

Transgénesis: una moderna biotecnología reproductiva en animales de interés zootécnico

GIBBONS, A.¹; BEVACQUA, R.J.²; FERNÁNDEZ-MARTÍN, R.²; PEREYRA-BONNET, F.³; CUETO, M.¹; BRUNO-GALARRAGA, M.¹; SALAMONE, D.²

RESUMEN

Los continuos avances en el conocimiento de la biología molecular han permitido un gran progreso de la ciencia, mediante la modificación genética tanto de virus, bacterias como de organismos superiores. Estos procedimientos de alta complejidad que comprenden a la ingeniería genética permiten identificar, reproducir, modificar y transferir material genético en células, tejidos u organismos. A su vez, las modernas técnicas reproductivas que han logrado incrementar progresivamente su eficiencia en los últimos años (inseminación artificial, sincronización hormonal de estros, fecundación "in vitro", fertilización asistida, transferencia de embriones, clonación, etc.), constituyen herramientas indispensables para seguir avanzando en las nuevas investigaciones referidas a la modificación genética en los animales. Se describen brevemente las diversas metodologías empleadas para la realización de transgénesis en animales de interés zootécnico.

Palabras claves: transgénesis, animales transgénicos, transfección.

ABSTRACT

Continuous advances in the understanding of molecular biology have allowed great progress of science, through genetic modification of viruses, bacteria and higher organisms. These highly complex procedures that include genetic engineering enable to identify, reproduce, modify and transfer genetic material into cells, tissues or organisms. In turn, modern reproductive techniques that have managed to gradually increase their efficiency in recent years (artificial insemination, hormonal synchronization of estrus, fertilization "in vitro", assisted fertilization, embryo transfer, cloning, etc.) are essential tools for continue advancing in new research concerning genetic modification in animals. The various methodologies used to carry out transgenesis in animals of zootechnical interest are briefly described.

Keywords: transgenesis, transgenic animals, transfection.

¹Laboratorio de Reproducción de Rumiantes Menores. EEA Bariloche. INTA. *gibbons.alejandro@inta.gob.ar

²Laboratorio de Biotecnología de la reproducción. Dpto. Producción animal. Facultad de Agronomía. UBA

³Instituto de Ciencias Básicas y Medicina Experimental del Hospital Italiano de Buenos Aires.

Los **animales transgénicos** se caracterizan por poseer una característica genética que ha sido introducida artificialmente, que de otro modo no poseerían. Estos animales pueden ser utilizados para distintos objetivos que incluyen modelos de enfermedades humanas y aplicaciones terapéuticas. Actualmente se dispone de modelos de roedores transgénicos para el estudio de diversas enfermedades humanas como el Alzheimer, HIV, cáncer, etc. Adicionalmente, los animales modificados genéticamente, permiten evaluar la eficacia de vacunas y realizar estudios sobre terapia génica para el tratamiento de enfermedades genéticas en los humanos. Las empresas farmacéuticas presentan un gran interés en adquirir animales transgénicos para producir proteínas humanas con fines terapéuticos, tales como enzimas, anticuerpos, hormonas o factores de crecimiento.

En el año 2006, la Agencia Europea del Medicamento (EMA) aprobó la comercialización de la primera proteína recombinante farmacéutica, la antitrombina, que es producida por la glándula mamaria de cabras transgénicas. Otra aplicación, y no menos interesante, ha sido la obtención de animales modificados genéticamente y denominados "xeno-transplanters" (en inglés), que son aquellos individuos que podrán ser utilizados como potenciales donantes de órganos para los seres humanos. Otras aplicaciones comprenden a los animales como "modelos científicos", para realizar investigaciones en biología, fisiología y genética. Así como realizar estudios "in vivo" de la función génica, durante su desarrollo, la organogénesis y el envejecimiento celular.

Las modificaciones en los animales están orientadas a lograr la incorporación y expresión de secuencias de ADN de interés, mediante la tecnología denominada como **transfección** (Lewin, 1999). Por consiguiente, los animales transgénicos incorporan nuevos genes que modificarán su genoma y permanecerán en el individuo de por vida. El objetivo es que los nuevos genes se encuentren incluidos en sus células germinales (espermatozoides u óvulos). Estos animales serán capaces de actuar como "fundadores" de un nuevo linaje transgénico y podrán transmitir a su descendencia las modificaciones genéticas realizadas por el hombre. Si bien en la actualidad más del 95% de los animales transgénicos utilizados en investigación biomédica son ratones, también se está avanzando en incrementar la eficiencia en la obtención de animales transgénicos de interés zootécnico.

La expresión óptima de un transgen requiere de elementos de codificación (genes de interés) y control (ej: promotores específicos) que deben estar incluidos en la construcción del ADN transgénico que se desea incorporar. Los elementos de control dirigen la expresión de los genes de interés hacia un tejido específico. Por ejemplo, la expresión del transgen puede dirigirse hacia la glándula mamaria para que se produzca un determinado producto de interés farmacéutico en la leche. Los **vectores** posibilitan el proceso de transferencia de un gen exógeno a la célula, facilitando su entrada y biodisponibilidad intracelular. Actualmente se han utilizado una gran variedad de vectores con fines experimentales, pudiendo ser clasificados en: vectores virales (adenovirus, retrovirus) y vectores no virales (plásmi-

dos, cromosoma artificial de levaduras o YACs). A pesar de los grandes avances científicos, todavía hoy es necesario realizar múltiples estudios a nivel básico, para poder llegar a entender cómo funcionan los diferentes genes y sus reguladores (promotores que dirigen la expresión a determinados tipos celulares y señales secretoras, responsables del destino de las proteínas codificadas por los genes).

La preparación tradicional de un transgen comienza con el aislado de una molécula de ADN más compleja, básicamente con el uso de enzimas de restricción, oligonucleótidos y PCR. Normalmente se combinan en el transgen secuencias de distintos orígenes, como por ejemplo el gen que codifica la proteína de interés y el promotor que dirige la expresión a un determinado tejido (ej. glándula mamaria para lograr la producción de la proteína de interés en la leche). En la actualidad existen empresas capaces de sintetizar moléculas de ADN de una secuencia dada, que simplifican la preparación del transgen.

Existen varias metodologías de transgénesis animal:

Microinyección pronuclear

Se realiza mediante la utilización de una micropipeta de vidrio (0,1 micras de diámetro) para poder inyectar el ADN de interés en el pronúcleo de un óvulo fecundado. Esta metodología requiere un equipo de ópticas y brazos mecánicos móviles (micromanipulador). La microinyección de ADN fue la primera técnica exitosa para lograr un mamífero transgénico y fue aplicada en ratones por Gordon y Ruddle (1981), luego se utilizó en otras especies como ratas, conejos, ovejas, cerdos, aves y peces. Sin embargo, aún es difícil controlar el lugar donde se integrará el transgen en el cromosoma, y esto a veces es causa de variación en el nivel de su expresión. La microinyección de pronúcleos es técnicamente exigente y tiene una baja tasa de éxito, sobre todo en especies donde la visualización de los pronúcleos es compleja. Por ejemplo, estudios de transferencia de genes revelan que en bovinos fue necesario inyectar 36500 cigotos para generar 18 terneros transgénicos (Eystone *et al.*, 1999). La inserción de ADN es un proceso aleatorio y existe una alta probabilidad de que el transgen introducido no se inserte en el sitio adecuado para su expresión. A su vez su presencia puede ser baja en las células de la línea germinal de la que surgen los gametos. A pesar de estas limitaciones, la microinyección pronuclear todavía es utilizada por los laboratorios de transgénesis, debido a su fiabilidad en producir descendencia transgénica y a la facilidad de su aplicación respecto a otros métodos.

Transgénesis mediada por vectores virales

Los virus son muy eficientes en la incorporación de su propio ADN o ARN en el ADN de una célula. Por consiguiente se preconizó la utilización viral como vectores de la transgénesis (Jaenisch, 1976). Estos vectores son más eficientes que la microinyección, en términos de tasas de

transformación y expresión, pero una limitación es el tamaño del transgen que es posible incorporar. La utilización de la transgénesis mediada por virus y la microinyección pronuclear están actualmente limitadas por la integración al azar, ya que su ubicación puede alterar la expresión del transgen.

Transgénesis mediante inyección espermática intracitoplasmática (ICSI-Tr, siglas en inglés)

Si bien el desarrollo de la transgénesis en el ganado está en sus comienzos en comparación con lo realizado en ratones, se ha propuesto que esta metodología permitirá una producción eficaz y menos costosa de animales transgénicos para poder estudiar determinadas enfermedades humanas. La ICSI-Tr es una buena alternativa cuando los transgenes son de gran tamaño (500 kb). La ICSI en ratón fue descrita por Kimura y Yanagimachi (1995) y la ICSI-Tr por Perry *et al.* (1999). Esta última técnica ha sido empleada en nuestros trabajos para generar embriones modificados genéticamente en vacas, ovejas, cerdos, gatos y caballos, siendo la primera vez a nivel mundial que una técnica resulta efectiva para cinco especies de mamíferos diferentes (Pereyra Bonnet *et al.*, 2008).

Transferencia nuclear mediante células somáticas (SCNT; siglas en inglés)

Esta tecnología proporciona una alternativa más eficaz con respecto a la microinyección de ADN. La SCNT ha sido reportada como un método de transgénesis eficiente en los bovinos (Cibelli *et al.*, 1998; Salamone *et al.*, 2006); la tasa de embriones transgénicos producidos a través de este método oscila en un 20% (Cibelli *et al.*, 1998). La transgénesis por SCNT requiere la obtención previa de **clones celulares** a partir de una única célula que contenga el transgen de interés, para luego poder ser usados como donantes de núcleos transgénicos. Es actualmente el método más utilizado para la generación de animales transgénicos de granja con modificaciones precisas, como los *knock-out* o pérdidas de alelos. La tasa de éxito (animales transgénicos nacidos vivos) en mamíferos es reducida (generalmente 1-3% de los embriones transferidos). Sin embargo, en la especie bovina se han logrado valores del 15-20% (Kues y Niemann, 2004). Aquí **la clonación** se utiliza como una herramienta para realizar transgénesis en animales, al transferir células o núcleos con ADN con un gen de interés a ovocitos enucleados, que luego son sometidos a impulsos eléctricos para la fusión de la membrana del núcleo transferido con el ovocito receptor. Finalmente, se procede a la activación química o eléctrica de la división celular para la formación de los embriones. La SCNT tiene su limitación por la alta incidencia de anomalías embrionarias, fetales y/o perinatales y podría ser considerada ineficaz hasta que se logren superar estos inconvenientes.

Nuestra experiencia

En forma conjunta entre el Laboratorio de Biotecnología de Reproducción de la Facultad de Agronomía de

la Universidad de Buenos Aires y el Laboratorio de Reproducción de Rumiantes Menores del INTA Bariloche, hemos realizado una serie de ensayos experimentales para desarrollar nuevas metodologías de transgénesis. A partir de los ensayos en bovinos (Pereyra Bonnet *et al.*, 2011), la técnica de transgénesis por microinyección de vesículas (TMiV) en embriones procedentes de ovocitos fecundados *in vitro* (FIV), adquiere una particular importancia debido a que podríamos estar frente a una técnica muy novedosa e inédita para lograr animales transgénicos, sin la necesidad de usar agentes químicos para inducir el desarrollo embrionario, como en la SCNT. La obtención de animales transgénicos mediante TMiV utilizando membranas citoplasmáticas ovocitarias como vectores de ADN exógeno, ha sido investigada y desarrollada en forma conjunta en ovinos, permitiéndonos obtener en el año 2010 un feto modificado genéticamente con una eficiencia global del 8,3% (usando la construcción pCX-EGFP sin promotor). A diferencia de la microinyección de pronúcleos, esta nueva técnica es más sencilla debido principalmente a la facilidad para inyectar el transgen en el citoplasma y a una mayor simplicidad y menor tiempo para su ejecución. En la microinyección de pronúcleos es imprescindible que los cigotos a inyectar se encuentren en la fase pronuclear. En los ensayos "*in vitro*" resulta relativamente fácil lograr esta sincronización, porque se conoce el momento exacto del comienzo de la FIV. Por el contrario, en los ensayos "*in vivo*" no se cuenta con esta información y se recuperan cigotos en varios estadios nucleares.

La ventaja de la TMiV respecto a la transgénesis por SCNT es que no se requiere la obtención previa de clones celulares a partir de una única célula que contenga el transgen, por lo que no es necesaria la utilización de marcadores de selección o genes de resistencia a drogas. La SCNT requiere la transformación de células fetales o adultas por electroporación, liposomas o agentes virales y una selección de las células que efectivamente contengan el transgen.

En la actualidad, nuestro objetivo es obtener corderos nacidos modificados genéticamente mediante la técnica TMiV con la finalidad de que expresen el gen de interés. Estamos en los primeros pasos de la TMiV y, al igual que con la microinyección pronuclear en sus comienzos, se considera que se puede mejorar su eficiencia. Por ejemplo, actualmente existen numerosas estrategias para aumentar la tasa de integración en las técnicas de transgénesis en mamíferos. Entre ellas podemos destacar el uso de transposasas (Suganuma *et al.*, 2005) y recombinasas (García-Vázquez *et al.*, 2009). Estas enzimas de restricción pueden diseñarse para que reconozcan secuencias específicas del genoma huésped y tienen como finalidad cortar y promover la integración del transgen (Cui *et al.*, 2011). Estas novedosas tecnologías constituyen las nuevas herramientas para mejorar las actuales técnicas de transgénesis. Los últimos avances en la transgénesis para lograr una mayor integración dirigida o específica han sido revisados por Kues y Niemann (2011).

CONCLUSIONES

La utilidad de la tecnología de la transgénesis está sujeta a la capacidad de identificar los genes y las secuencias reguladoras apropiadas para la producción de las características que se desean transmitir en los animales transgénicos. A su vez, dependerá de la metodología para incorporar estos genes deseados de una manera efectiva para que se expresen correctamente y de manera eficiente.

Los animales transgénicos serán claves para encontrar la cura de varias enfermedades, mejorar la calidad de los alimentos, reducir los costos de productos farmacéuticos, cumpliendo las normas éticas que aseguren las condiciones necesarias para el bienestar animal. Para que la confianza del público se fortalezca, será imprescindible realizar una mejor difusión pública de los beneficios de obtener animales transgénicos, para el bienestar de la humanidad.

Una regulación que aliente la investigación con información abierta sobre los temas de tecnologías de ingeniería genética en el mundo académico y la participación de toda la sociedad en el desarrollo de las leyes relativas a estas cuestiones, parece ser la mejor manera de eludir reacciones exageradas o negativas sobre esta importante biotecnología.

En la actualidad, la oferta mundial de alimentos de origen animal a menores precios está condicionada a la reducción de los costos y al aumento de su eficiencia productiva. A su vez, los nuevos avances en la modificación genética animal permitirán una reducción de las pérdidas económicas por enfermedades (virales, bacterianas, parasitarias, etc.) y de la actividad contaminante ambiental de origen animal, posibilitando incrementar la convertibilidad alimenticia. A nivel mundial, se están considerando las diversas aplicaciones potenciales de la metodología de la transgénesis para desarrollar nuevas y múltiples mejoras genéticas del ganado. Por consiguiente, un sinfín de posibilidades pueden ser previstas para un futuro cercano.

En resumen, la transgénesis en los animales de interés zootécnico no está lo suficientemente desarrollada y aun se requiere generar mucha información básica. La premisa será que todos los avances en la transgénesis animal deberán ser para beneficio de la humanidad, y contribuir al bienestar animal y a la conservación de los recursos.

BIBLIOGRAFÍA

CIBELLI, J.B.; STICE, S.L.; GOLUEKE, P.L.; KANE, J.J.; JERRY, J.; BLACKWELL, C.; PONCE DE LEON, F.A.; ROBL, J.M.

1998. Transgenic bovine chimeric offspring produced from somatic cell-derived stem like cells. *Nat. Biotechnol.* 16, 642–646.

CUI, X.; JI, D.; FISHER, D.A.; WU, Y.; BRINER, D.M.; WEINSTEIN, E.J. 2011. Targeted integration in rat and mouse embryos with zinc-finger nucleases. *Nat. Biotechnol.* 29(1):64–67.

EYESTONE, W.H. 1999. Production and breeding of transgenic cattle using in vitro embryo production technology. *Theriogenology* 51:509–17.

GARCÍA-VÁZQUEZ, F.A.; GARCÍA-ROSELLÓ, E.; GUTIÉRREZ-ADÁN, A.; GADEA, J. 2009. Effect of sperm treatment on efficiency of EGFP-expressing porcine embryos produced by ICSI-SMGT. *Theriogenology* 72:506–518.

GORDON, J.; RUDDLE, F. 1981. Integration and stable germ line transmission of genes injected into mouse pronuclei. *Science* 214: 1244–1246.

JAENISCH, R. 1976. Germ line integration and Mendelian transmission of the exogenous Moloney leukemia virus. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.* 73(4) 1260–1264.

KIMURA, Y.; YANAGIMACHI, R. 1995. Intracytoplasmic sperm injection in the mouse. *Biol Reprod.* 52(4):709–20.

KUES, W.A.; NIEMANN, H. 2004. The contribution of farm animals to human health. *Trends Biotechnol.* 22, 286–294.

KUES, W.A.; NIEMANN, H. 2011. Advances in farm animal transgenesis. *Veterinary Medicine* 102:146–156.

LEWIN, B. 1999. *Genes VII.* Oxford, Oxford University Press, 990 p.

PEREYRA-BONNET, F.; FERNÁNDEZ-MARTÍN, R.; OLIVERA, R.; JARAZO, J.; VICHERA, G.; GIBBONS, A.; SALAMONE, D. 2008. A unique method to produce transgenic embryos in ovine, porcine, feline, bovine and equine species. *Reproduction, Fertility and Development* 20, 741–749.

PEREYRA-BONNET, F.; BEVACQUA, R.; ROSA, I.L.; SIPOWICZ, P.; RADRIZZANI, M.; FERNANDEZ-MARTIN, R.; SALAMONE, D. 2011. Novel methods to induce exogenous gene expression in SCNT, parthenogenic and IVF preimplantation bovine embryos. *Transgenic Res.* 2011 Mar 24. PMID: 21431868.

PERRY, A.C.; WAKAYAMA, T.; KISHIKAWA, H.; KASAI, T.; OKABE, M.; TOYODA, Y.; YANAGIMACHI, R. 1999. Mammalian transgenesis by intra-cytoplasmic sperm injection. *Science* 284, 1180–1183.

SALAMONE, D.; BARANAO, L.; SANTOS, C.; BUSSMANN, L.; ARTUSO, J.; WERNING, C.; PRYNC A.; CARBONETTO, C.; DABSYS, S.; MUNAR, C.; SALABERRY, R.; BERRA, G.; BERRA, I.; FERNANDEZ, N.; PAPOUCHADO, M.; FOTI, M.; JUDEWICZ, N.; MUJICA, I.; MUNOZ, L.; ALVAREZ, S.F.; GONZALEZ, E.; ZIMMERMANN, J.; CRISCUOLO, M.; Melo, C. 2006. High level expression of bioacTMIv recombinant human growth hormone in the milk of a cloned transgenic cow. *J. Biotechnol.* 124(2):469–72.

SUGANUMA, R.; PELCZAR, P.; SPETZ, J.F.; HOHN, B.; YANAGIMACHI, R.; MOISYADI, S. 2005. Tn5 transposase-mediated mouse transgenesis. *Biol Reprod.* 73(6):1157–63.