

TEMA 13. BIOTECNOLOXÍA

Índice

1. A TECNOLOXÍA DO ADN RECOMBINANTE
2. CLONACIÓN DO ADN
3. AMPLIFICACIÓN DE ADN MEDIANTE A PCR
4. A SECUENCIACIÓN DO ADN
5. CLONACIÓN EN ORGANISMOS PLURICELULARES. REPROGRAMACIÓN
6. A EDICIÓN XENÉTICA: O SISTEMA CRISPR-Cas
7. APLICACIÓNS DA BIOTECNOLOXÍA
8. IMPLICACIÓNS ÉTICAS DA BIOTECNOLOXÍA

1. A TECNOLOXÍA DO ADN RECOMBINANTE

Dende antigo, as persoas modificaron os seres vivos para obter produtos coma o pan, a cervexa, o queixo, etc. Estas técnicas, xunto con outras moitas, son coñecidas co nome de **biotecnoloxía**. É dicir, a biotecnoloxía é o conxunto de técnicas mediante as cales os seres humanos obteñen ou melloran produtos a partir doutros seres vivos.

A **enxeñaría xenética** é unha das ramas da biotecnoloxía, na cal se manipulan directamente os xenos para controlar a súa expresión. Entre as súas aplicacións destacan a produción de novas substancias beneficiosas, a eliminación doutras perigosas, a curación de enfermidades, etc.

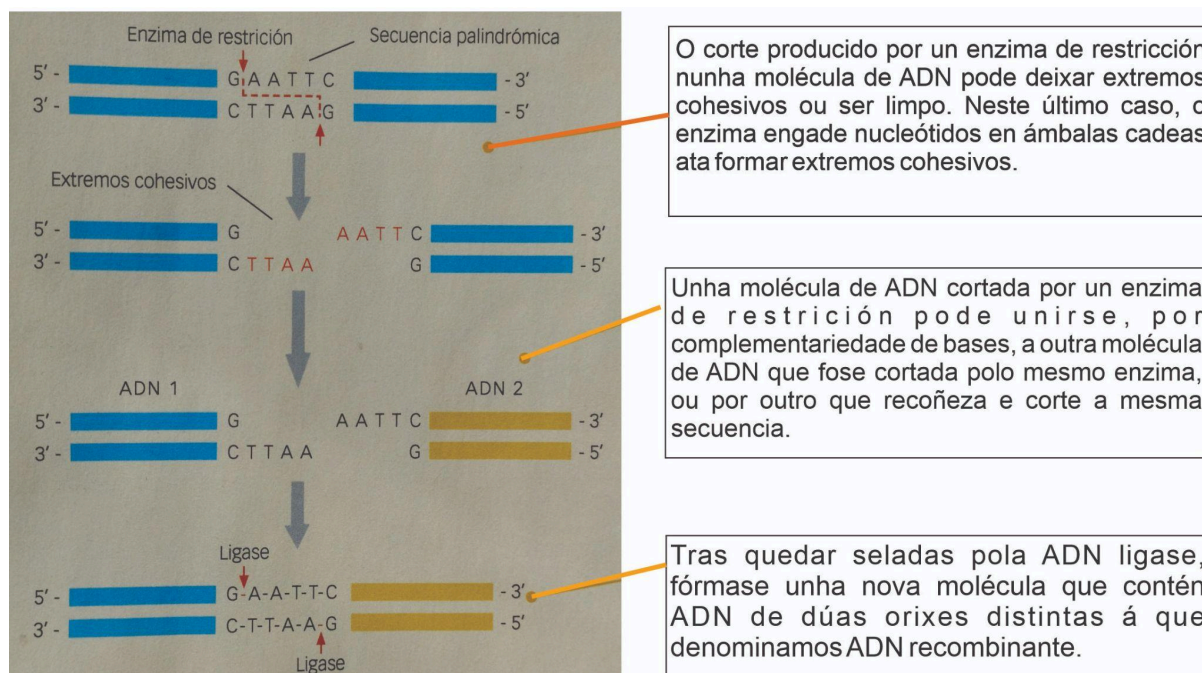
Ó longo deste tema imos ir estudando as diferentes técnicas empregadas en biotecnoloxía, poñendo especial fincapé naquelas relacionadas coa enxeñaría xenética, dende as primeiras que foron empregadas, como o uso dos enzimas de restricción e o ADN recombinante, ata as últimas ferramentas, en pleno desenvolvemento e evolución na actualidade, como a técnica CRISPR.

1.1. Enzimas de restricción e ADN recombinante

Os enzimas de restricción son endonucleasas, un tipo de enzimas que cortan os enlaces fosfodiéster do ADN e actúan sobre determinadas secuencias curtas de ADN palindrómicas, é dicir, que se len igual nunha cadea e en sentido inverso na súa complementaria, e cortan dentro delas.

Para nomear os enzimas de restricción:

- Primeiro úsase a abreviatura da bacteria onde se descubriron, por exemplo, Eco por *E. coli*.
- A continuación indícase a súa natureza, por exemplo unha R por restricción.
- Por último asígnaselle un número en función da orde en que foron descubertos, por exemplo, EcoRI.



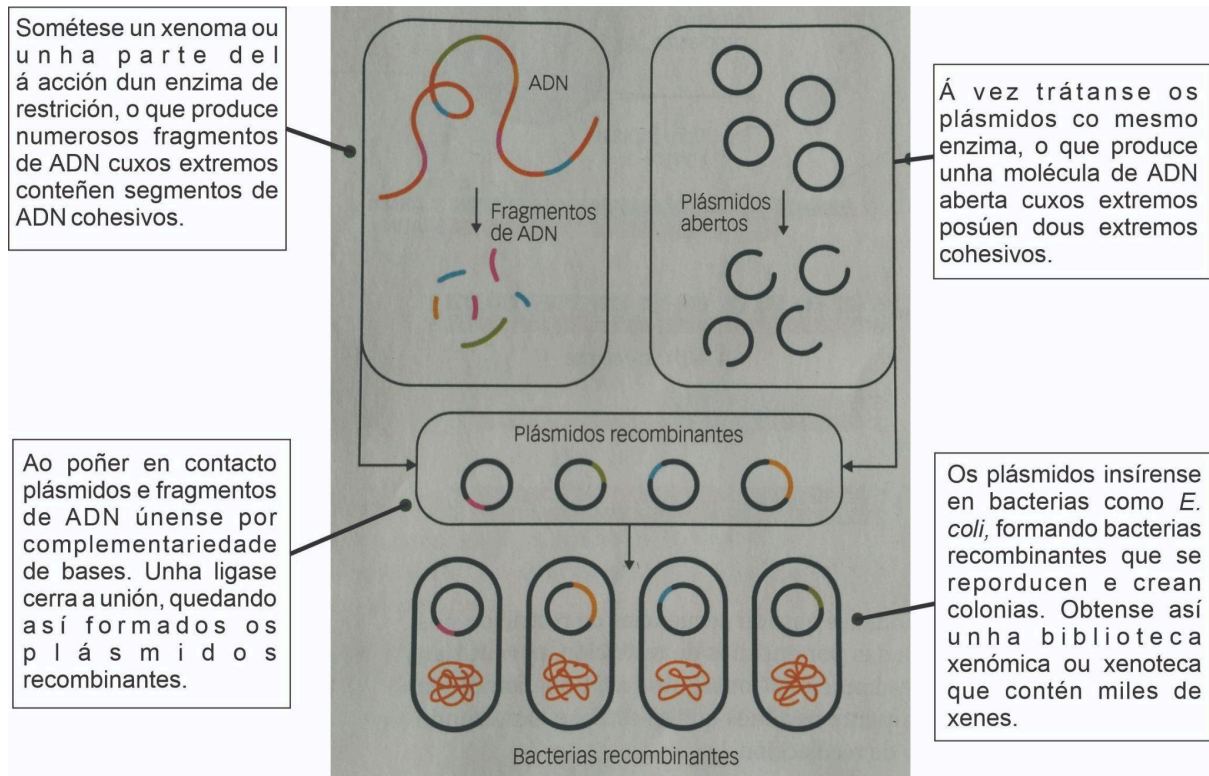
2. CLONACIÓN DO ADN

En bioloxía molecular, un **clon** é unha molécula idéntica a outra da que procede. Mediante a tecnoloxía do ADN recombinante é posible clonar o ADN para conseguir un xene ou un xenoma. Para isto necesítase ADN do organismo doador, enzimas de restricción, un vector de clonación e un organismo receptor.

O vectores de clonación son axentes biolóxicos empregados para introducir material xenético nunha célula. Existen varios tipos:

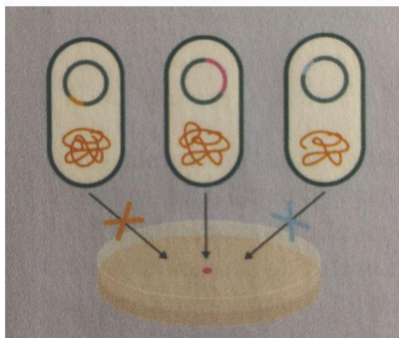
- **Plásmidos.** Divídense de forma coordinada coa célula que os contén. Poden transportar ata 10 kpb (kilo pares de bases) de ADN.
- **Virus bacteriófagos.** Especialmente o fago λ , cuxo ADN pode ser fragmentado por enzimas de restricción e recombinarse co ADN doante. A infección fática por bacterias é moi rápida. Poden transportar ata 15 kpb de ADN.
- **Cósmidos.** Moléculas circulares híbridas de fago λ e plásmidos bacterianos. Introdúcense *in vitro* en fagos e penetran nas bacterias por infección. Poden introducir ata 45 kpb de ADN.
- **Cromosomas bacterianos artificiais (BAC).** Constrúense a partir de plásmidos F bacterianos e poden albergar ata 500 kpb de ADN.
- **Cromosoma artificial de lévedos (YAC).** De gran tamaño, utilízase en células eucariotas e poden transportar ata 1000 kpb.

O procedemento simplificado segue os seguintes pasos:



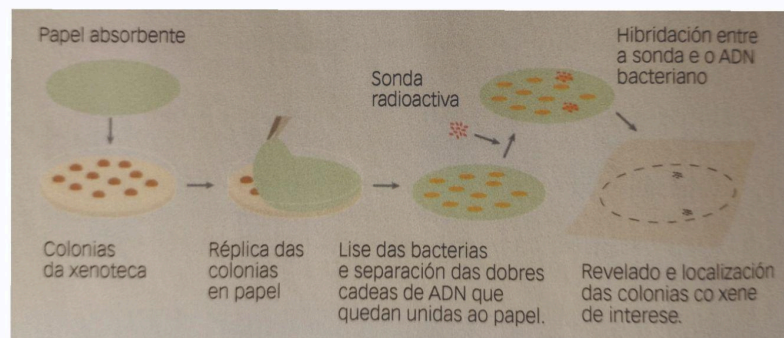
Método directo

Seméntanse as bacterias recombinantes nun medio que permite só o crecemento das que conteñen o xene de interese. Non sempre é posible.



Método indirecto

Un fragmento de ADN monocatenario, chamado **sonda**, complementario do ADN do xene e marcado radioactivamente, permite só a hibridación con este. A radioactividade marca unha película superposta (autorradiografía) e así indica ás colonias portadoras o xene buscado.



2.1. Xenotecas de ADN complementario

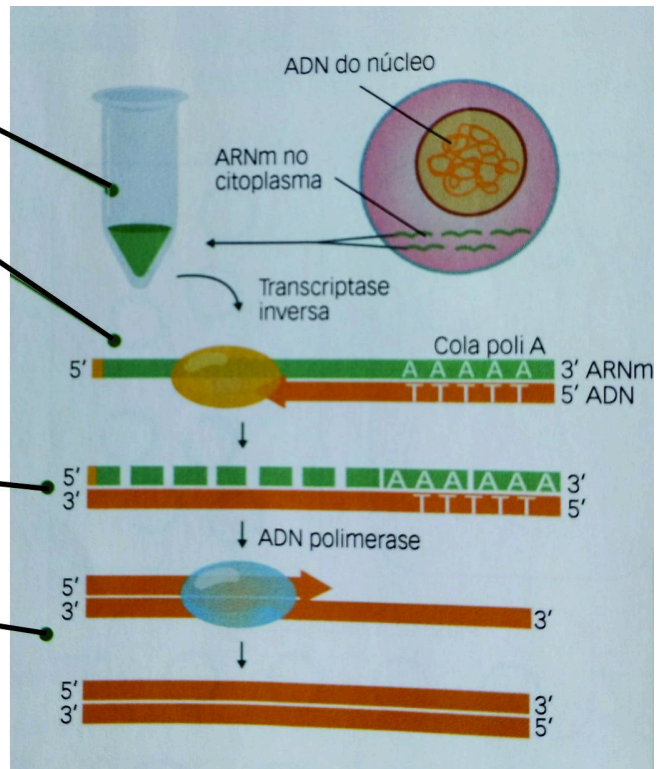
As xenotecas xenómicas conteñen xenes completos que en organismos eucariotas posúen exóns e intróns. Se só se desexa clonar os exóns, pódense preparar xenotecas a partir do ARN celular.

Extracción do ARNm do citoplasma.

Adición da transcriptase inversa para producir ADN fr cadea sinxela a partir de ARNm.

Eliminación enzimática do ARNm.

Adición da ADN polimerase para que sintetice unha dobre cadea complementaria da primeira.



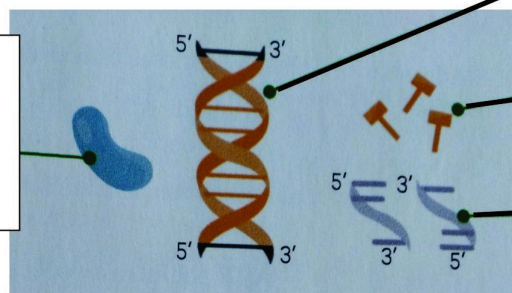
A este ADN complementario pódense engadir secuencias de restrición nos seus extremos que, ao ser cortadas por enzimas de restrición permitirán a súa inserción en vectores de clonación. Conséguese así unha xenoteca de ADNc que representa unicamente os xenes que se estaban expresando a ARN mensaxeiro no momento da recolección.

3. AMPLIFICACIÓN DE ADN MEDIANTE A PCR

A **reacción en cadea da polimerasa** ou **PCR** (*Polimerase Chain Reaction*) é un procedemento que permite obter unha cantidade moi elevada de copias dun ADN a partir dunha pequena mostra. Por esta razón é tamén unha ferramenta potente para usarse en combinación con clonación de xenes mediante un vector adecuado que o introduza nas células diana.

Para desenvolver a PCR necesítase:

ADN polimerase resistente á calor. Adóitase usar Taq, extraída da bacteria termófila *Thermus aquaticus* que pode funcionar a 74°C.



Mostra do ADN que se quere amplificar.

Cantidades suficientes dos catro nucleótidos.

Dous cebadores de ADN monocatenario, complementarios das secuencias extremas dunha e outra cadea dobre da mostra de ADN

Primeiro ciclo

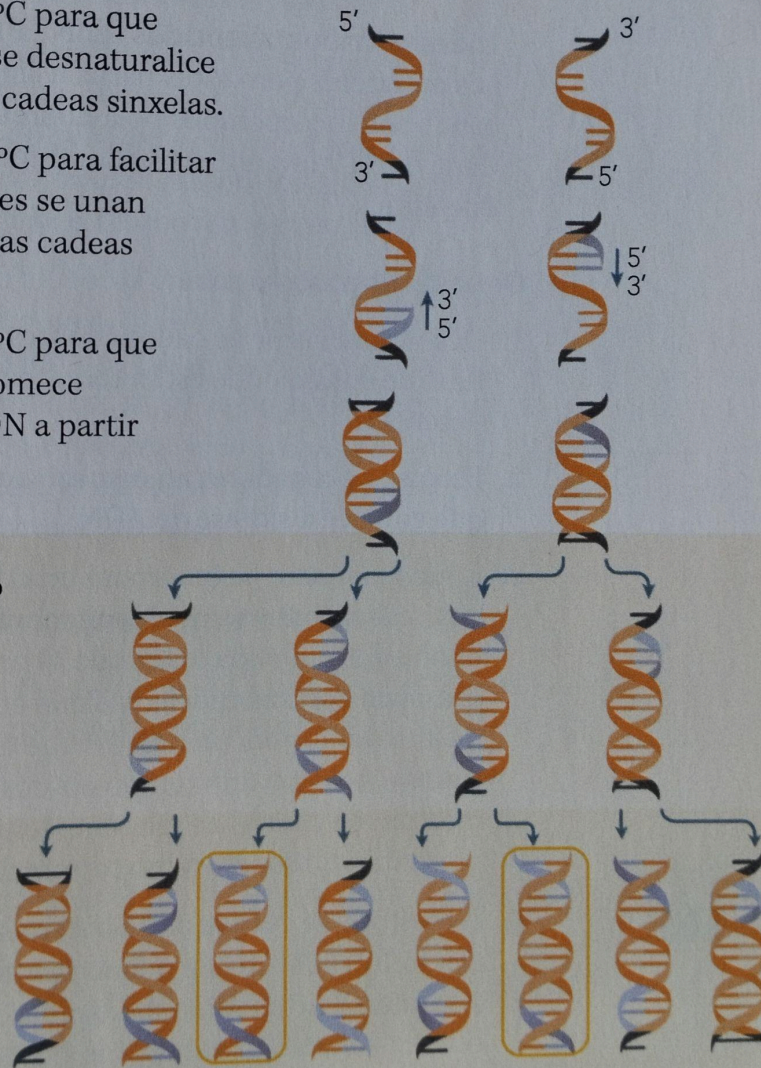
Quéntase a 94 °C para que a dobre hélice se desnaturalice e se separen as cadeas sinxelas.

Arrefríase a 55 °C para facilitar que os cebadores se unan aos extremos das cadeas sinxelas.

Quéntase a 74 °C para que a polimerase comece a síntese de ADN a partir dos cebadores.

Segundo ciclo

Terceiro ciclo



Ao rematar o terceiro ciclo xa se dispón de dúas moléculas idénticas en tamaño e secuencia ao ADN orixinal. A partir de aquí, o número de moléculas producidas crece en progresión xeométrica. Oa cabo dunhas horas obtéñense millóns de copias do fragmento inicial.

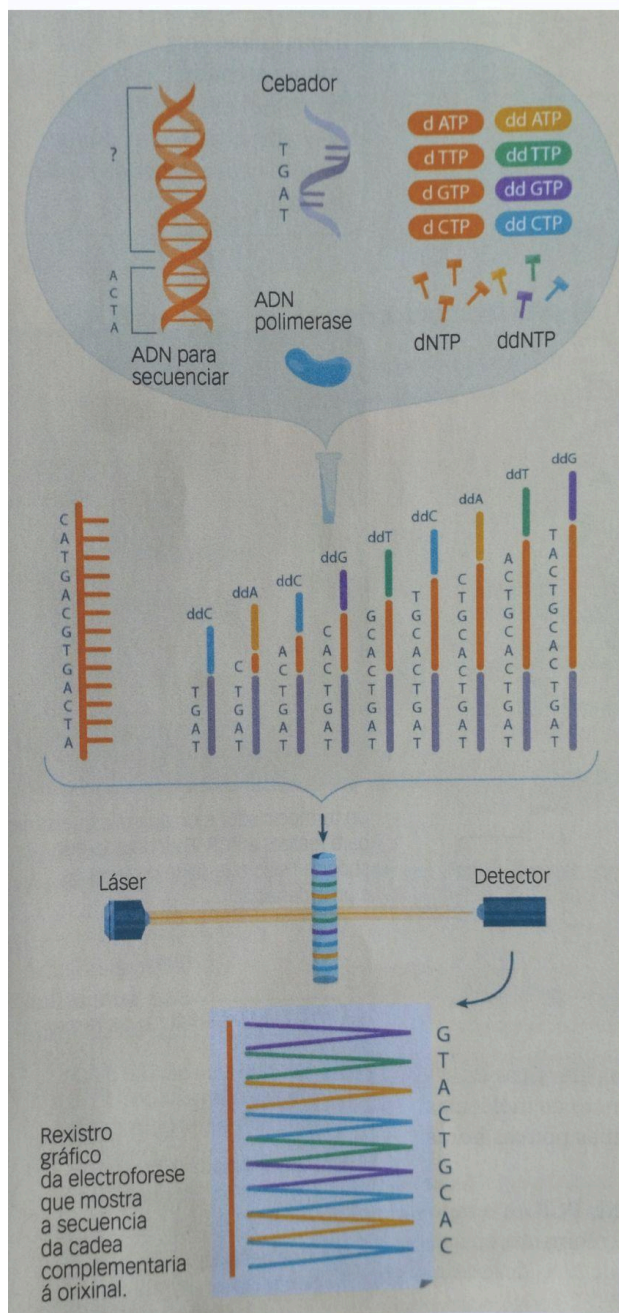
Actualmente un perfeccionamento desta técnica denominado PCR en tempo real permite medir a cantidade de ADN amplificado en cada momento, co que se pode deter o proceso cando se dispoña da cantidade desexada de ADN.

4. A SECUENCIACIÓN DO ADN

Dende 1979 é posible coñecer a orde en que se atopan os nucleótidos dunha cadea de ADN. O autor do método foi Frederick Sanger, que tamén secuenciou por primeira vez unha proteína. Ambos descubrimentos supuxeron dous premios Nobel para este investigador.

A secuenciación do ADN polo método de terminación de cadea (Sanger)

Baséase na separación de cadeas de ADN de lonxitude diferente ao ser sometidas a unha electroforese nun xel de poliacrilamida



Para obter esas cadeas necesítase:

- Mostra de ADN que se vai secuenciar (moitas copias obtidas por clonación ou por PCR).
- Cebadores para iniciar a síntese de ADN nunha cadea.
- ADN polimerasa especial, como a Taq.
- Desoxirribonucleótidos (dNTP) para alimentar a síntese.
- Didesoxirribonucleótidos (ddNTP). Son análogos aos anteriores pero estes paran a síntese da cadea cando son incorporados pola polimerase.

Cada ddNTP leva un marcador fluorescente diferente.

Os pasos do proceso son:

1. Desnaturalízase as cadeas dobres de ADN nun tubo de ensaio onde están tódolos ingredientes descritos.
2. Fíxanse os cebadores ao inicio da cadea para que se inicie a síntese de ADN.
3. Cando, por azar, se incorpora un ddNTP, a síntese nesa cadea detense, resultando un fragmento dunha determinada lonxitude. O proceso prosegue noutras cadeas ata que en cada unha delas se engade un ddNTP que para o proceso. Ao cabo dun tempo obtense unha mestura de fragmentos de diferentes lonxitude que presentan no seu extremo terminal un ddNTP.
4. A mestura de cadeas obtidas sométese a unha electroforese en xel de poliacrilamida nun capilar. As cadeas curtas son máis rápidas ca as longas, polo cal hai unha discriminación por tamaño que pode vir marcada pola diferenza dun único nucleótido. Un analizador mide a absorción de cor dos marcadores fluorescentes, co que identifican o ddNTP responsable. Obtense así a cadea complementaria do ADN que se quería secuenciar.

4.1. Secuenciadores de terceira xeración

Na actualidade hai varios métodos de secuenciación masiva coñecidos globalmente como métodos de **secuenciación de terceira xeración**.

Poden secuenciar cadeas moi longas de ADN e con moita rapidez. Os secuenciadores son do tamaño dun móbil.

Un dos máis prometedores utiliza unha membrana con nanoporos de 1 nm de diámetro. A ambos os lados créase unha diferenza de potencial que fai circular ións a través dos poros. Cando unha molécula bicatenaria de ADN é atraída ó poro, unha helicase situada sobre ela abre e fai que só unha cadea sinxela o atravesese. Cada nucleótido desta cadea obstrúe de diferente maneira o poro cando o atravesa, o que fai que a corrente iónica varíe en función do nucleótido que pasa. A alteración eléctrica que xera esa variación é detectada e relacionada co nucleótido que a causou, o que permite a secuenciación do ADN.

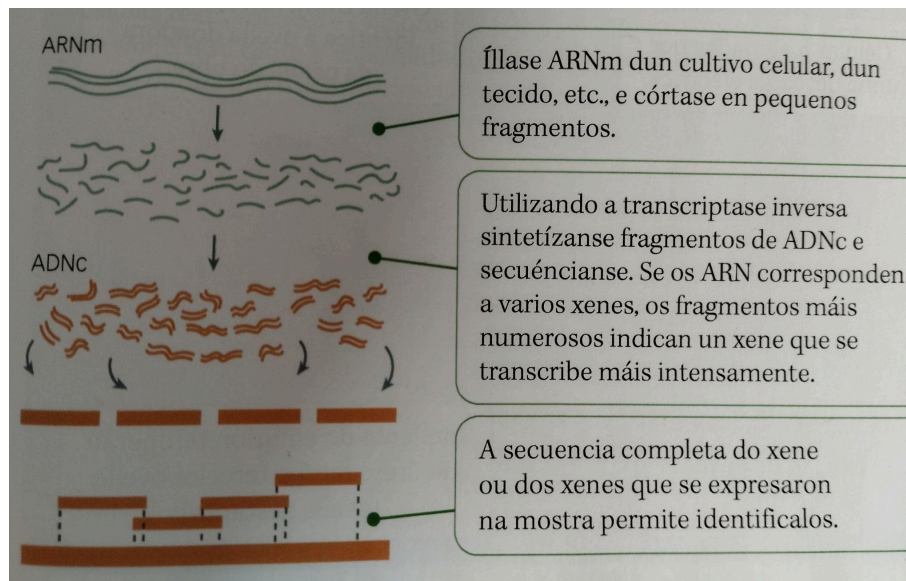
4.2. A secuenciación de xenomas

A automatización dos métodos de secuenciación e a aplicación de algoritmos informáticos permitiu a secuenciación de xenomas que culminou no ano 2003 coa secuenciación do xenoma humano. Antes secuenciárase o xenoma de organismos procariontes como *Haemophilus influenzae* e de eucariontes coma *Caenorhabditis elegans* e *Drosophila melanogaster*.

O xenoma humano foi completado por dous grupos: o Proxecto Xenoma Humano e Celera Genomics. O método “rápido” de secuenciación de xenoma humano, desenvolvido por Craig Venter en Celera partiu con moitas copias de cada cromosoma cuxo ADN se fragmentou en moitos anacos (*shotgun*), os cales se clonaron e secuenciaron. A superposición de secuencias destes fragmentos permitiu, mediante tratamento informático, a secuenciación de todos os cromosomas humanos.

4.3. Análise de expresión xénica

As técnicas de síntese de ADN e de secuenciación permiten detectar que xene ou xenes se expresan e con que intensidade se transcriben. Para iso úsase o seguinte método.

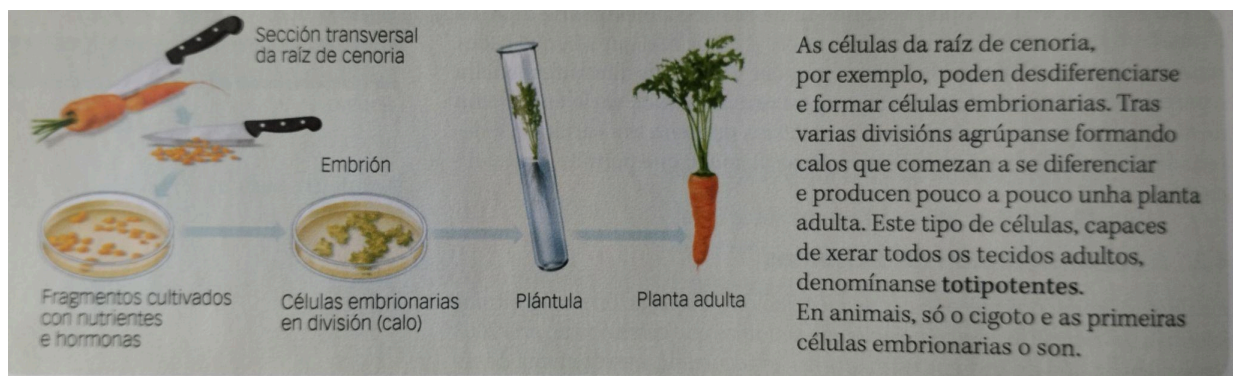


5. CLONACIÓN EN ORGANISMOS PLURICELULARES. REPROGRAMACIÓN

Un **clon** é un organismo xeneticamente idéntico a outro do cal procede. Os organismos unicelulares e as plantas clónanse de forma natural ao reproducirse asexualmente.

5.1. Clonación artificial en plantas

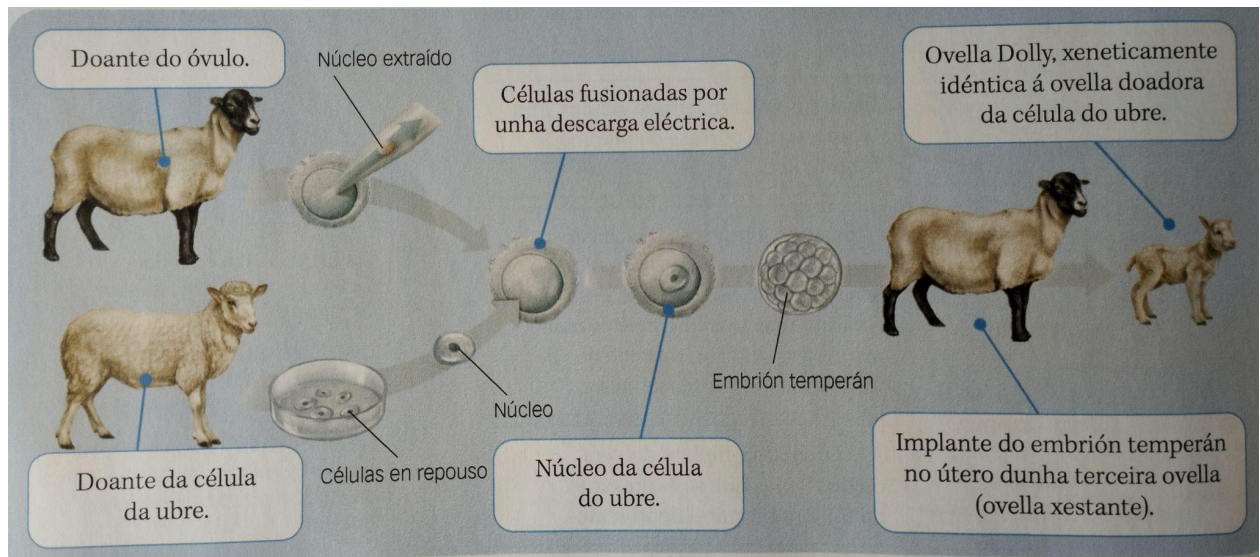
Pódese obter no laboratorio unha planta completa a partir dun fragmento desta.



5.2. Clonación artificial en mamíferos

En 1997, Wilmut e Campbell revolucionaron o panorama científico ao producir a ovella Dolly por transferencia nuclear, a partir do núcleo dunha célula adulta do ubre dunha ovella, fusionado cun óvulo enucleado dunha ovella doutra raza. Formaron así varios óvulos nucleados cunha dotación diploide de cromosomas que implantaron nos úteros de varias ovellas da mesma raza ca as doantes de óvulos. Desenvolvéronse varios embrións e grao diferente, aínda que só un o fixo ata o estado final de feto, a ovella Dolly.

Desde entón, por métodos semellantes clonáronse moitos animais. Este procedemento chámase **clonación reprodutiva**. A inmensa maioría dos científicos están en contra da clonación reprodutiva en humanos.



5.3. Clonación de células nai

As células nai embrionarias son **células pluripotentes**, procedentes dun embrión novo ou blastocito, que teñen capacidade autorreprodutiva e tamén de producir células especializadas de todas as liñas, pero non embrións completos.

Estas células pódense clonar por transferencia nuclear a partir do núcleo dunha célula somática implantado nun óvulo enucleado. Desenvólvese un embrión ata a fase de blastocito a partir dos cales se obteñen células nai coa información xenética da célula somática, que poden empregarse para a reparación de tecidos danados; é o que se coñecen como **clonación terapéutica**. Segundo consenso ético e científico universal, en humanos non se debe pasar desta fase embriolóxica.

Nos tecidos desenvolvidos hai tamén **células nai adultas**, cualificadas como multipotentes. Estas só poden producir algúns tipos de células. Por exemplo, as células da médula ósea poden xerar distintos tipos de células sanguíneas pero non células de todos os tecidos. Esta propiedade utilízase en **medicina rexenerativa**.

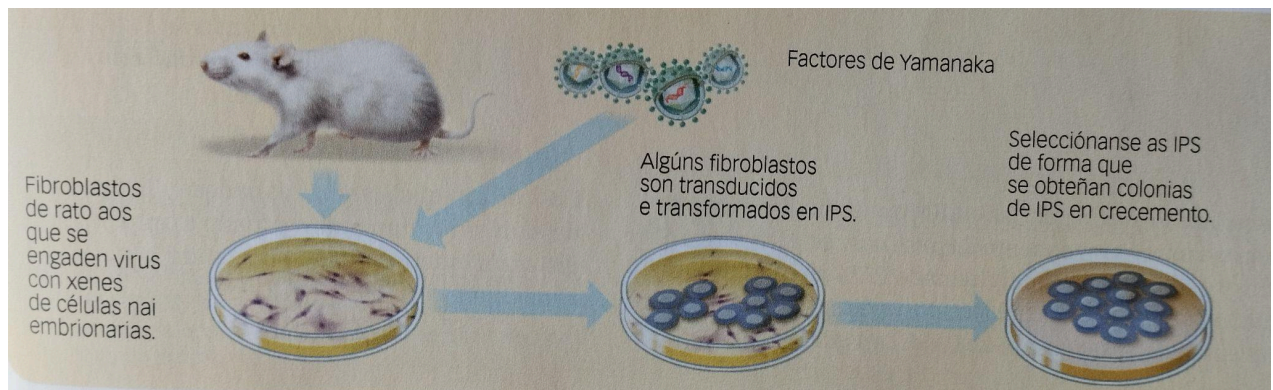
5.4. Reprogramación

Shinya Yamanaka conseguiu en 2006 reverter células adultas especializadas a células nai pluripotentes, as células nai pluripotentes inducidas, **IPS**. Este proceso, denominado **reprogramación**, logrouse *in vitro* ao transducir, en fibroblastos da pel dun rato, xenes para catro proteínas que se expresan en células nai (os factores de Yamanaka).

As células IPS adecuadamente inducidas poden converterse en células adultas especializadas, *in vitro* ou *in vivo*, ao ser transplantadas. Yamanaka foi galardoado co premio Nobel de Fisioloxía ou Medicina en 2012.

Un ano despois, Serrano e Abad descubriron a reprogramación *in situ*, dentro dun organismo animal, o que evita o proceso de extracción de células adultas e transplante de células reprogramadas.

Juan Carlos Ispizua e o seu equipo conseguiron posteriormente a reprogramación *in situ* interrompida, que evita algúns problemas do método anterior. Pero ademais observaron que, tras varios ciclos de reprogramación interrompida, as células rexuvenecían e este proceso afectaba a todo o organismo, facéndoo máis san e resistente a enfermidades. Estes achados tan prometedores son obxecto dunha intensa investigación actual.

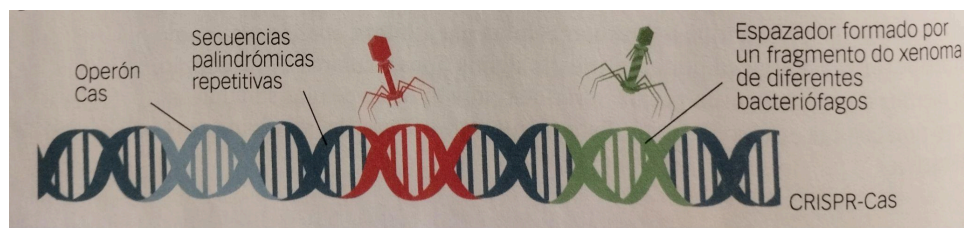


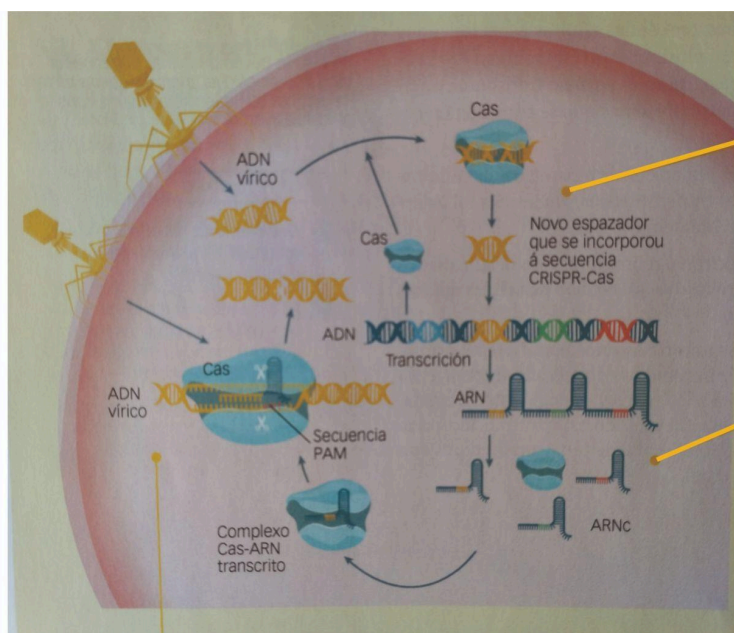
6. A EDICIÓN XENÉTICA: O SISTEMA CRISPR-Cas

A edición xenética comprende tódolos procedementos precisos para a inactivación ou modificación dun xene. Actualmente, o método máis potente e preciso de edición xenética é o sistema CRISPR-Cas, que foi descuberto polo microbiólogo español Francisco Juan Martínez Mojica.

Mojica descubriu que no xenoma de arqueas e bacterias existían secuencias repetitivas, palindrómicas, separadas por espazadores, ás que denominou CRISPR, siglas en inglés de "repeticións palindrómicas curtas agrupadas e regularmente interespazadas". Máis tarde encontrou que os espazadores son fragmentos de xenoma de virus bacteriófago. Comprobou que aquelas bacterias que tiñan fragmentos de ADN de determinados bacteriófagos non podían ser infectadas por estes. Pola contra, aquelas que non os tiñan eran infectadas facilmente. O que descubrira era un sistema de inmunidade adaptativo con base xenética en procariotas.

CRISPR-Cas é unha rexión do ADN de bacterias e arqueas formada polo operón Cas, e a rexión CRISPR.





A primeira vez que unha bacteria é infectada por un virus, as súas endonucleasas Cas cortan un fragmento do ADN vírico, xerando un espazador que se incorporará á secuencia CRISPR.

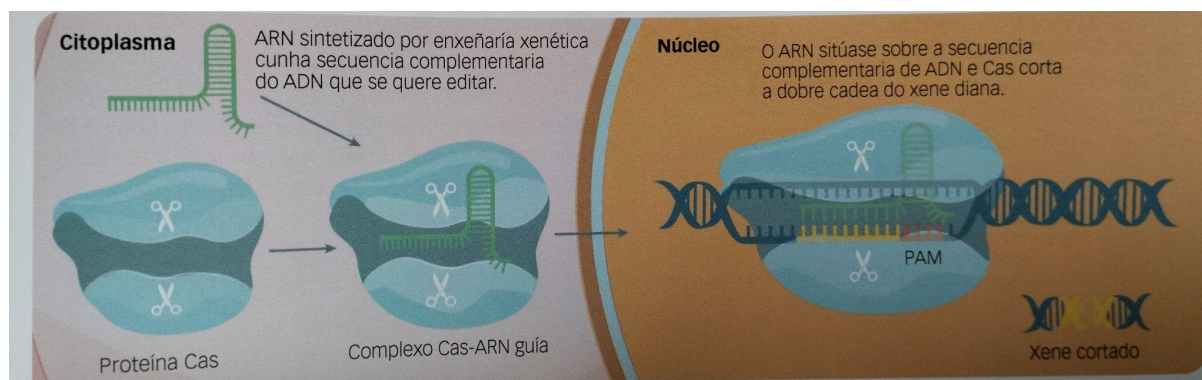
Nunha segunda infección do virus, a bacteria sintetiza múltiples cadeas de ARN da rexión CRISPR; as proteínas Cas sepáranse en pequenos fragmentos de ARN que levan a información dos espazadores, entre eles o do virus que infectou a bacteria novamente.

O complexo formado por Cas e ARN transcrito previamente do espazador correspondente diríxese cara o ADN vírico. Este complexo reconece un sinal chamado PAM do ADN do virus, formado por uns poucos nucleótidos, e diríxese a unha rexión complementaria, adxacente ao PAM, con que se une.

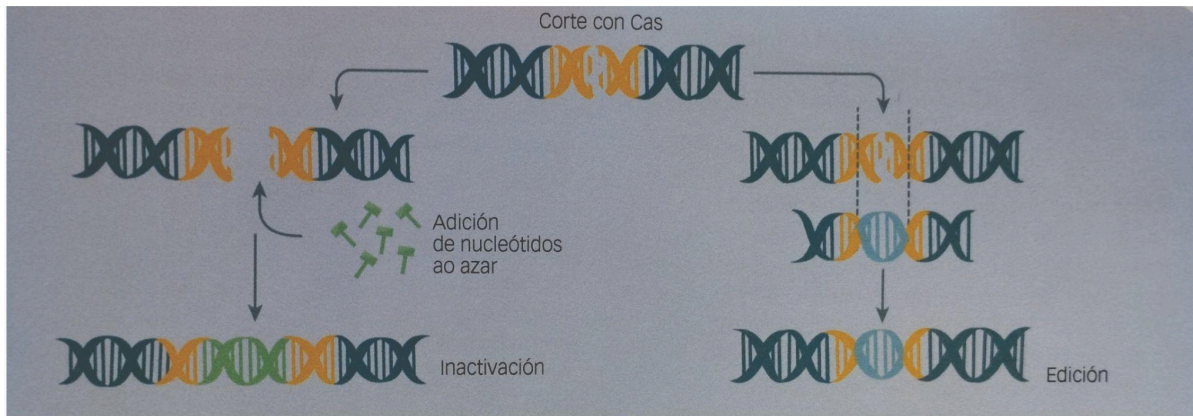
Cas corta daquela ambas as cadeas do ADN vírico nun punto situado a unha distancia exacta do PAM, abortando a infección.

6.1. Como editar xenes con CRISPR-Cas

Hoxe en día é posible sintetizar complexos de Cas con ARN que teña unha secuencia homóloga co xene que se vai a editar. Os complexos poden ser introducidos mediante un virus ou usando nanopartículas, e guiados polo ARN fíxanse sobre o ADN celular e producen un corte nun sitio exacto.



A clave da edición xenética atópase no sistema de reparación do ADN. Cando CRISPR corta o ADN que queremos editar, poden actuar dous sistemas de reparación.



Reparación de extremos non homólogos. Engade nucleótidos ao azar na rotura. Este sistema mantén a integridade física do cromosoma, pero altera con moita frecuencia a secuencia de bases e inactiva o xene, o que xustamente pode ser un dos fins da edición.

Reparación dirixida por homoloxía. Implica subministrar un novo segmento de ADN cunha secuencia igual á das zonas adxacentes ao corte, pero distinta na súa zona central. Desta forma incorpórase información nova na reparación.

7. APLICACIÓNS DA BIOTECNOLOXÍA

7.1. Aplicacións en saúde

Terapia xénica. Consiste na introdución en células nai adultas dun xene san mediante un virus para contrarrestar a acción dun xene defectuoso.

Estudo dos SNP. O ADN de diferentes persoas presenta secuencias comúns que difiren nun só nucleótido, denominadas polimorfismos dun só nucleótido ou SNP (*single nucleotide polymorphism*). Esa diferenza pode estar relacionada cun estado saudable ou coa predisposición a padecer determinadas enfermidades, coma o alzheimer ou algúns tipos de cancro. A análise de SNP pode facilitar un diagnóstico precoz e a súa prevención.

Edición xenética con CRISPR-Cas. A maioría dos ensaios para combatir enfermidades fixéronse en animais, pero xa se realizaron algúns en pacientes humanos que tiveron éxito, especialmente no tratamento de enfermidades raras, moitas delas producidas por un cambio nun único nucleótido.

CRISPR-Cas permite a reparación do xene afectado en células do propio individuo. Tras a inxección ao paciente das células editadas observouse a desaparición dos síntomas clínicos. Un exemplo levado a cabo *in vivo* é a amaroise conxénita de Leber, un tipo de cegueira causada por mutacións nun intrón dun xene. Tamén se realizaron análises químicos coa anemia falciforme, a beta talasemia e o anxioedema hereditario.

Aplicación da PCR. O uso da PCR permitiu amplificar unha gran cantidade de xenes asociados a enfermidades xenéticas e dexenerativas coma a hemofilia, a fibrose quística e a enfermidade de Huntington. A súa posterior secuenciación facilitou a diagnose e o tratamento desas enfermidades, moitas veces antes de que aparecesen síntomas. Tamén é moi útil na localización de axentes infecciosos, como o COVID-19 ou o VIH.

Producción de fármacos. A clonación de xenes humanos en bacterias permitiu obter fármacos difíciles de conseguir por outras vías, coma a insulina, a hormona do crecemento ou o interferón.

A algúns animais de granxa pódeseles transferir un xene humano. Estes animais transxénicos poden producir no seu leite as proteínas que expresan o devandito xene; por exemplo, a antitrombina, unha proteína que evita coágulos sanguíneos. Para isto inxéctase o xene clonado no núcleo de óvulos animais fecundados que darán lugar ao animal transxénico no cal se expresará o xene.

A produción de vacinas modernas faise mediante técnicas de enxeñaría xenética que evitan o rexeitamento que poden xerar as vacinas clásicas con restos de acterias e virus.

7.2. Aplicacións noutras áreas

Ciencia forense. As persoas podemos deixar rastros de ADN en lugares por onde nos movemos, tales como exudacións, pel, pelo, etc. Estas pequenas mostras poden ser amplificadas e comparadas con ADN por exemplo de persoas sospeitosas dun delito e determinar así a súa culpabilidade ou inocencia.

Medio ambiente. Cada vez máis, investigacións biotecnolóxicas teñen como obxectivo o medio ambiente e a súa protección. A absorción e transformación de contaminantes por microorganismos e plantas e a súa eliminación do medio é coñecida como **biorremediación**.

Algunhas bacterias son capaces de absorber da contorna metais pesados, hidrocarburos e outras substancias perigosas para o medio ambiente, pero con frecuencia crecen lentamente. A clonación do seu ADN en bacterias de crecemento rápido pode achegar unha solución ao problema.

Antropoloxía. A secuenciación do ADN de diferentes homínidos supuxo un grande avance na comprensión da nosa historia evolutiva. Actualmente sabemos que ata un 3% do ADN do *Homo neanderthalensis* está presente nos humanos actuais, o que supón que houbo un cruzamento entre as dúas especies.

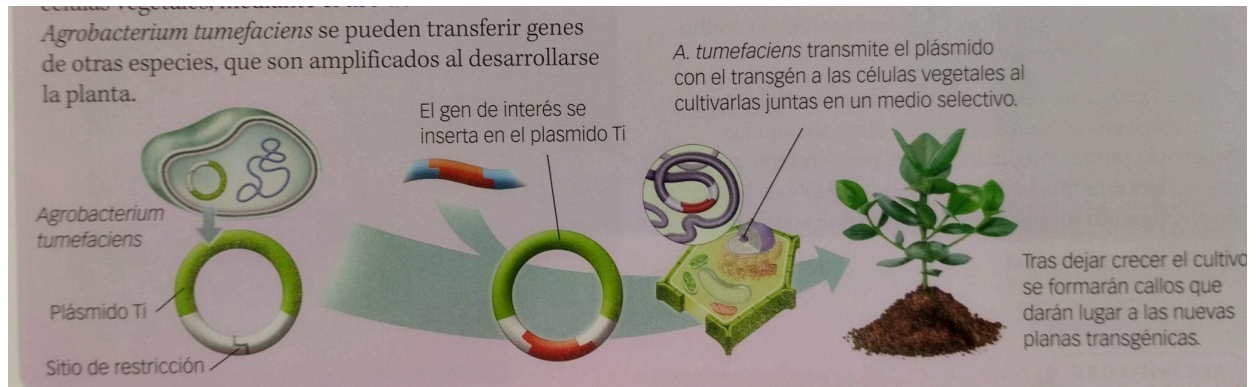
Grazas aos SNP pódese coñecer a orixe dunha persoa, xa que as poboacións humanas poden ter variantes particulares dun determinado SNP. Ao comparar os resultados dunha persoa cos perfís doutras poboacións pódense establecer relacións de parentesco.

Agricultura e gandaría. Os **organismos transxénicos** son aqueles que teñen incorporados no seu xenoma un ou varios xenes doutro organismo, e os **organismos modificados xenéticamente, OMX**, son calquera organismo cuxo xenoma foi modificado por métodos biotecnolóxicos. Estes termos son usados en ocasións como sinónimos.

A produción de plantas transxénicas permitiu dotalas de resistencia a pragas, á seca, melloras na aparencia e o sabor, biomasa, etc. Un procedemento amplamente usado é a transformación artificial de células vexetais; mediante o uso da bacteria *Agrobacterium tumefaciens* pódense transferir xenes doutras especies, que son amplificados ao desenvolverse a planta.

As técnicas tradicionais de cruzamento e mellora tamén poden ser implementadas pola biotecnoloxía. Unha das primeiras aplicacións da edición CRISPR-Cas foi a produción de arroz dourado, un produto que contén vitamina A, da que carece o arroz non editado.

A gandería tamén é un campo de aplicacións biotecnolóxicas; así e todo, os problemas de saúde e de benestar animal cuestionan os tratamentos transxénicos e limítanos a posibles actuacións futuras con CRISPR.



8. IMPLICACIÓNS ÉTICAS DA BIOTECNOLOXÍA

O impacto dos avances en biotecnoloxía supera as fronteiras da ciencia e ten consecuencias éticas, sociais e ambientais.

8.1. O cultivo dos OMX

Os organismos modificados xenéticamente son utilizados de forma corrente na industria agrícola en América e Asia, mentres que en Europa o seu cultivo está moi regulado. Está prohibido mesmo o cultivo de plantas modificadas mediante a edición con CRISPR-Cas e algunhas outras producidas por mutaxénese e que son obxecto de consumo habitual.

Ainda que a avaliación de riscos é exhaustiva, algunhas cuestións son obxecto de debate:

- Poden as plantas transxénicas hibridarse con outras cultivadas ou silvestres, transferíndolles á súa vez xenes exógenos que afecten aos cultivos e ecosistemas?
- Como poderán competir os pequenos agricultores cos propietarios de plantas OMX protexidas por patentes legais?
- Poden estas plantas afectar á saúde humana?

8.2. A aplicación de biotecnoloxía en humanos

Dende a súa secuenciación, o xenoma humano constituíu o centro de controversias e debates:

- Quen ten dereito a coñecer o xenoma dunha persoa?
- Como exercer o dereito á intimidade xenómica?

- Pode usarse ese xenoma en programas de saúde pública?
- Hai risco de que o coñecemento de xenomas transcenda ao campo das relacións laborais?

A edición CRISPR-Cas na actualidade é a ferramenta mais potente de modificación xenética. Xa hai case un centenar de ensaios clínicos en marcha en todo o mundo para tratar diferentes tipos de cancro e de enfermidades conxénitas, incluídas algunhas raras, pero hoxe en día procédese con moito coidado en aplicacións clínicas humanas.

A aplicación de forma ilegal e irresponsable desta técnica por parte dalgúns investigadores para editar embrións humanos é un sinal de alerta para que a comunidade internacional vixíe este tipo de prácticas.