Interferón y Biotecnología, Vol. 5, No. 3, 210-222 (1988)

Animales transgénicos. Posibilidades biotecnológicas

F. O. CASTRO y J. DE LA FUENTE

Centro de Ingeniería Genética y Biotecnología, Apartado 6162, La Habana, Cuba

Recibido en enero de 1988

INTRODUCCION

La introducción experimental de material genético en animales, su expresión en tejidos y momentos específicos, así como su transmisión estable a las próximas generaciones constituye, sin lugar a dudas, uno de los mayores retos que la biología moderna ha impuesto al hombre.

La transferencia de genes, o transgénesis, en animales es una novedosa técnica de la ingeniería genética, mediante la cual genes clonados "ajenos" pueden ser introducidos en el genoma de un animal, ser expresados correctamente, y en la mayoría de los casos, transmitidos por la vía germinal como un gen propio más.

Indiscutiblemente, la transgénesis constituye una poderosa "herramienta" para el estudio de importantes problemas de la biología molecular como son la regulación de la expresión genética en eucariotes y la transferencia interespecífica de información genética.

La transgénesis en animales puede ser llevada a cabo mediante diferentes métodos para la introducción de la información genética de interés: transfección de embriones preimplantatorios mediante cocultivo con retrovirus, microinyección de embriones unicelulares, células progenitoras embrionales, y otras.

En virtud de que los objetivos fundamentales al introducir ADN foráneo en un animal son que este se integre, se exprese y se transmita a las nuevas generaciones, resulta necesario buscar un sistema donde aún no se haya producido la fusión de información genética entre los parentales de una especie determinada, pues de esta manera se logran mejores resultados de integración-transmisión del gen introducido.

Se han empleado diferentes modelos animales para las investigaciones de transgénesis; así por ejemplo, se ha trabajado con el ovocito no fecundado del erizo de mar (McMahon *et al.*, 1985), huevos de *Drosophila melanogaster* (Sprading y Rubin, 1985) y de *Xenopus laevi* (Rusconi y Schaffner, 1981).

En mamíferos, los mayores esfuerzos se han concentrado en el ovocito recién fecundado de ratones (Gordon *et al.*, 1980; Constantini y Laci, 1981; Gordon *et al.*, 1981; Burki y Ulrrich, 1982; Brinster *et al.*, 1981) y otros.

La técnica más empleada para los trabajos de transgénesis es la de microinyección de embriones de las especies antes mencionadas, pues la misma ha demostrado ser más eficiente que las enumeradas con anterioridad (Brinster *et al.*, 1985).

Copyright © 1988, Sociedad Iberolatinoamericana para Investigaciones sobre Interferón
Publicado por el Palacio de las Convenciones, La Habana, Cuba

MICROINYECCION DE EMBRIONES. ASPECTOS METODOLOGICOS

La técnica de microinyección de embriones consta de un conjunto de pasos y requisitos, los cuales describiremos muy someramente en esta sección.

Para comenzar, es necesario tener hembras donantes y receptoras de embriones, medios de cultivo correctamente definidos, microinstrumentos especialmente confeccionados, microscopio y micromanipuladores.

Las hembras son inducidas a superovular sincronizadamente, mediante el uso de hormonas gonadotróficas, en dosis y esquemas que varían según la especie que se utilice. Posteriormente son apareadas las hembras donantes de embriones con machos fértiles, mientras que las hembras destinadas a recibir los embriones después de microinyectados son apareadas con machos estériles, preparados al efecto mediante vasectomía de los canales eferentes.

El chequeo de la fertilización es diferente según la especie que se utiliza; por ejemplo, en ratones, las hembras que han sido montadas, se detectan por la aparición de un tapón de fluido seminal coagulado en la vagina, unas horas después del coito. En las especies mayores o de importancia agrícola, la monta natural repetida o la inseminación artificial son tomados como criterios de fecundación.

Los óvulos recién fecundados son extraídos del tracto reproductivo por lavado de los oviductos, con medio de cultivo, ya sea por sacrificio del animal (ratones) o quirúrgicamente en las especies de importancia económica, y microinyectados los pronúcleos con finísimas agujas de cristal de diámetro inferior a la micra, a la vez que son sostenidos en fijación por una micropipeta especialmente construida (figuras 1 y 2).

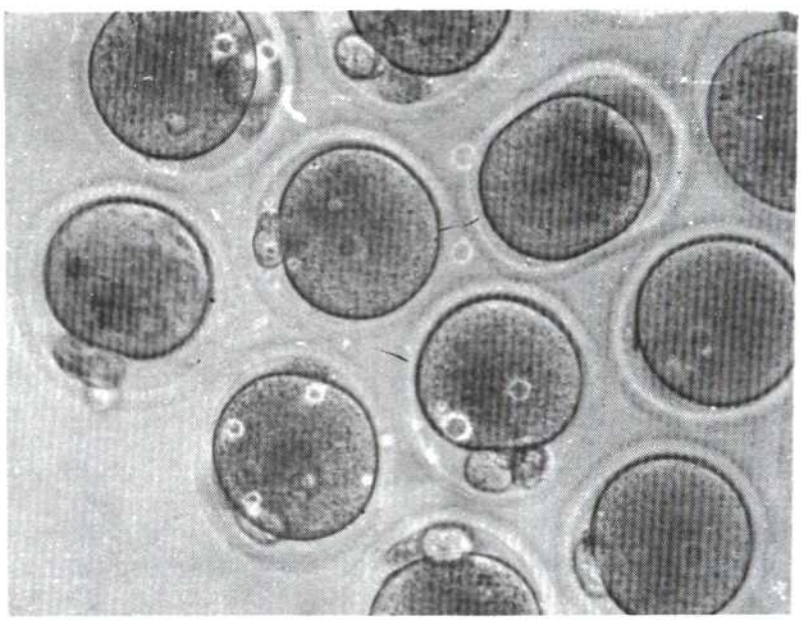

FIG. 1. Embriones unicelulares murinos en fase pronuclear. Visualización mediante contraste interferencial de Nomarski.

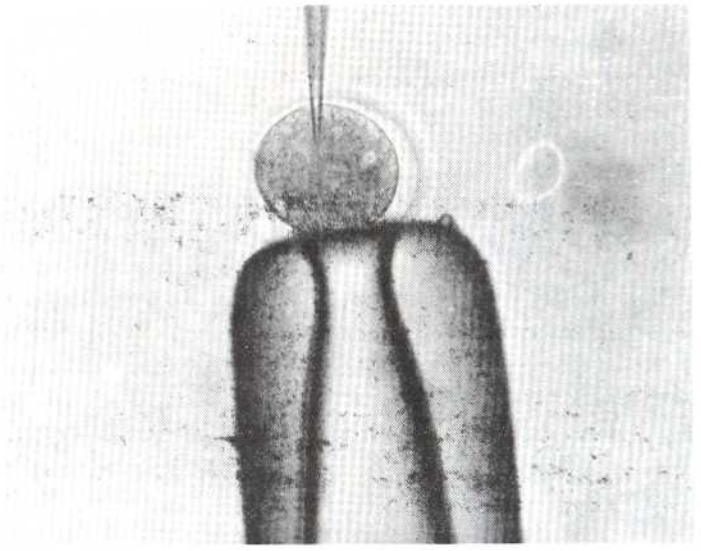

FIG. 2. Microinyección de embriones pronucleares de ratón. El embrión es sostenido por una micropipeta de cristal (diámetro externo, 100 micras); mientras se le introduce una microaguja, el diámetro interno de la microaguja es de aproximadamente una micra.

Los embriones que sobreviven estos pasos son incubados por espacio de 1-2 horas, con el fin de comprobar su viabilidad, y transferidos a las hembras receptoras que se habían preparado según lo descrito.

El próximo paso lo constituye esperar el nacimiento de crías a partir de estos embriones transferidos y chequear si se produjo integración del ADN que se inyectó según la técnica de Southern (Southern, 1975), así como los ensayos necesarios de expresión en diferentes órganos y tejidos de interés, y el cruce de los animales identificados como transgénicos, con el próposito de crear líneas portadoras del gen en estudio, para los objetivos propuestos.

Este trabajo pretende resumir los principales avances de la transgénesis en mamíferos de importancia económica y en peces que constituyen, sin duda, los objetivos más importantes a mediano y a largo plazos para la aplicación de esta novedosa posibilidad de la ingeniería genética y la biotecnología.

Se dedica un capítulo especial al "estado del arte" y a los principales trabajos realizados en ratones, como base fundamental para todos los demás experimentos llevados a cabo hasta el presente y como modelo básico de la transferencia de genes en animales.

TRANSGENESIS EN RATONES

El uso de ratón en el desarrollo de técnicas de transferencia de genes en organismos superiores está determinado por los mayores conocimientos que se tienen sobre esta especie en materia de biología y genética moleculares, además de ser un modelo muy útil por sus características reproductivas, bajo costo y fácil manejo. Gordon y colaboradores, demostraron por vez primera que un plasmidio recombinante podía ser introducido en embriones murinos

mediante microinyección de los pronúcleos, y ser posteriormente localizado en el ADN de los ratones nacidos, por *Southern blot* (Gordon *et al.*, 1980).

Posteriormente, Gordon y Ruddle (1981); E. Wagner *et al.* (1981); T. Wagner (1981); Brinster *et al.* (1985); Constantini y Lacy (1981); Burki y Ulrich (1982), entre otros, lograron repetir los resultados de Gordon con diferentes construcciones genéticas, evidenciando a su vez la expresión del material genético en tejidos específicos de las progenies.

En 1982, Palmiter y su grupo realizaron un experimento de importantísima connotación: la obtención de ratones transgénicos que expresaban funcionalmente el gen de la hormona de crecimiento de la rata (rGH), y otro grupo que expresaba la hormona de crecimiento humana (hGH), ambas situadas bajo el control del promotor inducible de la metalotioneína-I de ratón (MT-I), en dos construcciones genéticas diferentes. Los ratones portadores de semejantes construcciones (transgénicos), crecieron el doble de rápido con respecto a los grupos controles al recibir en su dieta suplementos de iones de metales pesados, capaces de inducir al promotor MT-I, llegando a alcanzar una talla dos veces superior; estos ratones fueron denominados *ratones gigantes* y constituyeron una demostración feaciente de las grandes posibilidades implícitas en la manipulación genética de los animales.

Sin embargo, los ratones de Palmiter no podían transmitir este nuevo carácter por la vía materna, ya que las hembras gigantes eran estériles (Palmiter *et al.*, 1982).

Los experimentos de este grupo demostraron, concluyentemente, tres cosas:

1) Es posible expresar de forma biológicamente activa una hormona de crecimiento "ajena", en un animal bajo el control de un gen obtenido por recombinación genética.

2) La expresión de ciertos genes de baja tejido-especificidad es posible inducirla en ratones transgénicos mediante el uso de un promotor de la transcripción adecuado.

3) La expresión en forma activa, del gen de la hGH y la rGH conduce a detrimentos colaterales sobre la fisiología de la reproducción de las hembras.

En 1985, Hammer demostró que era posible resolver este problema si se estimulaba la expresión de la hormona de crecimiento propia del animal, con copias extra del gen codificante para el factor liberador de la hormona de crecimiento (GHFR, siglas en idioma inglés) inyectado a embriones unicelulares de ratón. La producción de niveles suprafisiológicos de GHFR, condujo a niveles más altos de la hormona de crecimiento endógena y finalmente al aumento de la talla de los ratones. Esta característica era heredada por las generaciones subsiguientes al estilo mendeliano (Hammer *et al.*, 1985b).

En 1987 resaltan por su singular importancia dos trabajos relacionados con la obtención de ratones transgénicos:

1) Expresión del gen de la betalactoglobulina ovina en la leche de ratonas transgénicas (Simons *et al.*, 1987). La betalactoglobulina es una proteína del cuajo de la leche, inespecífica para los múridos, por tanto, su localización en la leche de ratonas demuestra que es posible la expresión de proteínas exógenas en la leche de ratonas a partir de donde pueden ser purificadas; además deja abierta la invitación para trabajar con vistas a obtener semejantes logros en la ganadería, utilizando los promotores de las proteínas estructurales de la leche como vectores para expresar productos de gran interés económico o terapéutico.

2) Expresión del activador tisular del plasminógeno humano recombinante (rhTPA) en las glándulas mamarias y en la leche de ratonas transgénicas (Gordon *et al.*, 1987).

Existe una considerable cantidad de trabajos relacionados con la transgénesis en ratones, que por su alta especificidad y su gran número resulta imposible resumir en este trabajo; algunos de dichos artículos se mencionan en las referencias.

TRANSGENESIS EN MAMIFEROS DE IMPORTANCIA AGRICOLA. REALIDADES Y DIFICULTADES

La transgénesis en animales de importancia agrícola es más reciente aun que esa técnica de trabajo en ratones. En este epígrafe versaremos solamente sobre mamíferos, excluyendo, con toda intención, a las aves, pues en la actualidad no existen aún sistemas definidos para la microinyección en embriones unicelulares de aves por lo difícil que resulta disponer de tales embriones, habiéndose logrado relativos avances en el uso de vectores retrovirales, como medio de transgénesis (Salter, 1986; 1987).

La posibilidad de llevar los logros de la transgénesis en ratones a la ganadería fue demostrada por Hammer y colaboradores en 1985 (Hammer *et al.*, 1985a; 1985b; 1986) y corroborada por G. Brem y su grupo de la Universidad Ludwig Maximilians, en Munich, RFA (Brem *et al.*, 1985).

Hammer obtuvo conejos, cerdos y ovejas con sus genomas modificados mediante microinyección de ADN en los pronúcleos de embriones unicelulares de las especies antes mencionadas.

En 1986, Kraemer y Church (Kraemer *et al.*, 1986; Church, 1986 y Pursell *et al.*, 1987), así como un grupo de investigadores de Edimburgo, Escocia, bajo la dirección de A. J. Clark (Simons *et al.*, 1987), han informado acerca de la obtención de animales transgénicos en las especies ovina, porcina, cunícula y bovina indistintamente.

Armstrong y Fabricant, de forma independiente, han llevado a cabo los primeros intentos de transgénesis en ganado caprino, llegando hasta el momento solamente a demostrar la factibilidad de microinyectar embriones caprinos unicelulares y al nacimiento de chivatos* a partir de esos embriones (Armstrong *et al.*, 1987; Fabricant *et al.*, 1987).

En la tabla 1 aparecen resumidos algunos de los principales trabajos realizados hasta el momento, relacionados con la transgénesis en animales de importancia agrícolaa.

De acuerdo con lo expuesto hasta aquí, podemos concluir que la mayoría de los trabajos en mamíferos de importancia agrícola han estado relacionados con la introducción de hormonas de crecimiento exógenas al genoma animal; los porcentajes de integración por especies son: 12,8% en conejo; 10% en cerdos y 1,3% en ovejas (Hammer *et al.*, 1986).

En trabajos anteriores algunos autores reportan el efecto de la administración parenteral de hormonas de crecimiento en forma de tratamientos sistemáticos, sobre algunos indicadores productivos como: aumento de la producción de leche en vacas Holstein (Peel *et al.*, 1981a,b; Peel *et al.*, 1982), ganancia de peso y eficiencia de conversión alimenticia en cerdos (Machin, 1972) y aumento de la producción lanar de ovejas en desarrollo (Johnson *et al.*, 1985).

Estas demostraciones, unidas a los trabajos de Palmiter y Hammer sobre el crecimiento desmesurado de ratones que expresaban hormonas de crecimiento exógenas, constituyeron la base de una gran ofensiva destinada a obtener animales transgénicos de importancia agrícola portadores de los genes para dichas hormonas.

Algunos autores desarrollan sus trabajos acerca de los eslabones intermediarios de la cascada de la hormona de crecimiento, como lo es el factor tipo insulina del crecimiento (Bren, comunicación personal, 1987).

---

* Chivo que pasa de seis meses y no llega al año.

Tabla 1

TRANSFERENCIA DE GENES EN ANIMALES DE IMPORTANCIA AGRICOLA

Construcción genética	*Resultados*		*Referencia*
hMT-IIA + hGH	8\127 2\8	conejos transgénicos, conejos transgénicos, expresaban la hGH.	Hammer *et al.*, 1985b
mMT-I-hGH	20\142 11\20 28\218 173 0\1	cerdos transgénicos expresaban la hGH conejos transgénicos ovejas transgénicas ovejas expresaban la hGH	Hammer *et al.*, 1985a; 1986
mMT-I-hGH	5\27 115	conejos transgénicos cerdos transgénicos	Brem, 1985; 1986
NR	7\126 1\7	terneros transgénicos terneros transgénicos expresaban la construcción	Church, 1986
HSV-TK (tinción de pronúcleos con DAPI	3	terneros nacidos; se demostró la factibilida de teñir los pronúcleos para facilitar su visualización-sin daño para el embrión.	Kraemer, 1986
pGH-pMT		demostración de factibilidad de microinyección de embriones caprinos	Anmstron, 1987
mMT-I-rGH	0\9	chivos transgénicos nacimiento de chivos a partir de embriones microinyectados	Fabricant, 1987
mMT/I/hGH mMT-I-bGH	3\11 2\3 31\341 19\31	ovejas transgénicas ovejas expresaban la bGH cerdos transgénicos cerdos transgénicos expresaban ya la hGH o la bGH.	Pursell, 1987
mMT/I/rGH		gestación determinada, no terneros nacidos aún	McEvoy, 1987
Beta-LG ovina-F/IX + 1-antitripsina humanos		ovejas transgénicas, no existen otros datos	Simons, 1987

Leyenda:

hMT-II A	Promotor de la metalotioneína II-A humana
mMT-I	Promotor de la metalotioneína I de ratón
pMT	Promotor de la metalotioneína porcina
TK	Promotor de la timidinoquinasa
hGH	Hormona de crecimiento humana
bGH	Hormona de crecimiento bovina
rGH	Hormona de crecimiento de la rata
beta-LG	Promotor de la β-lactoglobulina ovina
F-IX	Factor de coagulación IX humano

Hasta el momento, ninguno de los experimentos aquí descritos para animales agrícolas han podido culminar con la expresión biológica y fisiológicamente activa de las hormonas de crecimiento, ya que aunque en la mayoría de los casos se integra el gen, el producto, o sea, la hormona, no solo no es funcional, sino que en ocasiones produce detrimento a la salud y a la fisiología normales del animal (Pursell *et al.*, 1987). Probablemente el aumento de la talla

de los animales sea poco importante en la ganadería comparado con el impacto económico que puede traer consigo la mejora de la eficiencia productiva de los animales.

TRANSGENESIS EN PECES

En la piscicultura también se han realizado trabajos relacionados fundamentalmente con el incremento de la talla de los peces mediante la introducción de hormona de crecimiento exógeno.

Los peces han brindado un modelo barato y factible de investigación, en virtud de sus características reproductivas, tales como fecundación externa en la mayoría de las especies, gran cantidad de óvulos por hembra y alta velocidad de desarrollo de los alevines.

La pesca en reservorios naturales, a nivel mundial, ha alcanzado recientemente los setenta millones de toneladas métricas (ver reporte ICLARM 1987).

El cultivo comercial de peces exige diferentes requerimientos de importancia:

a) posibilidad de mantener un banco de reproducción,
b) lograr un balance dietético que permita al pez alcanzar la talla comercial,
c) mantener la salud del animal durante el ciclo de vida.

Conjuntamente con estos requerimientos, existen otros factores que influyen en la eficiencia del sistema de cultivo comercial de peces. Uno de estos factores es la duración del ciclo de producción, o sea, el tiempo requerido para alcanzar la talla comercial. Resulta de gran importancia reducir al mínimo posible este período para aumentar consiguientemente la velocidad de crecimiento de los peces.

Con el fin de alcanzar este objetivo, se han utilizado diferentes procedimientos: cruzamientos selectivos, elevación de la temperatura de los embalses, y otros. Sin embargo, todos estos métodos consumen grandes volúmenes de trabajo y de recursos, lo cual ha limitado grandemente su aplicación.

En 1985, Gill y colaboradores publicaron la posibilidad de utilizar la hormona de crecimiento recombinante bovina, así como la de pollo, para acelerar el crecimiento en salmones del Pacífico, *Oncorhynchus kisutch*. El aumento de peso de los peces que recibieron 5 μg/g de peso/semana, de la hormona recombinante, por vía intraperitoneal durante 42 días, fue aproximadamente el doble de los controles. La velocidad de crecimiento fue de 1,48% diario en el grupo experimental.

Esta vía de aceleración del crecimiento ofrece una nueva posibilidad biotecnológica de abordar un importante problema económico.

La transgénesis en peces ha sido dirigida fundamentalmente a la introducción, expresión y transmisión de hormonas de crecimiento exógenas y se ha logrado con relativo éxito (Maclean *et al.*, 1987).

En 1985, diferentes grupos publicaron la transferencia exitosa de ADN en huevos fertilizados de peces. Zhu y colaboradores, lograron transferir el gen de la hormona de crecimiento humana bajo el control del promotor de la MT-I de ratón a embriones de Gold Fish *Carassius auratus* L. 1758, con una eficiencia de integración del 50% aproximadamente (Zhu *et al.*, 1985).

El grupo de Houdebine tuvo éxito en la introducción de similar construcción en huevos fertilizados de trucha arcoiris *Salmo gairdneri* con una frecuencia de transformación de más del 5%.

En 1986, un grupo de investigadores chinos reportó, por primera vez, los efectos biológicos de la hormona de crecimiento humana en loach *Misgurnus anguillicaudatus* (Cantor). Los huevos fertilizados fueron inyectados con el gen de la hGH bajo el control del promotor

de la MT-I de ratón y estudiada la descendencia. Los peces transgénicos crecieron 3-4,6 veces más rápido que los controles (Zhu *et al.*, 1986).

Otros grupos han logrado también peces transgénicos en medaka (*Oryzias latipes*), (Ozato *et al.*, 1986), tilapia (*Oreochromis niloticus*) (Brem *et al.*, 1987) y otros (Moffat, 1987).

La transgénesis en peces permitirá el desarrollo de estudios sobre la regulación de la expresión en eucariotes, el aumento de la velocidad de crecimiento de las especies acuáticas de importancia económica y la posibilidad de utilizar los peces como factorías de producción de proteínas de alto valor farmacéutico.

¿CUALES SON LOS PRINCIPALES FACTORES QUE INCIDEN SOBRE LA BAJA EFICIENCIA DE LA TRANSGENESIS?

Existen impedimentos de tipo técnico y de índole fundamental que inciden sobre una inmediata mejora de la eficiencia de la transgénesis, no sólo en la ganadería, sino en el sistema de transgénesis en general.

Entre las limitantes se encuentran las técnicas de introducción de ADN. Uno de los principales escollos lo constituye la baja eficiencia de la microinyección de embriones en los animales agrícolas.

Entre los aspectos conflictivos se destaca la visualización de los pronúcleos dentro de los embriones; este problema se ha abordado por diferentes grupos y una de las soluciones ha sido la centrifugación de los embriones, lo que permite la estratificación del citoplasma, habitualmente muy saturado de lípidos que obscurecen y enmascaran a los pronúcleos; con esta técnica pueden observarse la mayoría de los pronúcleos, facilitándose, por tanto, la microinyección del material genético (Wall *et al.*, 1985; Loskutoff, 1987).

Sin embargo, la microinyección *per se* causa daños físicos a un gran número de embriones, lo que provoca que se necesiten elevadas cantidades de estos.

Otro de los factores que influyen sobre la eficiencia de la transferencia de genes es la dificultad y el alto costo de obtención de embriones unicelulares. Resulta imposible realizar el lavado de los oviductos en las especies agrícolas por el método de sacrificio del animal (al menos en la especie bovina): por lo general, el lavado se lleva a cabo de forma quirúrgica, al igual que la reimplantación de los embriones microinyectados. Esto, unido a los bajos niveles de ovulación de la mayoría de las especies que nos ocupan, encarece y frena notablemente la transgénesis en la ganadería.

En el futuro, los embriones bovinos han de obtenerse necesariamente a partir de folículos de Graaf madurados y fertilizados *in vitro* y cultivados hasta estadios preimplantatorios que no requieran de intervención quirúrgica para su transplante (mórula o blástula).

IMPEDIMENTOS DE CARACTER FUNDAMENTAL

Entre los impedimentos de carácter fundamental están:

1) Gran desconocimiento de la genética molecular de los animales de importancia agrícola. La confección de mapas genéticos adecuados de los animales domésticos es una de las premisas fundamentales para el avance en la comprensión de la genética de estas especies.

Soller y Beckmann (1986), han propuesto una nueva técnica para la confección de mapas genéticos: polimorfismo de longitud de los fragmentos de restricción.

Esta técnica es aplicada a los *loci* de caracteres cuantitativos con el objetivo de confeccionar el mapa de los segmentos cromosomales portadores del ADN que codifica para dichos genes,

y está basada en la segregación mendeliana y la identificación de longitudes específicas de ADN mediante marcadores genéticos.

2) Un factor de gran peso lo constituye la búsqueda de mecanismos eficientes de la integración del ADN. Esto no se logra con las técnicas actuales, ya que no se puede garantizar la integración del material genético en un sitio cromosómico preseleccionado, sino que esta se produce, por lo general, al azar en forma de varias copias ordenadas de "cabeza a cola" en un mismo sitio. Por demás, la inserción al azar puede producirse en una zona inerte del genoma, sin que el gen llegue a expresarse, o bien puede tener efecto negativo sobre la expresión de otros genes.

Algunos autores sugieren el uso de retrovirus como vectores portadores del gen de interés (Jaenish, 1976; Salter, 1986; 1987), otros se inclinan por teratocarcinomas derivados de células progenitoras (Robertson *et al.*, 1987). Estos métodos no están exceptos de desventajas, lo que limita su aplicación.

El desarrollo de técnicas para el reemplazamiento selectivo de porciones genómicas puede conducir al aumento de la eficiencia de integración. El uso de ARN antisentido puede ser una opción para elevar los porcentajes de integración (Hodge, 1985). Un plasmidio antisentido se elabora *in vitro* invirtiendo la secuencia que codifica para una proteína con respecto al promotor. Semejante plasmidio produciría no el ARN mensajero usual, sino uno complementario, que hibridizaría con el ARN mensajero normal e inhibiría la producción de la proteína correspondiente.

Son necesarios también vectores más eficaces para la introducción de la información a la célula; Ward (1986) y Clark (1987), plantean el uso de elementos transponibles tipo transposones en la *Drosophila melanogaster*, los cuales son capaces de movilizarse dentro del genoma.

El uso de plasmidios autorreplicativos a partir de papovavirus de mamíferos podría constituir otra opción para la propagación de ADN dentro del genoma animal (Rassovizadegan, 1986).

3) Son necesarios promotores de la transcripción de mayor grado de tejido-especificidad que los existentes en la actualidad, los cuales ayudarían a dirigir la expresión del gen de interés en el tejido de interés.

4) Ausencia de mecanismos externos de control de la expresión. Hammer en 1985 demostró la posibilidad de controlar la expresión del GHRF en ratones transgénicos adrenalectomizados, mediante el empleo de glucocorticoides. Por otra parte, el sistema de inducción del promotor de la metalotioneína con iones de metales pesados en la dieta de ratones funciona bien (Palmiter 1982; Hammer 1985a). Sin embargo estos trabajos fueron realizados utilizando promotores de la transcripción de baja tejido -especificidad, por tanto, no se puede afirmar la existencia de un mecanismo externo de control de la expresión.

A estos elementos obstaculizantes de tipo técnico y fundamental, es necesario añadir otro factor de no menos peso: el económico.

La transferencia de genes en organismos superiores es una técnica compleja y costosa, que requiere equipos altamente sofisticados, de un nivel teórico-práctico alto y de una base material grande. La creación de una masa ganadera transgénica no es asequible en la actualidad a todos los países; así, el costo de producción de un pequeño núcleo de ovejas transgénicas es de aproximadamente tres millones de dólares (Clark, 1987).

De lo expuesto en el párrafo anterior surge una interrogante lógica, ¿cuán rentable y necesaria es la transferencia de genes en animales? La respuesta a esta pregunta es necesario abordarla a través de las aplicaciones y de las perspectivas que esta novedosa técnica ofrece.

APLICACIONES DE LA TRANSFERENCIA DE GENES EN ANIMALES

La obtención, a gran escala, de proteínas de alto valor terapéutico o diagnóstico a bajos costos, la mejora genética acelerada de la masa ganadera y la elevación sustancial de su eficiencia productiva, así como la posibilidad de obtener animales resistentes a determinadas enfermedades, la manipulación genética de la leche u otros productos animales, son algunas de las principales aplicaciones de la transgénesis en animales domésticos y peces, además del indiscutible papel que ya está desempeñando esta técnica en el desarrollo de modelos animales de un altísimo nivel de especialización para la investigación.

¿QUE GENES O GRUPOS DE ELLOS PUEDEN SER TRANSFERIDOS MEDIANTE LAS TECNICAS ACTUALES?

Existen cuatro grupos de genes con las mayores posibilidades de aplicación a mediano plazo:

Genes codificantes para las hormonas peptídicas circulantes y factores de crecimiento

Sobre los trabajos relacionados con este grupo de genes, se ha venido discutiendo durante todo el trabajo, ya que han sido los genes de las hormonas de crecimiento u otros eslabones de la cascada de esta hormona los más utilizados en los estudios de transgénesis en animales.

Un ejemplo de la aplicación del grupo de genes codificantes para las hormonas peptídicas puede ser la introducción del gen de la Booroola en ovejas, ya que se estima que el producto de este gen sea responsable de un incremento de la susceptibilidad de las células granulosas del ovario a la acción de la hormona estimulante del folículo, lo que conduciría a la maduración más temprana de los folículos y a mejoras reproductivas en general (Mc Naty, 1985).

Indiscutiblemente, este grupo de genes tendrá prioridad durante algún tiempo en la aplicación de la transgénesis en animales.

Genes codificantes para proteínas estructurales

La alteración de la regulación de los genes de la queratina, puede implicar un aumento de la producción de lana (Lovel-Badge, 1985). Modificando los genes de la familia de las caseínas, o lactoglobulinas, es posible influir sobre la calidad de la leche (Simons *et al.*, 1987). Esto puede ser de gran utilidad para la industria farmacéutica y para la producción de proteínas de interés bajo el control de promotores de proteínas estructurales de la leche, lo que permitiría la expresión de estas en las glándulas mamarias, y por tanto, en la leche de donde serían purificadas.

Genes de tolerancia o resistencia a enfermedades

Las mayores posibilidades en esta área son:

- Obtener animales con resistencia innata a una enfermedad mediante la transferencia de genes funcionales de inmunoglobulinas específicas.
- Los alelos del locus de la histocompatibilidad están asociados a la resistencia a algunas enfermedades y a la susceptibilidad a otras, es por ello que constituyen un objetivo importante para la transgénesis. La exclusión alélica en mamíferos puede ser una realidad no tan lejana y hallaría su aplicación inmediata mediante la transgénesis.

Genes responsables de rutas metabólicas

La introducción de nuevas rutas metabólicas a un animal o la restauración de otras suprimidas es, sin dudas, interesante. Ward y su grupo, en Australia, laboran en la introducción de una nueva ruta enzimática a las ovejas: la síntesis de cisteína a partir de la serina, con vistas a incrementar la producción lanar (Ward *et al.*, 1986; Ward, comunicación personal, 1987).

Estas son algunas de las perspectivas más inmediatas de la aplicación de la transgénesis a la ganadería y a los animales de importancia económica. Realmente, el límite de aplicación de esta técnica lo constituye la imaginación humana; los horizontes que ofrece la transgénesis en animales, la convierten en una de las principales metas de la biotecnología para los años venideros.

REFERENCIAS

ARMSTRONG, D. T. y A. MICHALSKA (1987). *Gene Transfer in Goats: Methodologies and Potential Applications.* International Conference on Goats, Brasilia.

BREM, G.; B. BRENIG; H. M. GOODMAN; R. C. SELDEN y B. KRUFF (1985). *Production of transgenic Mice, Rabbits and Pigs by Microinjection into Pronuclei.* Zuchthygiene **20:** 251-252.

BREM, G.; B. BRENIG; H. M. GOODMAN; R. C. SELDEN y B. KRUFF (1986). *Gene Transfer in Rabbits and Pigs.* Third World Congress on Genetics Applied to Livestock Production, Lincoln, Nebraska, USA.

BREM, G. (1987). Comunicaciónes personales.

BRINSTER, R. L.; H. Y. CHEN; M. E. TRUMBAUER; A. W. SENEAR; R. WARREN y R. D. PALMITER (1981). *Somatic Expression of Herpes Thymidine Kinase in Mice Following Injection of a Fusion Gene into Eggs.* Cell **27:** 223-231.

BRINSTER, R. L.; H. Y. CHUEN; M. E. TRUMBAUER; M. K. YAGLE y R. D. PALMITER (1985). *Factors Affecting the Efficiency of Introducing Foreign DNA into Mice by Microinjecting Eggs.* Proc. Nat. Acad. Sci. USA **82:** 4438-4442.

BURKI, K. y A. ULRICH (1982). *Transplantation of the Human Insulin Gene into Fertilized Mouse Eggs.* EMBO. Journal **1,** N 1: 127-131.

CLARK, A. J.; P. SIMONS; I. WILMUT y R. LATHE (1987). *Pharmaceuticals from Transgenic Livestock.* Trends in Biotechnology. **5:** 20-24.

CONSTANTINI, F. y E. LACY (1981). *Genetic Engineering and Animal Improvement.* Proceedings of the Second World Congress on Sheep and Beef Cattle Breeding, Pretoria, South Africa.

CHOURROUT, D.; R. GUYOMARD y L. M. HOUDEBAINE (1986). *High Efficiency Gene Transfer in Rainbow Trout (Salmo gardnieri) by Microinjection into Egg Cytoplasm.* Aquaculture, **51:** 143-150.

DIACUMAKOS, E. G. (1973). *Methods in Cell Biology.* Vol 7. D. M. Prescott (Edit). New York, Academic Press, pp. 287-311.

FABRICANT, J. D.; L. C. NUTI; B. S. MINHAS; W. C. BAKER y J. S. CAPEHART (1987). *Gene Transfer into Goats.* Theriogenology, **27,** N 1: 229.

GILL, J. A.; J. P. SUMPTER; E. M. DONALDSON; M. M. DYF; L. SOUZA; I. BERG; I. WYBYCH y K. LANGLEY (1985). *Recombinant Chicken and Bovine Growth Hormones Accelerated Growth in Aquacultured Juvenile Pacific Salmon (Oncorhynchus kisutch).* Biotechnology, **3:** 643-646.

GODDARD, M. J. y H. P. PRATT (1983). *Control of Events During Early Cleavage of the Mouse Embryo: An Analysis of the 2-cell Block.* J. Embryol. Exp. Morph. **73:** 111-113.

GORDON, J. W.; G. A. SCANGOS; D. J. PLOTKIN; A. BARBOSA y F. H. RUDDLE (1980). *Genetic Transformation of Mouse Embryos by Microinjection of Purified DNA.* Proc. Nat. Acad. Sci. USA **77:** 73-80.

GORDON, J. W. y F. H. RUDDLE (1981). *Integration and Stable Germ Line Transmission of Genes Injected into Mouse Pronuclei.* Science, **214:** 1244.

GORDON, K.; E. LEE; J. A. VITALE; A. E. SMITH; H. WESTPHAL y L. HEMMINGHAUSEN (1987). *Production of Human Tissue Plaminogen Activator in Transgenic Mouse Milk.* Biotechnology, **5:** 1183-1187.

HAMMER, R. E.; R. L. BRINSTER y R. D. PALMITER (1985b). *Symposia on Quantitative Biology.* Cold Spring Harbor, New York, pp. 379-387.

HAMMER, R. E.; V. G. PURSELL; C. E. REXRDAD Jr.; R. L. BRINSTER y R. D. PALMITER (1985c). *Expression of Human Growth Hormone Releasing Factor in Transgenic Mice Results in Increased Somatic Growth.* Nature, **315:** 403.

HAMMER, R. E.; V. G. PURSELL; C. E. REXROAD Jr. y R. D. PALMITER (1986). *Genetic Engineering of Mammalian Embryos.* J. Anim. Sci., **63:** 269-278.

HODGES, J. (1986). *Biotecnología y animales domésticos.* Revista Mundial de Zootecnia, **59:** 2-10.

HOGAN, B.; F. CONSTANTINI y E. LACY (1986). *Manipulating the Mouse Embryo.* A Laboratory Manual. Cold Spring Harbor Laboratory, New York, USA.

JAENISH, R. (1976). *Germ Line Integration and Mendelian Transmission of the Exogenous Moloney Leukemia Virus.* Proc. Nat. Acad. Sci. USA, **73:** 1260-1264.

JOHNSON, I. D.; I. C. HART; B. W. BUTTLER-HOGG (1985). *Effects of Exogenous Bovine Growth Hormone and Bromocriptine on Growth, Body Development, Fleece, Weight and Plasma Concentrations of Growth Hormone, Insulin and Prolactin in Female Lambs.* Anim. Prod. **41:** 207.

KASHI, Y.; M. SOLLER; E. HALLERMAN y J. S. BECKMAN (1984). *Restriction Fragment Length Polymorphysm in Dairy Cattle Genetic Improvement.* Third World Congress on Genetics Applied to Livestock Production, Lincoln, Nebraska, USA.

KRAEMER, D.; B. MINHAS y J. CAPEHART (1986). *Gene Transfer into Pronuclei of Cattle and Sheep Zygotes.* Banbury Report **20.** Genetic Manipulation of the Early Mammalian Embryo. Cold Spring Harbor Laboratory, New York, USA, pp. 221-227.

KRAUSSLICH, H. (1986). *Criteria for Useful Gene Transfer.* Third World Congress on Genetics Applied to Livestock Production, Lincoln, Nebraska, USA.

LOSKUTOFF, N. M.; B. R. BORON y D. R. BARRIOS (1986). *Gene Microinjection of Bovine Embryos Facilitated by Centrifugation.* Theriogenology, **25:** 168.

LOVELL-BADGE, R. H. (1985). *Transgenic Animals.* New Advances in the Field. Nature, **315:** 628.

MACHLIN, L. J. (1972). *Effect of Porcine Growth Hormone on Growth and Carcass Composition of the Pig.* J. Anim. Sci, **35:** 794.

McLEAN, N.; D. PENMAN; Z. ZHU (1987). *Introduction of Novel Genes into Fish.* Biotechnology, **27:** 257-261.

McEVOY, T. G.; M. STACK; T. BARRY (1987). *Direct Gene Transfer by Microinjection.* Therigenology, **27,** N 1: 258.

McMAHON, A. P.; C. N. FLYTZAINS; B. R. HOUGH-EVANS y S. KATULA (1985). *Introduction of Cloned DNA into Sea Urchin Egg Cytoplasm: Replication and Persistance during Embryogenesis.* Dev. Biol. **108:** 420-430.

MOFFAT, A. S. (1987). *Fish Incorporate Rat Growth Hormone Genes.* Genetic Engineering News, pp. 1 y 29.

OZATO, K.; H. KONDOH; H. INOHARA; T. IWAMATSU y T. C. OKATA (1986). *Production of Transgenic Fish: Introduction and Expression of the Chicken Crystallin Gene in Medaka Embryos.* Cell Differentation, **19:** 237-244.

PALMITER, R. D.; R. L. BRINSTER (1982). *Dramatic Growth of Mice that Develops From Eggs Microinjected with Metallothionein-Growth Hormone Fusion Genes.* Nature, **300:** 611.

PELL, C. J.; D. E. BAUMAN; R. C. GOREWITH; C. J. SNIFFIN (1981a). *Effect of Exogenous Growth Hormone on Lactational Performance in High Yielding Dairy Cows.* J. Nutr., **111:** 1662.

PEEL, C. J.; T. J. FRONK; D. E. BAUMAN y R. C. GOREWITH (1981b). *Lactational Response to Exogenous Growth Hormone and Abomasal Infusion of a Glucose -sodium Caseinate Mixture in High Yielding Dairy Cows.* J. Nutr., **112:** 1770.

PEEL, C. J.; W. STEINHOUR (1982). *Administration of Growth Hormone to High Yielding Holstein Cows.* J. Dairy. Sci., **65** (Suppl. 1): 120.

PURSELL, V. G.; C. E. REXROAD Jr.; D. J. BOLT; R. E. HAMMER; R. D. PALMITER y R. L. BRINSTER (1987). Remitido para su publicación.

RASSOULZADEGAN, M.; P. LEOPOLD; J. VAILLY y F. CUZIN (1986). *Germ Line Transmission of Autonomous Genetic Elements in Transgenic Mouse Strains.* Cell, **46:** 513-519.

ROBERTSON, E. J. (1986). *Pluripotential Stem Cell Lines as a Route Into the Mouse Germ Line.* Trends in Genetics, January, pp. 9-13.

RUSCONI, S.; W. SCHAFFNER (1981), *Transformation of Frog Embryos with a Rabbit Beta-Globin Gene.* Proc. Natl. Acad. Sci. USA, **78:** 5051-5055.

SALTER, D. W.; E. J. SMITH; S. H. HUGHES (1986). *Retroviruses as Vectors for Germ Line Insertion in the Chicken.* Third World Congress on Genetics Applied to Livestock Production, Lincoln, Nebraska, USA.

SALTER, D. W.; E. J. SMITH; S. H. HUGHES (1987). *Transgenic Chickens: Insertion of Retroviral Genes into Chicken Germ Line.* Virology, **157:** 236-240.

SIMONS, P. J.; M. McCLENAGHAN; y A. J. CLARK (1987). *Alteration of the Quality of Milk by Expression of Sheep Beta-lactoglobulin Gene in Transgenic Mice.* Nature, **238,** N 6: 530-532.

SOUTHERN, E. (1975). *Detection of Specific Sequences Among DNA Fragments Separated by Gel Electrophoresis.* J. Mol. Biol., **98:** 503-517.

SPRADLING, A. C.; G. M. RUBIN (1982). *Transposition of Cloned P Elements into Drosophila Germ Line Chromosomes.* Science, **218:** 341-347.

WAGNER, E. F.; T. A. STEWART y B. MINITZ (1981). *The Human Beta-globulin Gene and a Functional Thymidine Kinase Gene in Developing Mice.* Proc. Natl. Acad. Sci. USA, **78:** 5016-5020.

WAGNER, T. E.; P. C. HOPPE; J. D. JOLLICK y D. R. SCHOLL (1981). *Microinjection of a Rabbit Beta-globin Gene into Zygotes and its Subsequent Expression in Adult Mice and Their Offspring.* Proc. Natl. Acad. Sci. USA, **78:** 6376.

WALL, R. J.; V. G. PURSELL; R. E. HAMMER y R. L. BRINSTER (1985). *Development of Porcine Ova that Were Centrifugated to Permit Visualization of Nuclei and Pronuclei.* Biol. of Reproduction, **32:** 645-651.