

15. BIOTECNOLOXÍA



1. QUE É A BIOTECNOLOXÍA?

COMO SE TRABALLA EN ENXEÑARÍA XENÉTICA?

O ADN recombinante reúne ADN de diferentes organismos.

A través da clonación obtéñense múltiples copias dun xene.

A PCR clona ADN.

Transcripción inversa

CRISPR/Cas 9 permite editar o ADN.

2. APLICACIÓNS DA BIOTECNOLOXÍA

Médica

A insulina foi a primeira proteína humana obtida por IX.

A medicina personalizada permite tratamentos máis eficaces

A terapia xénica permite eliminar enfermidades xenéticas.

Biotechonoloxía Agrogandeira.

Animáis transxénico. Clonación

3. A XENÓMICA E A PROTEÓMICA

O Proxecto xenoma Humano secuenciou o ADN humano.

Un paso máis adiante con Encode

Despois da xenómica vén a proteómica.

4. MICROBIOLOXÍA INDUSTRIAL

Alimentación.

Antibióticos.

Industrial e ambiental.

5. BIOÉTICA

15.1 BIOTECNOLOXÍA. ENXEÑERÍA XENÉTICA.

A **Bioteecnoloxía** é toda aplicación tecnolóxica que utilice organismos vivos, os seus derivados, ou calquera sistema biolóxico para a creación ou modificación de produtos ou procesos útiles.

A biotecnoloxía non é unha disciplina actual; os procesos de fermentación para a produción de pan, bebidas alcohólicas ou iogur coñécense dende tempos antigos.

Perodende os anos 50, grazas aos avances na bioloxía celular e na xenética molecular, abríronse novas vías de investigación, entre as que destaca pola súa importancia a **enxeñería xenética**: o conxunto de técnicas que permiten manipular o xenoma dun ser vivo.



Figura 15.1. Un proxecto de AT Estévez, que propón a xeración de árbores luminiscentes que iluminan as nosas rúas.

Fonte: <https://economiaurbana.wordpress.com/2009/11/23/genetic-architectures/>

Labregos e gandeiros levan séculos manipulando animais e plantas domésticos, mediante a reprodución selectiva, para mellorar determinadas características, pero a enxeñaría xenética ten varias vantaxes sobre estas técnicas tradicionais. En plantas e animais pódense introducir alelos específicos ou xenes completamente novos, o que reduce o tempo de espera para lanzar novas variedades ou razas útiles, e tamén permite combinar xenes entre diferentes especies (evolución horizontal), imposible cos métodos clásicos de hibridación. Ademais, noutros permite novas aplicacións relacionadas coa saúde, a protección ambiental, ...

Algúns dos **conceptos ou técnicas** da enxeñería xenética son:

ADN recombinante: é unha molécula de DNA formada pola unión artificial de DNA de dous organismos diferentes. A obtención de ADN recombinante é unha das técnicas de manipulación do ADN máis utilizadas.

Clon: copia idéntica dunha molécula, dunha célula ou dun organismo.

Organismo transxénico: incorporan no seu xenoma de forma estable ADN procedente de outras especies.

GMO: organismo xeneticamente modificado.

Célula transformada: célula que contén e expresa ADN foráneo.

Vectores: elementos que serven para introducir xenes estraños en células hospedadoras .

Encimas de restrición: encimas endonucleases que cortan o ADN en puntos concretos (secuencias específicas).

A reacción en cadea da polimerase (PCR) É unha técnica *in vitro* que permite obter moi rapidamente un número elevado de copias dun fragmento de ADN determinado.

Tecnoloxía CRISPR/Cas. É a técnica de edición xenética máis precisa que se coñece neste momento.

15.2 O ADN recombinante

Como o seu nome indica o **ADN recombinante** é o resultado da unión de fragmentos de ADN sintético ou de diferentes organismos. Como todos os seres vivos almacenan información xenética no ADN, coa mesma estrutura e o mesmo código xenético, este ADN pode introducirse nunha célula e expresarse, producindo proteínas. O organismo no que se introduce é un organismo transxénico ou modificado xeneticamente (GMO).

Emprégase para obterse na produción de proteínas como **insulina**, **hormona de crecemento**, factor de coagulación. Tamén na produción de vacinas, fármacos, encimas e plantas e animais transxénicos...

As ferramentas básicas para manipular moléculas de ADN son as encimas, neste caso, para obter ADN recombinante son necesarias polo menos encimas de restrición e ADN ligases.

Os **encimas de restrición** funcionan como tesoiras moleculares, son endonucleases que cortan a cadea de ADN en secuencias **específicas**, en moitos casos palindrómicas, (é igual se a lemos en dirección 5'→3' nunha cadea ou en dirección 5'→3' na cadea complementaria) . Descubertos en bacterias, coñécense agora máis de mil encimas de restrición diferentes, cada un deles específico para unha determinada secuencia. Moitas encimas de restrición funcionan en zigzag, deixando cadeas con lonxitudes desiguais; **bordos cohesivos** complementarios, polo que hibridarán, formando pontes de hidróxeno, con outros extremos de ADN cortados co mesmo encima.

Po último, os ADN **ligases** unen os fragmentos de cadeas de ADN con enlaces fosfodiéster.

Deste xeito, pódense cortar e unir fragmentos de ADN de distinta orixe formando ADN recombinante, que despois será introducido nunha célula hóspede.

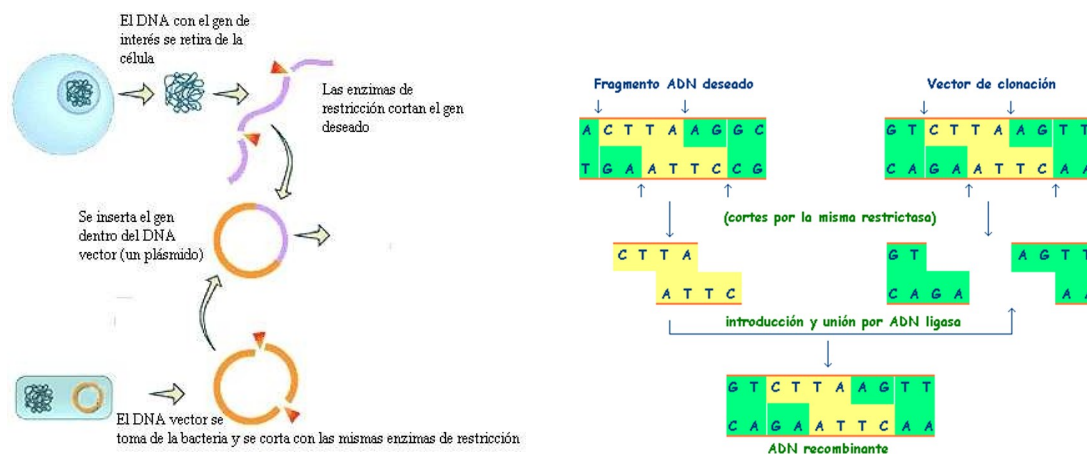


Figura 15.2. Tecnoloxía do ADN recombinante. Fonte: <https://fernandogs97.wordpress.com/2013/18/01/como-modificar-o-ADN-dun-organismo/> e Proxecto Biosfera .

- ✚ En primeiro lugar, córtase o ADN de dous organismos diferentes co mesmo encima de restrición (EcoRI, por exemplo).
- ✚ En segundo lugar, obtéñense fragmentos de ADN con extremos cohesivos complementarios en cada unha das moléculas.
- ✚ En terceiro lugar, os fragmentos de ADN obtidos póñense en contacto, hibridan e sométense ao encima ADN ligase, formando unha molécula de ADN recombinante, que contén ADN dos dous organismos.

vector de clonación.

Elementos que serven para introducir xenes estraños en células hospedadoras. A Selección do vector realízase segundo o tamaño as características do xene a transferir e da célula que se quere modificar: se é procariota, eucariota, de lévedo, animal, vexetal,...

Xene que queremos clonar + DNA vector = DNA recombinante

Os vectores máis utilizados son:

- Plásmidos
- Bacteriófagos.
- Outros tipos de virus segundo a célula a modificar.
- Outros: YACs (cromosomas artificiais de lévedos)
- A introdución de xenes pódese realizar tamén por métodos físicos e químicos que modifican a permeabilidade da célula como microinxeccións, electroporación, liposomas...

Mediante a clonación obtéñense múltiples copias dun xene

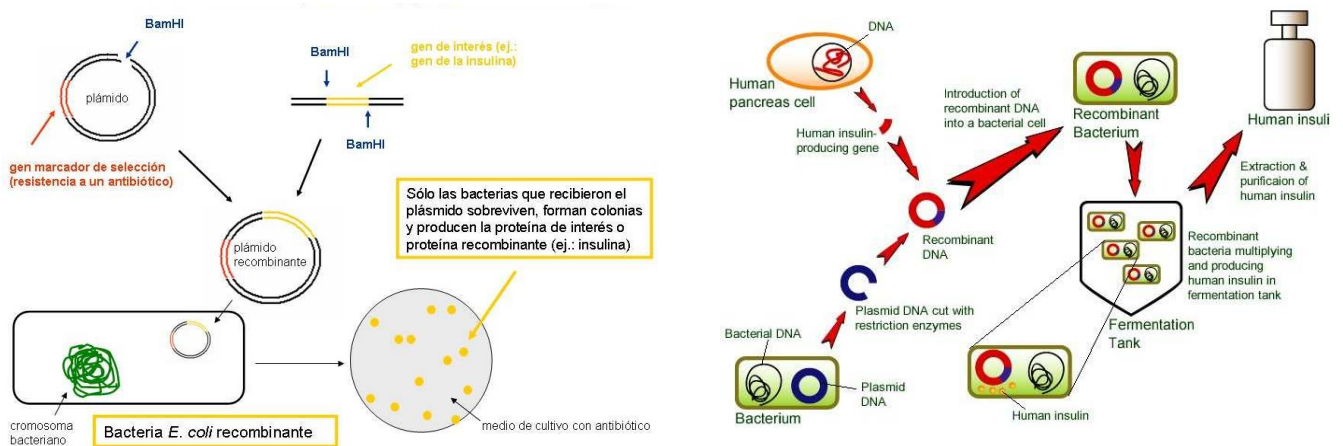
Para obter copias do xene ou secuencia *in vivo*, o ADN recombinado pode introducirse nunha bacteria, a **célula hóspede**, e a maquinaria desta célula hóspede utilízase para replicar o ADN obtido. Dado que as bacterias se multiplican rapidamente formando un clon, esta técnica chámase **clonación de ADN**.

Para introducir ADN na célula hóspede é necesario un **vector de clonación**, en procariotas os máis utilizados son **plásmidos**, pequenas moléculas de ADN circulares que poden replicarse independentemente do ADN cromosómico bacteriano e algúns tipos de virus como os bacteriófagos.

Os hóspedes transxénicos máis utilizados son as células procariotas: *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis*, etc ou células eucariotas como *Saccharomyces cerevisiae*, moi utilizado pola súa rápida velocidade de crecemento.

O proceso de clonación dun xene en bacterias, que inclúe as seguintes etapas:

- Obtención do fragmento de ADN problema, que contén o xene a clonar.
- Elección dun plásmido bacteriano. O plásmido elixido debe incorporar un **xene** de fácil detección denominado **marcador**, que xeralmente é un xene de **resistencia** a un antibiótico.
- Formación do plásmido recombinante. Utilízase o mesmo encima de restrición para cortar o ADN do plásmido e o xene a introducir e únense ambos fragmentos coa ADN ligase
- Para incorporar o plásmido recombinante, incúbanse bacterias capaces de captar ADN do exterior. Este proceso, chamado **transformación**, é un mecanismo de intercambio xenético que permite a entrada de ADN exógeno nas bacterias.



Imaxe 15.3. Esquema dun proceso de clonación de ADN con *Escherichia coli* para a produción de insulina.

Fonte: https://www.ied.edu.hk/biotech/eng/classrm/class_health5.html. Fonte: <http://www.argenbio.org/index.php?action=novedades-e=151>

Normalmente non todas as células do cultivo bacteriano incorporan o plásmido recombinante. Para seleccionar as bacterias transformadas, engádese ao medio de cultivo o antibiótico que coincida co do marcador. As bacterias que sobrevivan serán as que incorporasen o plásmido e, polo tanto, o xene que queremos clonar. Noutros casos o marcador é un xene que produce unha molécula luminiscente. Ao mesmo tempo que as bacterias se duplican, tamén se duplica o número de plásmidos recombinantes e o xene que inseriron.

Por último, obtense unha colonia bacteriana na que haberá millóns de copias, illanse os plásmidos recombinantes e obtense copias do xene de interese.

Como veremos máis adiante, esta técnica non só serve para clonar ADN senón tamén para obter, grazas á expresión dos xenes clonados, o **produto** xerado polo devandito xene.

A insulina foi a primeira proteína humana obtida por IG

Un dos logros máis importantes da biotecnoloxía foi a produción de hormonas con técnicas de enxeñaría xenética. Ata 1982, os diabéticos tiñan que inxectar insulina de vaca ou porco, pero a insulina de porco difire da insulina humana nun aminoácido e, como non son idénticos, o seu uso producía efectos secundarios. A solución foi a produción de insulina humana por *Escherichia coli* que se insire mediante enxeñaría xenética o xen humano que produce insulina.

A **insulina**, **interferón**, **hormona de crecemento ou factor VIII da coagulación** son exemplos de péptidos e proteínas que actualmente se fabrican mediante enxeñaría xenética. Os xenes necesarios para fabricar estas proteínas introdúcese nos microorganismos, normalmente en **bacterias**, que os fabricarán en grandes cantidades a baixo prezo e sen riscos. Tamén se poden introducir xenes nas bacterias para fabricar outros medicamentos como **antibióticos**, **vacinas**, **anticorpos**...

15.3 A reacción en cadea da polimerase (PCR).

A **reacción en cadea da polimerase (PCR)** é unha técnica que permite obter rapidamente múltiples copias de ADN *in vitro* (nun tubo de ensaio).

Para facelo engádense os seguintes compoñentes:

- A mostra de ADN a amplificar.
- Cebadores: pequenas cadeas de nucleótidos complementarias aos extremos do xene que queremos copiar.
- Os catro tipos de dNTP son os desoxirribonucleótidos trifosfatos (dATP, dGTP, dCTP, dTTP).
- Unha ADN polimerase resistente á calor obtida a partir de bacterias termófilas (*Thermus aquaticus* Taq-polimerase).



Figura 15.4. Os tubos Eppendorf son os máis utilizados nos traballos de bioloxía molecular e bioquímica.

Imaxe 15.5. O termociclador é o encargado de realizar os cambios de temperatura necesarios na PCR.

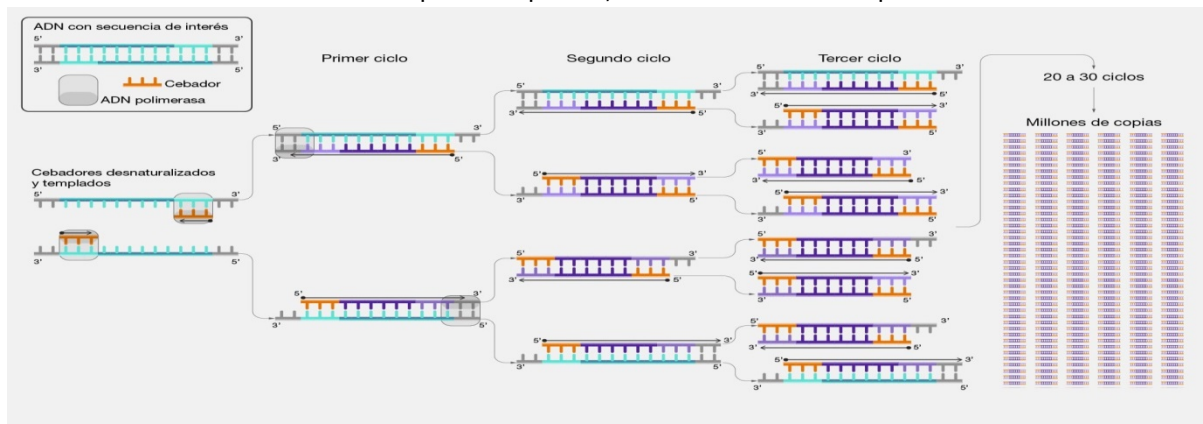


A PCR segue un proceso cíclico que repítese obténdose múltiples copias do ADN :

Fase de **desnaturalización**. Quéntase a mostra (95°C), o que provoca a desnaturalización do ADN, e así separa as dúas cadeas de nucleótidos.

Fase de **aliñamento**. A mostra arrefríase (55°C) para permitir que os cebadores se unan ás secuencias complementarias de cada unha das cadeas de ADN separadas.

Fase de **elongación ou extensión**. A temperatura elévase un pouco, para que a polimerase comece a funcionar. Tomando o cebador como punto de partida, forma unha cadea complementaria as existentes.



Imaxe 15.6.

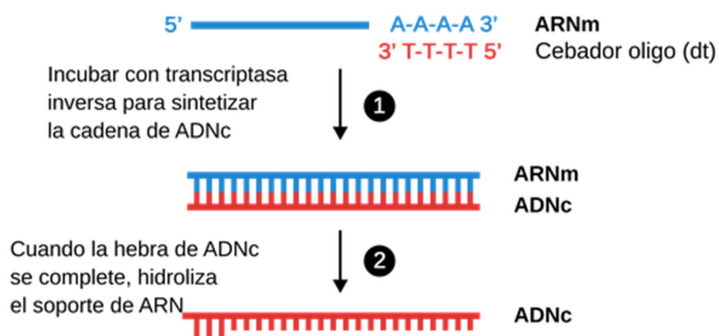
O quecemento e o arrefriamento repítese moitas veces; Cada ciclo dura de 2 a 3 minutos e duplica a cantidade de ADN existente, polo que despois dunhas horas hai millóns de copias de ADN. O proceso realízase automaticamente.

As **aplicacións da PCR** son múltiples, xa que permite obter múltiples copias a partir dunha pequena mostra de ADN:

- Amplificacións de ADN para todo tipo de estudos evolutivos ou paleontolóxicos.
- Obtención da pegada xenética do ADN en medicina legal, probas de paternidade, etc.
- Detección de ADN para probas de diagnóstico, por exemplo, detección de virus en fases iniciais da infección.

15.4 TECNOLOXÍA DO ADNc COMPLEMENTARIO

O ADN complementario (ADNc) é un ADN de dobre cadea, formado a partir dunha molécula de ARNm.



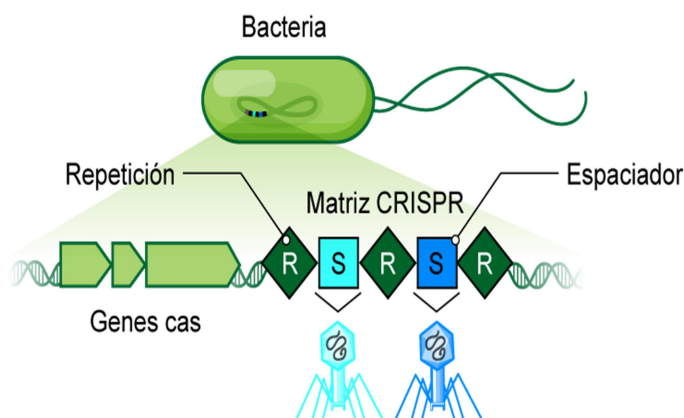
Prodúcese grazas a **transcriptase inversa o reversotranscriptase**, un encima presente nos retrovirus. Ten moita importancia en células eucariotas porque o ADN destas células ten segmentos que non codifican proteínas e que se eliminan durante o proceso de maduración do ARNm. Polo tanto a utilización do ARNm para illar un xene presenta a vantaxe de non obter intróns que si están presentes no ADN.

Utilízase en enxeñaría xenética para proporcionar clons de diferentes xenes.

Os investigadores prefiren usar o ADNc en lugar do propio ARNm porque os ARN son menos estables que o ADN e non hai técnicas rutinarias para amplificar e purificar as moléculas de ARN individuais. Por exemplo, para facer a PCR para a detección do COVID (virus de ARN), emprégase primeiro esta técnica.

Permite elaborar bibliotecas de xenes, colección de fragmentos de ADN clonados (CLONACIÓN MOLECULAR) dun organismo, tecido, órgano ou tipo celular específico. Se se representan todos os xenes dun organismo denomínase biblioteca xenómica.

15.5 CRISPR/Cas 9

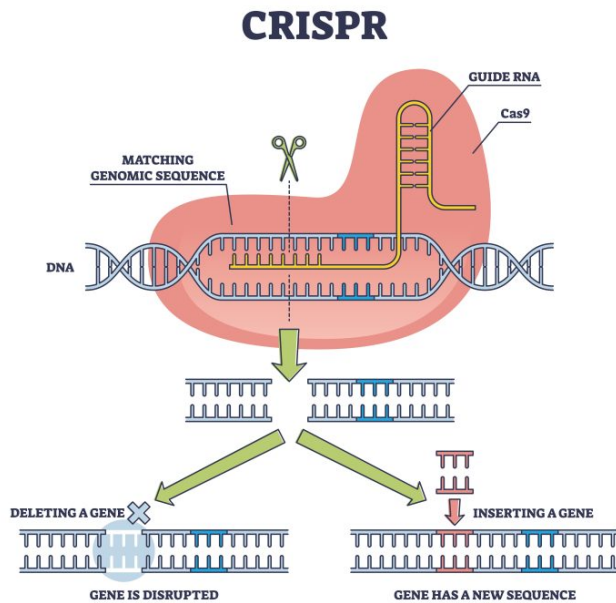


A tecnoloxía CRISPR/Cas9 utilízase para **editar o xenoma** de calquera célula. Trátase dunhas tesoiras moleculares capaces de cortar a molécula de ADN de xeito preciso e controlado, permitindo eliminar ou insertar os fragmentos que se desexe.

O acrónimo CRISPR procede Repeticións palindrómicas curtas agrupadas e regularmente espazadas. Cas9 é o nome dunha serie de proteínas, principalmente endonucleases, asociadas a estas secuencias (CRISPR).

O sistema CRISPR/Cas9 foi descuberto en procariotas, (Francis Mojica da Universidade de Alicante), é un sistema defensivo, que recoñece o ADN viral e o inactiva. Cada repetición vai seguida de pequenos segmentos de "ADN espaciador" procedentes de fagos que atacaron á bacterias no pasado, asociado

frecuentemente con xenes cas que codifican as endonucleases. Se a infección se repite a bacteria copia o ADN espaciador nun ARN que se asocia a endonuclease (Cas9) o que lles permiten recoñecer o ADN do fago e cortalo.



O sistema CRISPR/Cas9 consiste basicamente nunha **guía de ARN**, que é a transcrición do ADN que se quere modificar, asociada a **endonuclease** (Cas) que unha vez atopada a secuencia, corta a cadea de ADN buscada, permitindo cambiala por outra ou eliminala. Pódese aplicar en case calquera situación na que se desexa modificar a secuencia de ADN.

A tecnoloxía CRISPR/Cas está a experimentar un rápido desenvolvemento e expansión.

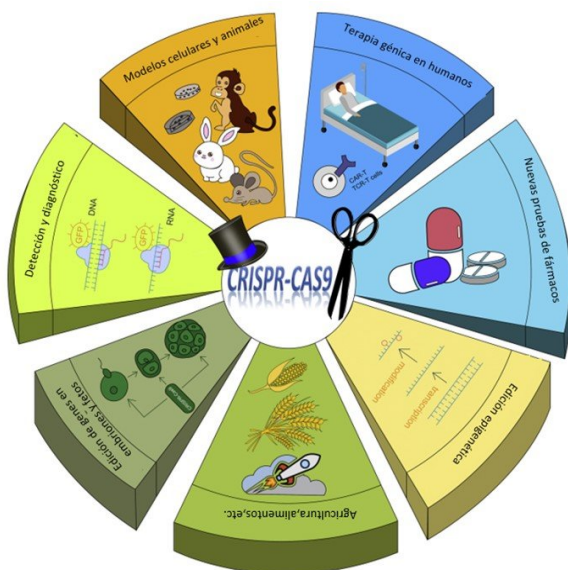
A técnica CRISPR/Cas é **barata** e sinxela de

usar, actualmente está dispoñible en practicamente todos os laboratorios de xenética do mundo.

Aplicacións de CRISPR/Cas 9

As aplicacións son moi diversas, xa que podería utilizarse en case calquera situación na que o material xenético necesite ser modificado.

As súas perspectivas no **campo da medicina** son amplas, CRISPR/Cas9 ten un enorme potencial para ser utilizado na **terapia xénica** para corrixir diversas enfermidades que teñen unha causa xenética, como as enfermidades monoxénicas ou o cancro; na detección, cura ou transmisión de **enfermidades infecciosas**, como a hepatite B e o VIH e na **investigación**, xa permite estudar as enfermidades humanas en animais.



Enfermidades xenéticas

A terapia xenética estase investigando para a cura de **enfermidades monoxénicas**, fundamentalmente nas células sanguíneas (porque hai unha maior facilidade de extraelas e modificalas) ou hematopoiéticas xa que perduran as células modificadas. Un exemplo prometedor é a terapia baseada no transplante de células nai hematopoiéticas corrixidas por CRISPR/Cas9 en pacientes con **anemia falciforme** e beta talasemia, enfermidades causadas por mutacións no xene da hemoglobina. A través de CRISPR/Cas9, os científicos puideron editar o xene HBB nas células dos pacientes e restaurar a función normal da hemoglobina.

Diferentes estudos en ratos demostraron o potencial de CRISPR/Cas9 para corrixir algúns

tipos xordeira, a distrofia muscular, a hemofilia ...

Cancro

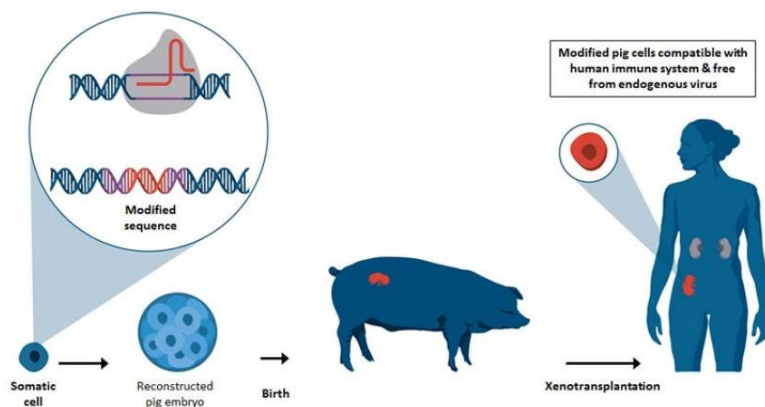
- Hai estudos que utilizan o sistema CRISPR/Cas9 para editar ou **eliminar mutacións** en xenes (oncoxenes e protooncoxenes) que provocan esta proliferación celular incontrolada e poden producir cancro .
- Ademais víronse resultados prometedores en estudos clínicos que utilizan CRISPR/Cas9 para a inmunoterapia de pacientes con cancro. Eses estudos eliminaron as células inmunitarias do paciente con cancro, alteraron esas células in vitro mediante CRISPR/Cas9 (**células T ou células CAR-T**) e despois reintroducíronas no corpo do paciente.

Enfermedades infecciosas

- Alteración dos **xenes que confiren resistencia ao virus**. O xene CCR5, codifica unha proteína que actúa como receptor nas membranas celulares, e produce resistencia á infección por virus VIH.
- Outras investigacións exploran a aplicación terapéutica de CRISPR/Cas9 en outras enfermidades producidas por virus como a gripe, ou virus respiratorio sincitial
- CRISPR/Cas9 demostrou ser moi eficaz nun estudo que combinou a técnica de edición de xenes cunha terapia antirretroviral que **suprime a replicación do virus** lentamente no organismo. Consegue editar o xenoma das células "reservorio" do virus VIH, que están latentes . No estudo, os científicos lograron eliminar o virus VIH en ratos infectados.
- Ademais, varias des estas infeccións virais, como o virus da hepatitis B (VHB), e o virus do papiloma humano (VPH), están relacionadas co desenvolvemento dalgúns tipos de **cancro**, como o fígado e o cervix. Varios estudos tamén utilizaron CRISPR/Cas9 como estratexia para tratar estes tipos de cancro, mediante a inactivación do xenoma do virus ou a inhibición da súa replicación.
- Tamén se investiga o seu uso para **modificar o mosquito** transmisor da malaria.

Animais transxénicos para usos médicos

- **Xerar modelos animais** para un estudo máis eficaz das enfermidades.
- Por exemplo, os modelos de rato (ratos knockout e knock) suprímense ou insírense xenes e permiten coñecer o papel destes xenes nas enfermidades. Por exemplo, o efecto das mutacións no cancro en xenes supresores de tumores ou en oncoxenes.
- Modelos de roedores modificados xeneticamente para probar tratamentos e vacinas contra o COVID. A estes animais introdúcese, mediante a tecnoloxía CRISPR, o xene humano que



produce a porta de entrada ao virus.

• Xenotransplantes.

Modificar órganos animais para suprimir xenes que codifican antíxenos, eliminar ADN vírico e inserir xenes humanos para que os órganos podan utilizarse en transplantes

Probas diagnósticas

Estase investigando o seu uso en probas diagnósticas para a detección de cancro en fase inicial ou enfermidades infecciosas como un test rápido para a detección da tuberculose.

Na **agricultura e gandería** poderíanse xerar variedades equivalentes ás dos transxénicos.

15.6 APLICACIÓN DA BIOTECNOLOXÍA

As técnicas biotecnolóxicas empréganse en diferentes tipos de industrias e sectores económicos. Hai cinco áreas principais :



- Biotecnoloxía aplicada **á medicina**, estudo e tratamentos de enfermidades, creación de novos fármacos, ...
- Sector **agroalimentario**. Inclúen a creación de novas variedades de plantas ou animais de interese agrícola, a produción de biofertilizantes e biopesticidas, o cultivo in vitro e clonación de vexetais.
- Aplicacións da biotecnoloxía ao **medioambiente**
- **Biotecnoloxía industrial**. Esta rama da biotecnoloxía presta especial atención ao deseño de procesos e produtos que consuman menos recursos que os tradicionais, facéndoo máis eficientes enerxéticamente ou menos contaminantes. Son numerosos os exemplos como o uso de microorganismos para a elaboración de produtos químicos, produción de novos materiais de uso cotián (plásticos, téxtiles...) e o desenvolvemento de novas fontes de enerxía sostibles, como por exemplo biocombustibles.

Imaxe 15.12. Os diferentes campos de aplicación da biotecnoloxía.

Fonte: <http://revistavolarcolombia.com/estilode-vida/tecnologia/colombia-le-apuesta-la-biotecnologia/>

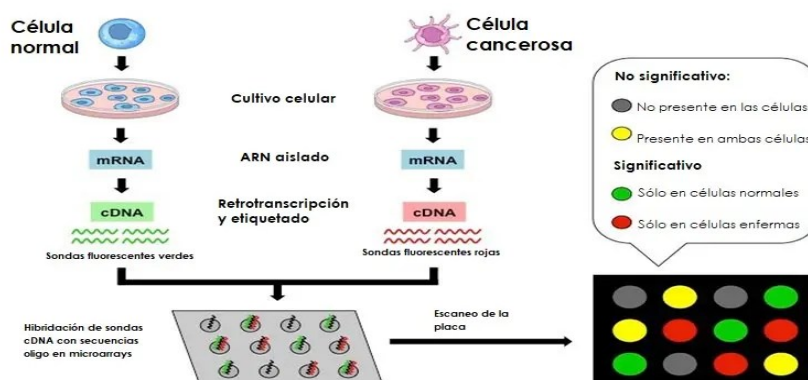
A biotecnoloxía aplicada a medicina

Ademais das xa vista :

- **Obtención de produtos** farmacéuticos como vacinas, anticorpos monoclonais, hormonas, novos fármacos como antibióticos, antitumorais, etc. (ADN recombinante)
- **Técnicas** moleculares de **diagnóstico**, como **biochips** de ADN para detectaren enfermidades xenéticas.
- Terapia **rexenerativa** celular que se basea en cultivos de **células nai** para rexenerar tecidos e órganos
- Uso de **animais transxénicos** que levan xenes humanos para fabricar órganos que poidan ser transplantados a humanos co menor rexeitamento posible (porcos principalmente). (CRISPR)

A medicina personalizada permite tratamentos máis eficaces

A medicina actual trata de desenvolver unha medicina personalizada, con fármacos específicos dirixidos a dianas moi concretas e a aplicación de cada fármaco segundo o paciente. Trátase de determinar o mellor que fármaco escoller, cal é a dosificación adecuada e canto tempo debe durar o tratamento.



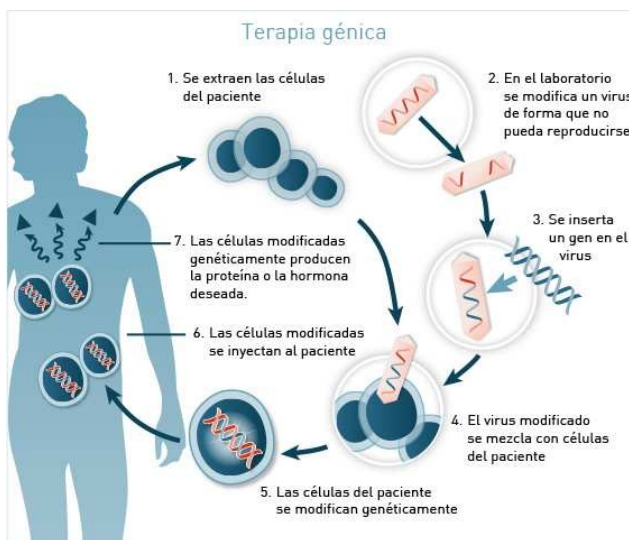
Imaxe 15.13. Esquema dunha análise de biochip de ADN. Fonte: el gen curioso

Para iso é necesario probas de diagnóstico precisas para a detección de biomarcadores

- Un exemplo das probas de diagnóstico que permiten unha medicina personalizada son os **biochips de ADN** que permiten analizar grandes cantidades de ADN. Son pequenas placas que conteñen centos de secuencias de ADN colocadas en pequenas caixas, sobre as que se colocan pingas de sangue ou saliva que levan o ADN problema e que permiten detectar rapidamente o grao de expresión dun xene que provoca unha enfermidade. Isto permite dividir os pacientes segundo a súa resposta a un determinado tratamento, seleccionando individuos que respondan ben ou excluindo aqueles que terán un efecto adverso.
- Como exemplo de medicina personalizada, cabe mencionar os novos tratamentos para **cancro**, dado que na actualidade pódense coñecer as características do tumor que sofre cada paciente e xa existen produtos específicos para diferentes variantes moleculares dos cancros de mama, pulmón, colon, pel e sangue.

Neste sentido, a medicina personalizada é máis **eficiente**, identificando grupos de pacientes que poden beneficiarse de medicamentos mellor deseñados, evitando algúns dos efectos secundarios asociados á quimioterapia e aforrando un tempo valioso cun tratamento axeitado nunha fase inicial. Por exemplo, o cancro de mama é o tumor máis común en mulleres occidentais. En España diagnósticanse ao redor de 25.000 novos cancros de mama ao ano, calcúlase que 1 de cada 8 mulleres terá cancro de mama ao longo da súa vida, pero o cancro de mama non é unha, senón moitas enfermidades diferentes. Por iso, son moi útiles os biochips de ADN para saber se portan o xene que desencadea un tipo específico de cancro.

O uso de **marcadores** ou sinais **xenéticos**, emprégase tamén en **investigación policial e medicina legal** para a identificación de presuntos sospeitosos, en probas de paternidade e en estudos históricos e arqueolóxicos onde se investiguen restos humanos. A comparación de marcadores xenéticos entre unha mostra coñecida e unha mostra descoñecida permítenos determinar se ambas mostras están relacionadas. Tamén se usan para mapear o xenoma e identificar os xenes de interese.



A terapia xénica permite eliminar enfermidades xenéticas

Entre as **6.000 enfermidades xenéticas** coñecidas, o xene causante xa se coñece por máis de 2.000. Polo tanto, na actualidade (2016) existen máis de 2.000 tipos diferentes de probas xenéticas, que permiten analizar no laboratorio se o xene está presente no xenoma do paciente. Pero a lista de probas xenéticas dispoñibles está en constante crecemento grazas aos avances na investigación xenética. Ademais da técnica da CRISPR, xa vista, pódense modificar as células utilizando un vector viral como na inmunodeficiencia conxénita nos nenos burbulla.

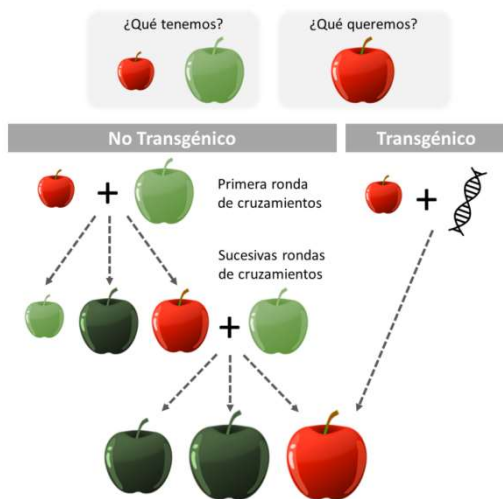
Imaxe 15.14. Fases para o tratamento con terapia

xénica ex vivo e in vivo. Fonte: <http://www.fundacionmencia.org/es/enfermedades-geneticas/terapia-genica/>

Bioteecnoloxía aplicada o sector agroalimentario.

Como xa se comentou ao inicio do tema, a bioteecnoloxía aplícase dende o comezo da gandería e a agricultura, o home seleccionou e modificou plantas e animais segundo as súas propiedades e estes son actualmente moi diferentes dos seus antepasados silvestres.

A obtención de variedades de plantas e animais polos métodos tradicionais baséanse na **reproducción selectiva**: o cruzamento entre individuos (dunha mesma especie) e a selección de exemplares que presenten as características desexadas, esta selección repítese sucesivamente para conseguir, a variedade final.



Este proceso de xeración de novas variedades foi (e segue a ser) moi útil e deu lugar ás variedades que se crían ou cultivan na actualidade.

A finais da década de 1920, os investigadores descubriron que se podían obter mutacións expoñendo as plantas a **axentes mutaxénicos** físicos (raios X e gamma etc.) ou químicos (etilmetanosulfonato, azida de sodio, etc.) Estas mutacións ocorren de forma aleatoria no xenoma e xeran unha gran variabilidade que pode provocar a aparición de características interesantes, que son seleccionadas. Así se obtivo o pomelo rosado a partir do pomelo branco mutaxenizado pola radiación. Hai máis de 2.000 especies vexetais consumidas no mundo que foron melloradas nalgún momento por mutaxénese, entre elas trigo, arroz, leitugas, xudías, etc.

A biotecnoloxía agrícola e gandeira actual aplica técnicas e ferramentas procedentes da bioloxía molecular e a xenética para mellorar a produción de cultivos, e a gandaría. Búscase desenvolver novas variedades de plantas e animais con características melloradas, como maior **resistencia ás enfermidades**, e as condicións adversas como a **seca e o frío**, maiores rendementos, menores costes, e mellor **calidade nutricional**. Tamén se busca mellorar as técnicas de produción e xestión para reducir o seu **impacto ambiental**.

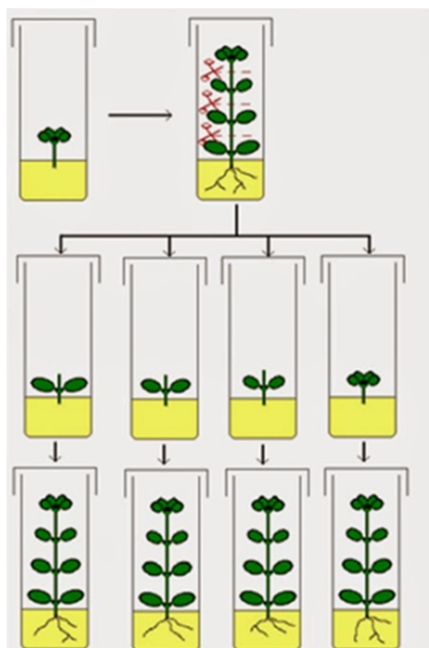
Exemplos de biotecnoloxía na agricultura

- Millo híbrido

As sementes híbridas (coñecidas como sementes F1) prodúcese cando unha planta fertiliza outra que non está xeneticamente relacionada coa primeira. As plantas híbridas presentan:

- Máis resistencia a diversas pragas e enfermidades grazas ao maior vigor dos froitos.
- Maior rendemento e calidade dos grans.
- Crecemento máis rápido, o que se traduce nunha maior produtividade

Pola contra a gran maioría dos casos as plantas híbridas non teñen descendencia fértil, as sementes que



obteñamos destas plantas serán difíciles de xerminar, ou o farán, dando como resultado unha planta cunhas características moi diferentes ás da predecesora (F2). Polo tanto hai que comprar sempre a semente que é máis cara.

Nota: Algunhas froitas sen pebidas como as sandías ou as uvas son híbridos.

- Resistencia a enfermidades.

A **micropropagación** consiste en tomar pequenas seccións de tecido vexetal ou estruturas como xemas, e cultivalas en condicións artificiais para rexenerar plantas enteiras. A micropropagación é especialmente útil para conservar plantas valiosas, acelerar a mellora vexetal e obter abundante material vexetal para a investigación. No que respecta aos cultivos e especies hortícolas, a micropropagación é actualmente a base dunha ampla industria.

A produción de plátanos está a diminuír en moitas rexións debido a problemas de pragas e enfermidades que non se poden resolver satisfactoriamente mediante pesticidas debido ao seu custo e aos seus efectos negativos sobre o medio ambiente.

Estes problemas agrávanse porque o plátano reproducese por

clonación polo que o uso de plantas nai enfermas produce descendencia enferma.

En Kenia, foi posible cultivar tecido de xemas terminais tratadas termicamente para destruír os organismos infecciosos e producir por micropropagación plantas fillas sans . Unha soa sección de tecido pode producir ata 1.500 novas plantas durante dez ciclos de rexeneración. Ten a vantaxe de ser unha tecnoloxía relativamente barata e de fácil aplicación.

Exemplos de biotecnoloxía na gandería.

A biotecnoloxía utilízase no diagnóstico de enfermidades, produción de vacinas , melloras na alimentación do gando...

- A **selección de variedades de animais** veuse favoreceu a través de prácticas como a inseminación artificial, a transferencia de embrións, a fecundación in vitro, e a cartografía xenética.
- Mediante biotecnoloxía prodúcense complementos para a **nutrición animal** como encimas, probióticos, proteínas e antibióticos para pensos que se usan amplamente en sistemas de produción intensiva de todo o mundo.
- Na vacas estase a utilizar a **somatotropina recombinante**, que produce un aumento da produción de leite e vacas e crecemento acelerado

- Mellora da saúde animal e seguridade alimentaria.

As **vacinas** producidas por métodos tradicionais tiveron un gran impacto na loita contra moitas das enfermidades do gando, pero grazas á enxeñaría xenética, estanse a desenvolver vacinas recombinantes máis eficaces que poden producirse a gran escala permitindo campañas de vacinación masiva.

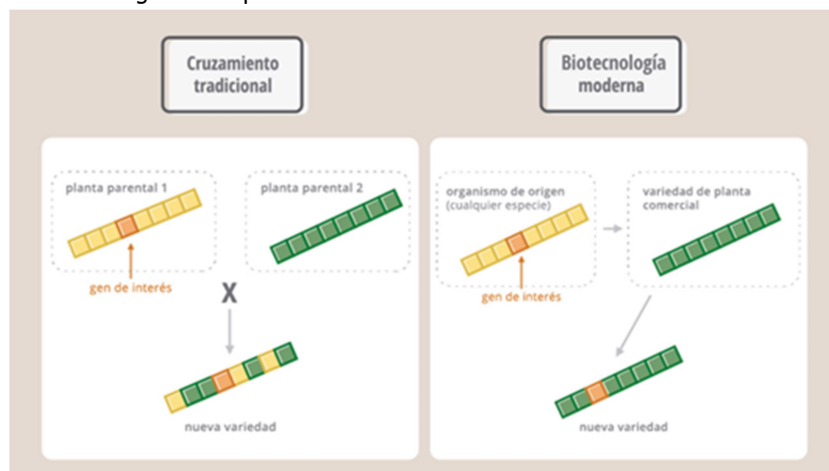
Ademáis, a biotecnoloxía ofrece **probos precisos de diagnóstico** para detectar e identificar patóxenos, xa que as enfermidades vexetais e animais as veces son difíciles de diagnosticar porque os síntomas poden ser enganosos ou mesmo estar completamente ausentes ata que se producen danos importantes.

A análise molecular dos virus da **peste bovina** foi fundamental para o éxito do Programa de erradicación da peste bovina mundial. O mundo está agora practicamente libre de peste bovina (o seu último punto quente é o ecosistema pastoril somalí, no nordeste de Kenia e sur de Somalia) . O obxectivo dun mundo completamente libre de peste bovina está ao noso alcance. A peste bovina sería a segunda enfermidade erradicada en todo o mundo, despois da varíola

ANIMAIS E PLANTAS TRANXÉNICOS.

Como xa vimos os organismo transxénicos incorporan no seu xenoma de forma estable ADN procedente de outras especies.

O obxectivo é o mesmo que os primeiros agricultores: producir cultivos ou animais superiores. Coa selección convencional é un proceso lento, xa poden pasar moitas xeracións antes de atopar a combinación desexada de características, e tempos poden ser moi longos, especialmente no caso de cultivos de plantas perennes como árbores e algunhas especies animais.



Os tranxénicos ofrecen unha gran **vantaxe**: os xenes que se van incorporar poden proceder de calquera especie, emparentada ou non (por exemplo, un xene dunha bacteria pódese incorporar ao xenoma da soia).

Con esta tecnoloxía é posible incorporar características que non existen nunha determinada especie, obtéñense de novas variedades de plantas e animais dun xeito máis rápido e preciso.

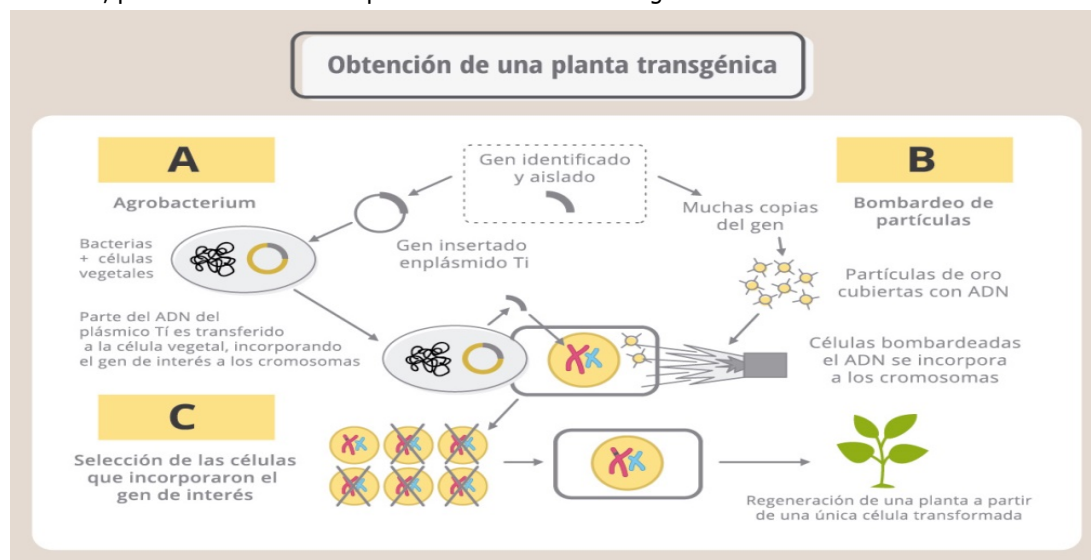
O inconveniente é que necesítase alta tecnoloxía e son procesos caros. No caso das sementes, adoitan ser creadas por grandes empresas como Monsanto ou Bayer, e están patentados, polo que só elas poden comercializalas e a extracción de sementes é ilegal.

O inconveniente é que estas variedades representan una ameaza para la conservación de las razas locais

Aínda que o xene de interese pode ser de calquera orixe, sempre debe ir acompañado de elementos que permitan a súa correcta expresión na planta hóspede (é dicir, a proteína pódese obter a partir do xene e, polo tanto, a característica desexada). Para iso o xene de interese, debe estar acompañado de **rexións reguladoras**, un promotor (que asegura o inicio da expresión) , e un terminador (que garante a correcta terminación da mensaxe). O xene coas rexións reguladoras insírese nun vector, que depende do método de transformación elixido.

Plantas transxénicas.

O cultivo das plantas transxénicas ten gran importancia na agricultura actual. Os tres maiores produtores mundiais son Estados Unidos, Brasil e Arxentina. Algúns exemplos de alimentos modificados xeneticamente comúns inclúen o millo, a soia, as patacas, as cabazas, a remolacha azucreira e os tomates. Estes alimentos foron modificados para ser máis resistentes a herbicidas, pragas, enfermidades ou condicións ambientais adversas, permitindo unha maior produción e eficiencia na agricultura.



O transxene insírese mediante un plásmido Ti, **vector** natural da bacteria ***Agrobacterium tumefaciens***, que infecta as plantas. Tamén é moi frecuente a **biobalística** con pistolas de microbalas de ouro (partículas de ouro que levan copias do xene na súa superficie). Ademais dos xenes de interese introdúcense outros xenes denominados "**marcadores de selección**" que confiren resistencia ás células que levan a antibióticos ou herbicidas. Despois da transformación, as células que recibiron os xenes de interese son seleccionadas mediante estes antibióticos ou herbicidas no medio de cultivo.

Unha gran parte das células vexetais son **totipotentes**, o que significa que unha célula de calquera parte da planta pode multiplicarse e xerar toda a planta. Para iso, as células deben crecer no medio de cultivo axeitado e en presenza de determinadas hormonas e factores vexetais. O resultado é unha planta que leva o xene de interese en cada unha das súas células.

O seguinte paso é incorporar o novo xene, mediante cruzamento, en liñas de alto valor comercial (liñas "élite"). Deste xeito a nova variedade terá un rendemento similar ao da liña elite, pero cun trazo adicional (por exemplo, resistencia aos insectos).

Usos de plantas transxénicas.

- **Resistencia a herbicidas, a insectos e a enfermidades microbianas.** Maior produción agrícola e nalgúns casos utilizando menor cantidade de produtos fitosanitarios o que abarata os costes e beneficia o medioambiente
- **Mellora na calidade dos produtos agrícolas.** Pódense producir alimentos con un maior valor nutritivo como cereais cun maior valor proteico. Un exemplo importante é o arroz dourado incorpora carotenos precursores da vitamina A . A vitamina A é indispensable durante o embarazo para previr a morbilidade, a mortalidade e a cegueira nocturna.
- **Maior resistencia á seca.** A seca segue a ser a gran ameaza para a produtividade agrícola. O cambio climático ameaza continuamente con prolongar as secas e aumentar os seus efectos. En África hai un proxecto internacional, que prevé plantar unha variedade de **millo híbrido** mais resistente a seca e as pragas . Dise que preto de 300 millóns de persoas dependen do millo como a súa principal fonte de alimento.
- **Síntese de produtos de interese comercial.** Existen xa plantas transxénicas que producen produtos biomédicos como anticorpos animais, interferón..., e incluso elementos industriais como un poliéster destinado á fabricación de plásticos biodegradables.
As plantas presentan **características** moi atractivas para ser utilizadas na produción de proteínas recombinantes, entre outras, fácil cultivo, baixo custo, a posibilidade de almacenar as proteínas recombinantes en sementes e tubérculos o que facilita o seu transporte e almacenamento .
En 2012, a Food and Drug Administration dos Estados Unidos, que regula os medicamentos nese país, aprobou por primeira vez a comercialización dunha proteína recombinante de uso terapéutico producida en plantas, que se utiliza para tratar a enfermidade de Gaucher, causada por unha enfermidade hereditaria. deficiencia do encima glucocerebrosidase. O medicamento aprobado contén unha variante desa encima producida nas células da cenoria.

Animais transxénicos.

O método máis utilizado actualmente é a microinxección directa de ADN nos protonúcleos dos óvulos fecundados.

Usos de animais transxénicos:

Modelos de investigación e xenotransplantes (xa visto).

Producir moléculas de interese médico e industrial.

Mellora de animais de interese

Producir moléculas de interese médico e industrial.

Esta aplicación da biotecnoloxía chámase "molecular pharming" en inglés e consiste no uso de animais como "fábricas de moléculas". Actualmente existen cabras transxénicas que xeran no leite unha proteína anticoagulante: este produto é o primeiro medicamento que se produce en animais transxénicos e está aprobado polas axencias reguladoras de Europa e Estados Unidos.

Existen varios proxectos neste sentido, que inclúen a produción de lisozima, lactoferrina, hormona de crecemento, insulina, alfa-antitripsina, activador tisular do plasminóxeno, etc., en leite de vaca, porco, ovella e cabra, ou en ovos de galiña.

A produción no leite de animais transxénicos é especialmente interesante para proteínas que son necesarias en grandes cantidades ou que son moi complexas. A produción en leite tamén permite unha purificación relativamente sinxela da proteína de interese. Dado que a produción da nova molécula non debe interferir co crecemento e metabolismo do animal, introdúcese o xene de interese xunto cun elemento (promotor) que permite a súa expresión só na glándula mamaria.

Mellora de animais de importancia económica.

A produción de transxénicos está máis desenvolta na acuicultura pola maior facilidade da manipulación dos ovos e embrións.



Un salmón transgénico AquAdvantage (atrás) al lado de un salmón del Atlántico convencional de la misma edad (frente).

Un exemplo dos os **salmóns** que alcanzan máis rápido o seu tamaño adulto, pola inserción dun xen do salmón do Pacífico (que crece todo o ano) e foi o primeiro animal transxénico en permitirse a súa venta (2015 Estados Unidos e Canadá).

Tamén estase investigando en vacas **resistentes a enfermidades** como a mamite, galiñas transxénicas (utilizando tecnoloxía RNAi) que non transmiten a gripe aviaria co fin de reducir non só a enfermidade das galiñas, senón tamén a posibilidade de que algunha cepa mutante pasa a barreira da especie e infecta aos humanos, como ocorreu coa cepa H1N1.

A biotecnoloxía pode axudar a producir animais **respectuosos co medio ambiente**. Un exemplo é o desenvolvemento de porcos transxénicos cunha mellor asimilación do fósforo na dieta para reducir o impacto ambiental do esterco animal. Enviropigs é a marca rexistrada de porcos desenvolvida para este fin na Universidade de Guelph en Ontario, Canadá. Son animais xeneticamente deseñados para producir o encima fitase nas súas glándulas salivares, o que permite unha dixestión máis eficiente do ácido fítico presente no millo e na soia.

Ventaxas e desvantaxas dos transxénicos.

Hai un amplo debate social sobre o uso de cultivos e alimentos transxénicos con posicións contrapostas.

VANTAXES

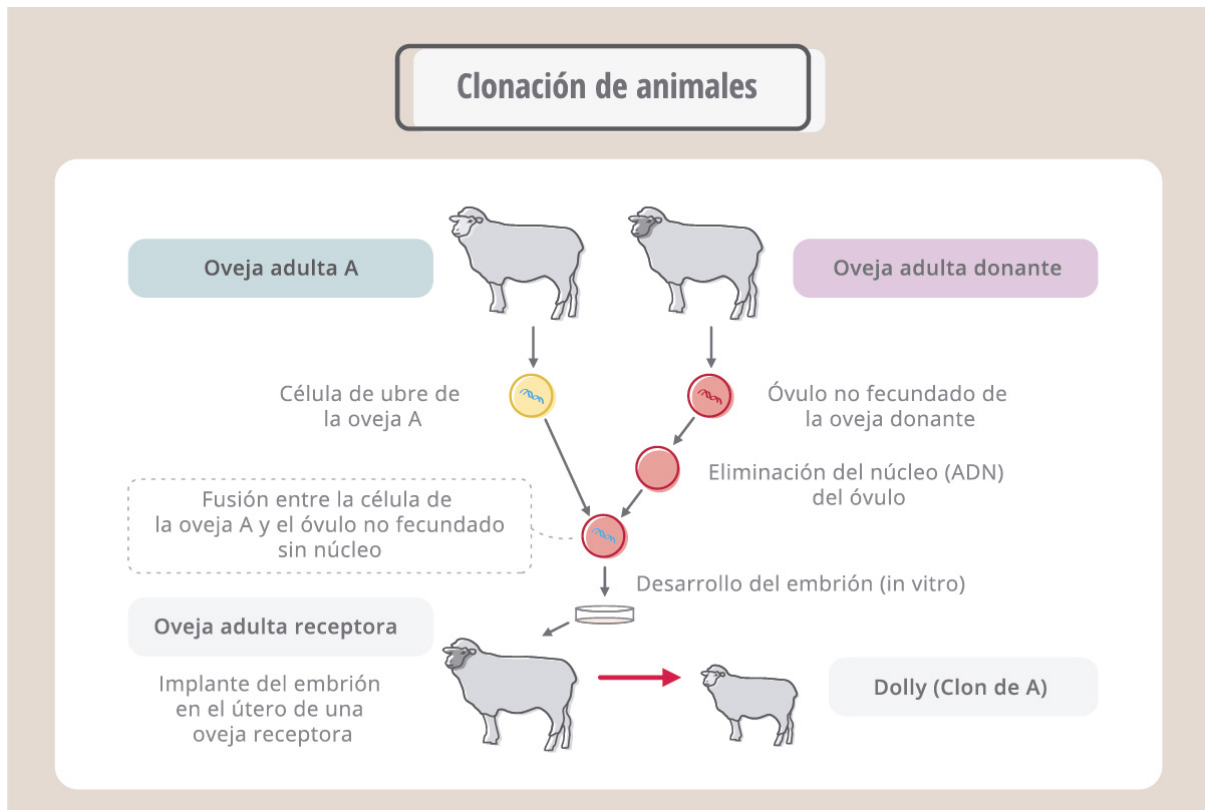
- **Aumento da produción.** As plantas son máis resistentes a enfermidades, seca... e de crecemento máis rápido, con menos necesidade de auga, fertilizantes, etc. Isto significa que se perden menos recursos e se pode alimentar unha maior porcentaxe da poboación.
- Redución da **fame** no mundo (como consecuencia do punto anterior).
- Beneficios para o **medioambiente**. Se temos plantas máis fortes, podemos reducir uso de pesticidas, herbicidas. A modificación xenética pode repercutir positivamente na saúde dos consumidores. Imaxinemos, por exemplo, un vexetal modificado para aportar unha maior cantidade de micronutrientes.

DESVANTAXES

- Posibles efectos sobre a **saúde humana**. posibles efectos a longo prazo sobre a saúde humana, como alerxias ou toxicidade ou cambios xenéticos inesperados. Tamén poden producir carencias se os alimentos que producen alimentos que son menos nutritivos, xa que en moitos casos interesa máis a produción en cantidade que a calidade.

Ademais, para moitos colectivos non é certo que sexan a solución á fame, xa que a gran maioría dos cultivos alimentarios modificados xeneticamente utilízanse para a alimentación animal que engorda animais explotados na gandería industrial para que nos países ricos poidamos ter carne barata.

- Impacto no **medio ambiente**: Existe preocupación polo impacto ambiental dos cultivos transxénicos, como a posible transferencia de xenes a especies silvestres, a perda de biodiversidade e a creación de resistencia en pragas. Na UE só se cultivan en España e Portugal (millo BT resistente ao taladro), aínda que si se importan transxénicos de países extracomunitarios
- **Control corporativo**: Algúns críticos sinalan que os cultivos modificados xeneticamente son caros e poden levar a un maior control das empresas biotecnolóxicas sobre os agricultores debido á dependencia de sementes patentadas e produtos asociados.



CLONACIÓN DE ANIMALES

A través da transferencia nuclear de células somáticas, pódese crear unha copia xenética exacta de células ou animais existentes.

Para iso son necesarias dúas células: un **ovocito** e unha **célula somática doadora**. O ovocito debe ser enucleado (eliminar o seu núcleo), o núcleo tómake da célula somática, que proporciona o conxunto cromosómico para o novo ser, e transfírese ao ovocito enucleado. O ovocito actúa sobre o núcleo transferido producindo a súa reprogramación: os xenes do desenvolvemento embrionario, silenciados debido ao efecto da diferenciación celular volven a ser activos. O cigoto así obtido comeza a dividirse e cando adquire o estado de blástula implántase no útero dun animal da mesma especie debidamente preparado.

Estas operacións, que deste xeito parecen unha cousa sinxela, requiren un gran coñecemento técnico e aínda así o número de fallos é enorme. Para a obtención da ovella Dolly (1997) necesitáron de 433 intentos. Por este motivo e sobre todo por razóns éticas, todos os países e científicos relacionados con este tema prohibiron a clonación reprodutiva humana.

Clonación reprodutiva

A finalidade é obter un novo organismo, polo que pode considerarse como unha forma sofisticada e complexa de reprodución asexual asistida.

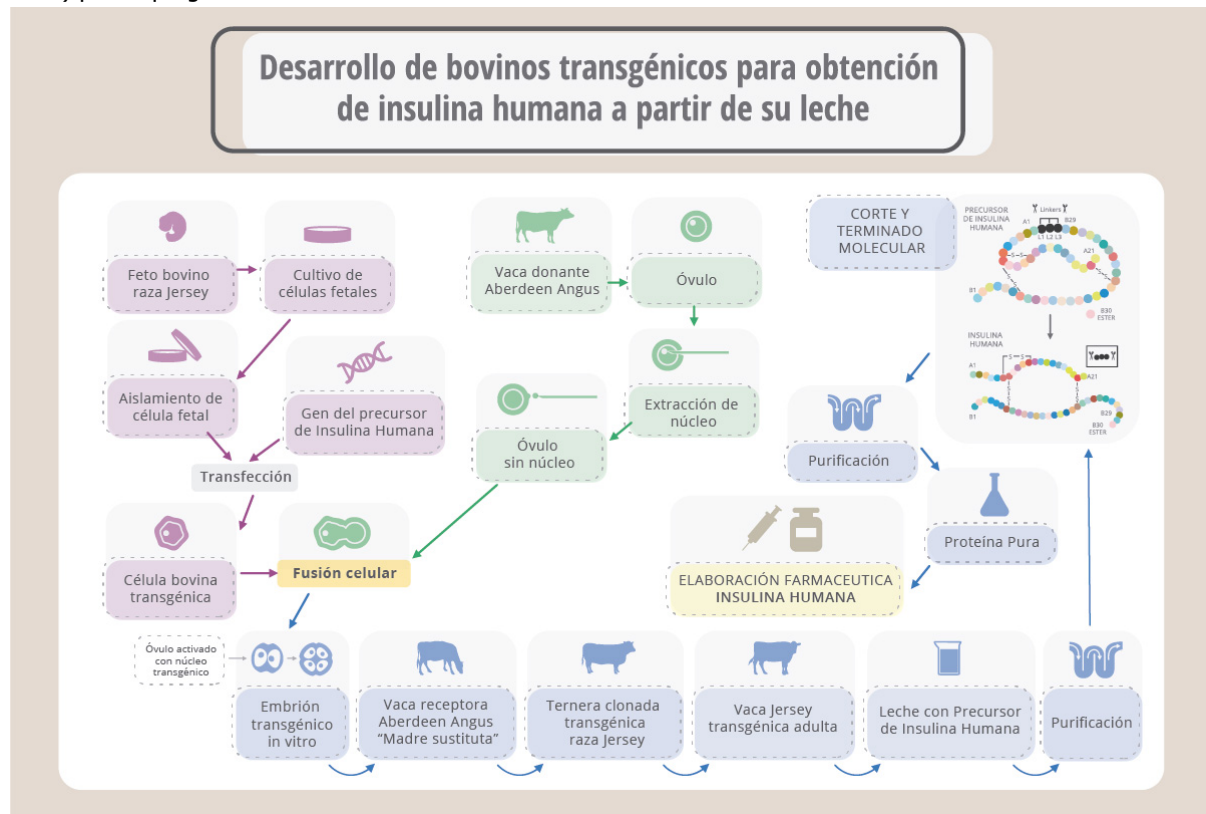
- Pódense **clonar animais** previamente modificados xeneticamente para obter fármacos, investigación, xenotransplantes...
- Ademais, as técnicas actuais de reprodución e clonación ofrece a posibilidade de preservar especies ameazadas. Por exemplo no 2020 clonouse dun hurón de patas negras, unha especie en perigo de extinción (americana). Tamén foron clonado un muflón (Italia) e o lobo ártico (China)
- Tamén tense clonados animais de especial valor como cabalos de carreiras.

Empresas privadas ofrecen a clonación de mascotas, Clonar un can custa uns 50.000 euros, e un gato uns 35.000 euros. Para un crecente grupo de ricos chineses, isto non é un obstáculo, segundo a dirección da fábrica de clonación. Moitos clientes ven á súa mascota como un membro máis da familia. "Hai moita xente que o pode pagar"

Clonación Terapéutica

O obxectivo é obter **células nai**, tecidos ou órganos para transplantes que non producirían rexeitamento a partir de embrións.

Actualmente pódese células nai de pluripotencia inducida, ou **células iPS** (premio Nobel de medicina Yamanaka 2012) pola reprogramación de células adultas



O PROXECTO XENOMA HUMANO

O **ixenoma** comprende o conxunto de **xenes** dun ser vivo. A **xenómica** estuda xenomas enteiros, ou grandes rexións dos mesmos

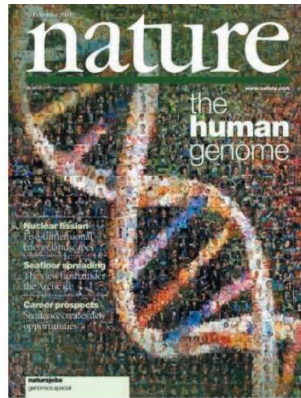
O **Iproxecto Xenoma Humano (PGH)** foi un dos maiores fitos científicos do século XX, un proxecto dedicado a determinar a **secuencia** de nucleótidos (ou bases) que compoñen o ADN humano e mapear os aproximadamente 20.000 a 25.000 xenes que contén.

No PGH liderado por USA e desenvolvido entre 1990 e 2003, participaron máis de 20 Universidades e institutos científicos de diferentes países, sendo o maior proxecto en **colaboración** da historia biomédica. Participaron organismos públicos e empresas privadas, entre elas Celera Genómics (con Craig Venter), que utilizou unha técnica diferente que lle permitiu secuenciar o ADN humano máis rapidamente. Durante o proxecto foi de gran importancia a mellora nada tecnoloxía para o secuenciación de bases. Os avances realizados permitiron que estea rematado dous anos antes do previsto. En 2001 publicouse o primeiro borrador *Nature e Science* e en 2003 publicouse o xenoma completo.

Conclusións do HGP

O xenoma humano consta de moitos menos xenes dos que se prevía, actualmente se calcula que temos uns 20.000 xenes codificantes, (3.200 millóns de pares de bases), fronte aos 100.000 estimados.

O 99,9% do xenoma é **idéntico** en todas as persoas e 98% idéntica á do chimpancé. As diferenzas con outras especies foron menores do esperado. Só unha pequena fracción do ADN humano codifica proteínas.



Imaxe 15.20. Á esquerda, as portadas de Science (16-2-2001) e Nature (15-2-2001)

A secuenciación do xenoma levou a un serio **debate ético** e social, e xurídico sobre a patente dos xenes da quenaceu a Declaración Universal sobre o Xenoma Humano e os Dereitos Humanos, elaborada pola UNESCO (1997) " *..o xenoma humano é o patrimonio da humanidade.*"

En 2013, o Tribunal Supremo dos Estados Unidos fallou contra a empresa. *Myriad*

Genetics, unha empresa que desenvolve probas de xenes supresores de tumores relacionados co cancro de mama (BRCA1 e BRCA2) e que cobrou uns 2.500 euros pola proba. A sentenza indica que non se pode patentar unha secuencia de ADN atopada de forma natural, aínda que se pode patentar o ADN producido sinteticamente.

Posteriormente se seguen realizando distintos proxectos para o estudo do noso xenoma, por exemplo, **Encode (Enciclopedia do ADN)**, é un proxecto de análise do xenoma humano, para saber se o ADN non codificante ten algunha función específica. O achado máis salientable é que o **80 %** do **ADN** contén elementos vinculados a **funcións bioquímicas**, desterrando a idea de que gran parte do ADN é simplemente "lixo" evolutivo. Polo tanto, a maior parte da secuencia de ADN, polo menos nalgúns dos tipos celulares investigados, está despregada e exposta, e presenta signos de que se está a transcribir (prodúcese ARN), ou de que existen proteínas que se adhírenespecificamente a dita secuencia. Gran parte do ADN non codificante, que non se expresa en proteínas, ten **funcións de regulación**, polo que poden estar relacionados con enfermidades e poden ser dianas terapéuticas.

Os resultados de ENCODE indican que os **xenes** son máis **complexos** do que se pensaba ata agora. En lugar da visión tradicional, segundo a cal un xene dá lugar a unha ou varias transcricións alternativas que codifican unha proteína, parece claro que unha rexión xenómica pode codificar diferentes produtos proteicos e tamén dar lugar a outras transcricións (non necesariamente codificantes de proteínas) en ambas as cadeas.

Aplicacións de proxectos xenómicos

As principais aplicacións destes proxectos enmárcanse no ámbito da **biotecnoloxía médica**, permitirá a identificación de xenes responsables de enfermidades xenéticas ou predisposición xenética, o que abre a porta ao desenvolvemento de métodos de diagnóstico, estudo da resposta a determinados fármacos, deseño de fármacos específicos para tratar a enfermidade.

Tamén nos permiten afondar na **historia da humanidade** e coñecer as rutas de **migracións** das poboacións humanas ao longo da historia

Proteómica

O **proteoma** é o conxunto de proteínas expresadas nunha célula, organismo ou especie. Varia segundo o momento (tempo) e estado da células. A proteómica é o estudo do proteoma, estrutura, función, comportamento, interaccións.

Os factores decisivos para o desenvolvemento da proteómica, foron a secuenciación dos xenomas (coñécese a secuencia dos xenes pero non a súa función), o avance das técnicas de separación e análise de proteínas, e o desenrolo dos sistemas bioinformáticos que permiten relacionar a estrutura proteica coa súa función.

A aplicación da proteómica ten un enorme potencial no ámbito da biomedicina.

15.7 APLICACIÓNS BIOTECNOLÓXICAS DOS MICROORGANISMOS

Os **microorganismos** son organismos microscópicos, pequenos seres vivos non visibles para o ollo humano, tamén coñecidos como microbios, pero inclúese tamén formas **acelulares** como os virus que só son visibles a través dun microscopio.

Dentro dos microorganismos inclúense os virus, as bacterias (procariotas), e organismos eucariotas uni ou pluricelulares; fungos (fermentos), protozoos e algas.

As **calidades do microorganismo** ideal para o seu uso en biotecnoloxía son as seguintes:

- Medra rapidamente en medios líquidos e a temperaturas moderadas
- Producir substancias de interese a grande escala e no menor tempo posible
- Ser xeneticamente estable
- Ser apto para a manipulación xenética
- Non ser patóxeno

Tradicionalmente, a palabra **fermentación** utilizouse en microbioloxía industrial para describir os procesos de cultivo a gran escala de microorganismos con fins industriais.

Non obstante, non debemos confundir este uso amplo da térmica co máis estrito referíndose á vía metabólica.

O desenvolvemento da fermentación industrial inclúe unha serie de procesos que se agrupan en dous partes:

- Na primeira parte, selecciónase e prepárase o microorganismo, e prepárase o medio de cultivo e as condicións nas que se cultivará.
- A segunda parte inclúe a recollida e depuración do produto

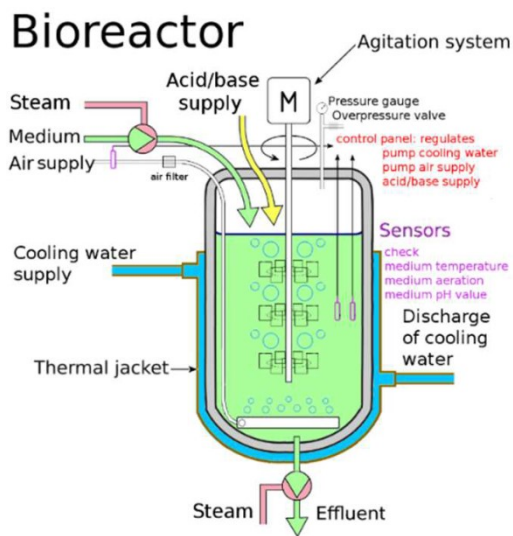


Figura 21.9. Un biorreactor en una industria y Figura 21.10. Un esquema de su funcionamiento.

Fuente: <http://cotterbrothers.com/products/bioreactors-fermentation/> y <http://bestofpicture.com/bioreact-or-diagram.html>

Para o cultivo industrial, utilízanse tanques de aceiro inoxidable, chamados **fermentadores ou biorreactores**. Son tanques de diferentes capacidades no que hai un líquido que actúa como medio de cultivo para o microorganismo. O medio de cultivo e microbios industriais mestúranse mediante un sistema de paleta e axústanse os parámetros de temperatura, pH, concentración de O₂, nutrientes, etc.

PRODUCCIÓN DE ALIMENTOS E BEBIDAS

Elaboración de pan

Utilízanse **lévedos** da especie *Saccharomyces cerevisiae*, tamén chamada lévedo de panadaría, en condicións **anaerobias** (son anaerobios facultativos) que realizan unha **fermentación alcohólica**. Como produtos obtéñense etanol (que se evapora durante a cocción) e CO₂, responsables do aumento de volume e esponxidade.

Ao mesturar fariña, auga e fermento, as amilases presentes nos fermentos actívanse en presenza de auga e hidrolizan o amidón formando glicosa, que será utilizada na fermentación.

Elaboración de viño e cervexa

Están implicados **lévedos**, o mais importante, *Saccharomyces cerevisiae* que realizan unha fermentación semellante á do pan.



-No proceso de elaboración do viño utilízanse os azucres presentes no zume da uva (mosto).

-Na fabricación de cervexa utilízanse sementes de cebada, que se humedecen e se deixan xerminar. Despois sécanse, obtendo a malta. A xerminación orixina amilases que, despois de moer a malta, son liberadas, transformando o amidón en glicosa. Ao incorporar as flores do lúpulo impídese o crecemento bacteriano e obtense o sabor amargo. O quecemento adicional da mestura desnatura as amilases. Despois engádense os lévedos que producirán a fermentación alcohólica. Finalmente, o líquido resultante é filtrado e pasteurizado.

Elaboración de vinagre

Empréganse **bacterias** (*Acetobacter* e *Gluconobacter*) que son responsables da transformación do etanol (de calquera bebida alcohólica) en ácido acético mediante **oxidación**.

Aínda que se coñece como fermentación acética, porque obtense un composto orgánico (o ac. acético), é unha **respiración incompleta** porque intervéñen o osíxeno e a cadea respiratoria.

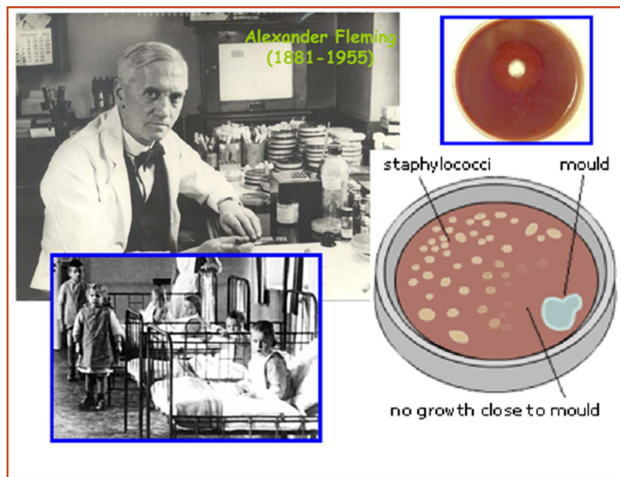
Elaboración de produtos lácteos

Utilízanse **bacterias** do ácido láctico, (ex: *Streptococcus thermophilus* y *Lactobacillus bulgaricus*) , que atópanse naturalmente no leite non esterilizado.

-O iogur prodúcese pola **fermentación láctica** do leite, a acidez **desnaturaliza** as proteínas do leite que precipitan.

-Na elaboración do queixo, ademais da fermentación láctica, engádeselle ao leite un encima chamado **renina** ou callo (do estómago dos ruminantes), e as proteínas precipitan. O leite callado fíltrase para separar o soro. O queixo entra na fase de maduración onde, pola acción de diferentes **bacterias, fermentos, e mofos** (*penicillium*) adquiren o sabor e o cheiro de cada variedade de queixo.

INDUSTRIA FARMACÉUTICA



Antibióticos.

Determinados **fungos filamentosos e bacterias** (ex: Streptomyces) producen antibióticos que se usan para combater bacterias (non os virus) e xogan un papel fundamental no control de enfermidades infecciosas. A penicilina, o primeiro antibiótico descuberto por Alexander Fleming (1928) é producido por un mofo : Penicillium.

Aínda que estes microorganismos producen de xeito natural antibióticos, para o seu uso médico foi necesario o desenvolvemento de técnicas de

cultivo e a selección de cepas adecuadas para a produción en grandes cantidades. Tamén existen antibióticos sintéticos producidos no laboratorio e semisintéticos producidos por microorganismos e posteriormente modificados en laboratorio. Hasta o momento coñécense cerca de 800 antibióticos distintos.

O consumo abusivo dos antibióticos está dando lugar á selección de poboacións bacterianas, aparecendo novas cepas **resistentes** ós antibióticos. Isto provocou na actualidade a aparición de enfermidades infecciosas que non responden ó tratamento con antibióticos

INXEÑERÍA XENÉTICA

- **Vectores de clonación**
- **ADN recombinante.** Elaboración de proteínas , por exemplo insulina, hormona do crecemento ou anticorpos.
- **Obtención de vacinas.**

BIOTECNOLOXÍA INDUSTRIAL

A biotecnoloxía industrial (biotecnoloxía branca) é aquela que se dedica a produción sostible de compostos químicos, biomateriais e biocombustibles, e a optimización de procesos industriais para xerar un menor impacto ambiental: menor consumo enerxético, materiais biodegradables, menos contaminantes...

Nos procesos biotecnolóxicos industriais teñen gran importancia os microorganismos, ademais dos alimentos e medicamentos xa vistos, grazas a actividade de distintos microorganismos pódese obter:

- **Encimas.** Utilízanse na industria alimentaria, deterxentes, biocombustibles, cosméticos .. A utilización de encimas nos deterxentes permiten que deterxentes máis ecolóxicos sen fosfatos, con menores tempos de lavado e a menor temperatura.
- **Aditivos alimentarios** como o glutamato, ac. cítrico....
- **Bioplásticos.** Obtéñense de produtos renovables e son biodegradables.
- **Biocombustibles.** Bioetanol (utilizado especialmente en Brasil e EEUU) As materias primas son renovables (azucre de cana, remolacha e amidón de millo) . O 95% obtense con *S. cerevisiae*. Nos últimos anos implantáronse en España varias fábricas de bioetanol.

BIOTECNOLOXÍA MEDIOAMBIENTAL



As áreas de actuación da biotecnoloxía ambiental están relacionadas coa conservación de ecosistemas, e/ou co aproveitamento dos recursos naturais.

A biotecnoloxía ambiental inclúe :

- Conservación da **biodiversidade**.
- Utilización de sistemas biolóxicos co fin último de previr, mitigar ou eliminar a presenza de **compuestos contaminantes** no medio ambiente

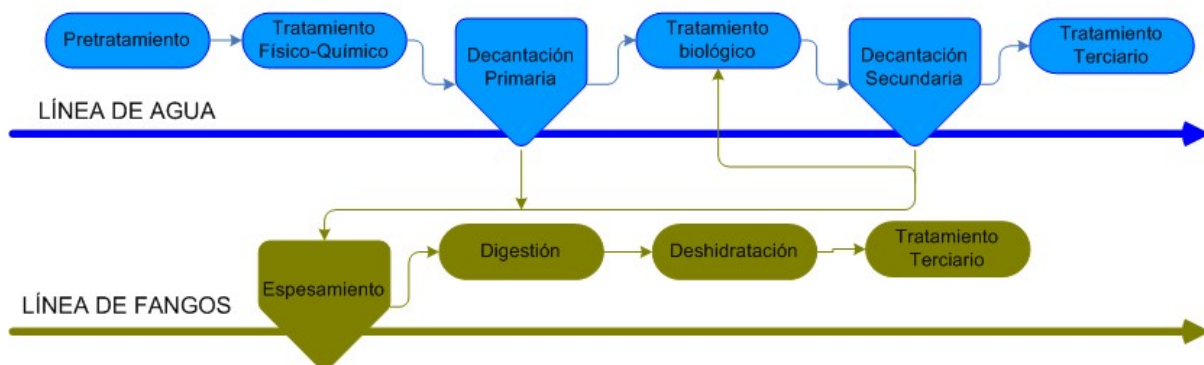
-Imaxe 19.14. A biotecnoloxía ambiental contribúe a manter a biodiversidade. Fonte: <https://www.linkedin.com/pulse/biotechnology-better-tomorrowkevin-brown>

Os microorganismos, especialmente as bacterias, grazas á súa **versatilidade metabólica**, poden degradar practicamente calquera substancia orgánica e poden utilizarse na **depuración e na biorremediación**. A depuración é a eliminación dun contaminante antes de que chegue ao medio mentres que a biorremediación utiliza seres vivos para restaurar ambientes xa contaminados.

Algunhas aplicacións da biotecnoloxía na mellora do medioambiente son:

- **Eliminación de vertidos industriais**, eliminación de metais pesados en residuos de explotacións mineiras...
- **Tratamento das mareas negras**. Degradación de hidrocarburos
- **Tratamento biolóxico das augas residuais urbanas**. (tratamento secundario)

CROQUIS E.D.A.R.



Na maioría das estacións depuradoras de augas residuais (EDAR) , estes procesos ocorren en tanques de aireación. Os microorganismos aliméntanse de contaminantes orgánicos presentes na auga, e tamén se eliminan compostos inorgánicos como compostos de fósforo e nitroxenados procedentes da agricultura. Despois destes procesos biolóxicos as augas residuais están libres de a maior parte das substancias biodegradables.

Os lodos obtidos ao final do proceso fermentase por microorganismo para a obtención de metano ou compost

- **Formación de compost**. Baséase na actividade dos microorganismos descompoñedores (fungos e bacterias) que actúan sobre os restos de materia orgánica

15.7 BIOÉTICA

Algunhas posibles aplicacións da biotecnoloxía xeran un debate sobre as súas implicacións éticas e morais (existe un Comité Internacional de Bioética da UNESCO en Zaragoza). Son moitos os aspectos da Biotecnoloxía que deben contemplarse dende este prisma para establecer normas e leis que regulen adecuadamente as distintas actividades. Xa vimos algúns deles como a **patente de xenes e a produción de alimentos transxénicos**, pero hai máis debates abertos, poderíamos considerar os seguintes entre eles:

O seu mal uso podería servir para discriminar a algunhas persoas porque se podían coñecer as diferenzas xenéticas entre individuos ou grupos de persoas.

- Hai polémica sobre a **manipulación de embrións** e mesmo a súa produción para o seu uso para a medicina rexenerativa (por exemplo, unha muller que queda embarazada de forma natural para que o embrión poida ser utilizado para curar outro fillo xa nacido).

- **Terapia Xénica**. Por exemplo, manipular o ADN dun humano adulto que leva un defecto causante da enfermidade pode ter certas implicacións éticas, pero poucos se oporían a tal intervención. E a manipular xenes "normais" para facelos mellores?. Ou a alterar o xenoma nos primeiros pasos do desenvolvemento embrionario?, implicaría a xeración dun individuo cunha nova información xenética, con potencial para transmitirse a xeracións sucesivas e, polo tanto, para establecer unha nova estirpe de seres humanos.

En 2018, unha noticia espallouse polos medios de comunicación: un científico chinés anunciou que os bebés xemelgos naceron despois de que os embrións fosen modificados xeneticamente mediante a técnica CRISPR/Cas9. Aos embrións modificouse o seu ADN, máis precisamente o xene CCR5, para que fosen resistentes ao virus VIH. O científico informou de que os bebés naceron sans e sen secuelas. Non obstante, a edición de xenes de embrións é un tema controvertido. O anuncio xerou varias discusións en todo o mundo e o científico foi condenado.

- Organismos modificados xeneticamente destinados á guerra biolóxica (virus e bacterias).
- Coa técnica da CRISPR o concepto de organismo transxénicos queda moito máis difuso.

PREGUNTAS E EXERCICIOS

1. Indica se as seguintes afirmacións son V ou F
 - a. As nucleases de restrición recoñecen secuencias de ADN que están necesariamente entre xenes
 - b. As secuencias de restrición sitúanse aleatoriamente no xenoma
 - c. Coa PCR utilízase unha ADN polimerase resistente á calor.
 - d. Os plásmidos recombinantes, que teñen fragmentos de ADN exógenos, sempre levan un xene que proporciona resistencia á ampicilina.
2. En relación coas técnicas de enxeñaría xenética, indica:
 - a. Que é o ADN recombinante?
 - b. Cales son as ferramentas moleculares básicas para a construción de ADN recombinante?
 - c. Como funciona cada unha destas ferramentas?
3. Ordena a secuencia do proceso de produción da planta transxénica de tabaco que contén o xene da encima luciferase:

IDENTIFICACIÓN: regáronse as novas plantas cunha solución que contiña luciferina e despois dun tempo as plantas brillaron.

INSERCIÓN: o cromosoma viral modificado foi inserido despois en plásmidos Ti. INCUBACIÓN: as bacterias foron incubadas con células de follas de tabaco.

TRANSFORMACIÓN: Os plásmidos foron transferidos ás bacterias *E. coli*.

RECOMBINACIÓN: o xene da luciferase foi empalmado no cromosoma dun virus vexetal, proporcionándolle unha secuencia reguladora.

PROPAGACIÓN: As células formaron unha masa de tecido, coñecida como callo, da que se obtiveron novas plantas nun medio de crecemento axeitado.

ILLAMENTO e AMPLIFICACIÓN: Unha vez coñecida a estrutura do encima luciferase, o xene da luciferase foi illado e posteriormente amplificado por PCR.

4. Cal é a función das secuencias CRISPR en bacterias e arqueas?
5. Que fai a proteína Cas9 no sistema CRISPR-Cas9?