebquest* definida por Dodge pero eliminando la página de conclusión por no considerarse relevante en esta aplicación de prácticas de laboratorio y con alguna modificación relevante. De este modo, *lawebquest* diseñada contiene una introducción, unas tareas y la evaluación de forma similar a como lo hace Dodge en su WebQuest. La página de proceso y fuentes de Dodge están ambas incluidas en cada una de las páginas de la prácticas de laboratorio (Laboratory sessions) y laboratorio virtual (Virtual laboratory) (Ver Figura 1

y 2.). Lo que destaca de lawebquestAICLE diseñada es que incluye procesos reales de laboratorio a realizar y no sólo procesos virtuales. Además, los procesos virtuales a trabajar son del tipo AICLE.

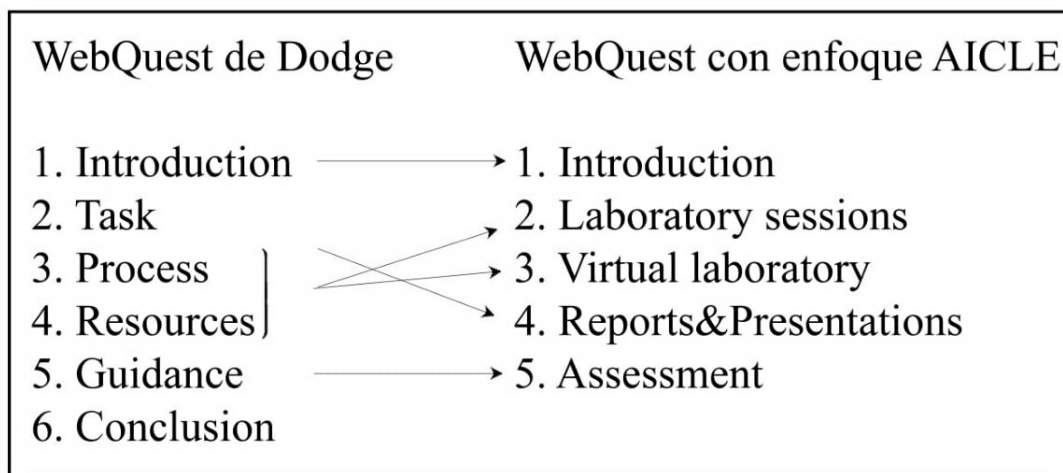


Figura 1: Comparación entre lawebquestde Dodge y lawebquestcon enfoque CTSA desarrollada.



Figura 2: Las cinco páginas web que constituyen lawebquestcon enfoque AICLE. Introducción (a), prácticas de laboratorio con los guiones descargables (b), laboratorio virtual (c y d), instrucciones para la elaboración de la memoria de prácticas y exposiciones (e) y evaluación (f).

Mediante esta metodología de prácticas de laboratorio se consigue trabajar y evaluar multitud de competencias esenciales para un futuro científico como es la de saber desenvolverse en un laboratorio utilizando el material e instrumentos adecuados.

Todos los videos del laboratorio virtual son en lengua inglesa. Sin embargo, algunas páginas de lawebquestfueron redactadas en la lengua nativa (L1) de los alumnos, el castellano, con el objetivo de no sobrecargar la parte lingüística en inglés (L2) de aprendizaje AICLE y así facilitar el proceso de enseñanza-aprendizaje. Aunque, la cantidad de contenido AICLE puede regularse fácilmente en próximas experiencias.

La utilización del L1 y L2 está considerado que proporciona un apoyo comunicativo significativo tanto para los estudiantes como para el profesorado [32]. Aunque los profesores en la enseñanza AICLE deberían utilizar al máximo la lengua objeto de enseñanza [33], el uso la lengua nativa puede servir como andamios de soporte para el aprendizaje de la segunda lengua y contenido. Todavía es necesario realizar más investigación sobre cómo el L1 puede ser utilizado, o está siendo usado en entornos AICLE para maximizar el aprendizaje de contenidos y de la L2 [34].

En las prácticas de laboratorio para futuros científicos AICLE del presente proyecto se trabaja las cuatro habilidades lingüísticas del L2: escuchar, hablar, leer y escribir. De este modo, se deben observar videos en inglés con subtítulos en castellano para trabajar la escucha integrando los conocimientos científicos abordados. La lectura se trabaja en los artículos científicos buscados para la elaboración del trabajo final a exponer. El habla se trabaja en las exposiciones finales en inglés. La escritura se trabaja en la elaboración del PowerPoint en inglés de las presentaciones finales.

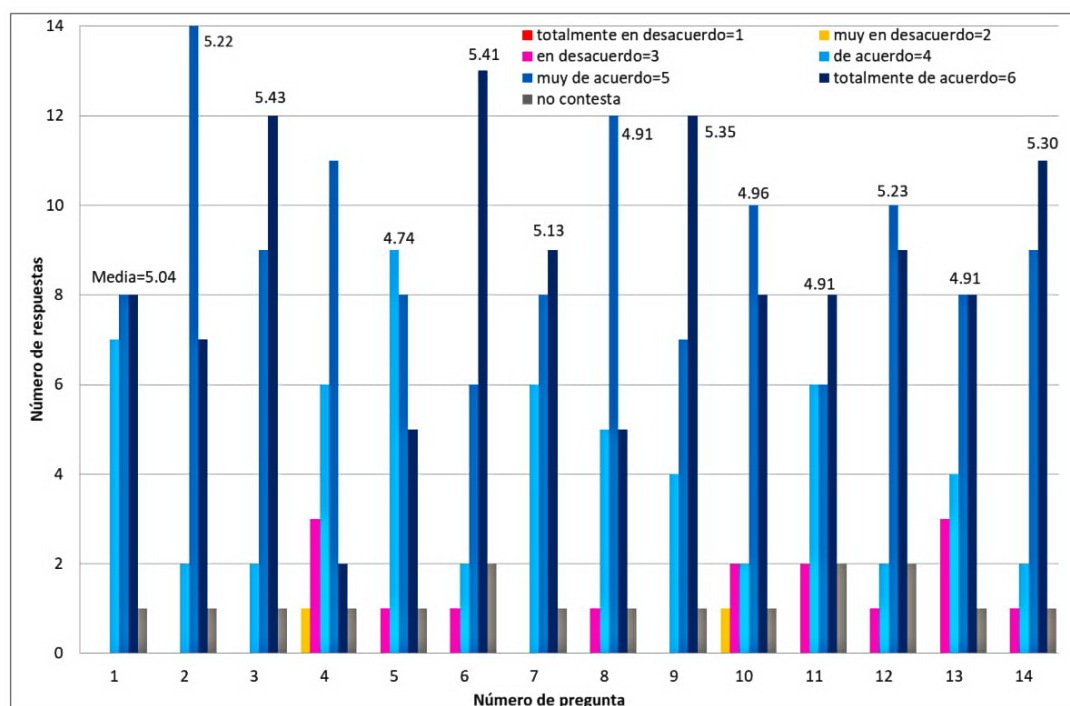
A continuación, en la Tabla 4, se muestran los resultados obtenidos en la evaluación de las memorias de prácticas y exposiciones finales en inglés por los cinco profesores participantes en el proyecto.

**Tabla 4.** Resultados de la evaluación de las memorias de prácticas y exposiciones en inglés (de 0 a 10). Se indica la media y desviación estándar obtenida de la evaluación de cada grupo por los cinco profesores universitarios participantes en el proyecto.

GRUPO	NOTA MEMORIA DE PRÁCTICAS	NOTA EXPOSICIONES
1	8.1±1.2	8.6±0.5
2	8.8±0.5	7.6±0.6
3	8.2±1.2	7.7±0.7
4	7.4±1.2	7.5±0.3

Como se puede observar en la Tabla 4, las calificaciones obtenidas en las memorias de prácticas y en las exposiciones en grupo fueron muy positivas, consiguiendo notas altas que denotan la implicación del alumnado en el proyecto de innovación docente.

Los resultados obtenidos en las encuestas realizadas a los 24 alumnos participantes se muestran en la Figura 3.





**Figura 3:** Resultado de la encuesta de catorce preguntas planteadas sobre las prácticas para futuros científicos guiadas mediante *webquest* con enfoque AICLE a los 24 alumnos participantes. El número de respuestas (calificadas de 1 (totalmente en desacuerdo) a 6 (totalmente de acuerdo)) y el valor medio de estas respuestas para cada pregunta se muestran en esta figura. El color gris representa la opción de no contestar a la pregunta del cuestionario.

La experimentación directa donde todos los profesores observaron una gran motivación del alumnado y los resultados de la encuesta ponen de manifiesto una buena aceptación de este modo de realizar prácticas de laboratorio interdisciplinar por parte del alumnado con alumnos de diferentes grados universitarios con medias desde 4.71 hasta 5.43 (ver Figura 3). La satisfacción global del alumnado respecto al proyecto (cuestión 12) es muy alta y la mayoría opina que se deberían realizar más actividades de este tipo entre diferentes grados de una misma universidad (cuestión 14). Además, se ha conseguido que la participación del alumnado en la búsqueda de artículos científicos en lengua inglesa para la preparación de las presentaciones en inglés les haya hecho conscientes de la necesidad de conseguir un gran dominio de la lengua inglesa en el campo científico (cuestión 6) y con una gran satisfacción en cuanto al tipo de prácticas de laboratorio científicas (cuestión 9). Sin embargo, estos resultados también revelan nuestras sospechas iniciales respecto a la dificultad de llevar a cabo tareas interdisciplinares (cuestiones 4 y 5) con un nivel bajo de conocimientos de la lengua inglesa por muchos alumnos que dificulta todavía más el desarrollo de este tipo de actividades no realizadas habitualmente en ninguno de los grados universitarios implicados en el proyecto. De este modo, un gran número de algunos alumnos manifestaron este resultado en los comentarios de la encuesta e indicaron que les supuso un gran esfuerzo al no dominar la lengua inglesa. Por lo tanto, esto manifiesta la necesidad de tomar medidas educativas que potencien el sistema AICLE desde niveles educativos inferiores que consigan facilitar la integración del alumnado universitario al mundo actual científico donde la lengua inglesa es el medio de comunicación dominante.

## **5. Conclusiones.**

En este estudio se ha aplicado una nueva metodología didáctica que integra todas las ventajas que ofrece por separado *lawebquest* y AICLE enfocado a realizar prácticas de laboratorio de alto nivel científico.

Los alumnos realizaron una memoria con buena presentación y calidad debido a la motivación conseguida mediante el desarrollo de este nuevo tipo de prácticas interdisciplinares para futuros científicos realizada por un equipo de trabajo interdisciplinar constituidos por alumnos de diferentes grados universitarios. Además, las exposiciones en inglés fueron realizadas con un alto grado de motivación indicando de algún modo la gran satisfacción del alumnado respecto al proyecto interdisciplinar de innovación docente llevado a cabo, como así han manifestado también los buenos resultados de las encuestas.

En definitiva, las encuestas del alumnado han puesto de manifiesto una buena aceptación de este modo de realizar prácticas de laboratorio interdisciplinar con alumnos de diferentes grados universitarios. La satisfacción global del alumnado respecto al proyecto es excelente y la mayoría cree que se deberían realizar más actividades de este tipo. Además, se ha conseguido motivar al alumnado y hacer consciente de la necesidad de dominar el inglés en el campo científico. Sin embargo, estos resultados también revelan la dificultad de llevar a cabo tareas interdisciplinares en inglés debido al bajo nivel lingüístico de la mayoría del alumnado y la necesidad de tomar medidas al respecto.

## **Agradecimientos**

Este proyecto ha sido financiado mediante el proyecto 2017-231-002 concedido en la I Convocatoria de proyectos de innovación docente y premios a la Innovación 2017/18.

Los autores del trabajo agradecen a todo el alumnado y personal de la Facultad de Veterinaria y Ciencias Experimentales de la Universidad Católica de Valencia San Vicente Mártir, y personal técnico

del Centro de Investigación Príncipe de Felipe por su amable participación y ayuda en este estudio.

## Contribuciones de los autores

Á. Serrano-Aroca ideó el estudio, consiguió financiación, planificó y dirigió la investigación, diseñó la WebQuest, analizó y discutió los resultados, elaboró las figuras y escribió el manuscrito. Á. Serrano-Aroca, B. Frígols, M. Martí, S. Ingesa-Cappacioni y V. Moreno-Manzano realizaron sus respectivas prácticas de laboratorio, y evaluaciones de las memorias de prácticas y exposiciones. Todos los autores revisaron la última versión del manuscrito.

## Referencias:

1. **Omodei E, De Domenico M, Arenas A** (2017) Evaluating the impact of interdisciplinary research: A multilayer network approach. *Network Science* 5: 235-246. DOI:10.1017/nws.2016.1.
2. **Torrelles C, Coiduras J, Isus S, Carrera F, París G, Cela J** (2011) Competencia de trabajo en equipo: Definición y categorización. Profesorado. *Revista de Currículum y Formación de Profesorado* 15: 329-344.
3. **Roberts TS** (Ed ) (2005) Computer-Supported Collaborative Learning in Higher Education. *Hershey: Idea Group Pub.*
4. **Goodyear P, Jones C, Thompson K** (2014) Computer-supported collaborative learning: Instructional approaches, group processes and educational designs. In *Handbook of Research on Educational Communications and Technology* (pp. 439-451). *New York: Springer.*
5. **Sheppard K, Dominick P, Aronson Z** (2004) Preparing engineering students for the new business paradigm of international teamwork and global orientation. *International Journal of Engineering Education* 20: 475-483.
6. **Hermann F, Rummel N, Spada H** (2001) Solving the case together: The challenge of net-based interdisciplinary collaboration. First European Conference on Computer-Supported Collaborative Learning. In P. Dillenbourg, A. Eurelings, & K. Hakkarainen (Eds.), *Proceedings of the first European conference on computer-supported collaborative learning* (pp. 293-300). *Maastricht: McLuhan Institute.*
7. **Popov V, Noroozi O, Barrett JB, Biemans HJA, Teasley, SD, Slof B, Mulder M** (2014) Perceptions and experiences of, and outcomes for, university students in culturally diversified dyads in a computer-supported collaborative learning environment. *Computers in Human Behavior* 32: 186-200.
8. **Domingues L, Rocha I., Dourado F, Alves M, Ferreira EC** (2010) Virtual laboratories in bio(chemical) engineering education. *Education for Chemical Engineers* 5: e22-e27.
9. **Serrano-Aroca A** (2015) Real and Virtual Bioreactor Laboratory Sessions by STSE-CLIL WebQuest. *Education for Chemical Engineers* 13:1-8. doi:10.1016/j.ece.2015.06.004.
10. **Kocijancic S, O'Sullivan C** (2004) *Informatics in Education* 3: 239-250.
11. **Jong T, Linn MC, Zacharia ZC** (2013) Physical and Virtual Laboratories in Science and Engineering Education. *Science* 340:305-308. DOI: 10.1126/science.1230579.
12. **Dodge B** (2007) WebQuest.org. Recuperable de <http://webquest.org/>
13. **Chalmers PA** (2003) The role of cognitive theory in human-computer interface. *Computers in Human Behaviour* 19: 593-607,
14. **Dodge B** (2001) FOCUS: Five rules for writing a great WebQuest. *Learning and Leading with Technology* 28(8): 6-9. Recuperable de <http://business.highbeam.com/4240/article-1G1-74336587/focus-five-rules-writing-great-webquest>
15. **Segers E, Verhoeven L** (2009) Learning in a sheltered Internet environment: The use of WebQuest. *Learning and Instruction*. 19: 423-432.
16. **Dodge B** (1997) Some Thoughts About WebQuests. Recuperable de [http://webquest.sdsu.edu/about\\_webquests.html](http://webquest.sdsu.edu/about_webquests.html)
17. **Marzano RJ** (1992) A different kind of classroom. Teaching with dimensions of learning. *Alexandria, VA: Association for Supervision and Curriculum Development.*
18. **Marzano RJ, Kendall JS** (2007) The new taxonomy of educational objectives. *Thousand Oaks, CA: Corwin.*
19. **March T** (2004) The learning power of WebQuest. *Educational Leadership* 61: 42-47.
20. **Wolff D** (2009) Content and Language Integrated Learning. In Knapp, K-F. and Seidelhofer, B. in cooperation with Henry Widdowson (eds.): *Handbook of Foreign Language Communication and Learning* 5: 545-572. *Berlin: Mouton de Gruyter.*
21. **Wolf D** (2011) CLIL and Learner Autonomy: relating two educational concepts. *Education et Sociétés Plurilingues*, 301.
22. **Fernández Fontecha A** (2010) The CLILQuest: A Type of Language WebQuest for Content and Language Integrated Learning (CLIL). *Computer Resources for Language Learning* 3: 45-64.
23. **Räsänen A, Kaasik T, Mathews HD, Oresik H, Sentocnik S** (1996) Profile of teacher qualifications required for bilingual education programmes, Report on workshop 12B, Bilingual education in secondary schools: Learning and teaching non-language subjects through a foreign language (pp. 277-292). *Echternach, Luxemburg: Council of Europe.*
24. **Hartiala AK** (2000) Acquisition of teaching expertise in content and language integrated learning. Doctoral Dissertation. *University of Turku, Turku: Painosalama Oy.*
25. <http://laboratorysessions.webs.com>, accesado 26/06/2018.
26. <http://laboratorysessions.webs.com/laboratory-sessions>, accesado 26/06/2018.

27. <http://laboratorysessions.webs.com/virtual-laboratory>, accesado 26/06/2018.
28. <http://laboratorysessions.webs.com/reports-presentations>, accesado 26/06/2018.
29. <http://laboratorysessions.webs.com/assessment>, accesado 26/06/2018.
30. **Brookhart SM** (2013) How to Create and Use Rubrics for Formative Assessment and Grading. Alexandria. VA: Association for Supervision and Curriculum Development.
31. **Dodge B** (2001) A Rubric for Evaluating WebQuests. Recuperable de <http://webquest.sdsu.edu/webquestrubric.html>
32. **Gorter D, Cenoz J** (2011) A Multilingual Approach: Conclusions and Future Perspectives. *The Modern Language Journal*, 95: 442-445, DOI: 10.1111/j.1540-4781.2011.01203.x
33. **Littlewood W, & Yu B** (2011) First language and target language in the foreign language classroom. *Language Teacher* 44: 64-77.
34. **Lasagabaster D** (2013) The use of the L1 in CLIL classes: The teachers' perspective. *Latin American Journal of Content and Language Integrated Learning* 6: 1-21. doi:10.5294/laclil.2013.6.2.1 eISSN 2322-9721.



ISSN 1666-7948

[www.quimicaviva.qb.fcen.uba.ar](http://www.quimicaviva.qb.fcen.uba.ar)

**Revista QuímicaViva**

Número 3, año 17, Diciembre 2018

[quimicaviva@qb.fcen.uba.ar](mailto:quimicaviva@qb.fcen.uba.ar)