

# BIOTECNOLOXÍA E ENXEÑERÍA XENÉTICA

- 1. Introducción
- 2. Biotecnoloxía tradicional: microbioloxía industrial
- 3. Os microorganismos na industria biotecnolóxica
  - 3.1. Obtención industrial de antibióticos
  - 3.2. Producción de aminoácidos
  - 3.3. Producción de vitaminas
  - 3.4. Biotransformación de esteroides
  - 3.5. Usos industriais dos fermentos
  - 3.6. Obtención de derivados lácteos
  - 3.7. Obtención de vinagre
  - 3.8. Obtención de ácido cítrico
  - 3.9. Tratamento de augas residuais
  - 3.10. Biorremedación
- 4. Técnicas empregadas en enxeñería xenética
  - 2.1. Tecnoloxía do ADN recombinante
  - 2.2. Clonación celular '*in vivo*' do ADN
  - 2.4. Clonación '*in vitro*' do ADN: reacción en cadea da polimerase (PCR)
  - 2.6. Edición xenética: tecnoloxía CRISPR/Cas9
- Repaso PAU

# 1. INTRODUCCIÓN

A biotecnoloxía é a rama da ciencia que se utiliza organismos vivos ou os seus compoñentes (encimas, proteínas, ARN, lípidos, etc), para obter produtos útiles para as persoas.

Abarca tanto a biotecnoloxía tradicional, que utiliza a potencialidade dos organismos vivos para a obtención de produtos, bens ou servizos, como a biotecnoloxía moderna, que abarca un conxunto de técnicas que permiten a manipulación do material xenético (ADN) dos seres vivos coa finalidade de fabricar ou modificar un produto, ou desenvolver organismos con capacidades determinadas para usos específicos.

## 2. BIOTECNOLOXÍA TRADICIONAL: MICROBIOLOXÍA INDUSTRIAL

A microbioloxía industrial cultiva os microorganismos a gran escala para obter alimentos ou produtos industriais en grandes cantidades. Os microorganismos empregados nesta disciplina inclúe organismos naturais, mutantes seleccionados no laboratorio ou incluso organismos modificados xeneticamente.

### OBSERVA

#### PRINCIPAIS PRODUTOS DA MICROBIOLOXÍA INDUSTRIAL

- Compostos farmacéuticos e médicos.
  - Antibióticos
  - Hormonas (insulina, hormona do crecemento, etc.)
  - Esteroides transformados
  - Alcaloides
- Ácidos orgánicos (cítrico, láctico, acético, etc.)
- Aditivos alimentarios
  - Vitaminas
  - Aminoácidos
- Produtos industriais
  - Encimas
  - Acetonas
- Biocombustibles (hidróxeno, metano, etanol, etc.)

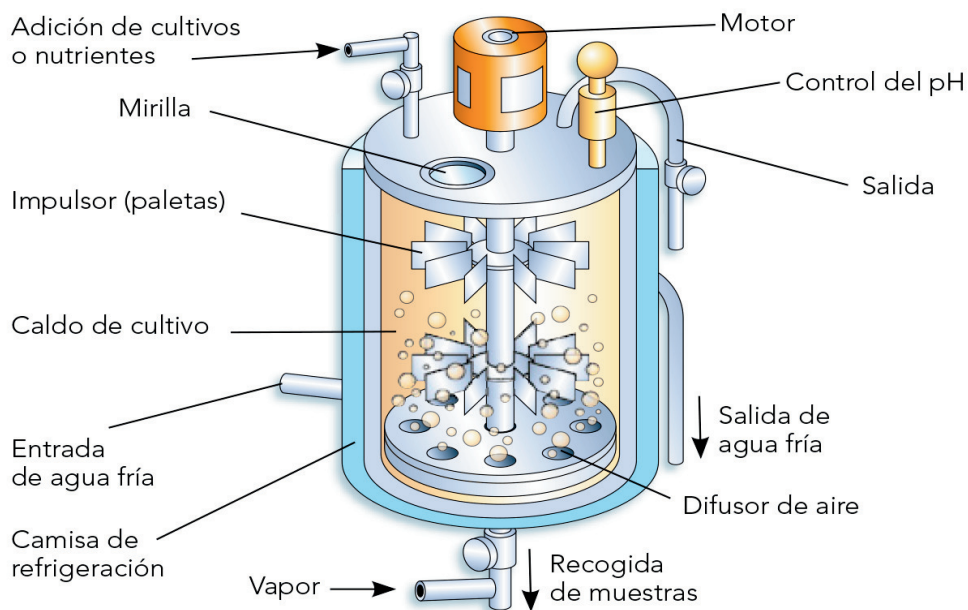


Requisitos dos microorganismos empregados en biotecnoloxía:

- Crecer rapidamente a gran escala en medios de cultivo líquidos
- Producir substancias de interese en curtos períodos de tempo
- Atoparse en cultivos que se poden manter durante longo tempo
- Ser xeneticamente estables e aptos para a manipulación xenética

A produción masiva de determinadas substancias derivadas da actividade dalgún destes microorganismos denomínase fermentación, impliquen ou non unha fermentación metabólica.

As fermentacións industriais realízanse en tanques chamados fermentadores ou biorreactores, que poden funcionar tanto en condicións aeróbicas como anaeróbicas.



**Figura 1.** Esquema dun fermentador. Consta dun depósito no que se introduce o medio apropiado para os microorganismos cos que se quere traballar, que se mesturan grazas ó impulsor. O control do pH e da temperatura son fundamentais para o bo desenvolvemento de todo o proceso.

## 3. OS MICROORGANISMOS NA INDUSTRIA BIOTECNOLÓXICA

### 3.1. OBTENCIÓN INDUSTRIAL DE ANTIBIÓTICOS

Os antibióticos son substancias químicas elaboradas por microorganismos, que inhiben ou matan o crecemento doutros microorganismos. Utilízanse principalmente con fines preventivos ou terapéuticos nas enfermidades infecciosas producidas por bacterias.

Moitos antibióticos están producidos por fungos filamentosos, dos xéneros *Penicillium* e *Aspergillus*, e por bacterias do grupo dos actinomicetos, que adoitan pertencer ao xénero *Streptomyces*.

Cando se identifica un novo produtor de antibiótico, realízase unha purificación e análise químico do axente microbiano. Despois, caracterízase estruturalmente a substancia e, se é bioloxicamente activo en cultivos celulares in vivo, pasa á fase de ensaio clínico en pacientes humanos (ou animais). Superada esta fase, prodúcese industrialmente en fermentadores a gran escala e, finalmente, refínase para obter un produto cristalino de alta pureza.

### 3.2. PRODUCCIÓN DE AMINOÁCIDOS

A biosíntese de determinados aminoácidos realízase con bacterias mutantes que son capaces de liberar ao medio de cultivo grandes cantidades destas substancias.

Un dos aminoácidos de interese industrial é o ácido L-glutámico, que se emprega na industria alimentaria como potenciador do sabor, ou na industria farmacéutica porque estimula a circulación sanguínea. Na produción deste aminoácido emprégase a bacteria *Corynebacterium glutamicum*, que transforma a glicosa en L-glutámico.

Esta mesma bacteria utilízase na obtención de L-lisina, un aminoácido que se emprega na industria alimentaria na formulación de pensos animais, ou na industria cosmética.

### 3.3. PRODUCCIÓN DE VITAMINAS

A obtención de vitaminas realízase mediante fermentación con fungos filamentosos como *Ashbya gossypii*, lévedos como *Candida famata*, ou bacterias como *Bacillus subtilis* ou *Pseudomonas denitrificans*.

A vitamina C é unha das máis producidas industrialmente pola súa utilidade na industria farmacéutica como suplemento, aditivo de cosméticos ou tratamento de queimaduras. Tamén é moi utilizada na industria alimentaria como conservante debido ás súas propiedades antioxidantes. A forma de obtención é variada, pero existe unha microalga, *Chlorella pyrenoidosa*, capaz de formar ácido-L-ascórbico en procesos de fermentación industrial.

### 3.4. BIOTRANSFORMACIÓN DE ESTEROIDES

Os esteroides empréganse principalmente na industria farmacéutica para a produción de fármacos con diversas finalidades: antiinflamatorios, inmunosupresores, terapia hormonal, etc. Estas substancias obtéñense mediante transformación encimática de diferentes precursores.

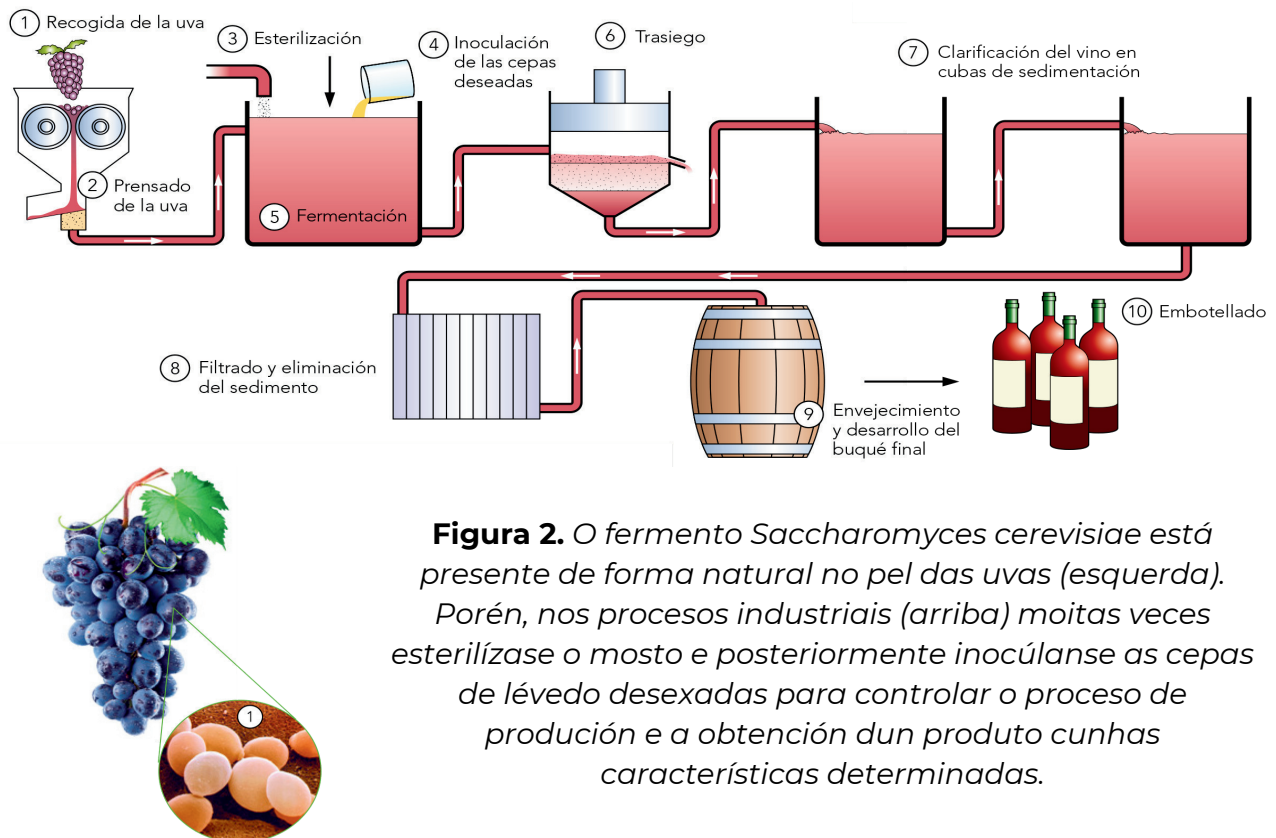
Na obtención de hormonas esteroides empréganse diversas substancias que son transformadas por diversos fungos dos xéneros *Mucor* e *Penicillium*, ou bacterias do xénero *Bacillus*.

### 3.5. USOS INDUSTRIAIS DOS FERMENTOS

Os fermentos son microorganismos eucariotas unicelulares moi empregados nos procesos industriais. En case todos eles participan os lévedos descendentes da cepa silvestre da especie *Saccharomyces cerevisiae*, empregada dende a antigüidade para fabricar viño e cervexa.

#### Produción de viño

Esta bebida alcólica obtense da fermentación alcólica de zumes de froitas, fundamentalmente da uva. A enoloxía é a ciencia que trata da produción do viño.



**Figura 2.** O fermento *Saccharomyces cerevisiae* está presente de forma natural no pel das uvas (esquerda). Porén, nos procesos industriais (arriba) moitas veces esterilízase o mosto e posteriormente inocúlanse as cepas de lévedo desexadas para controlar o proceso de produción e a obtención dun produto cunhas características determinadas.

#### Elaboración de pan

Os panaderos utilizan os fermentos da especie *Saccharomyces cerevisiae* nun formato prensado e seco que mantén as células vivas e biolóxicamente activas. Neste caso, o lévedo engádesse á masa de pan húmida, de tal forma que os azucres da fariña son fermentados e transformados en etanol e dióxido de carbono. Este gas acumúlase en burbullas dentro da masa, facendo que esponxe. Ó cociñarse tanto o alcol como o dióxido de carbono evapóranse e os lévedos morren.

A elaboración dalgúns tipos de pan acedos emprega bacterias lácticas do xénero *Lactobacillus* que lles confiren un sabor característico.

### 3.6. OBTENCIÓN DE DERIVADOS LÁCTEOS

A fabricación de iogur, manteiga, queixo e outros derivados lácteos, realízase mediante o proceso de fermentación láctica e implica a participación de diferentes microorganismos, entre eles as bacterias do ácido láctico que se atopan de forma natural no leite.

Na fabricación dalgúns tipos de queixo, primeiro o leite transfórmase en coallada por acción de bacterias como *Streptococcus cremoris* ou *Streptococcus lactis*, que consumen a lactosa e producen ácido láctico. Como consecuencia, prodúcese unha baixada de pH que provoca a coagulación das proteínas do leite. A continuación prodúcese a maduración do queixo, proceso no que tamén poden participar diversos microorganismos: bacterias anaerobias que maduran o seu interior, e fermentos e mofos, que o fan no seu exterior.

### 3.7. OBTENCIÓN DE VINAGRE

O vinagre, produto amplamente empregado na alimentación e na limpeza, obtense por fermentación que realizan as bacterias do xénero *Acetobacter*. Estas bacterias oxidan o etanol e transfórmanse en ácido acético en condicións aeróbicas. O proceso industrial de produción de vinagre complétase nunhas poucas horas grazas á aireación que se introduce nos biorreactores.

### 3.8. OBTENCIÓN DE ÁCIDO CÍTRICO

O ácido cítrico é unha substancia empregada na industria alimentaria como aditivo e conservante de certos produtos alimenticios. Na súa produción industrial emprégase o mofo *Aspergillus niger*, que emprega a glicosa ou a sacarosa como fonte de carbono para producir máis ácido cítrico do que consume no ciclo de Krebs, exportando este exceso fóra da célula.

### 3.9. TRATAMENTO DE AUGAS RESIDUAIS

O tratamento secundario das augas residuais urbanas consiste na eliminación de materia orgánica disolta e suspendida. Na maioría dos casos, empréganse bacterias aerobias que consumen os compoñentes orgánicos destas augas.

Tamén no tratamento terciario, que se realiza condo a auga se descarga a un ecosistema sensible, se empregan bacterias polifosfato para eliminar o exceso de fósforo da auga, e bacterias nitrificantes para eliminar o nitróxeno.

### 3.10. BIORREMEDIACIÓN

A biorremediación consiste na utilización de organismos para eliminar ou neutralizar contaminantes no solo ou na auga. Nos procesos de biorremediación poden empregarse plantas (fitorremediación), microorganismos (biorremediación microbiana) ou encimas producidas en bacterias (biorremediación encimática).

Na biorremediación microbiana apróveitanse a capacidade natural que teñen certos microorganismos de transformar moléculas orgánicas en substancias máis pequenas que resultan menos tóxicas.

# 4. BIOTECNOLOXÍA MODERNA: ENXEÑERÍA XENÉTICA

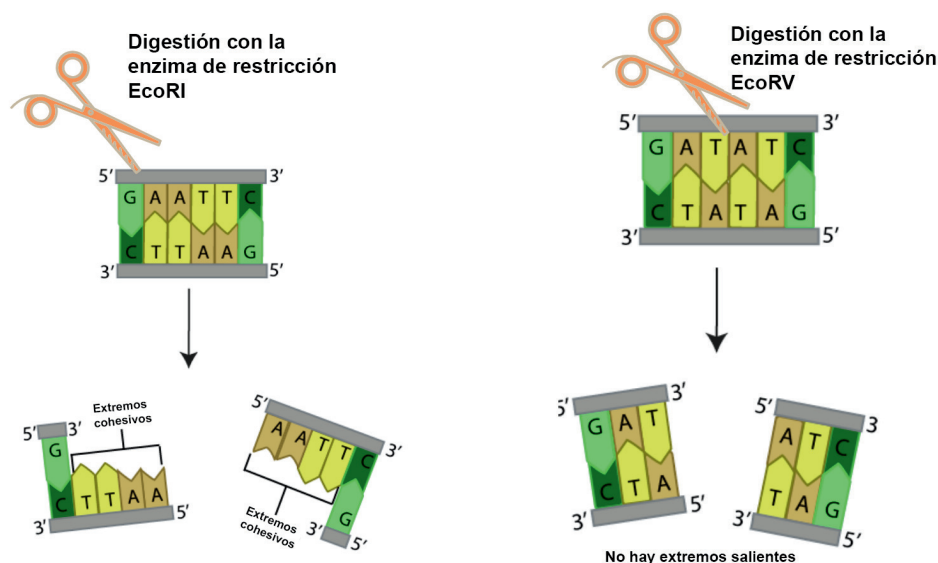
A biotecnoloxía moderna emprega técnicas de enxeñería xenética para manipular os xenes dun organismo coa fin de modificalos, silencialos, duplicalos ou transferilos duns a outros e así obter organismos xeneticamente modificados. Para elo emprega a tecnoloxía do ADN recombinante, xunto con outras como a reacción en cadea da polimerase, a secuenciación e a análise de fragmentos de ADN, a edición xenómica mediante CRISPR/Cas9, a reprogramación e a clonación celular, e o cultivo de células e tecidos.

## 2.1. TECNOLOXÍA DO ADN RECOMBINANTE

O ADN recombinante é o resultado da unión de fragmentos de ADN sintéticos ou procedentes de organismos diferentes.

Esta tecnoloxía desenvolveuse a partir do descubrimento das endonucleases ou encimas de restricción na década de 1960. Estas encimas son producidas de forma natural polas bacterias, que as empregan para defenderse dos ADN alleos que podan penetrar nelas (por exemplo, o ADN dun bacteriófago).

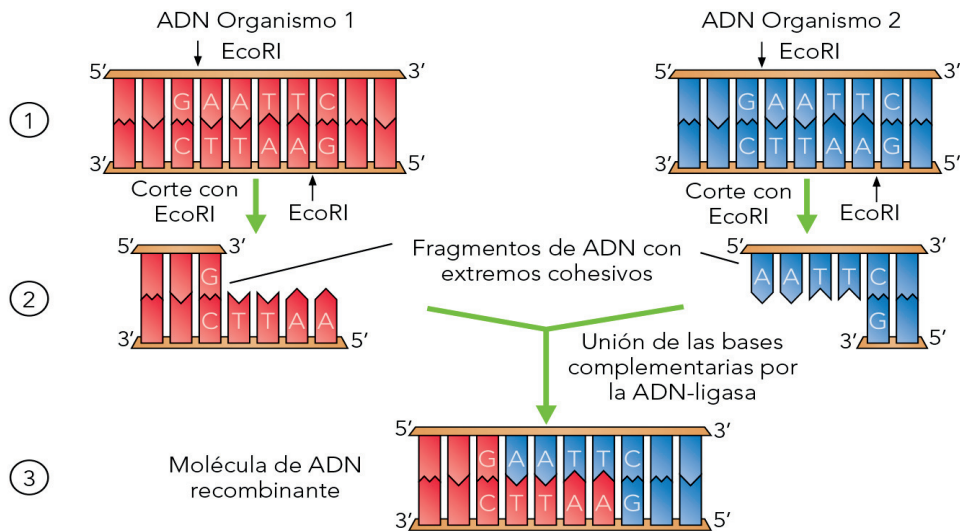
As encimas de restricción teñen a capacidade de cortar o ADN por lugares específicos. Actúan recoñecendo certas secuencias de ADN (normalmente palíndromos) coñecidas como sitios de restricción, cortando a continuación as dúas cadeas de ADN por ese lugar. É por isto mesmo que tamén se coñecen como 'tesoiras moleculares'. Os fragmentos resultantes da actividade dunha encima de restricción chámanse fragmentos de restricción.



**Figura 3.** As encimas de restricción recoñecen secuencias específicas no ADN e córtano por lugares específicos deixando dous tipos de bordos. Os extremos cohesivos (esquerda) posúen rexións desaparelladas que facilitan a unión doutras secuencias con ese mesmo tipo de bordo. Este tipo de bordos obtéñense cando as encimas de restricción producen un corte asimétrico na molécula de ADN. Os extremos romos (dereita) non posúen nucleótidos desaparellados e son o resultado do corte simétrico das encimas de restricción.

Para obter ADN recombinante, séguense os seguintes pasos:

- Obtención de fragmentos de ADN: as dúas secuencias que se queren unir, córtanse coa mesma encima de restrición que deixe extremos cohesivos, de forma que en ámbalas dúas se xeneran extremos de ADN monocatenarios complementarios entre si.
- Unión dos fragmentos de restrición: os fragmentos obtidos no paso anterior, mestúranse e incúbanse xunto cunha ADN ligase. Os extremos complementarios de ambos fragmentos hibridarán mediante o establecemento de pontes de hidróxeno entre bases complementarias; e a ADN ligase unirá as respectivas cadeas de nucleótidos, mediante a formación de enlaces fosfodiéster entre os nucleótidos implicados.



**Figura 4.** Obtención de ADN recombinante

## 2.2. A CLONACIÓN 'IN VIVO' DO ADN

A clonación do ADN consiste na obtención de múltiples copias dun fragmento de ADN de interese.

A clonación '*in vivo*' consiste na introdución do fragmento de ADN que se quere clonar no interior dunha célula, de modo que esta o replique e dea lugar a varias copias idénticas do mesmo.

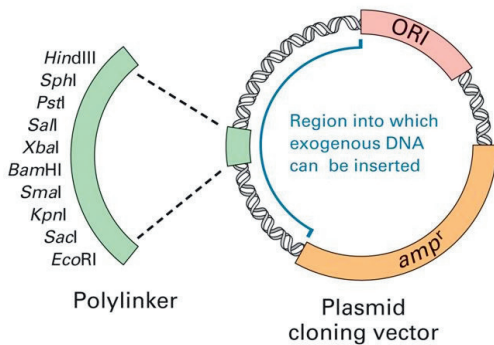
Os hospedadores nos que se introducen os fragmentos de ADN para a súa clonación poden ser bacterias ou organismos eucariotas unicelulares. Estes organismos cumpren unha serie de requisitos que os fan aptos para o procedemento:

- Son de crecemento rápido, o que permite obter varias xeracións en pouco tempo.
- Non son patóxenos.
- Favorecen a entrada do ADN no seu interior e o incorporan ó seu mecanismo de replicación.
- Son fácilmente manipulables.

Para introducir un fragmento de ADN no hospedador empréganse vectores de clonación, que son moléculas de ADN capaces de transportar ADN exógeno e de replicarse dentro do organismo hospedador. Todos eles deben reunir certas características:

- Deben ter a súa propia orixe de replicación.
- Deben portar xenes marcadores que sirvan para a súa rápida e doada identificación: resistencia a antibióticos, síntese dalgunha proteína fácilmente detectable, etc.

Existen diferentes vectores de clonación, que se empregarán en función do tamaño do fragmento de ADN que se quere clonar. Uns dos máis empregados son os plásmidos, que son moléculas de ADN bicatenario, de pequeno tamaño e estrutura circular pechada, presentes de forma natural no citoplasma de moitas bacterias. Non forman parte do cromosoma bacteriano e teñen capacidade para replicarse de forma independente, xa que posúen a súa propia orixe de replicación. Ademais, moitos plásmidos levan xenes que lles confiren resistencia a antibióticos. Os plásmidos empregados na actualidade están baseados en plásmidos bacterianos pero están modificados para conter dianas para múltiples encimas de restricción, diferentes xenes de resistencia a antibióticos e outras secuencias que facilitan a súa estabilidade e detección.



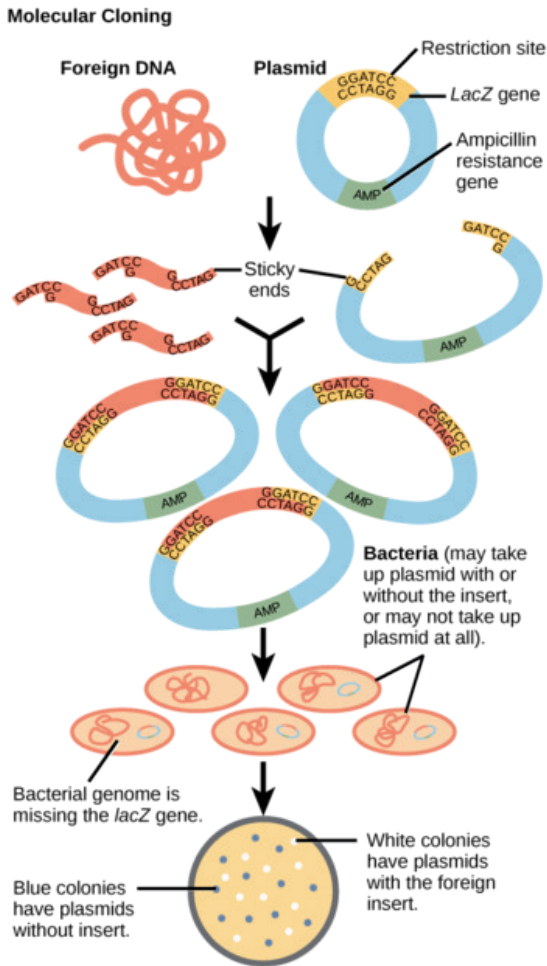
**Figura 5.** Estrutura básica dun plásmido de clonación. Ccontén unha orixe de replicación (ORI) que permite a súa autoduplicación independente da replicación do ADN xenómico da bacteria. Tamén posúe un ou máis xenes de resistencia a antibióticos, neste caso a ampicilina (*amp<sup>r</sup>*). É importante tamén que inclúa un lugar con múltiples dianas para diferentes encimas de restricción; nese lugar será onde se inserten os fragmentos de ADN exógenos que interesen.

Procedemento para a clonación 'in vivo':

- Obtención dun plásmido recombinante formado polo plásmido e o xen que se desexa clonar mediante a tecnoloxía do ADN recombinante.
- Transformación das bacterias. Consiste na incorporación do plásmido recombinante nunha bacteria mediante diferentes técnicas:
  - Choque térmico: consiste en someter as bacterias a cambios bruscos de temperatura, o que favorece a formación de poros na súa membrana.
  - Electroporación: consiste en aplicar unha breve descarga eléctrica de alta voltaxe, o que provoca a apertura transitoria de poros na membrana.
  - Biolística: consiste no bombardeo das células con microesferas de tungsteno ou ouro recubertas co ADN recombinante.
- Selección das bacterias recombinantes (as que incorporaron o plásmido recombinante): para iso cultívanse as bacterias sobre unha placa de Petri empregando un medio de cultivo cun antibiótico (normalmente ampicilina) e *X-gal*, unha substancia semellante á lactosa. Neste medio de cultivo só crecerán as bacterias que incorporaron o plásmido, pois son as que tamén incorporan a resistencia ó antibiótico usado. Para diferenciar as que posúen un plásmido recombinante daquelas que conteñen un plásmido baleiro, empréganse a actividade  $\beta$ -galactosidase. É frecuente que os plásmidos empregados levan o xene desta encima modificado para que as dianas das encimas de restricción máis frecuentes o rompan polo medio. Cando se incorpora o fragmento de ADN de interese, o xene queda interrompido e non se formará encima, polo que a bacteria non poderá degradar o *X-gal*. Se o plásmido non incorpora o fragmento de ADN porque se volve pechar sobre sí mesmo, reconstitúese este xene, a bacteria pode sintetizar a

encima e degradará o *X-gal*, cuxo produto ten cor azul. Na placa de Petri obtense colonias de bacterias brancas e azuis; as primeiras non dixeriron o *X-gal*, polo que son as que incorporaron un plásmido co xene de interese.

- Obtención masiva das bacterias recombinantes co fragmento de ADN recombinante en medio de cultivo líquido.
- Illamento do plásmido recombinante, que posúe o xen de interese na súa estrutura.



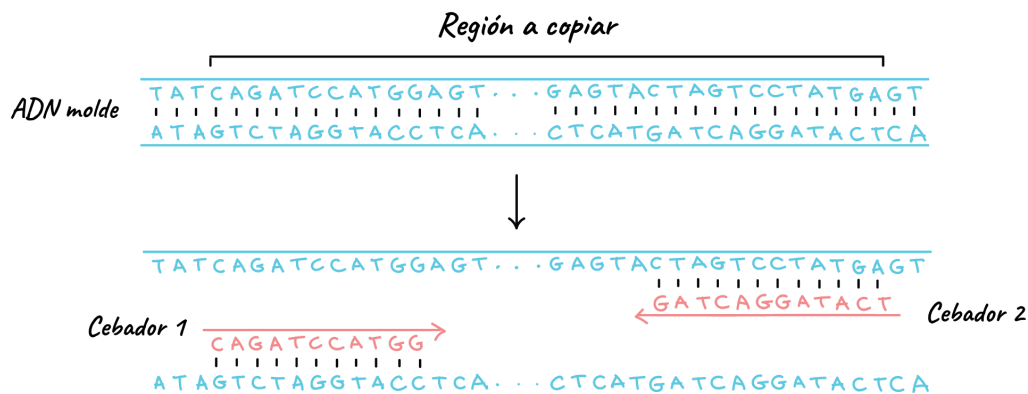
**Figura 6.** Clonación 'in vivo' de ADN recombinante. Primeiro obtense un ADN recombinante insertando nun plásmido a secuencia de ADN que se quere clonar. Con este ADN recombinante transfórmanse bacterias e cultívanse nun medio selectivo con antibiótico, de tal forma que só medran as que incorporen o plásmido co xen de resistencia a dito antibiótico. No medio de cultivo tamén se engade *X-gal*, unha substancia que é substrato da  $\beta$ -galactosidase, unha encima do sistema operón-*lac*. Con este sistema pódense diferenciar as bacterias que incorporaron un plásmido recombinante (brancas) das que incorporaron o plásmido sen o ADN de interese (azuis).

## 2.4. CLONACIÓN 'IN VITRO' DO ADN: A REACCIÓN EN CADEA DA POLIMERASE (PCR)

A técnica de PCR permite amplificar ADN *in vitro*, sen necesidade de células vivas, o que permite ter un elevado número de copias dun fragmento de interese en moi pouco tempo. A reacción lévase a cabo en tubos eppendorf, onde se mesturan os seguintes compoñentes:

- A mostra de ADN a amplificar.
- Cebadores: pequenas cadeas de nucleótidos complementarias ás secuencias de ADN que flanquean o xene que queremos copiar.

- Os catro tipos de desoxirribonucleótidos trifosfato (Dntp; dATP, dGTP, dCTP, dTTP).
- Unha ADN polimerase resistente á calor, obtida a partir da bacteria termófila *Thermus aquaticus* (Taq-polimerase).



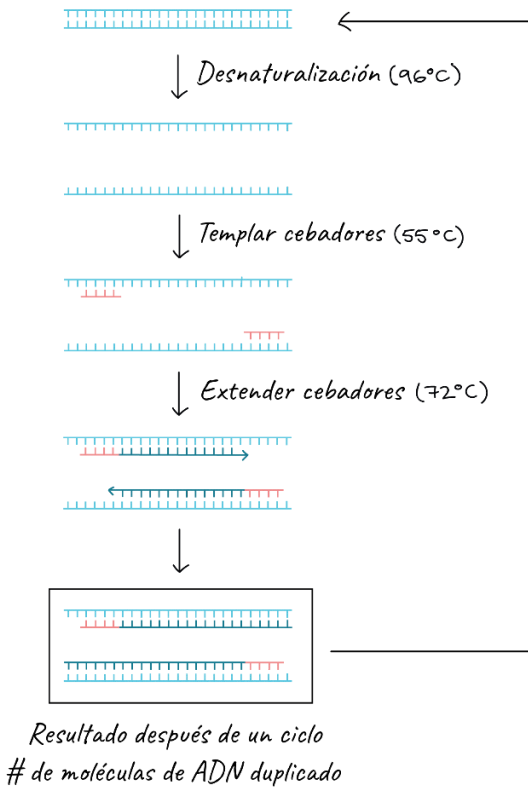
**Figura 7.** Na PCR sempre se empregan dous cebadores para cada fragmento que se quere amplificar. Un deles é complementario a unha secuencia flanqueante á este fragmento nunha das cadeas de ADN; o outro é a outra secuencia contigua á de interese na cadea complementaria, de tal forma que, entre os dous, acotan a rexión do cromosoma que se quere amplificar.

A PCR realízase nuns aparellos chamados termocicladores nos que se repite entre 25-35 veces un ciclo que consta de tres etapas:

- Desnaturalización do ADN: a mostra quéntase a 95 °C durante un minuto para que se separen as dúas febras que forman a dobre hélice.
- Hibridación: a mostra arrefríase ata os 50-60 °C para permitir a unión dos cebadores. Canto maior temperatura se empregue neste proceso, maior especificidade terá a reacción. O deseño dos cebadores debe ter en conta este aspecto tanto no que se refire á súa lonxitude como ó seu contido en GCs.
- Elongación da cadea: a Taq polimerase, que traballa a 72 °C, copia as cadeas do ADN molde a partir dos cebadores.

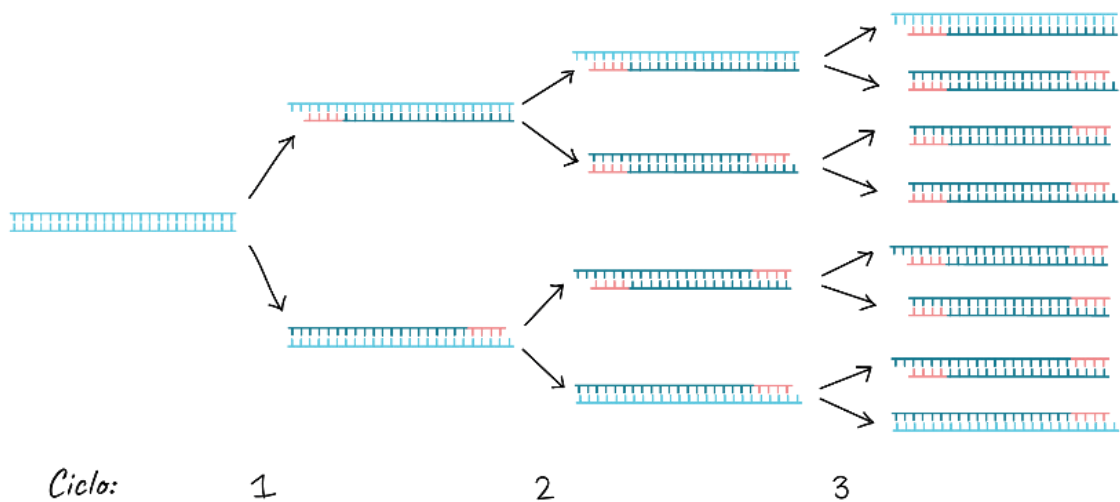
#### Aplicacións da PCR

- Secuenciación. A PCR xera suficiente cantidade de ADN para a súa secuenciación.
- Bioloxía evolutiva. Debido á súa capacidade para traballar con pequenas cantidades de ADN de baixa calidade, a PCR foi utilizada para amplificar e clonar ADN de restos humanos momificados e mesmo restos de seres extinguidos. Por outra banda, mediante o estudo de similitude de secuencias pódense construír árbores filoxenéticas.
- Estudos de mapeo. A PCR utilizouse para conseguir o mapa do xenoma humano.
- Diagnóstico. Foi empregada para o diagnóstico prenatal de enfermidades hereditarias a partir de células coriónicas ou tomadas do líquido amniótico. Tamén se emprega para o diagnóstico de enfermidades infecciosas como a tuberculose, a amigdalite bacteriana ou o SARS-CoV-2.
- Medicina forense e probas de paternidade. Recóllese ADN en cantidades moi pequenas de restos de sangue, pelo, tecido ou seme e aplícase a técnica chamada “pegada xenética”.



Repetir  
25-35 X

**Figura 8.** Un ciclo da PCR consta de 3 pasos (esquerda) que se repiten entre 25 e 35 veces, o que permite obter un gran número de copias ( $2^n$ ) dun fragmento de ADN dunha forma rápida (abaixo). Por iso esta técnica é a idónea para facer copias de mostras con pouca cantidade de ADN inicial ou con ADN deteriorado e fragmentado.

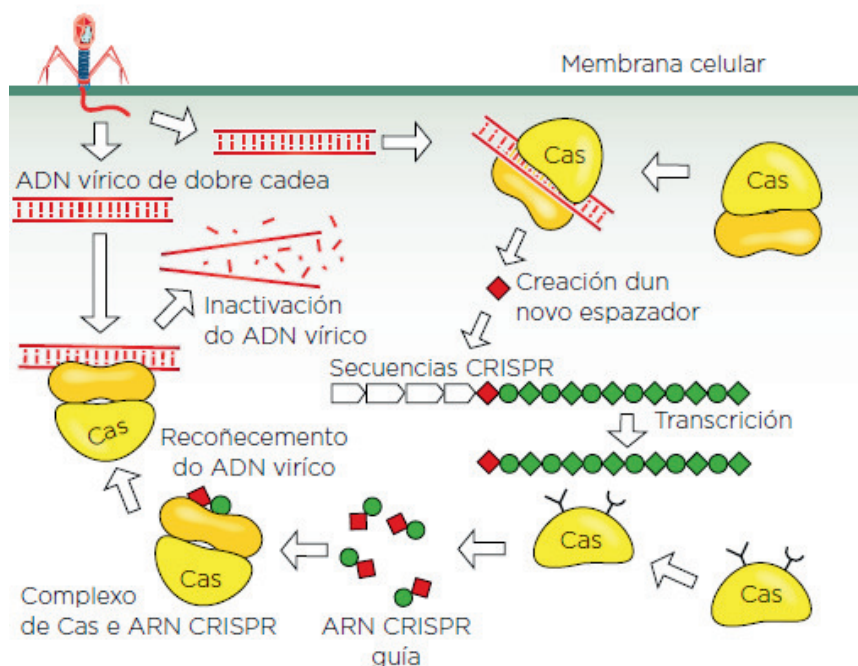


## 2.6. A TECNOLOXÍA CRISPR/Cas9

As secuencias CRISPR (repeticións palindrómicas curtas agrupadas e regularmente espazadas) son secuencias repetidas, separadas entre si mediante secuencias espazadoras (PAM), que están presentes no xenoma de moitas bacterias e que conteñen secuencias de ADN de virus que infectaron previamente esas bacterias. Asociadas a estas secuencias encóntranse os xenes *Cas*, que codifican para endonucleases que cortan o ADN de forma específica.

O científico español Francisco Juan Martínez Mojica descubriu que estas secuencias CRISPR son unha especie de memoria inmunitaria que as bacterias utilizan como medio de defensa fronte a infeccións virais ás que xa fixeron fronte no pasado. As secuencias CRISPR xeran fragmentos de ARN que as proteínas *Cas* recoñecen e toman como guía para cortar as secuencias complementarias dos virus. Así deféndense de novas infeccións virais.

## Xeración de secuencias CRISPR en bacterias

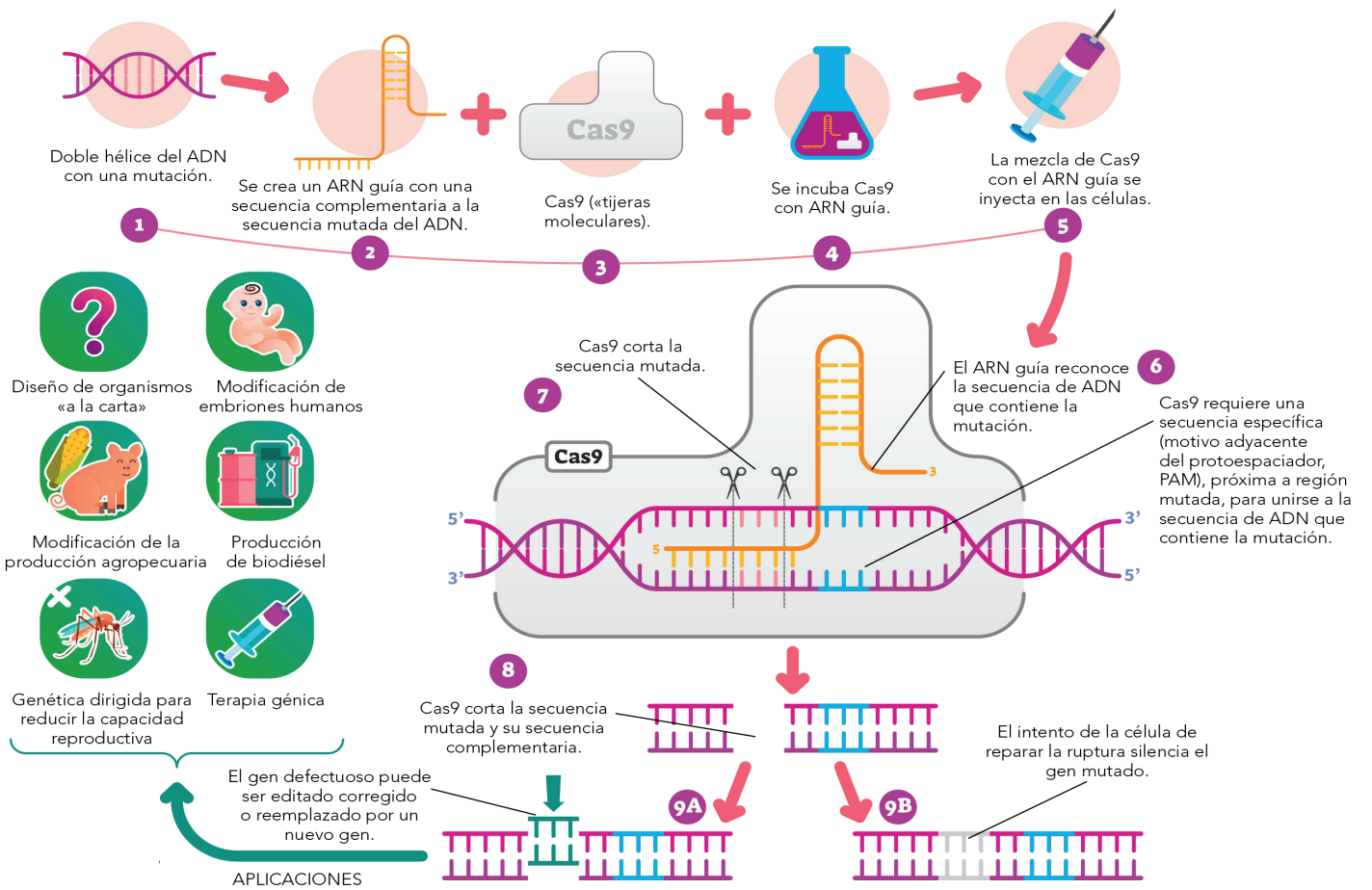


**Figura 10.** O sistema CRISPR/Cas é empregado polas bacterias como un sistema de 'memoria' que utilizan como defensa fronte a infeccións de bacteriófagos.

A tecnoloxía CRISPR/Cas9 foi desenvolvida polas investigadoras Emmanuelle Charpentier e Jennifer Doudna, que aplicaron esta ferramenta molecular para editar xenos.

A aplicación da tecnoloxía CRISPR/Cas9 segue estes pasos:

- Deséñase un ARN guía complementario a unha secuencia concreta do ADN. Ese ARN será recoñecido pola endonucleasa Cas9.
- A Cas9 corta o ADN complementario ao ARN guía.
- Despois interveñen os mecanismos celulares naturais de reparación do ADN, que poden actuar de dúas formas:
  - Poden pechar o corte de xeito impreciso, provocando insercións ou deleccións que inactivan o xene.
  - Poden encher o corte incorporando, por recombinación homóloga, unha secuencia que se introduce artificialmente na célula, de modo que o xene queda editado (modificado).



**Figura 11.** Edición xenómica empleando a tecnología CRISPR/Cas9