



Proteínas recombinantes e o seu potencial en produción animal

Ofrecemos unha perspectiva xeral das proteínas recombinantes producidas en distintos sistemas de expresión, focalizándonos nos tres alicerces fundamentais para produción animal: reprodución, eficiencia alimentaria e saúde, co fin de realizar unha fotografía do seu uso e das investigacións relacionadas coa tecnoloxía destas na produción animal actual e nun futuro próximo.

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

¹Investigadoras de Producción de Ruminantes, Instituto de Investigación e Tecnoloxía Agroalimentarias (IRTA)
Torre Marimon, Caldes de Montbui (Barcelona)

²Estudiante de doutoramento (IRTA)

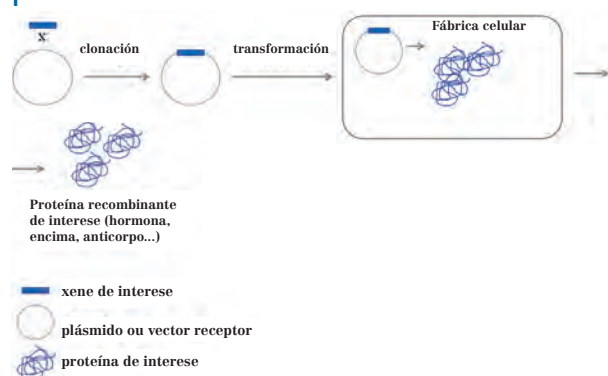
As proteínas son moléculas cun papel biolóxico moi relevante e por iso teñen un gran número de aplicacións e un enorme potencial. Durante anos a única forma de obter estas proteínas era a través da extracción das súas fontes naturais mediante procesos moi caros e pouco

eficientes [1]. No entanto, o descubrimento da tecnoloxía do DNA recombinante nos anos setenta permitiu dar un salto cualitativo neste campo de estudo, o que facilitou que hoxe en día se poida producir calquera proteína de interese usando células procariotas ou eucariotas como fábricas celulares. De

forma resumida, esta tecnoloxía permítenos seleccionar calquera xene de interese e incorporalo nun sistema de expresión heterólogo ou recombinante (bacterias, fermentos, algas, células de mamífero ou células de insecto, entre outros) [2] para producir a proteína codificada no devandito xene, tanto a escala de laboratorio coma a unha escala industrial (figura 1). Actualmente, a pesar de que existe un amplo abano de sistemas de produción recombinantes, a bacteria *Escherichia coli* e as células de mamífero seguen sendo as opcións elixidas en moitos dos casos.

► AS HORMONAS RECOMBINANTES PRESENTAN MELLOR ACTIVIDADE, MESMO CON DOSES INTERIORES, QUE AS HORMONAS DERIVADAS DA GLÁNDULA PITUITARIA

Figura 1. Esquema dun proceso de produción dunha proteína recombinante



En primeiro lugar, insírese o xene de interese nun plásmido ou vector de expresión mediante un proceso de clonación. A continuación, introdúcese o plásmido co xene de interese no sistema de expresión elixido (bacterias, fermentos, fungos, células de insecto, células de mamífero etc.). Este sistema de expresión que actúa coma unha fábrica celular produce a proteína de interese que posteriormente é purificada.

Máis concretamente, e centrándonos no uso das proteínas recombinantes en produción animal, o uso dos citados sistemas como fábricas celulares medrou de xeito notable na última década. Un dos campos máis amplamente estudados é o relacionado co sistema endócrino e, especificamente, co uso de hormonas recombinantes [3-6]. Na actualidade xa existen hormonas producidas de forma recombinante e dispoñibles comercialmente, e moitos grupos de investigación están a estudar o seu uso co obxectivo de mellorar o potencial reprodutivo. Ademais, estanse a desenvolver outras estratexias terapéuticas ou tratamentos profilácticos baseados en proteínas recombinantes, á vez que se estudia o seu uso como encimas para mellorar a eficiencia da conversión dos alimentos a produtos máis facilmente 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 FINS REPRODUTIVOS

Como xa se mencionou anteriormente, no ámbito da reprodución animal, o uso de hormonas recombinantes con fins reprodutivos é o máis amplamente explorado [3, 7-8]. De feito, as devanditas hormonas úsanse con dous obxectivos opostos: aumentar a fertilidade da femia, mediante a regulación da ovulación e/ou facilitando a implantación do embrión, mentres que doutra banda se usan para esterilizar os machos co obxectivo de mellorar a calidade da carne. Todo iso é debido a que as hormonas reprodutivas teñen un rol crítico na regulación da función reprodutiva do macho e no ciclo reprodutivo e o mantemento do embarazo da femia. As hormonas máis amplamente usadas para estes fins son a hormona estimulante do folículo (FSH), a hormona luteinizante (LH) e a gonadotropina coriónica (CG), entre outras [9]. A FSH e a LH, xunto coa CG, úsanse para provocar unha superovulación nas femias e, no caso dos machos, para estimular a produción de testosterona e mais a espermatoxénese. Por tanto, o uso destas hormonas é unha práctica habitual en distintas especies animais.

Actualmente, as hormonas máis usadas para fins reprodutivos illanse en moitas ocasións a partir da glándula pituitaria dos animais. Cabe destacar que, a pesar de ser unha estratexia moi usada, leva importantes problemas asociados:

- variación entre lotes, dando lugar a respostas distintas entre animais,
- pouca pureza, xa que a miúdo hai outras hormonas contaminando a mostra,
- posible contaminación con axentes patóxenos [8].

En consecuencia, é necesario aplicar protocolos de purificación moi complexos para garantir a calidade do produto final. É neste contexto onde a produción de hormonas de forma recombinante aparece como unha prometedora estratexia para solucionar os citados problemas, xa que, ao compararmos a súa funcionalidade, vemos que a miúdo as hormonas recombinantes presentan mellor actividade, mesmo con doses inferiores, que as hormonas derivadas da glándula pituitaria [7, 10].

Ata agora, a produción recombinante de hormonas realizouse esencialmente usando células de mamífero.

Existen distintas formas comerciais producidas neste sistema de expresión, así como extraídas a partir da súa fonte natural, a pituitaria, tal e como se resume na táboa 1. As células ováricas de hámster chinés (CHO) son as máis amplamente usadas, aínda que as células de ril embrionario humano (HEK) tamén se usan. Con todo, a produción nestes sistemas de expresión é complexa e ten importantes custos asociados, ademais de ser un proceso longo.

De forma alternativa xa se empezaron a explorar os fermentos (microorganismos eucariotas), tales como *Pichia pastoris* e a bacteria *E. coli* (microorganismo procariota), como sistemas máis económicos e cos que é fácil traballar [11,12]. Como exemplo, a FSH bovina, porcina e ovina producíronse satisfactoriamente en *P. pastoris* [13-15]. O fermento *Hansenula polymorpha* tamén se usou para producir FSH bovina e probouse a súa función en ratos. Aínda queda traballo por facer nesta dirección, pero os resultados obtidos ata o momento mostran que os fermentos se poden converter nunha alternativa para a produción de FSH nun futuro próximo.

No caso da LH e da CG explorouse a súa produción en células de insecto [71], en *P. pastoris* [19] e tamén en *E. coli* [20]. Por tanto, estes estudos proban que é posible producir hormonas funcionais en organismos eucariotas máis simples e mesmo en sistemas procariotas. ►►

► NALGÚNS CASOS A SUPLEMENTACIÓN FAISE CON ENZIMAS QUE SE PRODUCEN EN NIVEIS INSUFICIENTES POR PARTE DO ANIMAL

Táboa 1. FSH, LH e CG dispoñibles comercialmente para produción animal

	Nome comercial	Fábrica/orixe celular
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	Ouriños
	Folligon®	Soro
	Novormon®5000	Corion
	PG600®	Corion e soro

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



ENCIMAS FIBROLÍTICOS RECOMBINANTES

A dixestibilidade da parede celular das plantas por parte dos encimas animais é baixa e por iso as dietas son suplementadas con encimas fibrolíticos para mellorar a taxa de conversión e así mellorar a produción animal. Tradicionalmente, os encimas fibrolíticos (β -glucanasas, xilanasas, manasas, pectinasas, galactosidasas e fitasas) usáronse en porcos e aves, pero hoxe en día úsanse tamén en ruminantes. Ademais, nalgúns casos a suplementación faise con encimas que se producen en niveis insuficientes por parte do animal, por exemplo proteasas, lipasas e amilasas. Igual que no caso das hormonas, os encimas fibrolíticos pódense obter a partir da súa fonte natural (neste caso fungos ou bacterias) e nestes casos úsase un extracto celular, que a miúdo contén unha mestura de distintas actividades encimáticas. No entanto, debido ao gran número de impurezas presentes na mostra, cómpre eliminar calquera residuo de DNA ou doutros residuos da fermentación non desexables. A pesar de que hoxe en día os encimas comercialmente dispoñibles para estes fins proveñen das súas fontes naturais, está a explorarse o desenvolvemento de estratexias baseadas na tecnoloxía do DNA recombinante para a produción da forma pura de cada encima. Para iso exploráronse un amplo abano de microorganismos, incluíndo bacterias (*E. coli*, *Bacillus subtilis* e *Bacillus licheniformis*), fermentos (*P. pastoris*) e fungos (*Trichoderma reesei* e *Aspergillus niger*). En todos os casos as estratexias desenvolvidas pretenden ter en conta os requirimentos da industria: altos niveis de produción, baixo custo de produción, procesos facilmente escalables e produtos cataliticamente eficientes e moi estables.

Actualmente foron publicados un gran número de artigos que mostran prometedores resultados, feito que é particularmente interesante nunha situación de crecente demanda destes encimas [21, 22]. *P. pastoris* e *Saccharomyces cerevisiae* están a estudarse en detalle para a produción de distintas xilanasas e conseguíronse optimizar os seus niveis de produción e a súa estabilidade. No caso de bacterias explorouse *E. coli*, *Lactobacillus spp.* e *B. subtilis*, e os fungos máis estudados son *Aspergillus spp.* e *Trichoderma spp.*

Así mesmo, as fitasas empréganse para degradar o fitato, sendo a principal fonte de fósforo nas dietas animais [23]. Como alternativa usouse durante anos fósforo inorgánico como suplemento, pero isto supón un problema ambiental debido á acumulación no chan e na auga do exceso de fósforo excretado. Aínda que se valorou a súa obtención a partir da súa fonte natural, vendo os baixos niveis resultantes, empezouse a explorar a súa produción recombinante.

Coa comercialización da primeira fitasa recombinante en 1991 minimizouse o impacto do fósforo residual e desde entón outras alternativas saíron ao mercado [24]. O mercado das fitasas supón un 60 % do total do mercado dos encimas fibrolíticos e son especialmente importantes non só porque aumentan a eficiencia senón porque contribúen a reducir a polución asociada á presenza de fósforo. Por iso, distintos grupos están a traballar para mellorar o deseño e a produción de fitasas recombinantes [23, 25]. Para producir este encima usáronse fungos (*T. reesei*, *A. niger* e *A. oryzae*) e fermentos (*Saccharomyces pombe* e *P. pastoris*), principalmente. O xénero *Aspergillus* é o máis amplamente estudado entre os fungos, *P. pastoris* é o fermento máis usado e o xénero *Bacillus*, así como algúns *Lactobacillus* e *E. coli* son os máis estudados entre os sistemas bacterianos. Hoxe en día a investigación neste campo está máis centrada na optimización de propiedades clave de encimas xa descritos, máis que na identificación de novas fitasas, e para iso a enxeñería de proteínas terá un papel decisivo [26]. En concreto, a investigación céntrase no desenvolvemento de encimas máis estables a pH baixos e temperaturas altas, sendo condicións que mimetizan o tracto dixestivo e o proceso de fabricación de *pellets*, respectivamente.

PROTEÍNAS RECOMBINANTES PARA TRATAMENTOS PREVENTIVOS E TERAPÉUTICOS

A administración de anticorpos, tamén coñecida como inmunización pasiva, usouse de forma satisfactoria nun amplo número de especies animais, incluíndo vacún, porcos, ovellas, cabras, aves e peixes, para controlar infeccións [27]. A diferenza da vacinación (ou inmunización activa), a administración de inmunoglobulinas esta-

► O MERCADO DAS FITASAS SUPÓN UN 60 % DO TOTAL DO MERCADO DOS ENCIMAS FIBROLÍTICOS

► A TECNOLOXÍA RECOMBINANTE [...] PERMITIU DAR UN SALTO SIGNIFICATIVO EN PRODUCCIÓN ANIMAL E XA COMEZA A TER UN IMPACTO TANXIBLE

blece unha inmunidade instantánea, o que lle dá protección ao animal a curto prazo. Estes tratamentos son especialmente relevantes naqueles casos con doenzas multifactoriais e/ou que non responden a control de vacinas. Neste sentido, durante a última década desenvóléronse tecnoloxías para a produción recombinante de anticorpos que poden chegar a ser altamente específicos fronte a un patóxeno. Varios exemplos mostran que son unha boa aproximación en produción animal; viuse, por exemplo, que a administración de anticorpos recombinantes fronte ao Coronavirus da gastroenterite transmisíble (TGEV), que afecta a porcos e causa unha mortalidade próxima ao 100 % nos leitóns, aumenta notablemente a supervivencia destes animais [28]. Outro exemplo son os anticorpos fronte ao herpes virus 1 bovino (boHV-1), que mostran unha clara actividade neutralizante in vitro [19]. Aínda que para este último caso é necesario determinar a súa efectividade in vivo, os resultados in vitro mostran valores de neutralización comparables a un anticorpo xa descrito e que reduce a mortalidade en coellos. Un terceiro exemplo probouse con anticorpos contra o FMDV, un virus que afecta ao gando bovino, a porcos e a ovelas, demos-

trando que pode ser un tratamento útil para controlar brotes de FMDV en rexións como a Unión Europea. Así mesmo, os anticorpos recombinantes, neste caso producidos en *E. coli*, usáronse para o tratamento de infeccións intramamarias. Estas infeccións causan importantes perdas económicas na industria leiteira e a inmunización pasiva podería ser unha boa aproximación para tratar infeccións debidas a *Staphylococcus aureus*. Aínda que xa empeza a haber resultados prometedores neste sentido, aínda queda traballo por facer nesta liña.

CONCLUSIÓN

En resumo, a tecnoloxía recombinante, xunto coa enxeñaría de proteínas, permitiu dar un salto significativo en produción animal e empeza a ter un impacto tanxible. Hoxe en día xa é posible deseñar secuencias de encimas á carta, que poden mesmo combinar propiedades distintas nunha única molécula funcional. Ademais, esta aproximación permite producir hormonas mediante procesos economicamente viábles usando microorganismos como fábricas celulares. Sumado a iso, novas estratexias, tales como a inmunización pasiva, están a gañar terreo debido ao elevado potencial que iso ofrece.

Ata o momento fixéronse xa esforzos para minimizar os custos destes procesos, pero aínda queda moito por facer. De feito, durante os próximos anos é necesario ir máis aló e fai falta facer uso doutras tecnoloxías, como a nanotecnoloxía, que traballa coa encapsulación das proteínas ou o seu recubrimento con nanoemulsións, liposomas, nanocápsulas, partículas poliméricas e/ou hidroxelos para chegar a obter produtos comercialmente viábles. É necesario darlles un novo formato ás moléculas (proteínas)

producidas, co fin de aumentar así a súa función e a súa vida media para, finalmente, poder reducir dose e, en consecuencia, reducir custos. ■

BIBLIOGRAFÍA

- [1] Rosano & Ceccarelli. *Front Microbiol*. 2014;5:1–17.
- [2] Saccardo P *et al*. *Appl Microbiol Biotechnol*. 2016;100:4347–55.
- [3] Bó & Mapletoft. *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] Samaddar *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

**Asesoramento
e servizo para
o sector agrario**

