

# L'ENGINYERIA GENÈTICA i LA BIOTECNOLOGIA



At harvest time Ted's ethical objections to the use of frog genes in potato breeding were conveniently forgotten.

# L'enginyeria genètica i la biotecnologia

- Tècniques per introduir gens en cèl·lules.
- Producció de còpies de DNA.
- Obtenció de la proteïna que codifica el gen.
- Introducció de gens en cèl·lules humanes.
- Obtenció de vacunes recombinants.
- Obtenció d'un animal transgènic.
- Obtenció d'una planta transgènica.
- La clonació reproductiva.
- Medicina regenerativa. Clonació terapèutica. Cèl·lules mare.

# Obtenció d'un animal transgènic

Un animal transgènic és aquell animal desenvolupat a partir d'una cèl·lula a la que li hem introduït un gen estrany amb la finalitat de modificar-li característiques ja existents o afegir-ne de noves.

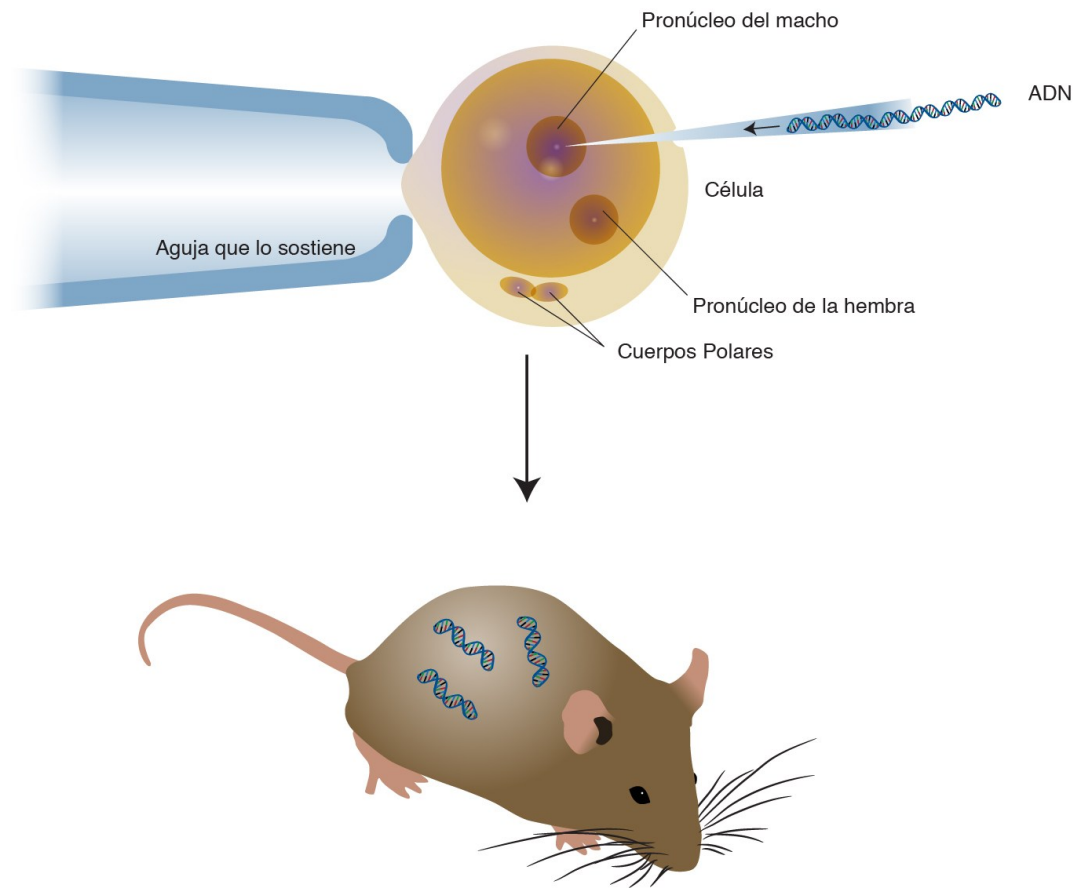
El gen introduït (el transgen) passarà a formar part del genoma de l'individu i per tant la modificació genètica passarà a la descendència.

Per insertar un gen correctament en un animal, el transgen ha de poder expressar-se en el moment adequat, amb la quantitat adequada i en el lloc adequat de l'animal: per tant a part de la regió codificadora ha de portar una zona promotora i seqüències reguladores.

La introducció del transgen en animals es pot fer per...

- Microinjecció
- Electroporació
- Biobalística
- Mitjançant retrovirus.

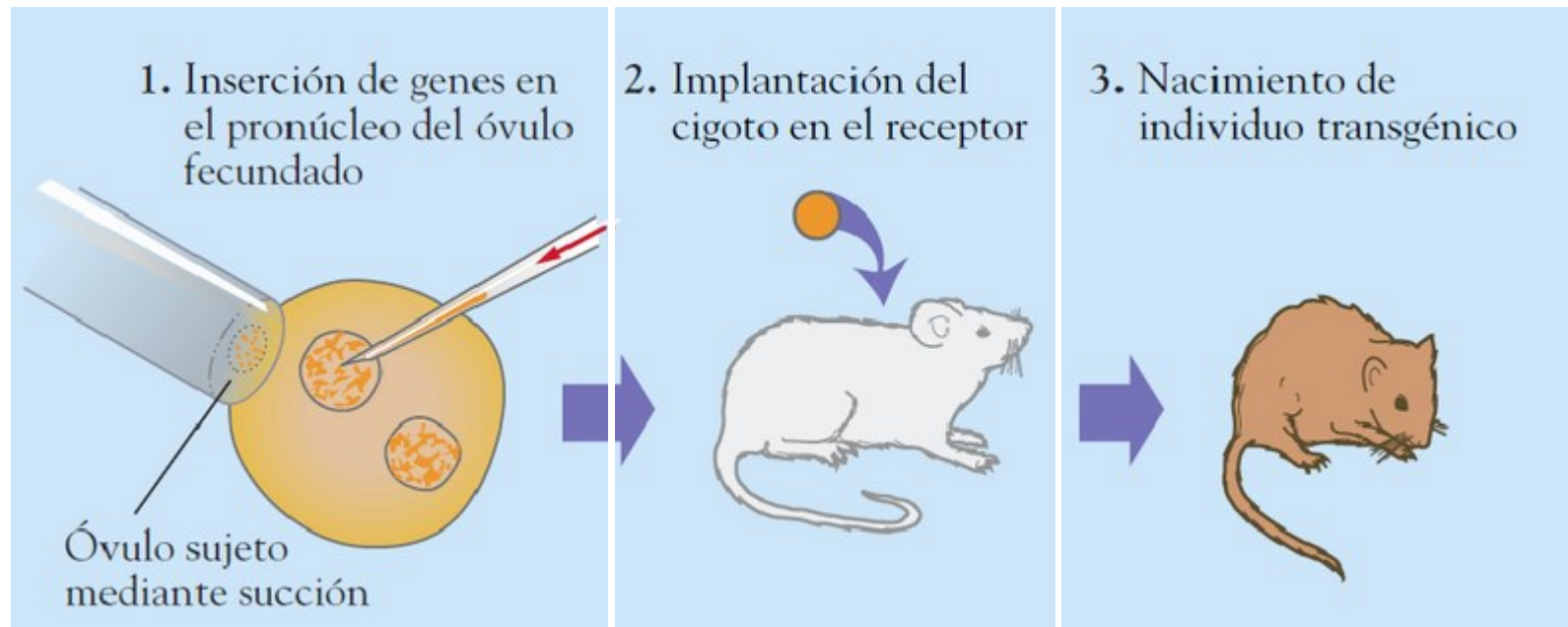
Ens centrarem en la microinjecció...

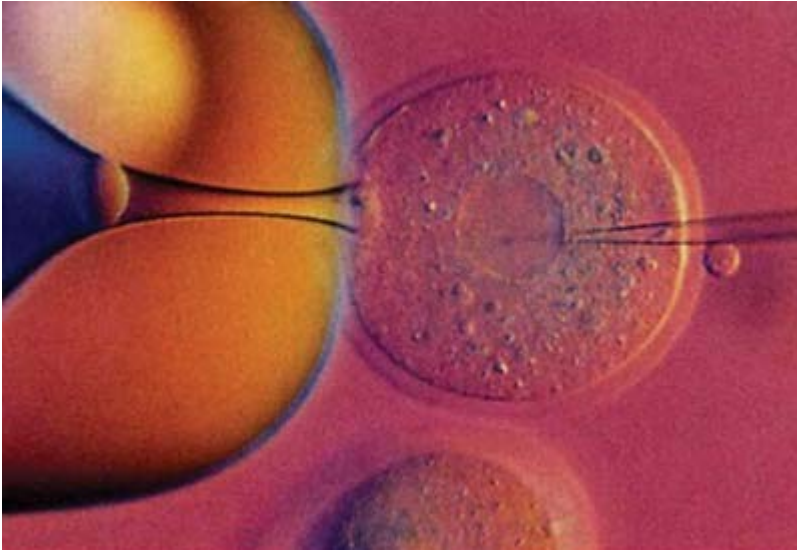


## Mecanisme simplificat per a l'obtenció d'un animal transgènic

### Tècnica 1: per microinjecció en zigots

- Aïllament del gen que es vol transferir (tallant-lo amb enzims de restricció).
- Obtenció dels òvuls fecundats d'una femella (per fecundació "in vitro")
- Introducció del gen en un dels pronuclis de l'òvul fecundat (zigot) per microinjecció.
- Implantació de l'embrió modificat a l'uter d'una femella.
- Totes les cèl·lules del nou organisme seran portadores del transgen introduït.





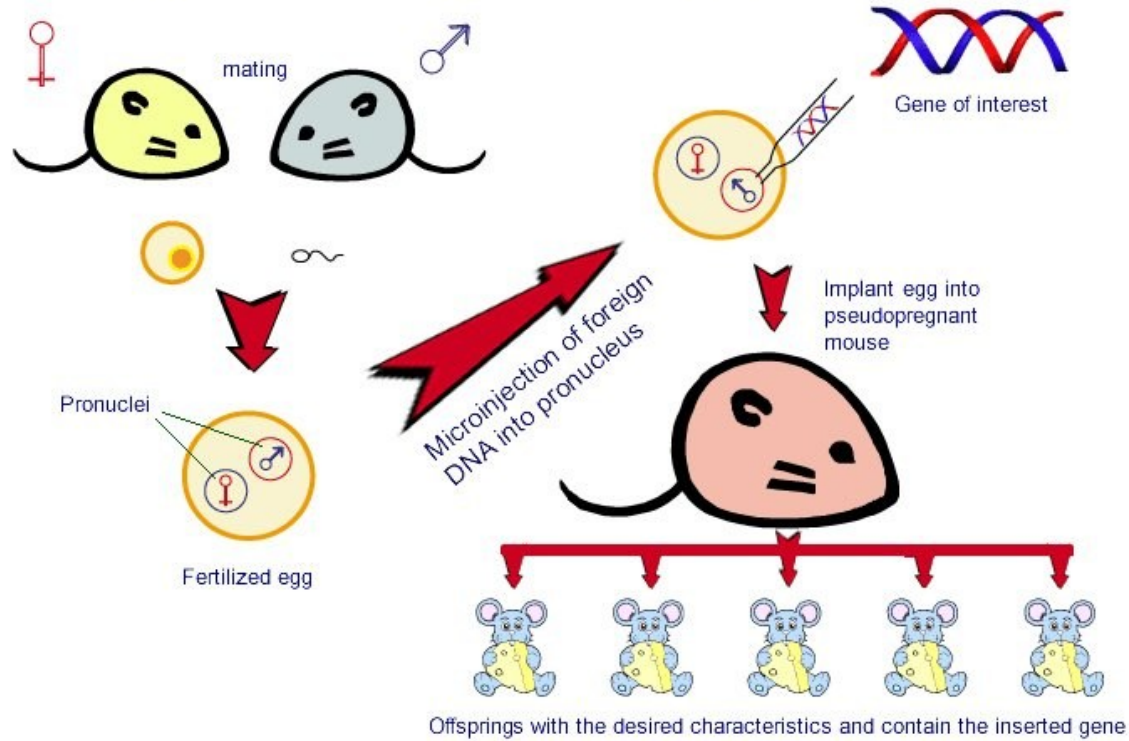
Microinjecció d'ADN en un pronucli d'un embrió d'una cèl.lula. A l'esquerra, la micropipeta de subjecció que succiona suaument la cèl.lula. A la dreta, la pipeta d'injecció.



Equip per manipular embrions i realitzar hi la microinjecció. Damunt de la platina es veuen la micropipeta de subjecció i la d'injecció

Font. Article aprofundim en la ciència. Animals transgènics: què són, com s'obtenen i per què serveixen. Anna Pujol UAB.

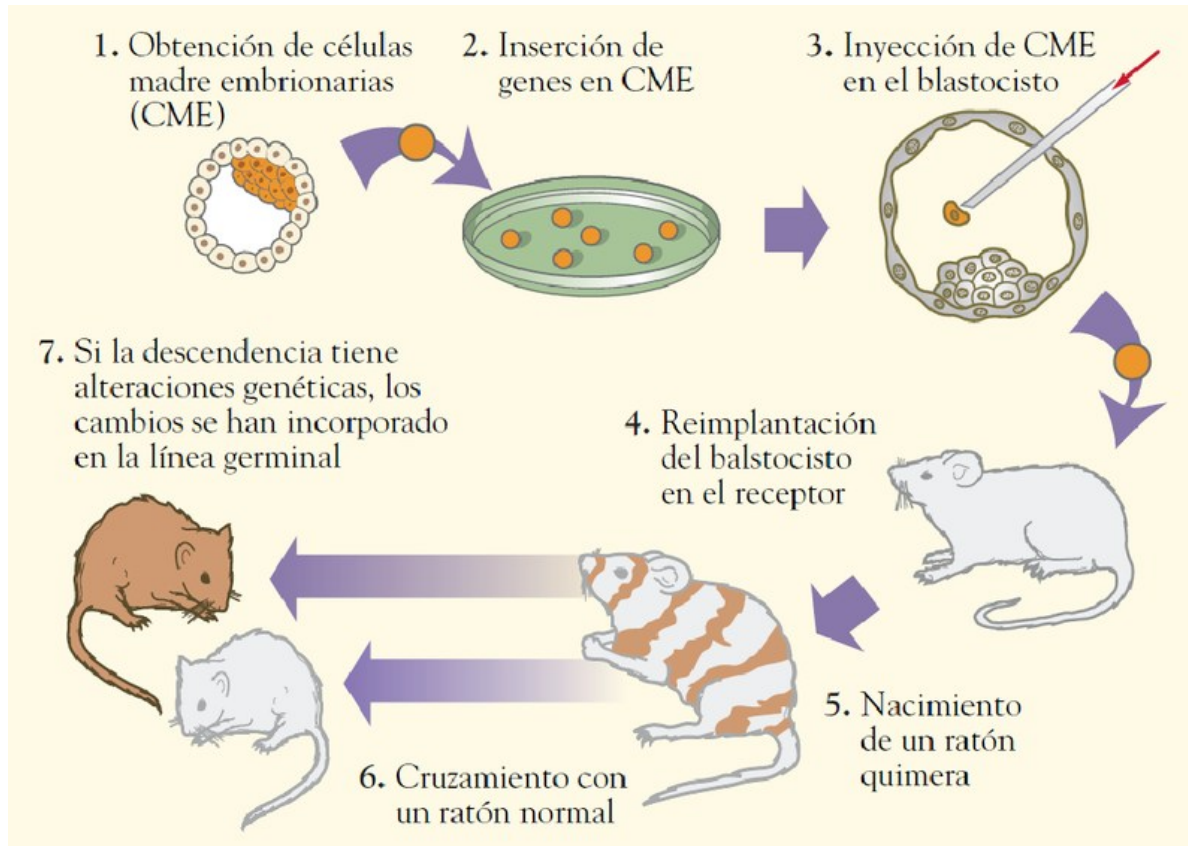
# Transgenic Mice by Microinjection





# Mecanisme simplificat per a l'obtenció d'un animal transgènic

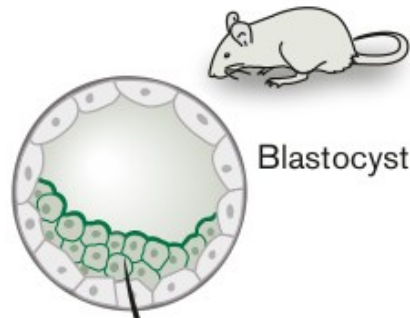
## Tècnica 2: per microinjecció en cèl·lules embrionàries



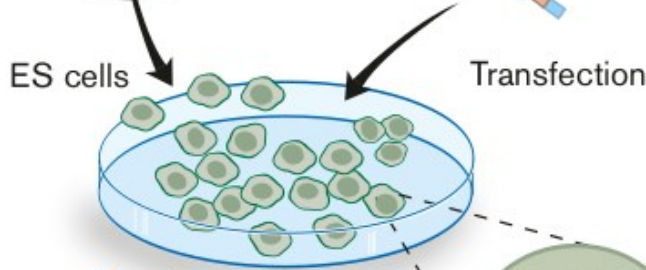
- Aïllament del gen que es vol transferir (tallant-lo amb enzims de restricció).
- Extracció d'algunes cèl·lules d'un embrió en fase de blastòcit i cultiu al laboratori.
- Introducció del gen en el nucli de les cèl·lules embrionàries en cultiu (per microinjecció, plasmidis especials, virus, descàrrega elèctrica, o algun altre sistema)
- Reintroducció de les cèl·lules modificades al blastòcit
- Implantació del blastocit a l'uter d'una femella.
- Part de les cèl·lules del nou individu seran portadores del transgen (organisme quimera)

# 1. ES cell culture

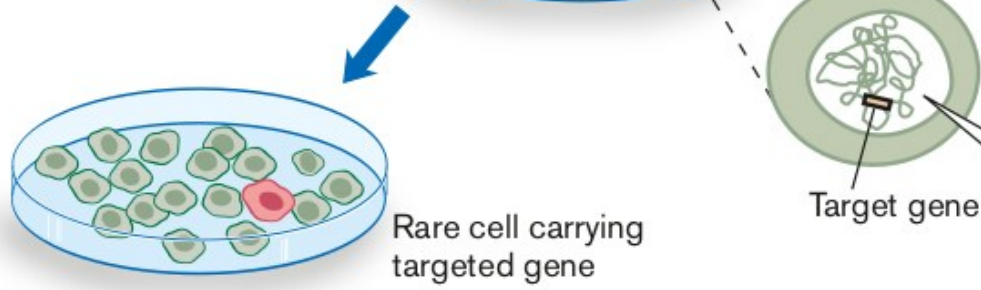
Embryonic stem (ES) cells are cultivated from mouse pre-implantation embryos (blastocysts).



# 2. Construction of targeting vector

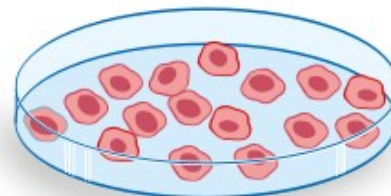


# 3. ES cell transfection



Positive-negative selection

# 4. Proliferation of targeted ES cell



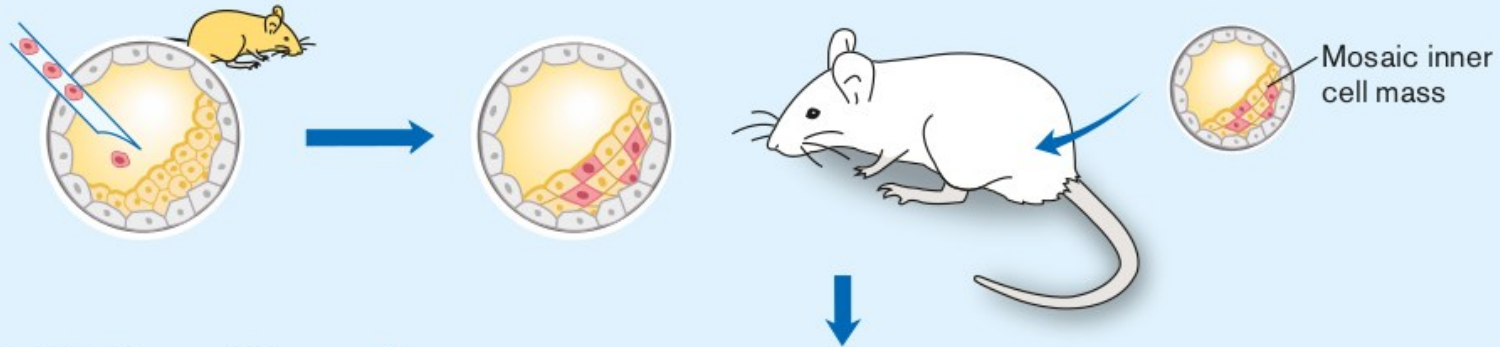
Pure population of ES cells carrying targeted gene

## 5. Injection of ES cells into blastocysts

The targeted ES cells are injected into blastocysts...

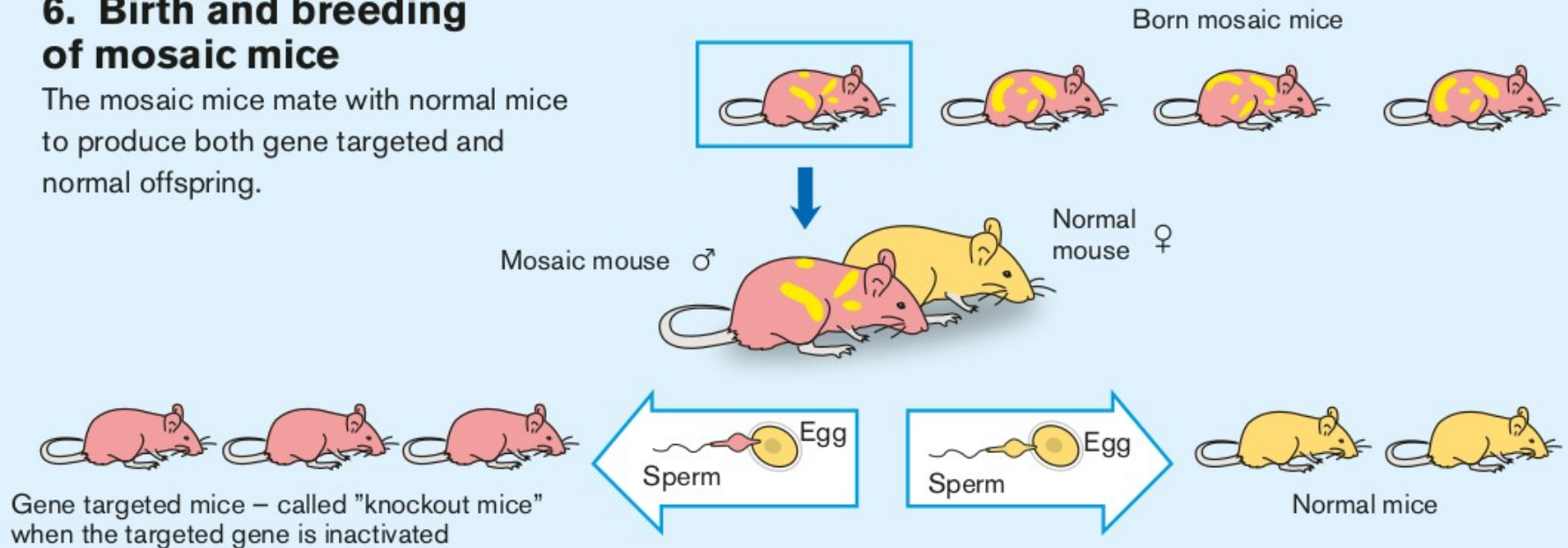
...where they mix and form a mosaic with the cells of the inner cell mass from which the embryo develops.

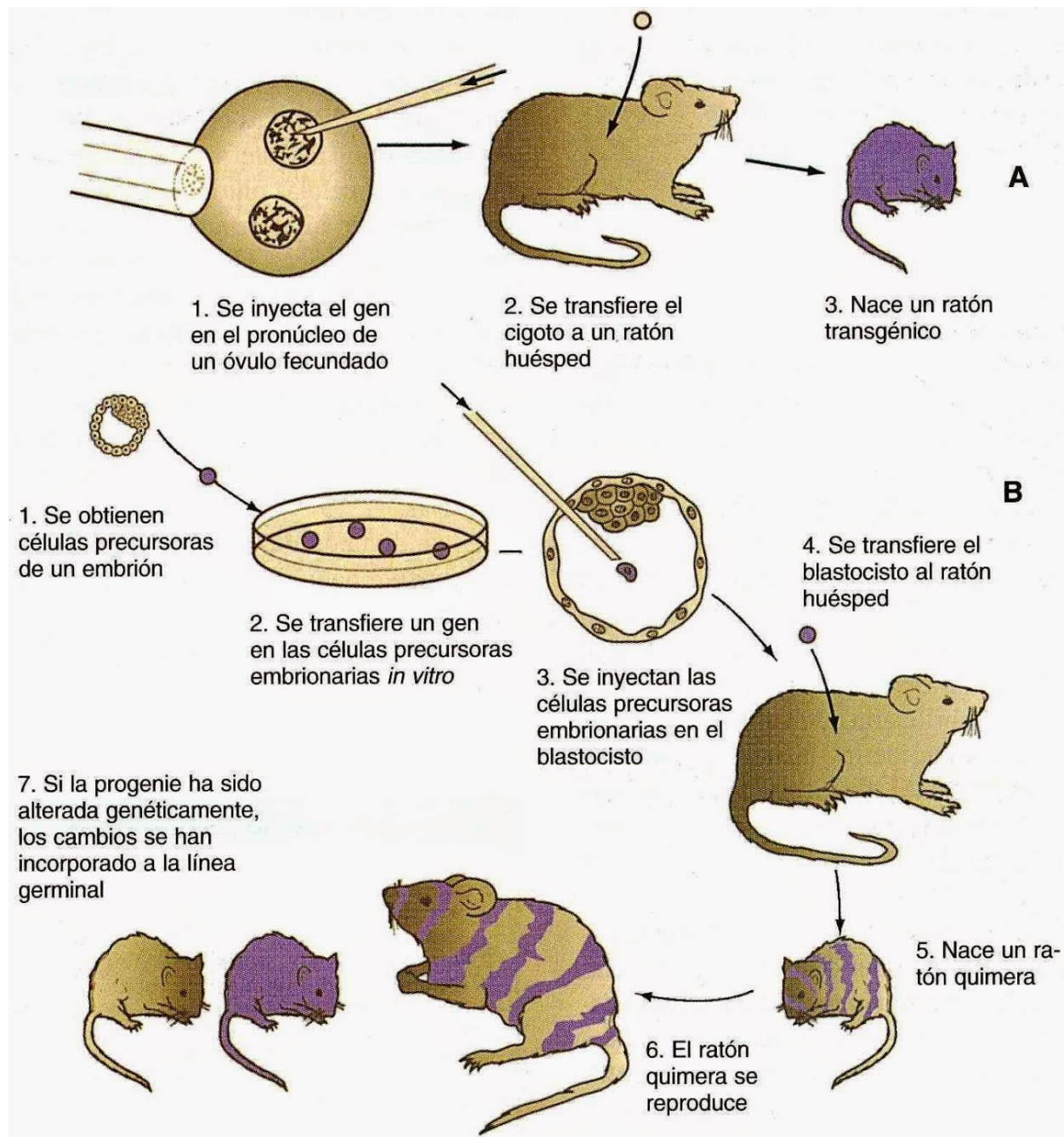
The injected blastocysts are implanted into a surrogate mother where they develop into mosaic embryos.



## 6. Birth and breeding of mosaic mice

The mosaic mice mate with normal mice to produce both gene targeted and normal offspring.

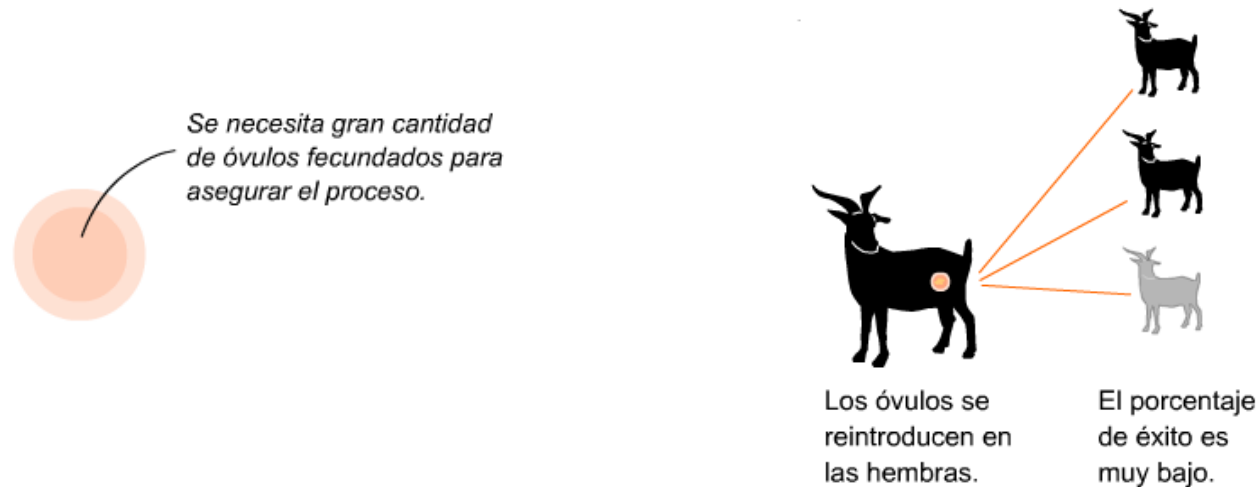




**Figura 3-10** A. Procedimiento para crear ratones transgénicos mediante inyección en los pronúcleos, B. procedimiento para insertar genes en ratones introduciéndolos primero en células precursoras embrionarias y después insertando las células precursoras transfectadas en un blastocisto por lo demás normal.

## Desavantatges d'aquestes tècniques...:

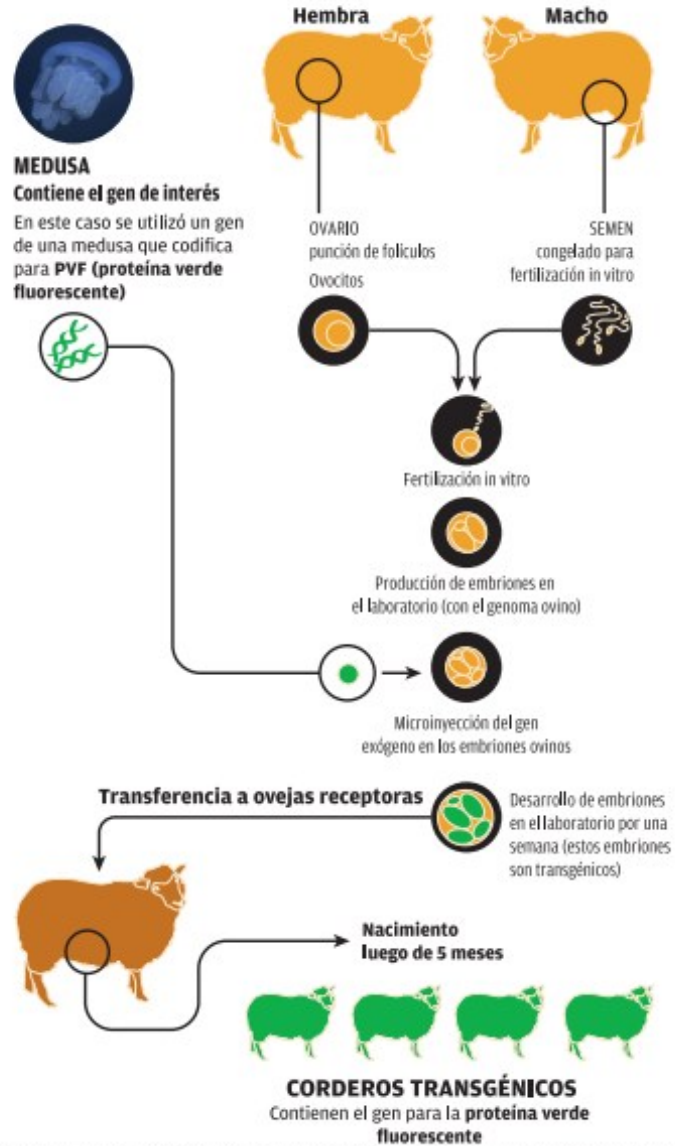
- Percentatge d'èxit baix. El gen s'inserta a l'atzar, es necessiten molts òvuls fecundats i/o embrions... només un percentatge molt baix dona lloc a animals transgènics vius.



- També lligat amb el fet que la integració del transgen és produïda a l'atzar, pot ocasionar l'alteració involuntària d'algun altre gen del genoma.
- Amb aquesta tecnologia de transgènesi no es pot suprimir totalment (si fos necessari) l'expressió d'un gen endogen.

Aquests inconvenients s'estan resolent mitjançant una metodologia més complexa, la **transgènesi dirigida per recombinació homòloga**, que permet introduir el transgen en lloc específics del genoma de la cèl·lula hoste.

## ¿CÓMO SE PRODUCEN LOS ANIMALES TRANSGÉNICOS?



Mayo 2013.- Científicos del Instituto de Reproducción Animal Uruguay (Irauy) y del Institut Pasteur han creado nueve ovejas transgénicas con un gen propio de las medusas que los hace fluorescentes bajo la luz ultravioleta, según informa la BBC.

Los científicos utilizan la transgénesis -la introducción de un gen ajeno a una especie en algunos ejemplares para que lo incorporen en su ADN y lo doten de nuevas características- para investigar la cura de enfermedades.

En este caso, sin embargo, se realizó para ensayar la complicada técnica utilizada y también con un objetivo divulgativo. "Usamos este gen en particular porque ese color verde permite muy fácilmente identificar que la técnica fue exitosa", ha explicado un investigador a la BBC.

Los corderos fluorescentes tiene ahora seis meses, durante el día no se diferencian del resto de sus congéneres y "van a tener una vida de oveja normal". Los autores de la investigación recalcan que "a diferencia de los animales que se utilizan para producir alimentos, como la carne, a éstos nadie los va a sacrificar".

Algunes de les aplicacions que pot tenir el **desenvolupament d'animals transgènics** són:

- Producció de proteïnes humanes d'interès (fàrmacs).
- Investigació malalties humanes en animals.
- Animals resistents a malalties, a baixes temperatures,..
- Animals que creixen més ràpidament.
- Millora en la producció de carn, peix, ous.. per alimentació humana.
- Xenotransplantaments d'òrgans (com a donants d'òrgans).

## Producció de proteïnes humanes (“pharming”):

S'introdueixen els gens humans en animals. Aquests produeixen la proteïna que després es purificada i comercialitzada...

Anticossos monoclonals, interleucina2, eritropoietina, hormona del creixement, són alguns exemples de proteïnes obtingudes d'aquesta manera.



Vacas, ovejas y cabras cuya leche puede ser usada para tratar la diabetes, el enfisema pulmonar o la hemofilia, entre otras enfermedades.



El pez Tilapa puede producir insulina humana para diabéticos.



Cerdos que contienen hemoglobina humana en sus glóbulos rojos.

**"Pharming"** és un joc de paraules entre les paraules angleses *farm* (granja) i *pharm* (farmacia): utilització d'animals de granja per a la producció de proteïnes humanes que poden ajudar al tractament de malalties.



## Obtención de medicamentos por ingeniería genética

El gen del factor VIII, procedente de células humanas, se inserta en un plásmido.

Tras el desarrollo del embrión, nacerá una vaca transgénica que portará el gen del factor VIII en sus células.

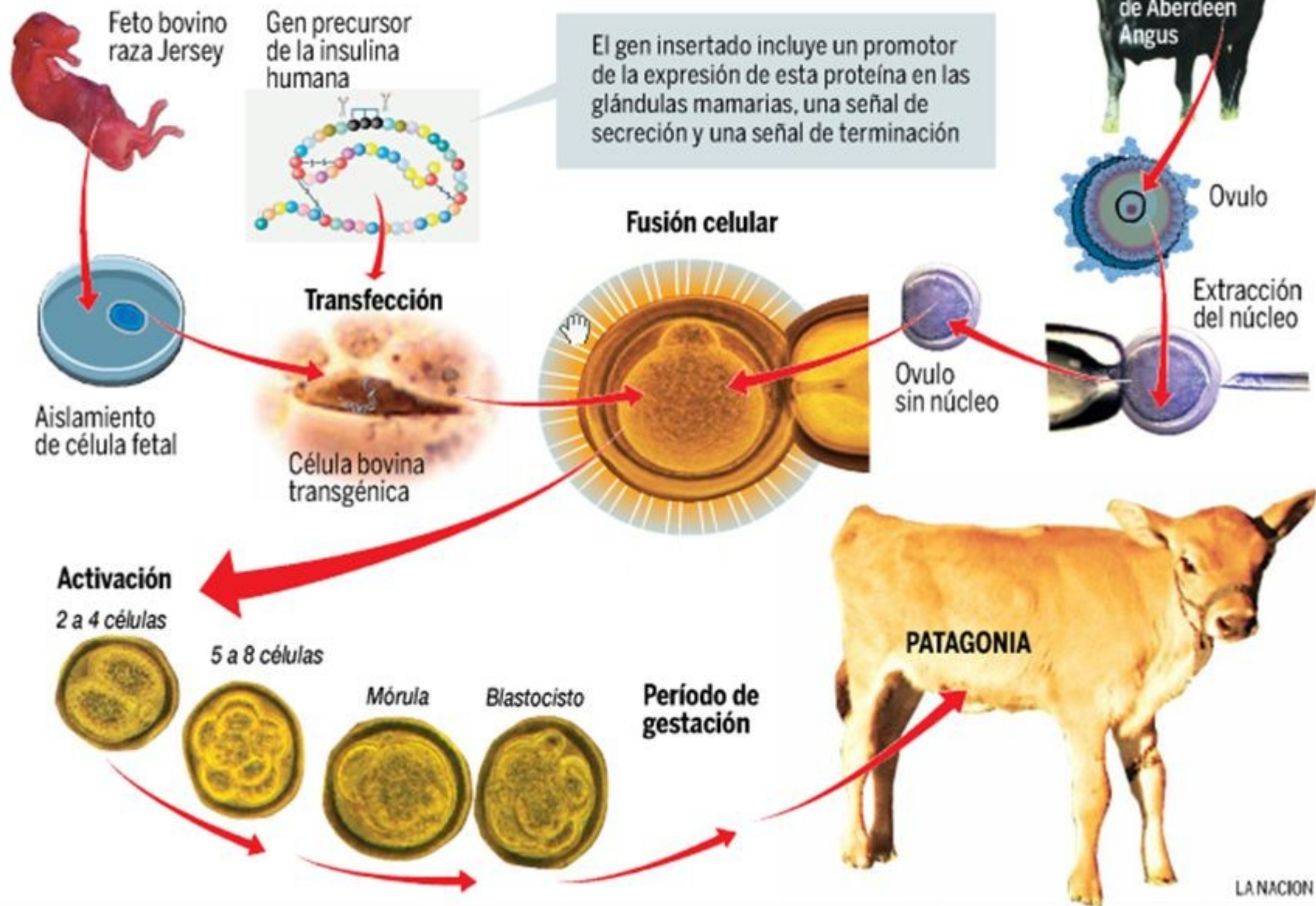


Animals transgènics.

Exemple. Factor de coagulació VIII (deficient en persones hemofíliques) s'obté d'animals transgènics, als quals s'ha transferit el gen humà que codifica aquesta proteïna.

# Receta para diseñar una vaca

Investigadores argentinos insertaron el gen humano de la insulina en el genoma de terneras que producirán la hormona en su leche, la dinastía *Patagonia*



# Investigació de malalties humanes en animals.

Exemple, el càncer humà en ratolins.

S'aïlla el gen humà que produeix la malaltia i s'introdueix en un ratoli. Aquest desenvolupa la malaltia i es poden investigar tractaments per a humans en ratolins.

Se aísla el gen humano causante de la enfermedad sobre la que se quiere investigar.



*Gen humano responsable de la enfermedad*



El animal desarrolla la enfermedad igual que lo haría un humano.

Los científicos pueden investigar nuevos tratamientos sin arriesgar vidas humanas.

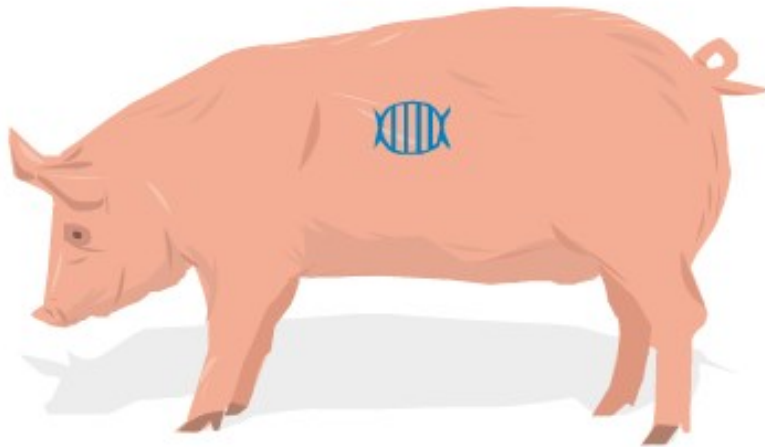


# Xenotrasplantament d'òrgans (en investigació)

Exemple:

En els porcs s'ha introduït gens humans per produir proteïnes de membrana humanes, disminuint així el rebuig en els trasplantament d'òrgans entre porcs i humans.

*Debido al tamaño de sus órganos, el cerdo se podría convertir en el principal donante transgénico.*



Hígado



Riñón



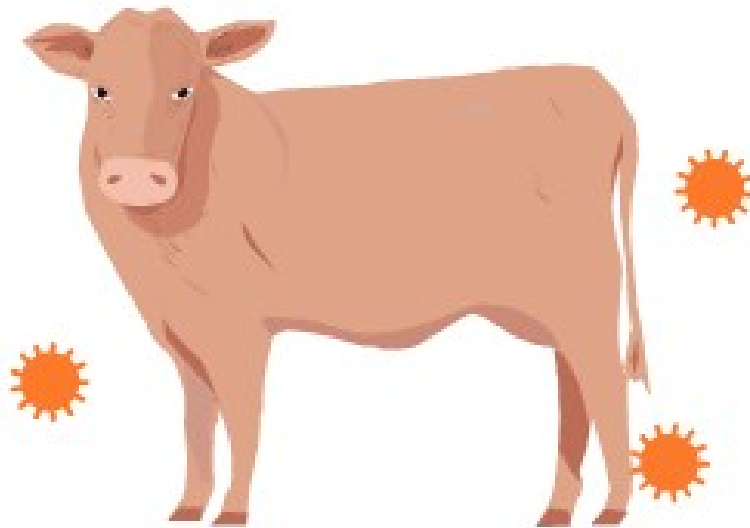
Corazón

- Resistència a malalties:

Implantació de gens per reforçar el sistema immunitari o fins i tot, immunitzar totalment cap algunes malalties.

Exemple, vedelles immunes al còlera (inflamació bacteriana de l'intestí), la mastitis (inflamació bacteriana glandula mamària),

...

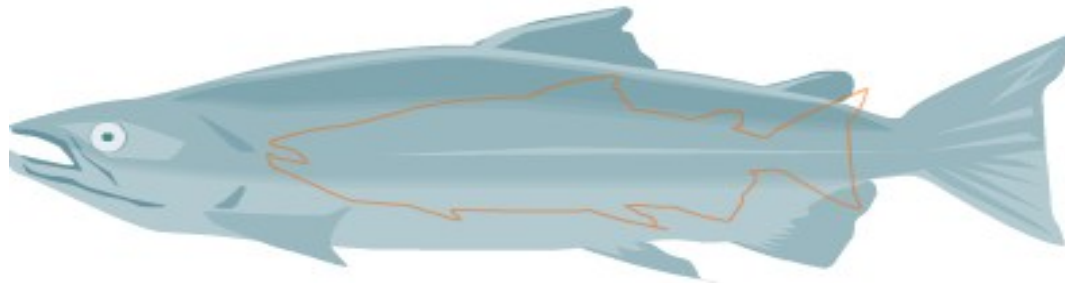


## Creixement organismes:

Implantació de l'hormona del creixement.

Exemple:

Introducció del gen de la hormona del creixement de la truita en carpes. Creixen més ràpid i molt més que de manera natural.

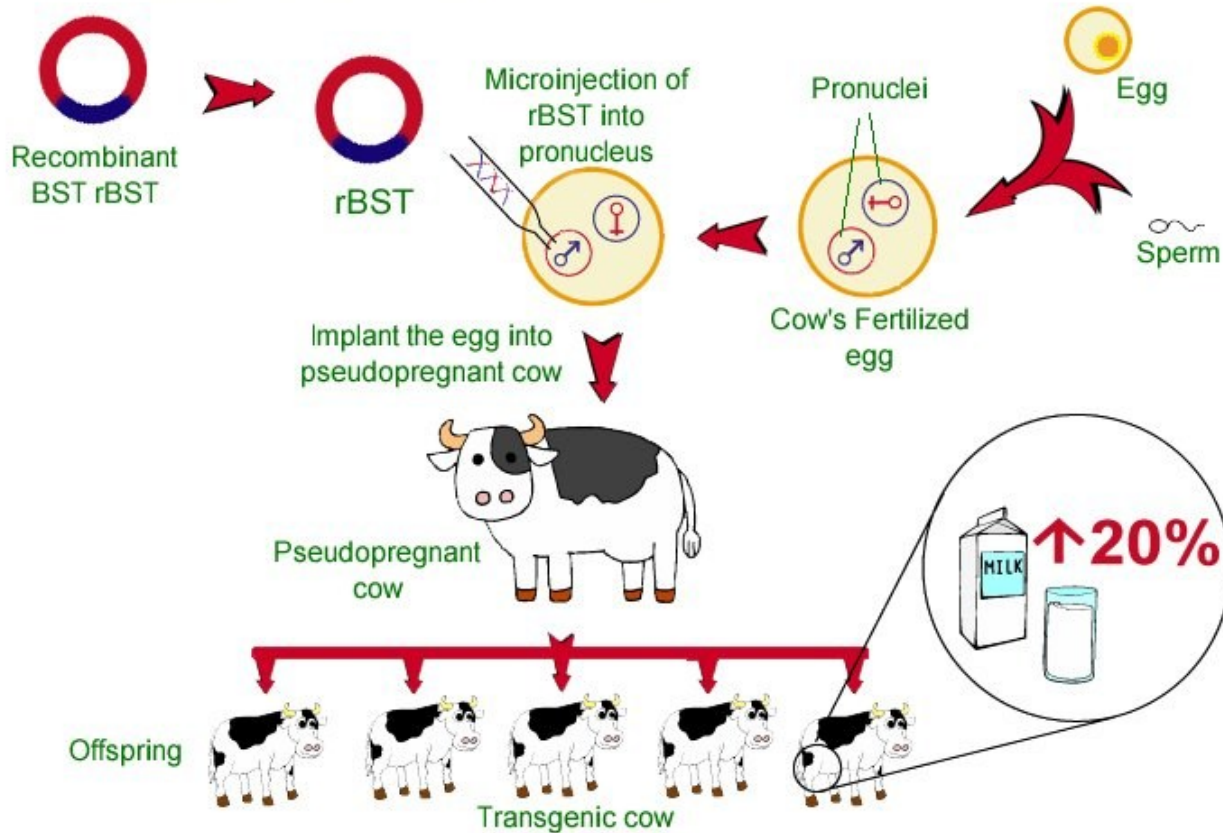


## Organismes més resistents a les baixes temperatures

Exemple:

Salmó més resistent gràcies a la incorporació d'un gen d'una espècie de pelaia que viu a l'àrtic.

# Increase the Yield of Milk



Aumentar el rendimiento de la leche

La somatotropina bovina (BST), también conocida como hormona de crecimiento bovina (BGH), es una proteína natural producida por la glándula pituitaria de los bovinos.

La biotecnología permite a los científicos producir una forma recombinante de esta proteína llamada rBST.

Las glándulas mamarias de tales vacas lecheras toman más nutrientes de la sangre y producen más leche.

El rBST aumenta la producción de leche de vaca hasta en un 20 por ciento.

# Obtenció d'una planta transgènica

La introducció de gens en plantes és més difícil per la presència d'una paret cel·lular de cel·lulosa.

S'utilitza el **plasmidi Ti** d'*Agrobacterium tumefaciens* com a vector biològic.



*Agrobacterium tumefaciens* infectant una cèl·lula de pastanaga. En el procés, el material genètic del bacteri entrarà dins la cèl·lula.  
Font wikipedia.



***Agrobacterium*** és un gènere de bacteris capaç de transferir part del seu material genètic a les plantes (mitjançant un plasmidi anomenat plasmidi Ti) causant-los tumors.

Aquest procés de transferència natural de DNA és aprofitat pels investigadors per introduir gens en cèl·lules vegetals.

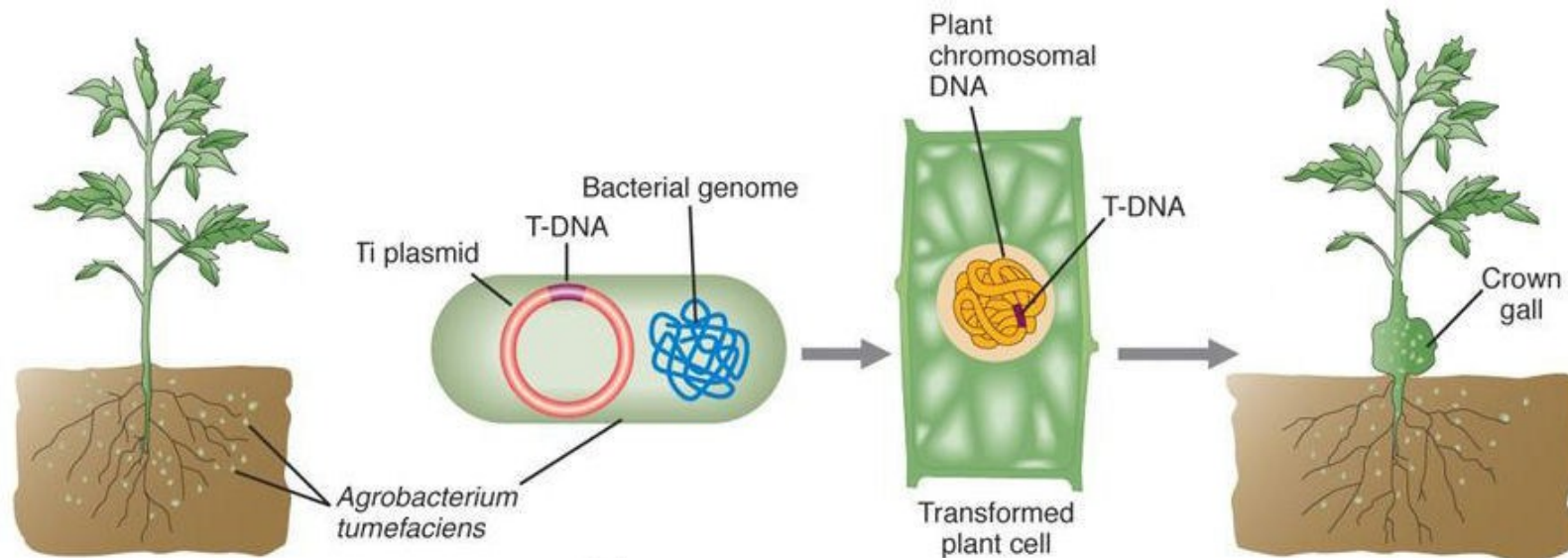


Tumors produïts per *Agrobacterium tumefaciens*

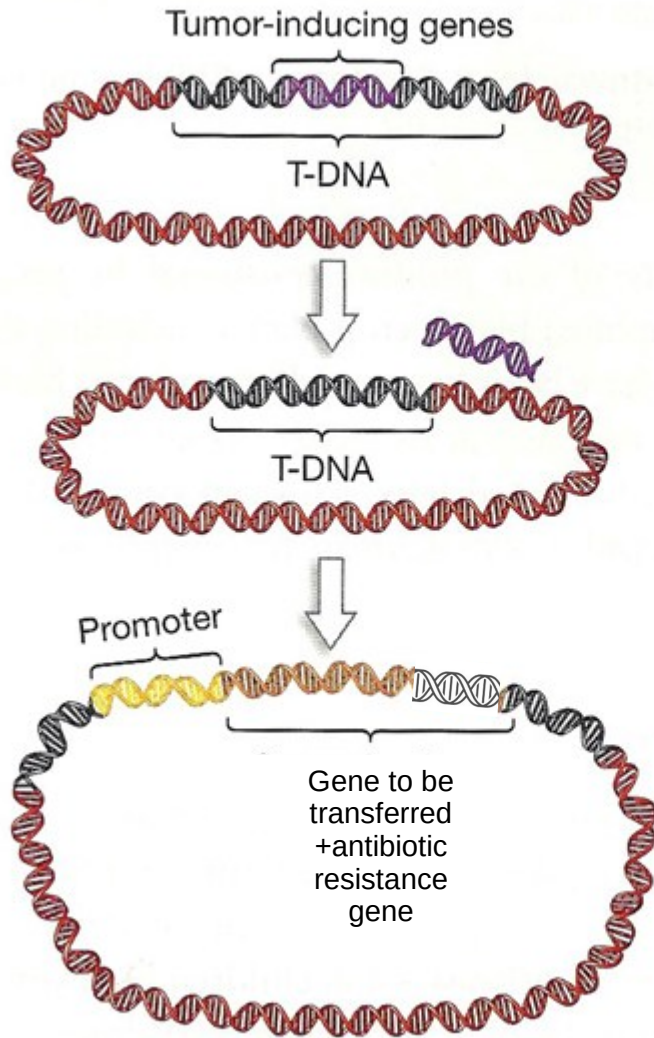
El bacteri *Agrobacterium tumefaciens* infecta les plantes a través de les ferides.

Presenta un plasmidi, el **plasmidi Ti** (*tumor inducing*) amb un sector, anomenat T-DNA, que conté els gens responsables del tumor.

El bacteri introdueix la regió T-DNA a les cèl·lules vegetals. La regió T-DNA s'hi integra en un dels cromosomes de la planta provocant-li el tumor.

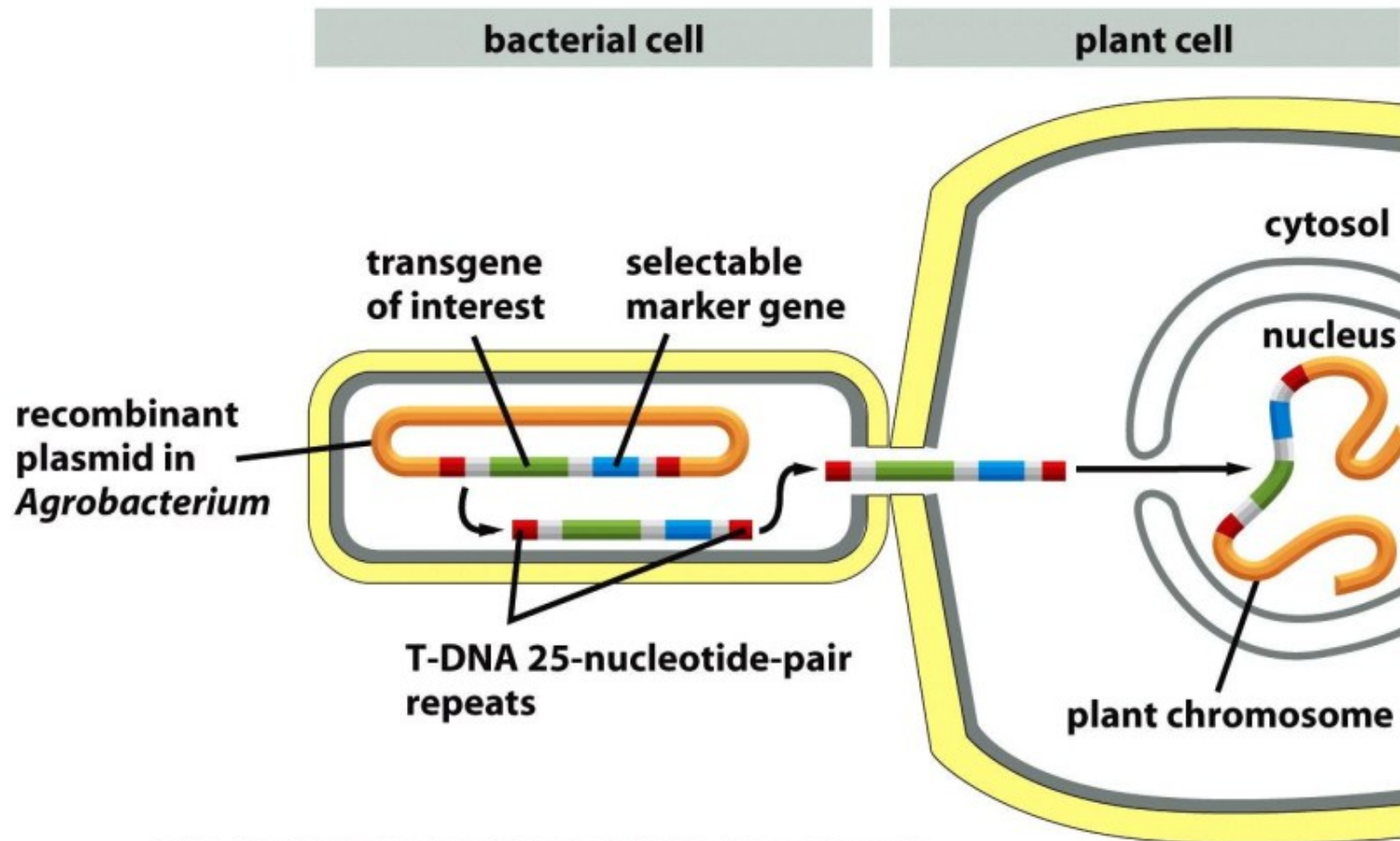


# Plasmidi Ti com a vector biològic



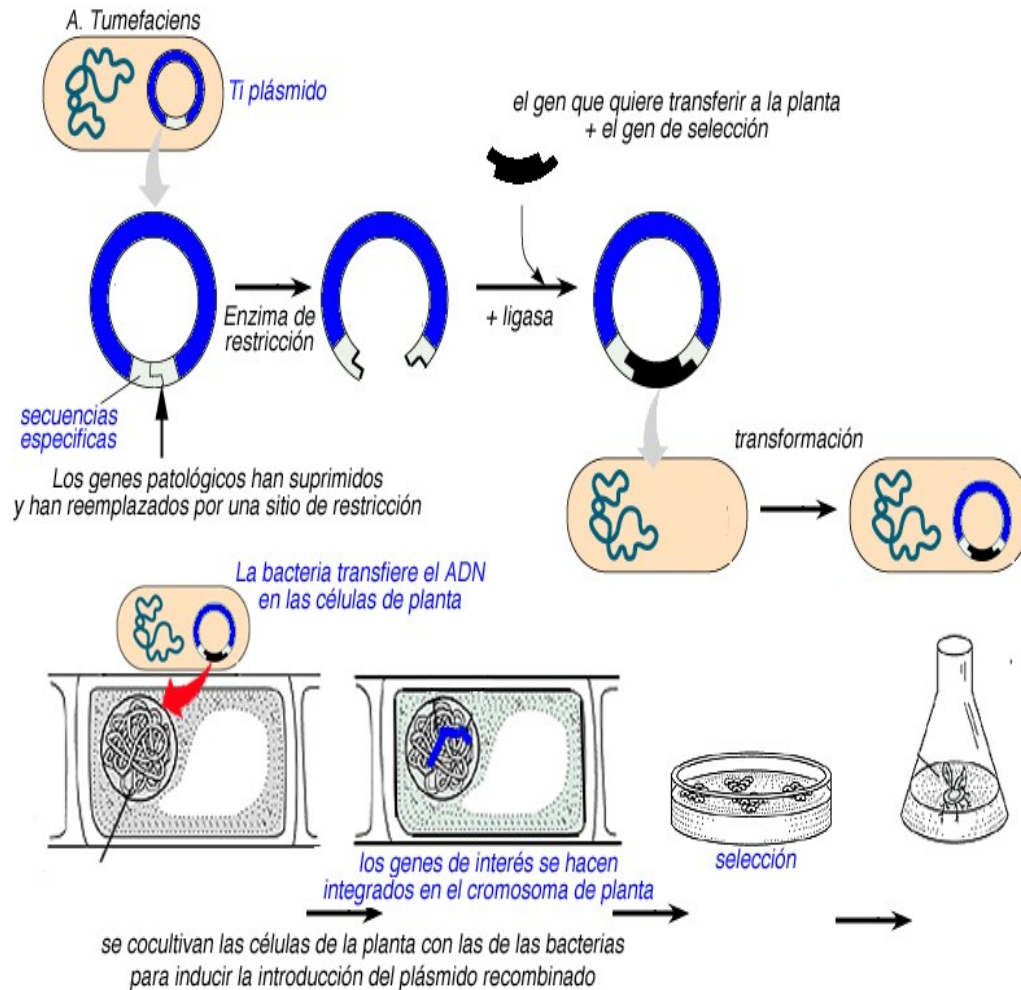
## Preparació del plasmidi Ti:

Se li extreu els gens responsables del tumor i se li inserta el gen d'interès amb la regió promotora i un gen marcador de selecció com pot ser un gen de resistència a un antibiòtic.

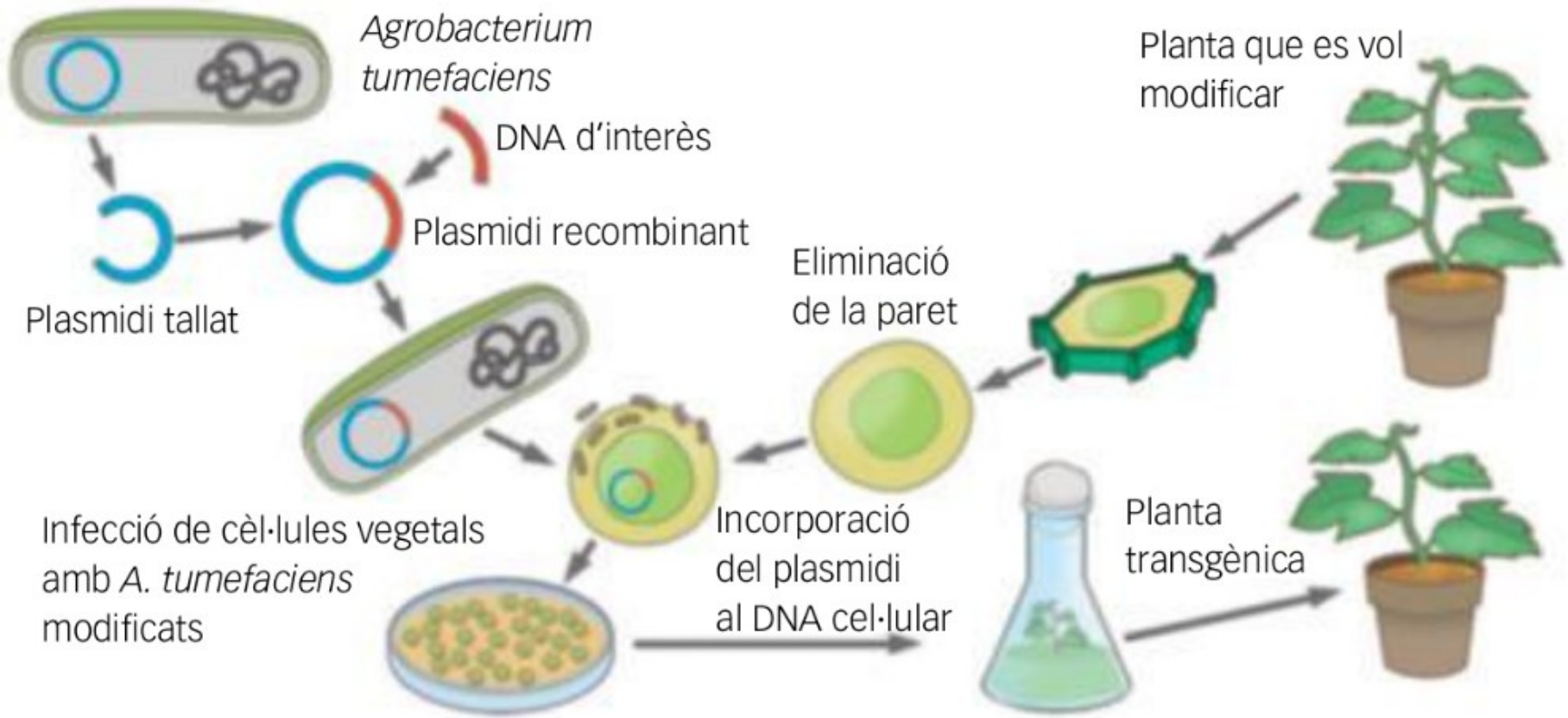


**DNA IS EXCISED FROM PLASMID AS A LINEAR MOLECULE AND IS TRANSFERRED DIRECTLY INTO THE PLANT CELL, WHERE IT BECOMES INTEGRATED INTO THE PLANT CHROMOSOME**

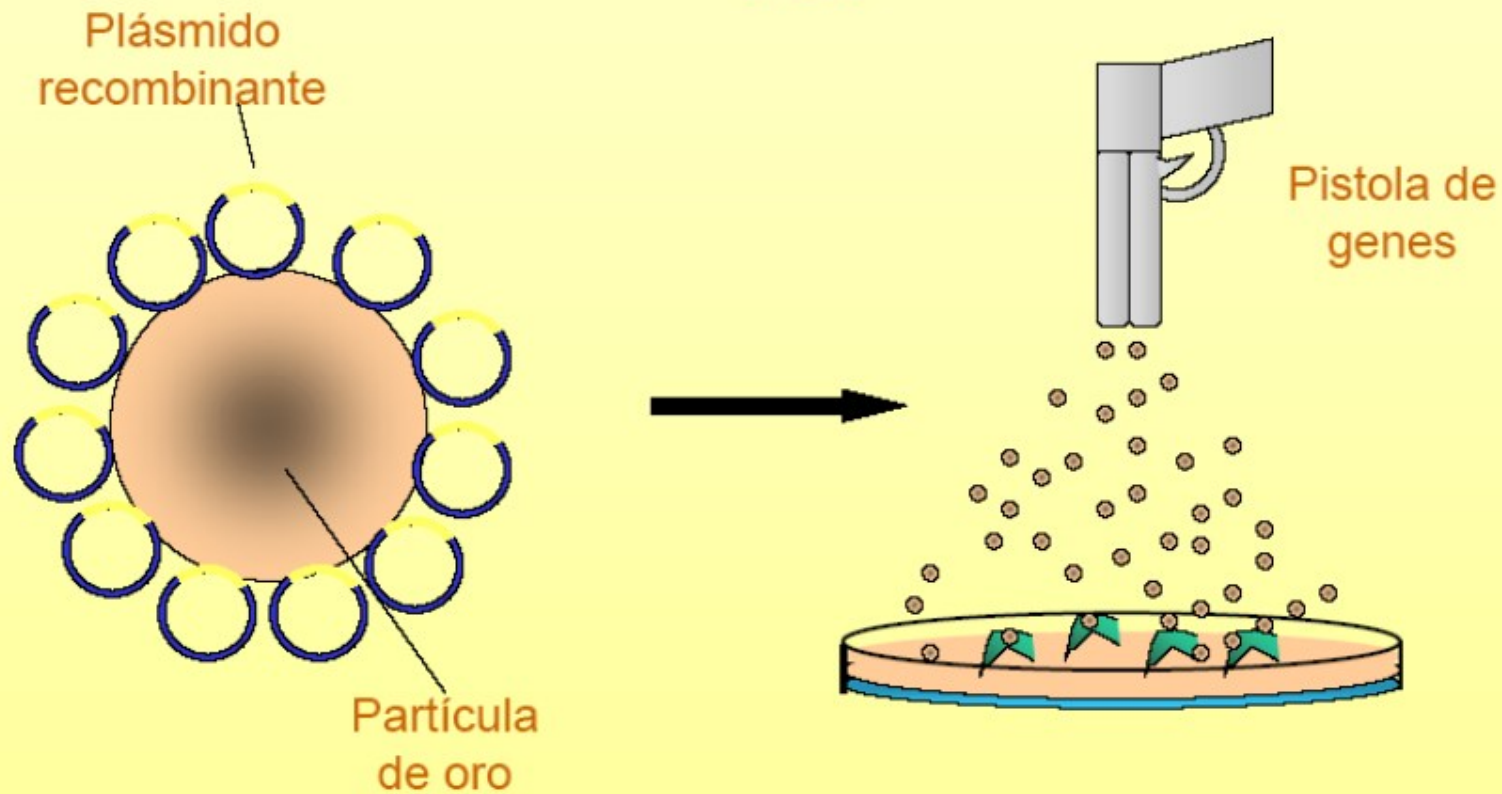
# Procés per a l'obtenció d'una planta transgènica



- Aïllament del gen que es vol transferir. (tallant-lo amb enzims de restricció).
- Aïllament del plasmidi Ti d'*Agrobacterium tumefaciens*. Eliminació dels gens de la regió T-DNA causants del tumor i substitució pel gen d'interès. Obtenim així un plasmidi Ti híbrid.
- Introducció del plasmidi Ti híbrid al bacteri *Agrobacterium tumefaciens* (per transformació o algun altre sistema)
- Selecció dels bacteris que han incorporat el plasmidi.
- Ínfecció d'un cultiu de cèl·lules embrionàries de la planta que es vol modificar amb els bacteris que contenen el plasmidi híbrid.
- Selecció dels embrions que han incorporat el gen d'interès (la manera dependrà del fenotip al que done lloc el gen introduït)
- Obtenció de plàntules transgèniques.



Para transformar plantas que no son atacadas por *Agrobacterium* se recurre a la **pistola o cañón de genes**



# ¿Cómo se transforma una planta?

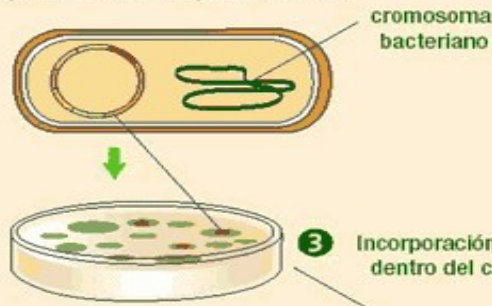
## Método con Agrobacterium

1 Construcción de un plásmido con el Gen de interés

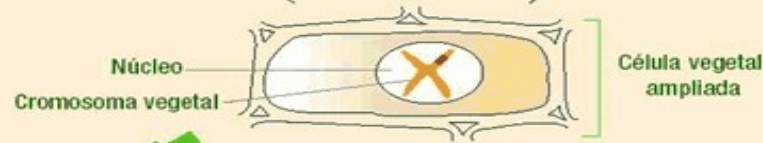


2 Introducción del plásmido en *Agrobacterium* \*

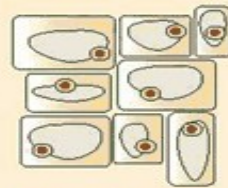
*\* bacteria que habita comúnmente en el suelo y que introduce ADN en las plantas naturalmente.*



3 Incorporación del Gen de interés dentro del cromosoma vegetal



4 Multiplicación Celular



5 Regeneración y selección, de plántulas transformadas \*

*\*aquellas que recibieron el gen de interés*

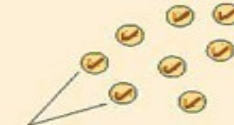


6 Transferencia de las plántulas seleccionadas al suelo



## Método con Cañón de Partículas

1 Micropartículas recubiertas de ADN que contiene el gen deseado



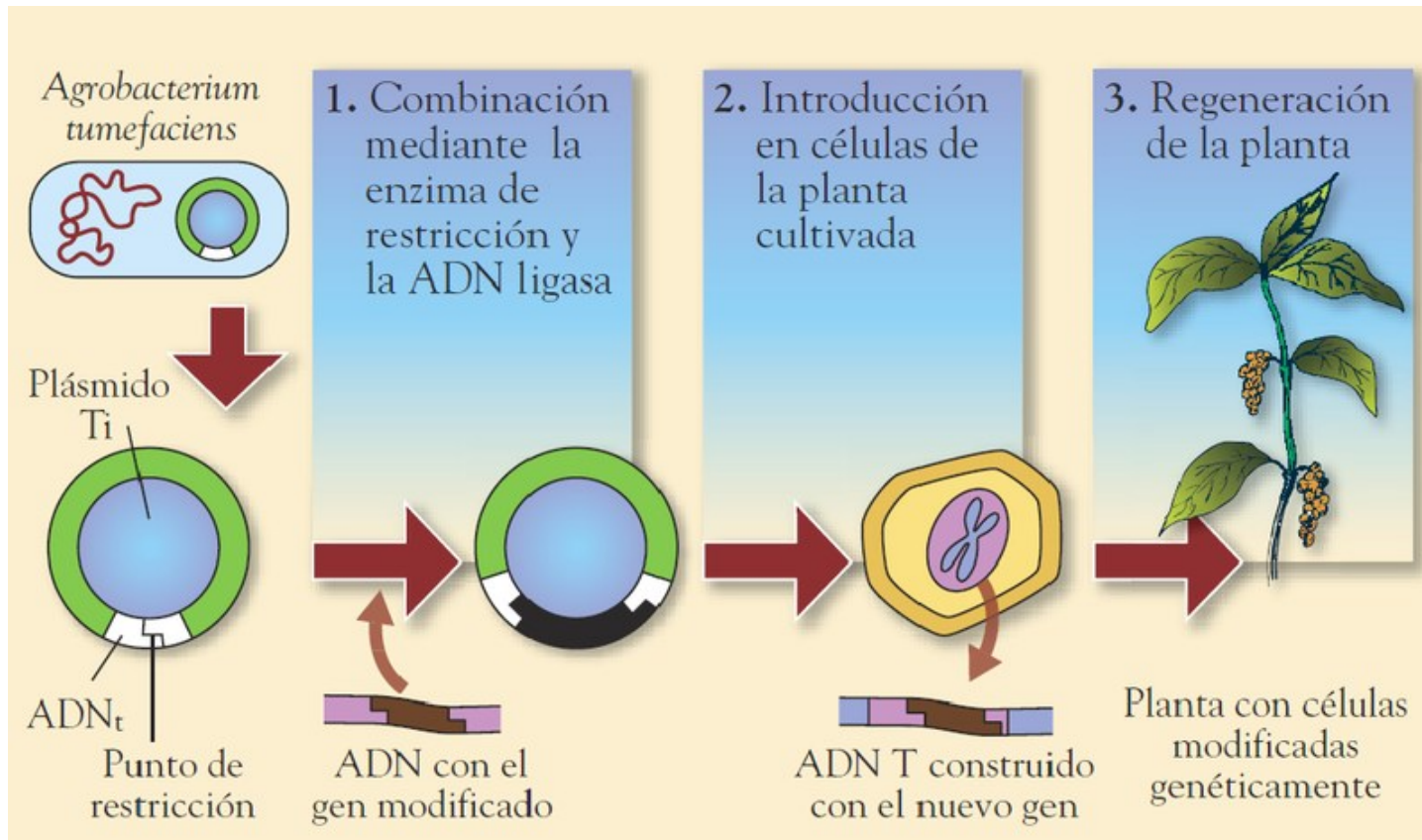
Cañón de Partículas

2 Bombardeo de Micropartículas



Diario: del Madero



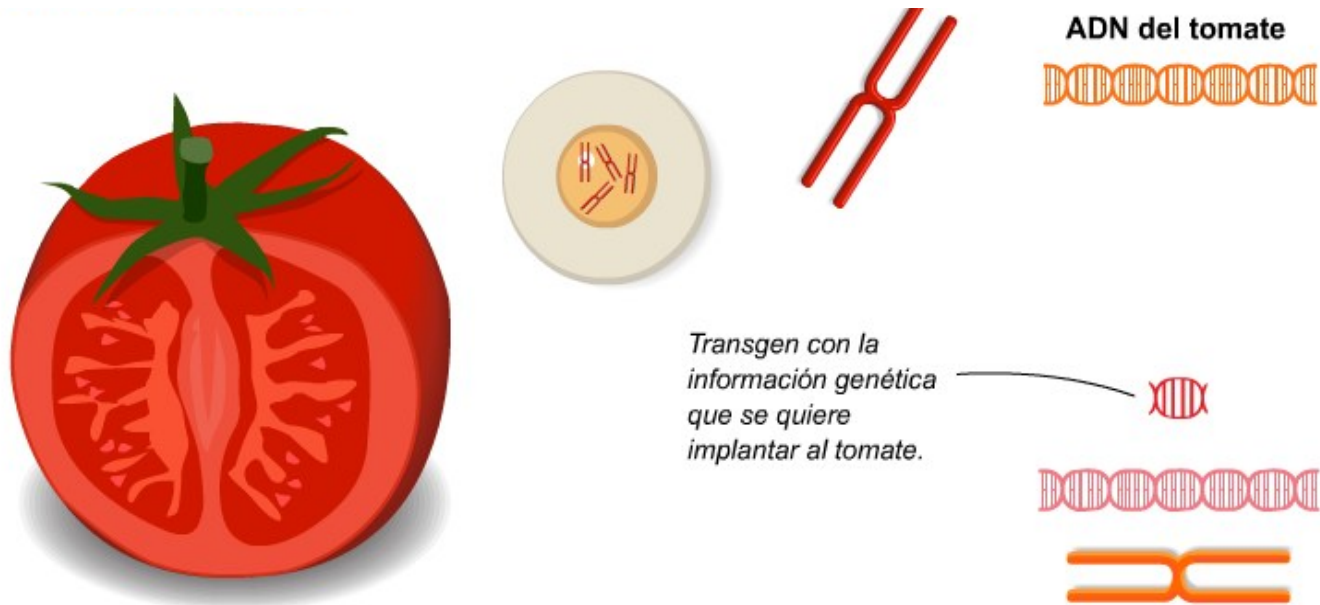


## Algunes de les aplicacions que pot tenir el **desenvolupament de plantes transgèniques** són:

- Resistència a condicions ambientals agressives, com gelades, sequeres i sòls salins.
- Resistència a herbicides, a plagues d'insectes i a malalties.
- Millora de les qualitats nutritives dels productes agrícoles i augment de la mida de les fruites.
- Allargament de la vida comercial d'un producte.
- Assimilació del nitrogen atmosfèric. Alguns bacteris contenen gens responsables de la fixació del  $N_2$  atmosfèric. La inserció d'aquest gens al genoma de les plantes permet que les plantes no depenguin d'adobs nitrogenats.
- Síntesi de productes de interès comercial. Existeixen plantes que produeixen anticossos animals, interferò, i fins i tot elements d'un polièster destinat a la fabricació de plàstics biodegradables.

- Tomàquets transgènics:
  - Retard maduració tomàquets "Flavr Savr" (1994 EE.UU.), als que li han eliminat la poligalacturonasa, una proteïna que fa que les parets es facin malbé quan madura massa, de manera que es manté durant molt més temps.





**1** Se extrae el ADN de uno de los doce cromosomas del tomate.

**2** De otro organismo, se extrae el gen con la proteína que nos interesa implantar.



**3** Mediante ingeniería genética se clona, se modifica y se fragmenta el gen.

ADN del tomate



**4** Se introduce en el ADN del tomate sin causar daño a la célula.

- Blat de moro transgènic:
  - Amb vitamines A, C i àcid fòlic.(gens bacterians).



Tenen un color ataronjat que recorda a les pastanagues, pel seu alt contingut en el betacarote de la vitamina A

## RESISTENCIA A LAS PLAGAS



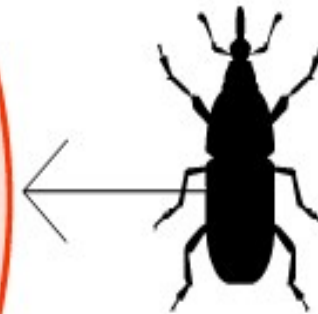
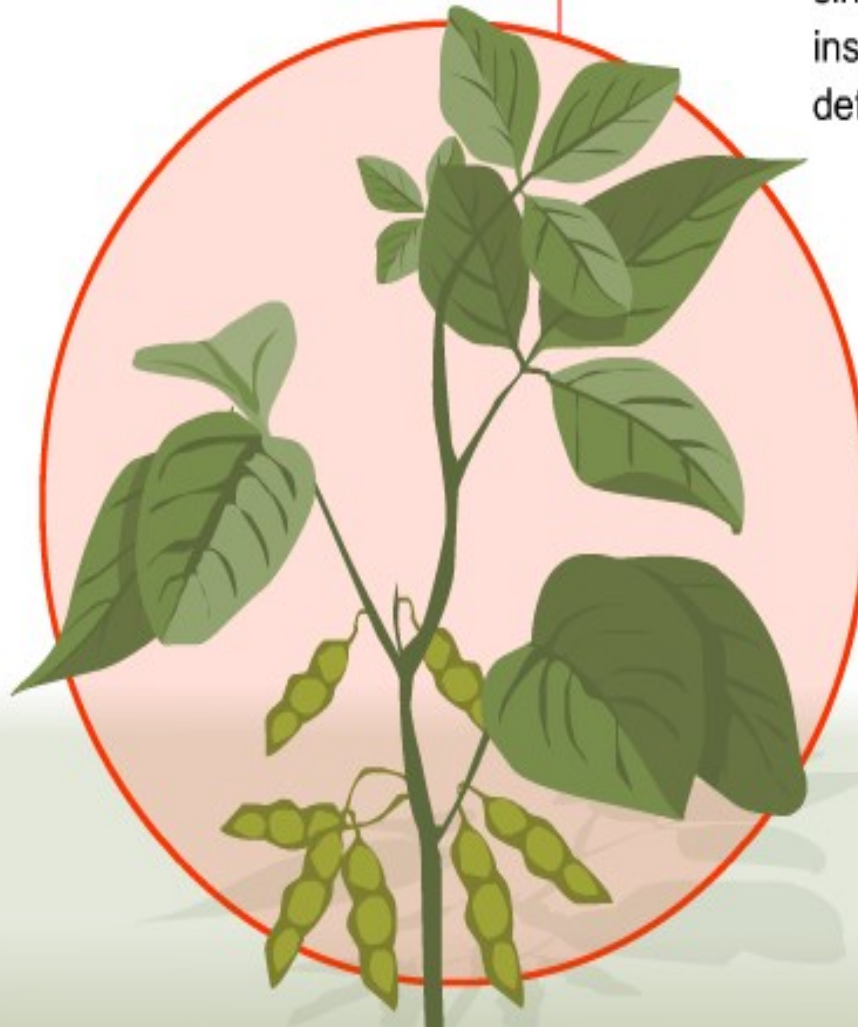
El desarrollo de plantas transgénicas resistentes a plagas específicas logra reducir considerablemente la cantidad de insecticida que se le aplica a los cultivos.



## RESISTENCIA A LAS PLAGAS

Los insecticidas tienen una acción indiscriminada tanto sobre insectos dañinos como benéficos.

En respuesta a esto, se han creado plantas transgénicas capaces de sintetizar sus propios herbicidas o insecticidas selectivos para defenderse del ataque de plagas.



# Resistentes a plagas (gen bacterià)

## Ejemplo del empleo de la ingeniería genética en la lucha contra plagas

Bt (*Bacillus thuringiensis*) es una bacteria que se encuentra naturalmente en el suelo, en todo el mundo. La característica exclusiva de esta bacteria es la producción de un cristal proteico que mata en forma selectiva un grupo específico de insectos. Estos cristales proteicos (proteínas Cry) son tóxicos para el aparato digestivo de los insectos sensibles y deben ser ingeridos para ejercer su acción. Una vez ingeridos, las enzimas digestivas del insecto activan la fórmula tóxica de la proteína. Las proteínas Cry se ligan a "receptores" específicos del revestimiento interno de los intestinos y dañan las células. Los insectos dejan de comer dos horas después de haber ingerido el primer bocado y, si han comido suficiente cantidad de toxina, mueren dos o tres días después. Durante más de treinta años se han aplicado con éxito en una serie de cultivos diversas fórmulas líquidas y granuladas de Bt contra lepidópteros (orugas).

La inserción en el maíz del gen procedente de *Bacillus thuringiensis*, que codifica esta proteína tóxica para el insecto que provoca la enfermedad conocida como "taladro del maíz", hace que esta planta se vuelva resistente al insecto.

<http://www.ull.es/coordinacion/biologia/Material/transgen.htm>

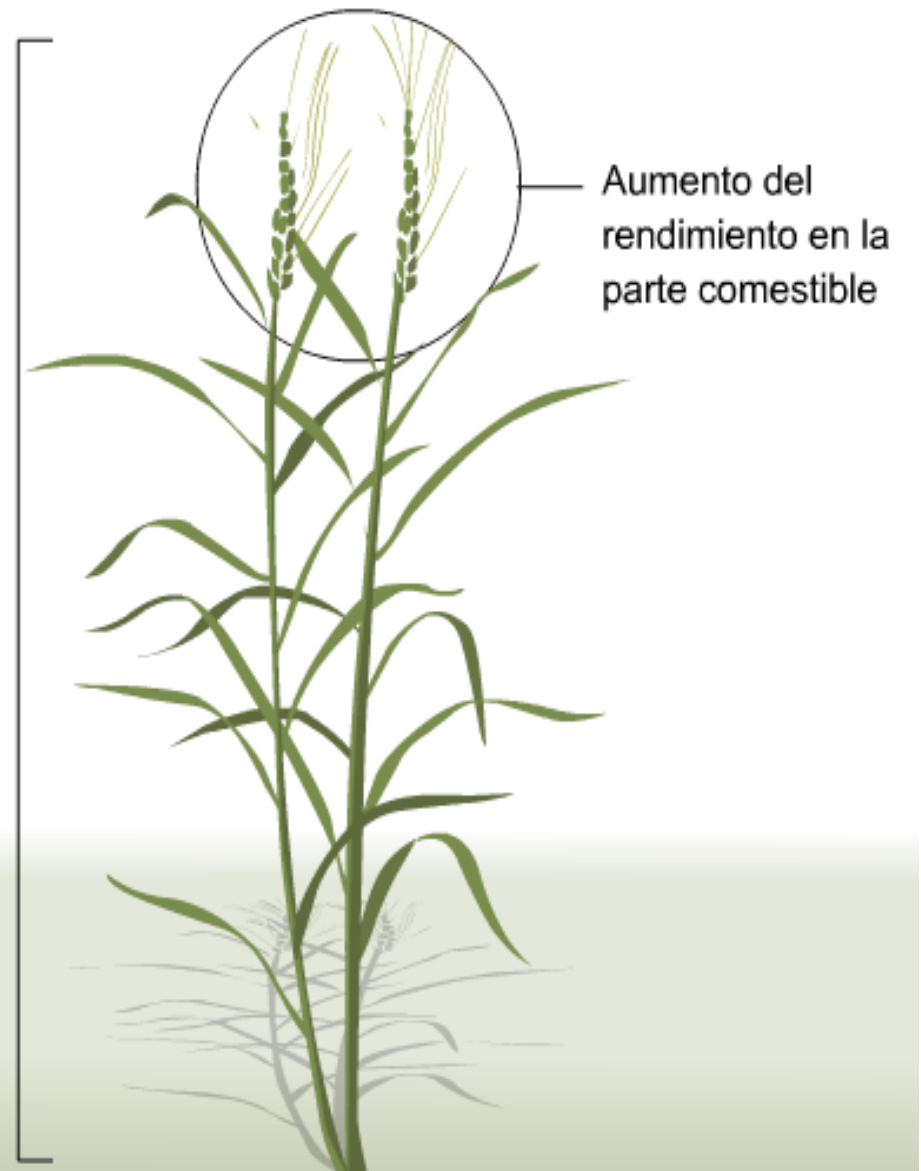




## MEJORA DEL RENDIMIENTO

La modificación genética de algunos cultivos producen una planta más corta y fuerte al tiempo que aumenta el rendimiento de la planta ya que ésta invierte más energía en sus parte comestibles.

Planta más  
corta y fuerte



## PLANTAS RESISTENTES A LA SEQUIA Y AL FRIO

La sequía es una amenaza generalizada para la agricultura mundial y una de las principales causas de la pérdida de cultivos. Existen variedades de plantas transgénicas que duplican su rendimiento aún bajo condiciones de sequía severa o heladas.

Los investigadores incorporaron a diversos cultivos genes de especies vegetales **resistentes a la falta de agua**, lo que redujo su deshidratación en época de sequía al tiempo que también se logró disminuir la cantidad de agua necesaria para su riego.

Con el fin de aumentar la resistencia de los cultivos a las **bajas temperaturas** o las **heladas** los científicos estudian la incorporación de genes o grupos de genes de especies adaptadas a climas extremos que otorgarán a las plantas una mayor tolerancia al frío.



## USO DE TIERRAS MARGINALES

Grandes extensiones de la superficie terrestre se encuentran actualmente inutilizables por ser excesivamente salinas o alcalinas. Los científicos lograron identificar, clonar y transferir a algunas plantas un gen de tolerancia a la sal que permitiría el desarrollo de la agricultura en tierras marginales.



## BENEFICIOS NUTRICIONALES

Es posible la obtención de alimentos con mayor contenido en vitaminas, minerales y proteínas o con menor contenido en grasas.

Con la introducción de nuevos genes en el **arroz** se logró una mayor producción de beta-caroteno, el precursor de la vitamina A. Este arroz amarillo o dorado, puede ayudar a resolver el problema de la deficiencia de vitamina A que padecen miles de niños en las regiones tropicales.

Además, se produce un arroz transgénico con altas concentraciones de hierro que combatiría la anemia que sufren millones de mujeres embarazadas en Asia y Africa.



## PROLONGACION DE LA CONSERVACION Y DURABILIDAD DE LOS ALIMENTOS

El desarrollo de tecnología de modificación genética logró retrasar la maduración de las frutas y verduras lo que permite almacenarlas por más tiempo.



Además, es posible mejorar el sabor, el olor y el aspecto de los alimentos.