



Proteínas recombinantes y su potencial en producción animal

Ofrecemos una perspectiva general de las proteínas recombinantes producidas en distintos sistemas de expresión, focalizándonos en los tres pilares fundamentales: reproducción, eficiencia alimentaria y salud, con el fin de realizar una fotografía de su uso y de las investigaciones relacionadas con su tecnología aplicada a la producción animal actual y en un futuro próximo.

Elena García-Fruitós¹, Laia Gifre-Renom², Anna Arís¹

¹Investigadoras de Producción de Rumiantes, Instituto de Investigación y Tecnología Agroalimentarias (IRTA)
Torre Marimon, Caldes de Montbui (Barcelona)

²Estudiante de doctorado (IRTA)

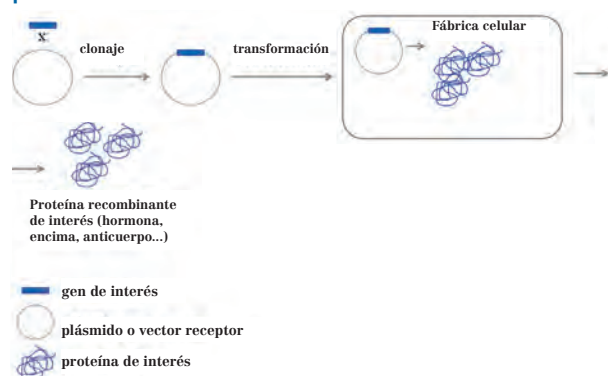
Las proteínas son moléculas con un papel biológico muy relevante y por ello tienen un gran número de aplicaciones y un enorme potencial. Durante años la única forma de obtener estas proteínas era a través de la extracción de sus fuentes naturales mediante procesos muy caros y poco

eficientes [1]. No obstante, el descubrimiento de la tecnología del DNA recombinante en los años setenta permitió dar un salto cualitativo en este campo de estudio, permitiendo que hoy en día se pueda producir cualquier proteína de interés usando células procariotas o eucariotas como fábricas celulares. De

forma resumida, esta tecnología nos permite seleccionar cualquier gen de interés e incorporarlo en un sistema de expresión heterólogo o recombinante (bacterias, levaduras, algas, células de mamífero o células de insecto, entre otros) [2] para producir la proteína codificada en dicho gen, tanto a escala de laboratorio como a una escala industrial (figura 1). Actualmente, a pesar de que existe un amplio abanico de sistemas de producción recombinantes, la bacteria *Escherichia coli* y las células de mamífero siguen siendo las opciones elegidas en muchos de los casos.

► LAS HORMONAS RECOMBINANTES PRESENTAN MEJOR ACTIVIDAD, INCLUSO CON DOSIS INFERIORES, QUE LAS HORMONAS DERIVADAS DE LA GLÁNDULA PITUITARIA

Figura 1. Esquema de un proceso de producción de una proteína recombinante



En primer lugar se inserta el gen de interés en un plásmido o vector de expresión mediante un proceso de clonaje. A continuación, se introduce el plásmido con el gen de interés en el sistema de expresión elegido (bacterias, levaduras, hongos, células de insecto, células de mamífero, etc.). Este sistema de expresión, que actúa como una fábrica celular, produce la proteína de interés que posteriormente es purificada.

Más concretamente, y centrándonos en el uso de las proteínas recombinantes en producción, el uso de dichos sistemas como fábricas celulares ha crecido de manera notable en la última década. Uno de los campos más ampliamente estudiados es el relacionado con el sistema endocrino y, específicamente, con el uso de hormonas recombinantes [3-6]. En la actualidad, ya existen hormonas producidas de forma recombinante y disponibles comercialmente, y muchos grupos de investigación están estudiando su uso con el objetivo de mejorar el potencial reproductivo. Además, se están desarrollando otras estrategias terapéuticas o tratamientos profilácticos basados en proteínas recombinantes, a la vez que se estudia su uso como enzimas para mejorar la eficiencia de la conversión de los alimentos a productos más fácilmente consumibles. ►



neovia

La solución ganadora para el destete



Leche maternizada para rumiantes



Núcleos para piensos de arranque







SETNA NUTRICIÓN, S.A.U.
 c Clavo, nº1 · Pol. Ind. Santa Ana · 28522 · Rivas Vaciamadrid (Madrid)
 t (34) 91 666 85 00 · f (34) 91 666 71 94 · setnanutricion@setna.com · w setna.com

HORMONAS RECOMBINANTES USADAS CON FINES REPRODUCTIVOS

Como ya se ha mencionado anteriormente, en el ámbito de la reproducción animal, el uso de hormonas recombinantes con fines reproductivos es el más ampliamente explorado [3, 7-8]. De hecho, dichas hormonas se usan con dos fines opuestos: aumentar la fertilidad de la hembra, mediante la regulación de la ovulación y/o facilitando la implantación del embrión, mientras que por otro lado se usan para esterilizar a los machos con el objetivo de mejorar la calidad de la carne. Todo ello es debido a que las hormonas reproductivas tienen un rol crítico en la regulación de la función reproductiva del macho y en el ciclo reproductivo y el mantenimiento del embarazo de la hembra. Las hormonas más ampliamente usadas para estos fines son la hormona estimulante del folículo (FSH), la hormona luteinizante (LH) y la gonadotropina coriónica (CG), entre otras [9]. La FSH y la LH, junto con la CG, se usan para provocar una superovulación en las hembras y, en el caso de los machos, para estimular la producción de testosterona y la espermatogénesis. Por lo tanto, el uso de estas hormonas es una práctica habitual en distintas especies animales.

Actualmente las hormonas más usadas para fines reproductivos se aíslan en muchas ocasiones a partir de la glándula pituitaria de los animales. Cabe destacar que, a pesar de ser una estrategia muy usada, conlleva importantes problemas asociados:

- variación entre lotes, dando lugar a respuestas distintas entre animales,
- poca pureza, ya que a menudo hay otras hormonas contaminando las muestras,
- posible contaminación con agentes patógenos [8].

En consecuencia, es necesario aplicar protocolos de purificación muy complejos para garantizar la calidad del producto final. Es en este contexto donde la producción de hormonas de forma recombinante aparece como una prometedora estrategia para solucionar dichos problemas, ya que al comparar su funcionalidad vemos que a menudo las hormonas recombinantes presentan mejor actividad, incluso con dosis inferiores, que las hormonas derivadas de pituitaria [7, 10].

Hasta ahora, la producción recombinante de hormonas se ha realizado esencialmente usando células de mamífero. Existen distintas formas comerciales producidas en este sistema de expresión, así como extraídas a par-

tir de su fuente natural, la pituitaria, tal y como se resume en la tabla 1. Las células ováricas de hámster chino (CHO) son las más ampliamente usadas, aunque las células de riñón embrionario humano (HEK) también se usan. Sin embargo, la producción en estos sistemas de expresión es compleja y tiene importantes costes asociados, además de ser un proceso largo.

De forma alternativa ya se han empezado a explorar las levaduras (microorganismos eucariotas), tales como *Pichia pastoris*, y la bacteria *E. coli* (microorganismo procariota), como sistemas más económicos y con los que es fácil trabajar [11,12]. Como ejemplo, la FSH bovina, porcina y ovina se han producido satisfactoriamente en *P. pastoris* [13-15]. La levadura *Hansenula polymorpha* también se ha usado para producir FSH bovina y se ha probado su función en ratón. Todavía queda trabajo por hacer en esta dirección, pero los resultados obtenidos hasta el momento muestran que las levaduras pueden convertirse en una alternativa para la producción de FSH en un futuro próximo.

En el caso de la LH y la CG se ha explorado su producción en células de insecto [71], en *P. pastoris* [19] y también en *E. coli* [20]. Por lo tanto, estos estudios prueban que es posible producir hormonas funcionales en organismos eucariotas más simples e incluso en sistemas procariotas. ►►

► EN ALGUNOS CASOS LA SUPLEMENTACIÓN SE HACE CON ENZIMAS QUE SE PRODUCEN EN NIVELES INSUFICIENTES POR PARTE DEL ANIMAL

Tabla 1. FSH, LH y CG disponibles comercialmente para producción animal

	Nombre comercial	Fábrica/origen de las células
FSH	Follistim®	Células CHO
	Puregon®	
	Gonal-F®	
	BoviPureFSH™	
	EquiPureFSH™	
	FSH	Células HEK
	Folltropin-V®	Glándula pituitaria
	Pluset®	
LH	BoviPureFSH™	Células CHO
	EquiPureFSH™	
	Luveris®	
	Pluset®	Glándula pituitaria
CG	Pregnyl	Orina
	Folligon®	Suero
	Novormon®5000	Corion
	PG600®	Corion y suero

41 INTERNATIONAL FAIR OF AGRICULTURAL MACHINERY
FERIA INTERNACIONAL DE LA MAQUINARIA AGRÍCOLA

FIMA

25-29 FEBRERO/FEBRUARY

2020

ZARAGOZA (ESPAÑA/SPAIN)

WWW.FIMA-AGRICOLA.ES



ENZIMAS FIBROLÍTICOS RECOMBINANTES

La digestibilidad de la pared celular de las plantas por parte de los enzimas animales es baja y por ello se suplementan las dietas con enzimas fibrolíticos para mejorar la tasa de conversión y así mejorar la producción animal. Tradicionalmente, los enzimas fibrolíticos (β -glucanasas, xilanasas, manasas, pectinasas, galactosidasas y fitasas) se han usado en cerdos y aves, pero actualmente se usan también en rumiantes. Además, en algunos casos la suplementación se hace con enzimas que se producen en niveles insuficientes por parte del animal, como por ejemplo proteasas, lipasas y amilasas. Igual que en el caso de las hormonas, los enzimas fibrolíticos se pueden obtener a partir de su fuente natural (en este caso hongos o bacterias) y en estos casos se usa un extracto celular, que a menudo contiene una mezcla de distintas actividades enzimáticas. No obstante, debido al gran número de impurezas presentes en la muestra, es necesario eliminar cualquier residuo de DNA o de otros residuos de la fermentación no deseables. A pesar de que hoy en día los enzimas comercialmente disponibles para estos fines provienen de sus fuentes naturales, se está explorando el desarrollo de estrategias basadas en la tecnología del DNA recombinante para la producción de la forma pura de cada enzima. Para ello se han explorado un amplio abanico de microorganismos, incluyendo bacterias (*E. coli*, *Bacillus subtilis* y *Bacillus licheniformis*), levaduras (*P. pastoris*) y hongos (*Trichoderma reesei* y *Aspergillus niger*). En todos los casos las estrategias desarrolladas pretenden tener en cuenta los requerimientos de la industria: altos niveles de producción, bajo coste de producción, procesos fácilmente escalables y productos catalíticamente eficientes y muy estables.

Actualmente se han publicado un gran número de artículos que muestran prometedores resultados, hecho que es particularmente interesante en una situación de creciente demanda de estas enzimas [21, 22]. *P. pastoris* y *Saccharomyces cerevisiae* se están estudiando en detalle para la producción de distintas xilanasas y se han conseguido optimizar sus niveles de producción y su estabilidad. En el caso de bacterias se ha explorado *E. coli*, *Lactobacillus* spp. y *B. subtilis*, y los hongos más estudiados son *Aspergillus* spp. y *Trichoderma* spp.

Por otro lado, las fitasas se emplean para degradar el fitato, siendo la principal fuente de fósforo en las dietas animales [23]. Como alternativa se ha usado durante años fósforo inorgánico como suplemento, pero esto supone un problema medioambiental debido a la acumulación en suelo y agua del exceso de fósforo excretado. Aunque se valoró su obtención a partir de su fuente natural, viendo los bajos niveles resultantes, se empezó a explorar su producción recombinante.

Con la comercialización de la primera fitasa recombinante en 1991 se minimizó el impacto del fósforo residual y desde entonces otras alternativas han salido al mercado [24]. El mercado de las fitasas supone un 60 % del total del mercado de los enzimas fibrolíticos y son especialmente importantes no solo porque aumentan la eficiencia sino también porque contribuyen a reducir la polución asociada a la presencia de fósforo. Por ello, distintos grupos están trabajando para mejorar el diseño y la producción de fitasas recombinantes [23, 25]. Para producir esta enzima se han usado hongos (*T. reesei*, *A. niger* y *A. oryzae*) y levaduras (*Saccharomyces pombe* y *P. pastoris*), principalmente. El género *Aspergillus* es el más ampliamente estudiado entre los hongos, *P. pastoris* es la levadura más usada y el género *Bacillus*, así como algunos *Lactobacillus* y *E. coli* son los más estudiados entre los sistemas bacterianos. Hoy en día la investigación en este campo está más centrada en la optimización de propiedades clave de enzimas ya descritas, más que la identificación de nuevas fitasas, y para ello la ingeniería de proteínas tendrá un papel decisivo [26]. Concretamente, la investigación se centra en el desarrollo de enzimas más estables a pH bajos y temperaturas altas, siendo condiciones que mimetizan el tracto digestivo y el proceso de fabricación de pellets, respectivamente.

PROTEÍNAS RECOMBINANTES PARA TRATAMIENTOS PREVENTIVOS Y TERAPÉUTICOS

La administración de anticuerpos, también conocida como inmunización pasiva, se ha usado de forma satisfactoria en un amplio número de especies animales, incluyendo vacuno, cerdos, ovejas, cabras, aves y peces, para controlar infecciones [27]. A diferencia de la vacunación (o inmunización activa), la administración de inmunoglobulinas establece una inmunidad instantánea dando protección a corto plazo

► EL MERCADO DE LAS FITASAS SUPONE UN 60 % DEL TOTAL DEL MERCADO DE LOS ENZIMAS FIBROLÍTICOS

► LA TECNOLOGÍA RECOMBINANTE [...] HA PERMITIDO DAR UN SALTO SIGNIFICATIVO EN PRODUCCIÓN ANIMAL Y YA EMPIEZA A TENER UN IMPACTO TANGIBLE

al animal. Estos tratamientos son especialmente relevantes en aquellos casos con enfermedades multifactoriales y/o que no responden a control vacunal.

En este sentido, durante la última década se han desarrollado tecnologías para la producción recombinante de anticuerpos que pueden llegar a ser altamente específicos frente a un patógeno. Varios ejemplos muestran que son una buena aproximación en producción animal; se ha visto, por ejemplo, que la administración de anticuerpos recombinantes frente al Coronavirus de la gastroenteritis transmisible (TGEV), que afecta a cerdos y causa una mortalidad cercana al 100 % en los lechones, aumenta notablemente la supervivencia de estos animales [28]. Otro ejemplo son los anticuerpos frente al herpes virus 1 bovino (boHV-1), que muestran una clara actividad neutralizante *in vitro* [19]. Aunque para este último caso es necesario determinar su efectividad *in vivo*, los resultados *in vitro* muestran valores de neutralización comparables a un anticuerpo ya descrito y que reduce la mortalidad en conejos. Un tercer ejemplo se ha probado con anticuerpos contra el FMDV, un virus que afecta al ganado bovino, a cerdos y a ovejas, demostrando

que puede ser un tratamiento útil para controlar brotes de FMDV en regiones como la Unión Europea.

Por otro lado, los anticuerpos recombinantes, en este caso producidos en *E. coli*, se han usado para el tratamiento de infecciones intramamarias. Estas infecciones causan importantes pérdidas económicas en la industria lechera y la inmunización pasiva podría ser una buena aproximación para tratar infecciones debidas a *Staphylococcus aureus*. Aunque ya empieza a haber resultados prometedores en este sentido, todavía queda trabajo por hacer en esta línea.

CONCLUSIÓN

En resumen, la tecnología recombinante, junto con la ingeniería de proteínas, ha permitido dar un salto significativo en producción animal y ya empieza a tener un impacto tangible. Hoy en día ya es posible diseñar secuencias de enzimas a la carta, que pueden incluso combinar propiedades distintas en una única molécula funcional. Asimismo, esta aproximación permite producir hormonas mediante procesos económicamente viables usando microorganismos como fábricas celulares. Sumado a ello, nuevas estrategias, tales como la inmunización pasiva, están ganando terreno debido al elevado potencial que ello ofrece.

Hasta el momento se han hecho ya esfuerzos para minimizar los costes de estos procesos, pero todavía queda mucho por hacer. De hecho, durante los próximos años es necesario ir más allá y hace falta hacer uso de otras tecnologías, como la nanotecnología, que trabaja con la encapsulación de las proteínas o su recubrimiento con nanoemulsiones, liposomas, nanocápsulas, partículas poliméricas y/o hidrogeles para llegar a obtener productos comercialmente viables. Es necesario dar un nuevo formato a las moléculas (proteínas) producidas, para

así aumentar su función y su vida media para finalmente poder reducir dosis y, en consecuencia, reducir costes. ■

BIBLIOGRAFÍA

- [1] Rosano & Ceccarelli. *Front Microbiol.* 2014;5:1-17.
- [2] Saccardo P *et al.* *Appl Microbiol Biotechnol.* 2016;100:4347-55.
- [3] Bó & Mapletto. *Theriogenology.* 2014;81:38-48.
- [4] Jennings *et al.* *Anim Reprod Sci.* 2009;116:291-307.
- [5] Liu *et al.* *Theriogenology.* 2015;83:314-9.
- [6] Geary *et al.* *J Anim Sci* 2006;84:343-50.
- [7] Adams & Boime *Reprod Domest Anim.* 2008;43:186-92.
- [8] Hesser *et al.* *Reprod Domest Anim.* 2011;46:933-42.
- [9] De Koning *et al.* *Nat Biotechnol.* 1994;12:988-92.
- [10] Meyers-Brown *et al.* *J Equine Vet Sci.* 2010;30:560-8.
- [11] Fachal *et al.* *Anim Reprod Sci.* 2010;117:331-40.
- [12] Rutigliano *et al.* *Theriogenology.* 2014;82:455-60.
- [13] Richard *et al.* *Biochem Biophys Res Commun.* 1998;245:847-52.
- [14] Samadpour *et al.* *Protein Expr Purif.* 1997;10:345-55.
- [15] Fidler AE *et al.* *J Mol Endocrinol.* 1998;21:327-36.
- [16] Qian W *et al.* *Protein Expr Purif.* 2009;68:183-9.
- [17] Legardinier *et al.* *Reprod Nutr Dev.* 2005;45:255-9.
- [18] Blanchard *et al.* *Glycoconj J.* 2007;24:33-47.
- [19] Gadkari *et al.* *Protein Expr Purif.* 2003;32:175-84.
- [20] Huth *et al.* *Endocrinology.* 1994;135:911-8.
- [21] Ravindran & Son. *Recent Pat Food Nutr Agric.* 2011;3:102-9.
- [22] Gifre *et al.* *Microb Cell Fact.* 2017;16(1):40.
- [23] Haefner *et al.* *Appl Microbiol Biotechnol.* 2005;68:588-97.
- [24] Lei *et al.* *Annu Rev Anim Biosci.* 2013;1:283-309.
- [25] Rao *et al.* *Crit Rev Biotechnol.* 2009;29:182-98.
- [26] Mukhametzyanova *et al.* *Microbiology.* 2012;81:267-75.
- [27] Hedegaard *et al.* *Vet Immunol Immunopathol.* 2016;174:50-63.
- [28] Bestagno *et al.* *J Gen Virol.* 2007;88:187-95.
- [29] Pasman *et al.* *Clin Vaccin Immunol.* 2012;19:1150-7.

AgroBank

**Asesoramiento
y servicio para
el sector agrario**

