

# CARACTERÍSTICAS Y APLICACIONES DE LA TRANSGÉNESIS EN ANIMALES DOMÉSTICOS

Josep M. Folch Albareda

Unitat de Genètica i Millora, Departament de Patologia i Producció Animals, Facultat de Veterinària, Universitat Autònoma de Barcelona, 08193 Bellaterra

## 1. INTRODUCCIÓN

En 1980 Gordon *et al.* describieron por primera vez la creación de ratones transgénicos por microinyección de ADN exógeno en el pronúcleo de embriones en estadio de una célula. Inmediatamente después, otros cuatro grupos lograron también obtener ratones transgénicos y demostraron que el ADN introducido se transmitía a la descendencia y se expresaba.

La primera demostración de la posibilidad de alterar el fenotipo en los animales transgénicos fue obtenida por Palmiter *et al.* (1982), que microinyectó en ratones el gen que codifica la hormona de crecimiento de rata fusionado con el promotor de la metalotioneína. Los ratones transgénicos expresaban la hormona de crecimiento en diversos tejidos y mostraban un tamaño corporal mucho mayor (de 2 a 4 veces el tamaño normal de un ratón).

Un animal transgénico se puede definir como aquel cuyo genoma ha sido modificado por la introducción de un ADN exógeno o por la delección de un fragmento de ADN propio. El ADN exógeno puede ser un gen de otra especie o una secuencia nucleotídica manipulada de la misma especie. El nuevo gen introducido se denomina transgén y, normalmente, se encuentra integrado de forma estable en el genoma del animal transgénico.

## 2. TÉCNICAS DE TRANSFERENCIA DE GENES

Diferentes métodos han sido desarrollados para la obtención de animales transgénicos:

### 2.1. Microinyección de ADN en pronúcleo de embriones

Consiste en la microinyección de ADN en el pronúcleo (normalmente el masculino debido a su mayor tamaño) de embriones en estadio de una célula y la posterior transferencia de estos embriones al oviducto de hembras receptoras sincronizadas hormonalmente. Es una técnica relativamente simple y ha sido utilizada extensamente en ratones y en casi todos los animales transgénicos obtenidos en especies productivas. La eficiencia de integración del transgén (animales transgénicos/embriones microinyectados y transferidos) es muy variable, siendo como promedio del 1 % en animales domésticos y del 3 % en animales de laboratorio (Wall, 1996). La microinyección en animales domésticos se ve dificultada por la opacidad de los óvulos, que impide la visualización de los pronúcleos, y hace necesario centrifugar los óvulos o utilizar técnicas de microscopía especiales. El número de embriones que se pueden recuperar por superovulación es limitado y se están desarrollando técnicas que permiten la obtención de embriones mediante la maduración y fecundación *in vitro* de óvulos de ovarios de animales sacrificados en matadero. Además, en especies poco prolíficas es necesario disponer de un elevado número de madres receptoras para implantar los embriones microinyectados. Uno de los mayores inconvenientes de este método es la imposibilidad de controlar el número de copias y el lugar de integración del transgén.

### 2.2. Vectores retrovíricos.

Los retrovirus pueden ser modificados para clonar fragmentos de ADN y ser utilizados como vectores para infectar embriones animales. Son potencialmente interesantes debido a la elevada eficiencia de integración del transgén observada en ratones y a la inserción de una única copia intacta del transgén en una determinada localización cromosómica. Presentan, sin embargo, algunos inconvenientes como son la limitación en el tamaño de los insertos de ADN que pueden ser introducidos en los retrovirus (menor de 10 kb), la integración del transgén en sólo una fracción de las células del embrión generándose animales mosaico que no transmiten o lo hacen con una frecuencia baja el transgén a la descendencia, los problemas en el control de la expresión del transgén debido a la presencia de secuencias reguladoras propias del retrovirus y las dudas sobre la seguridad de estos vectores debido a la posibilidad de que sean activados por recombinación con provirus existentes en el genoma huésped. La utilización de retrovirus en animales productivos ha sido muy escasa y sólo se ha descrito la obtención de transgénicos en ratones y en aves. En cerdos y ovejas se han utilizado retrovirus salvajes, pero no se han encontrado evidencias de la integración del ADN en línea germinal.

### 2.3. Células embrionarias totipotentes

Las células ES (*Embryonic Stem Cells*) son células totipotentes derivadas de blastocitos que pueden ser cultivadas *in vitro* manteniendo su totipotencia. Es decir, pueden implantarse en un embrión receptor en desarrollo y formar parte de diferentes tejidos, incluyendo la línea germinal. Los animales obtenidos serán por tanto quimeras. Su principal ventaja es la capacidad de ser transformadas con un ADN de interés y posteriormente seleccionadas *in vitro* para un determinado genotipo antes de ser implantadas en un embrión. Es una técnica compleja, pero es la única que permite dirigir por recombinación homóloga la integración del transgén en una localización genómica concreta. Permite inactivar la expresión de un gen (knock-out), sustituir un gen por una versión modificada en el laboratorio y controlar mejor la expresión de un transgén al poder integrarlo en un lugar específico del genoma. El mayor inconveniente de esta técnica es la ausencia del transgén en la línea germinal de muchos de los animales. Se ha utilizado sólo en la manipulación del genoma del ratón porque no se ha logrado todavía obtener células ES en especies domésticas a pesar del enorme esfuerzo dedicado.

### 2.4. Otros métodos

Transfección de espermatozoides. Consiste básicamente en incubar con ADN los espermatozoides, utilizados como vehículo para la transgénesis, y realizar una fecundación *in vitro*. La obtención de ratones transgénicos mediante esta técnica fue descrita por Lavitrano *et al.* en 1989, sin embargo, diferentes grupos no pudieron reproducir estos experimentos. Posteriormente, se ha demostrado que los espermatozoides de diferentes especies son capaces de incorporar ADN y recientemente, se han obtenido cerdos transgénicos (Sperandio *et al.*, 1996). Uno de los mayores problemas de esta técnica es la presencia de reordenaciones en los transgénos introducidos.

Adenovirus como vectores. Este nuevo método (Tsukui *et al.*, 1996) ha sido descrito para la obtención de ratones transgénicos y consiste en la utilización de adenovirus como vectores para transferir genes a embriones de ratón en estado de pronúcleos a los que se retira la zona pelúcida.

## 3. CARACTERÍSTICAS DE LOS ANIMALES TRANSGÉNICOS

Los transgenes contienen normalmente secuencias reguladoras y estructurales. Las secuencias reguladoras son las que determinarán el tipo de tejido y momento de expresión del transgén. El elemento estructural es la secuencia de ADN que codifica por la proteína que se quiere expresar.

En la técnica de microinyección, el ADN se integra normalmente en forma de múltiples copias del transgén y en una única localización cromosómica. Se desconoce el mecanismo molecular de integración de los transgenes y parece no existir límite en el tamaño del fragmento de ADN. La mayoría (>62%) de los animales transgénicos fundadores son mosaicos (sólo una proporción de sus células son portadoras del transgén). Se cree que este fenómeno se produce por la integración del transgén en el genoma después de la primera replicación del ADN cromosómico (Whitelaw *et al.*, 1993). Los animales fundadores son hemigotos y, por tanto, es de esperar que transmitan el transgén al 50% de su descendencia. No obstante, algunos animales transgénicos no transmiten el transgén o lo hacen con frecuencias inferiores al 50%. La explicación más probable de este fenómeno es el mosaicismo en las células de la línea germinal.

No siempre se produce la expresión del transgén y, a veces, se observa en tejidos o en momentos del desarrollo no específicos (expresión ectópica). En general, la expresión del transgén depende del lugar de integración en el genoma, por lo que diferentes líneas de transgénicos pueden tener patrones de transcripción muy diferentes. Este efecto posicional puede ser debido a la estructura de la cromatina o a la presencia de elementos reguladores próximos. En algunos transgenes se ha descrito una expresión independiente del lugar de integración, encontrándose una correlación entre los niveles de expresión y el número de copias del transgén. Se han identificado algunos elementos responsables de esta expresión independiente (LCR, MAR, SAR) y se cree que tienen una actividad *enhancer* y/o crean dominios funcionales que aíslan el transgén de la estructura de la cromatina propia del lugar de integración.

## 4. APLICACIONES DE LOS ANIMALES TRANSGÉNICOS

El interés de los animales domésticos transgénicos se ha centrado en cuatro áreas principales (Purcell, 1995): la mejora de caracteres productivos, la resistencia a enfermedades, la utilización de estos animales como modelo de enfermedades humanas y la síntesis de productos biomédicos.

### 4.1. Mejora de caracteres productivos

La tecnología de animales transgénicos es potencialmente útil para modificar caracteres de importancia económica de una forma rápida y precisa. A diferencia de las técnicas de selección, es

necesario un conocimiento de los genes que controlan estos caracteres y su regulación.

**Crecimiento.** En muchos de los primeros trabajos en especies domésticas se utilizó la hormona de crecimiento dirigida por el promotor de la metalotioneína para controlar su expresión. En estudios posteriores se utilizaron, además de la hormona de crecimiento, el factor liberador de la hormona de crecimiento, IGF-I, cSKI y un receptor de estrógenos (revisado en: Cameron *et al.*, 1994; Pursel, 1995), dirigidos por diversos promotores. Se obtuvieron cerdos y ovejas transgénicas que mostraban niveles elevados de la hormona de crecimiento en el suero. Sin embargo, no se consiguió incrementar la tasa de crecimiento y sólo en algunas líneas se aumentó la ganancia media diaria cuando se suplementó la dieta con proteíñas. Los mayores efectos se observaron en la reducción de grasa en la canal. Sin embargo, un número elevado de diferentes patologías y una reducción de la capacidad reproductiva fueron descritas en estos animales. Los promotores utilizados no han permitido un control eficiente de la expresión del transgén y, actualmente, se está trabajando con construcciones más complejas que activen o repriman la expresión del transgén de una forma más precisa.

**Producción de lana.** Los objetivos son mejorar la producción de lana de oveja y modificar las propiedades de su fibra. Debido a que la cisteína parece ser el aminoácido limitante en la síntesis de lana, la primera aproximación para incrementar su producción consistió en transferir genes bacterianos de biosíntesis de cisteína al genoma ovino. Sin embargo, en esta aproximación no se logró la expresión de estos enzimas en el rumen de las ovejas transgénicas. Otra estrategia consistió en dirigir la expresión de IGF-I al folículo de la lana mediante la utilización de un promotor específico (Damak *et al.*, 1996). Se logró incrementar la producción de lana (expresada como peso neto de lana) en un 6,2 % como promedio con respecto a los animales no transgénicos. Fue la primera demostración de la mejora de un carácter productivo en especies domésticas por transgénesis, sin que se observaran efectos deletéreos en los animales.

**Composición de la leche.** Las proteíñas lácteas están codificadas por genes de copia única que pueden ser manipulados para modificar la composición y propiedades de la leche. Entre las diferentes aplicaciones (revisado en Bawden *et al.*, 1994) de la modificación de la leche en animales transgénicos, cabe destacar las siguientes:

a) Maternizar la leche de vaca para hacerla más apropiada al consumo de los bebés. Las principales diferencias entre la leche humana y la bovina son la ausencia de  $\beta$ -lactoglobulina ( $\beta$ -LG), una relación proteíñas séricas/caseíñas mayor, y un elevado contenido de lactoferrina y lisozima. La lactoferrina es responsable del transporte de hierro e inhibe el crecimiento bacteriano. Para introducir la lactoferrina humana en la leche bovina, se obtuvieron vacas transgénicas (Krimperfort *et al.*, 1991), pero no se ha descrito la producción de lactoferrina en la leche de estos animales. La eliminación de la  $\beta$ -LG en la leche de vaca sería otro objetivo interesante debido a que es uno de los principales determinantes de alergia a la leche.

b) Reducir el contenido de lactosa en la leche para permitir su consumo a las personas con intolerancia a la lactosa. Se estima que un 70% de la población mundial es deficiente en lactasa intestinal, enzima necesaria para digerir la lactosa. La reducción en lactosa se podría conseguir expresando  $\beta$ -galactosidasa en la leche o disminuyendo el contenido de  $\alpha$ -lactalbúmina ( $\alpha$ -LA; proteíña láctea implicada en la síntesis de lactosa). En ratones transgénicos en los que se inactivó el gen de la  $\alpha$ -LA (Stinnakre *et al.*, 1994), se obtuvo una leche sin  $\alpha$ -LA y lactosa. Sin embargo, ésta era muy viscosa y no era secretada fuera de la glándula mamaria debido a la importancia de la lactosa en la osmoregulación de la leche.

c) Variar el contenido de caseíñas de la leche para incrementar su valor nutricional y el rendimiento en la producción de queso. Algunas de las líneas de investigación en las que se está trabajando para mejorar el rendimiento quesero son el incremento en el número de copias del gen de la k-CN, la reducción del tamaño de las micelas y la modificación de la k-CN para hacerla más susceptible a la digestión con quimosina.

#### 4.2. Resistencia a enfermedades

Las aproximaciones que se están realizando incluyen la transferencia de genes de resistencia naturales, de anticuerpos y de proteíñas de la membrana vírica (Pursel, 1995). Así, un alelo del gen Mx del ratón, que le confiere resistencia al virus *influenza*, fue transferido al genoma porcino. No obstante, no se obtuvo expresión del mismo. También, diferentes anticuerpos fueron utilizados para generar cerdos y ovejas transgénicas, pero se formaron siempre anticuerpos quiméricos constituidos por cadenas ligeras codificadas por el transgén y cadenas pesadas codificadas por genes del propio animal, que no demostraron la especificidad deseada. La expresión de un transgén que codifica una proteíña de la envuelta del virus de la leucemia avícola permitió obtener aves de corral resistentes al subgrupo A de este virus, pero no al subgrupo B. En ovejas se introdujo el gen de la envuelta proteica del

retrovirus *visna* y los animales transgénicos obtenidos expresaron el gen, pero no se ha demostrado todavía su resistencia a la infección vírica.

**4.3. Modelo animal para enfermedades humanas**

Los ratones transgénicos han sido utilizados como modelo de enfermedades genéticas humanas, para ello se elimina el gen o se reemplaza por una forma mutada del mismo. También, sería útil disponer de animales de mayor tamaño como modelo, aunque sería necesario desarrollar la metodología de células ES en especies domésticas.

**4.4. Síntesis de productos biomédicos y órganos para trasplantes**

Es la aplicación de la transgénesis en los animales domésticos que ha dado mayores éxitos y ha permitido la síntesis de proteínas terapéuticas humanas de muy difícil obtención por otros medios.

La glándula mamaria ha demostrado ser el órgano ideal para la expresión de proteínas recombinantes por su elevada capacidad de síntesis, los escasos riesgos que presenta la expresión del transgén sobre la salud del animal y la facilidad de recolección y purificación del producto. La estrategia seguida para expresar proteínas en la glándula mamaria en lactación consiste en la utilización de construcciones que contienen la región codificante del gen que se desea expresar, fusionado con las regiones reguladoras de los genes que codifican las proteínas lácteas. Se han empleado los promotores de diversos genes de proteínas lácteas, incluyendo la  $\beta$ -LG ovina, la  $\alpha$ S1-CN bovina, la  $\beta$ -CN de vaca, rata y conejo y la WAP de ratón y conejo. Se han obtenido ovejas, cabras, vacas, cerdos y conejos transgénicos (Tabla I) para diversos productos terapéuticos. El resultado más espectacular corresponde a la expresión de  $\alpha_1$  antitripsina ( $\alpha_1$ AT) humana controlada por el promotor de la  $\beta$ -LG ovina. Así, ovejas transgénicas para esta construcción produjeron hasta 37,5 g/l de  $\alpha_1$ AT, es decir, más del 50% del contenido total de proteína de la leche. Resultados comercialmente interesantes fueron también descritos en la expresión, en cabras transgénicas, del activador tisular plasminógeno dirigido por el promotor de la  $\beta$ -CN caprina y en la expresión, en cerdos transgénicos, de la proteína C humana controlada por la WAP de ratón.

En fase preliminar, se encuentra la producción de hemoglobina humana en cerdos y la modificación de órganos en animales transgénicos, principalmente cerdos, para disminuir el rechazo en el trasplante de estos órganos a humanos (revisado en Wall, 1996).

**Tabla I**  
Expresión de proteínas terapéuticas en la glándula mamaria de animales domésticos transgénicos.

| Animal transgénico | Gen regulador         | Proteínas humanas producidas | Nivel de expresión (ml <sup>-1</sup> ) | Referencia                       |
|--------------------|-----------------------|------------------------------|----------------------------------------|----------------------------------|
| Oveja              | $\beta$ -LG ovina     | FIX (cDNA)                   | 25 ng                                  | Clark <i>et al.</i> , 1989       |
| Oveja              | $\beta$ -LG ovina     | $\alpha_1$ AT (cDNA)         | 5 $\mu$ g                              | Simons <i>et al.</i> , 1988      |
| Oveja              | $\beta$ -LG ovina     | $\alpha_1$ AT (gen)          | 1,5-37,5 mg                            | Wright <i>et al.</i> , 1991      |
| Cabra              | WAP ratón             | tPA (cDNA)                   | 3-6 $\mu$ g                            | Ebert <i>et al.</i> , 1991       |
| Cabra              | $\beta$ -CN caprina   | tPA (cDNA)                   | 1-3 mg                                 | Ebert <i>et al.</i> , 1994       |
| Vaca               | $\alpha$ S1-CN bovina | LF (cDNA)                    | N.D.                                   | Krimpenfort <i>et al.</i> , 1991 |
| Vaca               | $\alpha$ S1-CN bovina | EPO (gen)                    | N.D.                                   | Hyttinen <i>et al.</i> , 1994    |
| Cerdo              | WAP ratón             | Proteína C (cDNA)            | 0.001-1 mg                             | Velander <i>et al.</i> , 1992    |
| Conejo             | $\beta$ -CN conejo    | IL-2 (gen)                   | 50-430 ng                              | Bühler <i>et al.</i> , 1990      |

N.D.: no determinado.

$\alpha_1$ AT:  $\alpha_1$  antitripsina; EPO: eritropoyetina; FIX: factor IX de coagulación; IL-2: interleukina 2; LF: lactoferrina; tPA: activador tisular plasminógeno

## 5. PERSPECTIVAS FUTURAS

Las técnicas para la obtención de animales transgénicos en especies de interés productivo son todavía ineficientes. Algunas aproximaciones que podrían incrementar esta eficiencia son la selección de embriones transgénicos antes de su implantación en madres receptoras, el desarrollo de células embrionarias totipotentes y el trasplante de núcleos de células embrionarias a óvulos.

Para tener mayores garantías de éxito, es importante probar la eficiencia y especificidad de expresión de una construcción en ratones transgénicos antes de ser transferida a una especie doméstica. Aunque no siempre los resultados obtenidos en ratones son extrapolables a otras especies. Una alternativa reciente consiste en la transformación de tejidos somáticos de animales desarrollados, mediante técnicas similares a las utilizadas en terapia génica.

La utilización, en el futuro, de la transgénesis en la mejora de caracteres productivos se encuentra limitada por nuestro desconocimiento sobre la identidad y regulación de los genes que determinan estos caracteres. El avance en la elaboración de mapas genéticos permitirá disponer de un número mayor de genes candidatos susceptibles de ser manipulados.

Una de las aplicaciones más prometedoras a corto plazo es la síntesis de productos biomédicos o de elevado interés comercial en animales transgénicos. La primera generación de productos terapéuticos sintetizados en la glándula mamaria está siendo evaluada en pruebas clínicas para su pronta comercialización. Un mayor conocimiento sobre los mecanismos que determinan la integración de los transgenes y sobre la regulación génica permitirá un control más preciso de la expresión de los transgenes.

## 6. BIBLIOGRAFÍA

- Bawden W.S., Passey R.J. y Mackinlay A.G. (1994) *Biotech. Genet. Eng. Rev.*, 12:89-137.
- Bühler Th. A., Bruyère Th., Went D.F., Stranzinger G. y Bürki K. (1990) *Bio/Technology*, 8:140-143.
- Cameron E.R., Harvey M.J.A. y Onions D.E. (1994) *Br. Vet. J.*, 150:9-24.
- Clark A.J., Bessos H., Bishop J.O., Brown P., Harris S., Lathe R., McClenaghan M., Prowse C., Simons J.P., Whitelaw C.B.A. y Wilmut I. (1989) *Bio/Technology*, 7:487-492.
- Damak S., Su H., Jay N. P. y Bullock D. W. (1996) *Bio/Technology*, 14:185-188.
- Ebert K.M., Selgrath J.P., DiTullio P., Denman J., Smith T.E., Memon M.A., Schindler J.E., Monastersky G.M., Vitale J.A. y Gordon K. (1991) *Bio/Technology*, 9:835-838.
- Ebert K.M., DiTullio P., Barry C.A., Schindler J.E., Ayres S.L., Smith T.E., Pellerin L.J., Meade H.M., Denman J. y Roberts B. (1994) *Bio/Technology*, 12:699-702.
- Gordon J.W., Scangos G.A., Plotkin D.J., Barbosa J.A. y Ruddle F.H. (1980) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 77:7380-7384.
- Hyttinen J.M., Peura T., Tolvanen M., Aalto J., Alhonen L., Sinervirta R., Halmeekytö M., Myöhänen S. y Jänne J. (1994) *Bio/Technology*, 12:606-608.
- Krimperfort P., Rademakers A., Eyestone W., Van Der Schans A., Vand Der Boek S., Kooiman P., Kootwijk E., Platenburg G., Pieper F., Strijker R. y De Boer H. (1991) *Bio/Technology*, 9:844-847.
- Lavitrano M., Camoioni A., Fazio V.M., Dolci S., Farace M.G. y Spadafora C. (1989) *Cell*, 57:717-723.
- Palmiter R.D., Brinster R.L., Hammer R.E., Trumbauer M.E., Rosendfeld M.G., Birnberg N.C. y Evans R.M. (1982) *Nature*, 300:611-615.
- Pursel V.G. (1995) K.H. Engel, G.R. Takeoka y R. Teranishi (eds). *Genetically modified foods: safety issues*. ACS Symposium series, 605. American Chemical Society, pag. 211-229.
- Simons J.P., Wilmut I., Clark A.J., Archibald A.L., Bishop J.O. y Lathe R. (1988) *Bio/Technology*, 6:179-183.
- Sperandio S., Lulli V., Bacci M.L., Forni M., Maione B., Spadafora C. y Lavitrano M. (1996) *Anim. Biotechnol.*, 7:59-77.
- Stinnakre M.G., Vilotte J.L., Soulier S. y Mercier J.C. (1994) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 91:6544-6548.
- Tsukui T., Kanegae Y., Saito I. y Toyoda Y. (1996) *Nature BioTechnol.*, 14:982-985.
- Velander W.H., Johnson J.L., Page R.L., Russell C.G., Subramanian A., Wilkins T.D., Gwazdauskas F.C., Pittius C. y Drohan W. (1992) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 89:12003-12007.
- Wall, R.J. (1996) *Theriogenology*, 45:57-68.
- Whitelaw C.B.A., Springbett A.J., Webster J. y Clark J. (1993) *Transgenic Res.*, 2:29-32.
- Wright G., Carver A., Cottom D., Reeves D., Scott A., Simons P., Wilmut I., Garner I. y Colman A. (1991) *Bio/Technology*, 9:830-834.