

## AUTOR INVITADO

Jorge Piedrahita<sup>1</sup>

## Los Animales Transgénicos y su Potencial en el Desarrollo de la Biotecnología Animal

## ABSTRACT

*Title: Transgenic animals and their potential in the development of animal biotechnology*

The development of new technologies in animal sciences, have allowed the production of transgenic animals as an alternative to improve some characteristics. Transgenic animals have a huge importance in human and veterinary biomedicine and in animal production. These animals are being used as research models in medicine. For example, apolipoprotein E deficient mice that show susceptibility to arteriosclerosis, are good models to study the factors involved in the development of this disease. Several important proteins in human and veterinary medicine obtained from human or animal tissues, are as expensive as 10000 dollars per milligram.

These costs could be reduced by using the mammary gland as a bioreactor to produce these proteins in the recombinant form. However, one the major difficulties to produce transgenic animals is the impossibility to predict the regulation and expression level of the gene in the animal obtained. In this paper, technological alternatives that are being evaluated to improve gene inclusion and to control the expression of the gene in the transgenic animal are critically reviewed.

*Key Words:* animal production, transgenic animals, recombinant genes, gene expression.

1. Departamento de Anatomía Veterinaria y Centros de Genética Animal y Biotecnología Animal, Universidad de Texas A&M, College Station, Texas, USA 77843-458.

e-mail: JPiedrahita@vetmed.tamu.edu

## RESUMEN

Las nuevas tecnologías en las ciencias animales han permitido la producción de animales transgénicos como una alternativa para el mejoramiento de ciertas características genéticas en los individuos de una especie. El uso de los animales transgénicos tiene amplia repercusión en la biomedicina humana y veterinaria, al igual que en producción animal. Los animales transgénicos están siendo utilizados como modelos de investigación en medicina humana; un ejemplo, es la obtención de ratones deficientes en apolipoproteína E que muestran alta susceptibilidad a la arterioesclerosis y con los cuales se facilita el análisis de los factores comprometidos en el desarrollo de esta enfermedad. Actualmente, varias proteínas de importancia en medicina veterinaria y humana se obtienen de tejidos animales o humanos, con costos que llegan a los 10 millones de pesos por miligramo de proteína pura; estos costos podrían reducirse al producirlas en forma recombinante, mediante el empleo de la glándula mamaria como un biorreactor natural. Sin embargo, una de las grandes dificultades en la producción de animales transgénicos es la imposibilidad de predecir el nivel de regulación y de expresión del gene en el animal resultante. En el presente artículo se muestran las alternativas tecnológicas que se están evaluando para permitir una mayor incorporación de los genes y un mejor control de la expresión de los mismos en los animales transgénicos.

*Palabras Claves:* producción animal, animales transgénicos, recombinación de genes, expresión de genes.

## INTRODUCCIÓN

ACTUALMENTE existen tres técnicas de producción de mamíferos transgénicos: la inyección pronuclear, el uso de vectores retrovirales y la recombinación homóloga en células embrionarias madres (células EM). Tanto la inyección pronuclear como el uso de los vectores retrovirales se basan en la introducción de un gene "artificial" o "transgene" en un cromosoma del embrión en desarrollo. Desafortunadamente, todavía no es posible predecir el lugar de inserción del transgene, por lo cual, es necesario construir genes artificiales que funcionen en cualquier parte del cromosoma (el proceso de inserción del transgene en la técnica de inyección pronuclear es referido como recombinación ilegítima). Por esta razón, el transgene debe contener toda la información necesaria para un control adecuado de transcripción. Entre las secuencias de ADN involucradas en el control de expresión de un gene se encuentran, entre otros, los promotores, los intensificadores y las regiones de fijación a la matriz nuclear (MAR) (Klintonworth, 1990; Brooks et al., 1994). Es-

tas secuencias reguladoras son difíciles de identificar y aislar y, máxime si se tiene en cuenta, que su nivel de expresión y su regulación apropiada están afectadas por áreas adyacentes de la cromatina. Eso quiere decir que, si se producen diez animales transgénicos con el mismo transgene, cada uno de ellos será diferente debido a que contiene el ADN artificial en diferentes áreas cromosómicas. Este efecto, llamado el efecto de localización o efecto posicional, es la causa más importante de la imposibilidad para producir animales transgénicos de especies domésticas que regulen la expresión del transgene de una manera apropiada (Klintonworth, 1990).

Afortunadamente, durante los últimos años se ha desarrollado una técnica que permite la introducción del transgene en áreas específicas del cromosoma (Smithies et al., 1985; Koller y Smithies, 1992). Es decir, hace posible predecir el sitio en donde terminará localizado el transgene, y no es necesario que este sea autosuficiente, ya que se pueden usar las secuencias endó-

genas reguladoras que se encuentran en el área donde se está tratando de introducir el transgene. Esta técnica, llamada recombinación homóloga, hace uso, como su nombre lo indica, de regiones de homología entre el ADN exógeno (el transgene) y el ADN endógeno (cromosómico), para insertar el transgene en áreas específicas del cromosoma. En otras palabras, usando esta técnica se puede seleccionar el lugar en el cromosoma donde seleccionar el ADN exógeno irá a terminar.

Como se puede ver en la figura 1, el gene endógeno, o gene X, está compuesto de varios intrones y exones que definen su identidad. Esta secuencia de ADN es única en cada región, por lo que se puede definir como una "huella dactilar" genética. Utilizando métodos de ingeniería genética se construye el transgene conteniendo las regiones de ADN, tanto intrones como exones, que definen el gene X. Al introducir el ADN exógeno en la célula, las regiones de homología entre el gene endógeno y el exógeno actúan como pequeños imanes y se atraen mutuamente. Esta atracción hace que el ADN exógeno identifique, entre el ADN cromosomal completo, el ADN endógeno que contiene las mismas regiones de homología (Koller y Smithies, 1992).

Una vez encontradas las regiones de homología, el transgene reemplaza al ADN endógeno haciendo uso del proceso de recombinación homóloga. En este tipo de inserción el ADN es intercambiado y difiere de aquel que ocurre en la inyección pronuclear y los vectores retrovirales en los cuales durante la recombinación homóloga, el ADN es añadido. Tanto el proceso de inserción como el resultado final son diferentes. En el caso de la recombinación homóloga el ADN del transgene interactúa con el ADN endógeno a través de regiones homólogas e induce un intercambio de ADN entre el transgene y el ADN cromosómico (Koller y Smithies, 1992). En el caso de la inyección pronuclear la secuencia del transgene no influye en el proceso de inserción ya que el ADN cromosómico no interactúa con el transgene de manera específica.

Similarmente, el sistema de inserción en los retrovirus no está basado en secuencias del ADN cromosómico, sino en la presencia de una enzima viral llamada integrasa y unas secuencias de ADN en el retrovirus llamadas repeticiones terminales largas (LTR; Van der Putten, 1985). La necesidad del transgene de interactuar con una región específica en el sistema de recombinación homóloga, hace que la frecuencia de inserción específica sea relati-

vamente baja. Esta baja eficiencia del proceso de recombinación homóloga no permite su uso directo en embriones, sino que obliga a su utilización en células pluripotenciales obtenidas del embrión, llamadas células embrionarias madres o células EM.

Las células EM son aisladas de la masa celular interna (MCI) de un embrión en el período de preimplantación. Básicamente, las células de la MCI se separan de las células trofoblásticas y se cultivan en condiciones que permitan su proliferación, pero que eviten su diferenciación. En estas condiciones, las células continúan dividiéndose sin perder su habilidad de diferenciarse normalmente (Evans y Kaufman, 1981; Martín, 1981). Esto implica que el material genético de estas células se pueda modificar en cultivo y solamente después de seleccionar aquellas células que contienen el cambio deseado, se produce el animal transgénico. Como se puede ver en la Figura 2, la manera de obtener un organismo completo de una célula en cultivo es a través de la inyección de las células embrionarias madres transgénicas en un embrión huésped. Debido a que las células del embrión huésped no son capaces de distinguir entre sus propias células del MCI y las células EM, las señales responsables del control del desarrollo normal de las células del MCI también son recibidas por las células EM. Estas células EM responden a las señales y se desarrollan normalmente. El resultado de este codesarrollo de las células EM y las células del embrión huésped es la producción de un animal compuesto por dos tipos de tejido; uno procedente de las células del embrión huésped, y otro de las células EM (Bradley et al., 1984). Este animal "mixto" se conoce como una quimera y puede producir prole con el genotipo tanto del embrión huésped como de las células transgénicas. Esto quiere decir que la mutación que se introdujo en cultivo puede ser transmitida a través de los espermatozoides o de los oocitos a las futuras generaciones.

#### **Animales Transgénicos en la Biomedicina Humana y Veterinaria.**

La utilización conjunta de la recombinación homóloga con la habilidad de diferenciación de las células EM luego de su modificación genética, han permitido el desarrollo de dos técnicas nuevas de manipulación del material genético en mamíferos. En primer término, ha permitido la inactivación de genes específicos mediante la inserción de un transgene en un gene activo, causando su bloqueo. Esta

técnica es conocida como inactivación insercional y permite el análisis de la función de genes específicos en la fisiología de un organismo. Es así como, utilizando esta técnica ha sido posible determinar la función de diferentes genes y la generación de animales con síndromes similares a los encontrados en ciertas enfermedades de los humanos (Koller y Smithies, 1992). En nuestro laboratorio, por ejemplo, hemos desarrollado un ratón deficiente en la apolipoproteína E, una proteína involucrada en el transporte del colesterol (Piedrahita et al., 1992). Estos ratones desarrollan arteriosclerosis prematura, lo cual los hace un modelo excelente para el análisis de factores que afectan, tanto positiva como negativamente la incidencia de la enfermedad (Zhang et al., 1992).

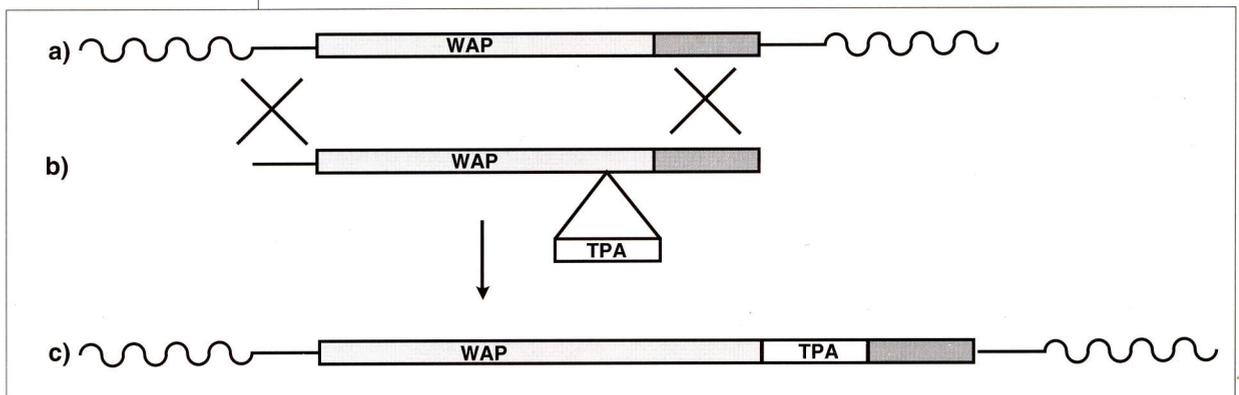
En segundo lugar, y de mayor utilización en la industria animal, está la producción de animales transgénicos que produzcan proteínas modificadas en ciertos órganos, especialmente en la glándula mamaria. Para lograr esta regulación tan específica es necesario no solo que todos los reguladores de la transcripción del ADN estén intactos en el transgene, sino, más importante aún, que éste se encuentre en el lugar cromosómico que le corresponde. La única forma de lograr que se cumplan esos dos requerimientos, es introduciendo un gene en el animal de manera que quede bajo control de un gene endógeno que sea expresado apropiadamente. En el caso de la glándula mamaria, sería un gene que codifica a una proteína única de la leche como la caseína, la lactoglobulina, o la proteína ácida del suero (WAP), (Wilmot et al., 1991a, 1991b). Como se puede observar en la Figura 3, este objetivo se puede completar utilizando la técnica de recombinación homóloga. Básicamente, el transgene está compuesto de áreas homólogas al gene del WAP, pero adicionalmente contiene un segundo gene (en este ejemplo el gene del activador de plasminógeno de tejidos-TPA) codificador de la proteína que se desea producir en la glándula mamaria. Mediante las zonas homólogas es posible lograr que el transgene se incorpore en el lugar cromosómico que contiene el gene del WAP endógeno a través de una reacción de recombinación homóloga. El resultado de esta reacción es el cambio del gene endógeno por el transgene. Si el transgene esta bien diseñado, es posible obtener expresión tanto del WAP como de TPA. Lo importante es que a nivel de la transcripción, el gene esté controlado por los reguladores del WAP, los cuales no solo

han quedado intactos sino que están en el lugar cromosómico donde normalmente funcionan.

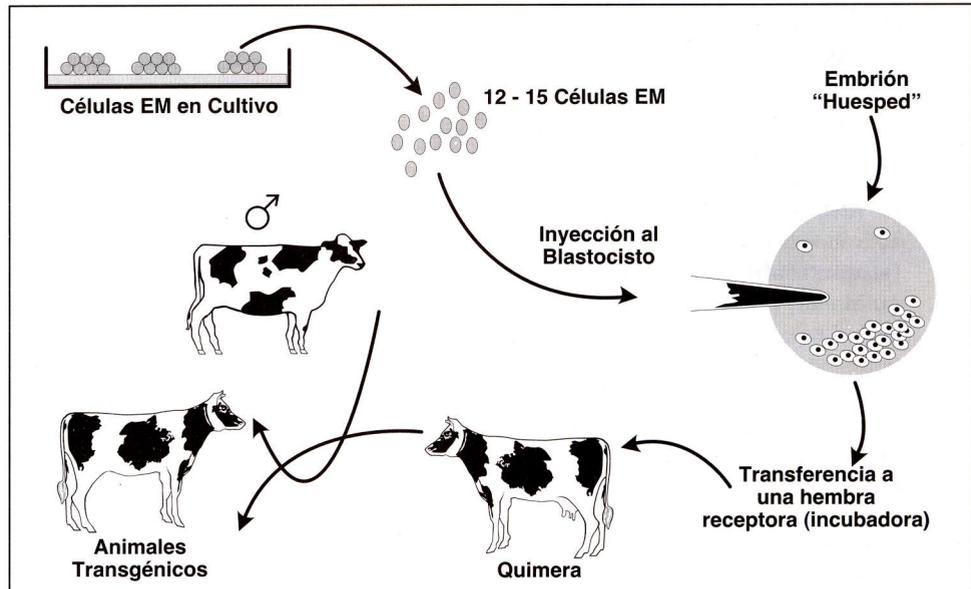
El interés en los estudios de la glándula mamaria se debe a que actualmente, proteínas de importancia en medicina humana y veterinaria se obtienen de material humano o animal, a costos exorbitantes que llegan a alcanzar los 5-10 millones de pesos por miligramo de proteína pura. Estos costos se pueden reducir utilizando proteínas recombinantes producidas ya sea por bacterias, levaduras, células en cultivo o empleando animales como bioreactores.

Un sistema ideal de producción de proteínas recombinantes debe llenar los siguientes requisitos: Primero, el sistema debe producir altas cantidades de la proteína de interés. Segundo, la proteína debe ser activa biológicamente y ser idéntica a la proteína endógena. Tercero, el costo de producción debe ser relativamente bajo en relación con el valor probable de la proteína en el mercado. Desafortunadamente, las bacterias no procesan la proteína de una manera igual a las células de los mamíferos, lo que puede resultar en una proteína que cause una reacción inmunológica en el paciente. Aunque la proteína producida por células en cultivo, y hasta cierto punto por las levaduras, no tiene problemas con reacciones inmunológicas debido a procesamientos irregulares, los costos de producción y el nivel técnico requerido para su producción son muy altos.

**Figura 3.** Proceso de recombinación homóloga para producción de fármacos en la glándula mamaria. a) Gene endógeno de la proteína ácida del suero (WAP) con todos los reguladores necesarios para su expresión en la glándula mamaria durante la lactancia. b) Transgene que contiene las regiones de homología con el gene endógeno, necesarias para la inducción del proceso de recombinación homóloga. Adicionalmente, el transgene contiene el gene activador del plasminógeno de tejidos (TPA), dando origen a la producción de una proteína de fusión compuesta por el WAP y el TPA. c) Gene endógeno del WAP luego del proceso de recombinación. De esta manera el TPA será expresado en la glándula mamaria durante la lactancia.



**Figura 1.** El proceso de recombinación homóloga. a) Región endógena con cuatro áreas específicas. Esta copia se encuentra en el cromosoma. b) Transgene producido en el laboratorio conteniendo tres áreas idénticas a las de la región endógena. Adicionalmente contiene el gene de la neomicina, el cual permite seleccionar las células que contienen el transgene. c) Las áreas I, II y III del gene endógeno han sido reemplazadas por las áreas 1, 2 y 3 del transgene durante el proceso de recombinación homóloga. Adicionalmente el gene de la neomicina ha sido introducido en el cromosoma, dando como resultado final el reemplazo de una región específica del cromosoma por un ADN producido en el laboratorio.



**Figura 2.** Producción de quimeras utilizando las células embrionarias madres (EM). Las células EM transgénicas son disociadas y un grupo de 12 a 15 se inyectan en un blastocisto huésped. Los embriones son transferidos a una receptora sincronizada que actúa como incubadora. Los embriones se desarrollan en el útero de la receptora y nace una quimera. La quimera tiene tejidos derivados de las células EM y tejidos derivados del embrión huésped. Estos tejidos mixtos pueden incluir los testículos o los ovarios, es decir, se pueden obtener gametos derivados de las células EM. El cruzamiento de estas quimeras con una pareja normal puede dar una progenie que contiene el transgene introducido en la célula EM en cultivo.

Estos problemas con los métodos *in vitro* han llevado al desarrollo de métodos de producción de proteínas *in vivo*. En particular, se han generado animales transgénicos que producen proteínas exógenas de interés médico en la glándula mamaria. El método de producción de estos animales ha sido a través de la inyección pronuclear de un transgene que contiene las regiones reguladoras responsables de la expresión del gene únicamente en la glándula mamaria y del gene que expresa la proteína de interés. Las tres regiones más utilizadas han sido las reguladoras de la ovalbumina ovina, de la caseína beta de la rata, y de la proteína ácida del suero (WAP), (Pittius et al., 1988; Shamay et al., 1991; Wilmut et al., 1991a).

Utilizando la inyección pronuclear y las secuencias reguladoras de la glándula mamaria, tanto la industria privada como los laboratorios universitarios han desarrollado cerdos, ovejas y cabras transgénicas, produciendo proteínas heterólogas en la glándula mamaria. Estas proteínas incluyen alfa-1-antitripsina (anti-inflamatorio), colágeno (tratamiento de fracturas y quemaduras), factor VIII y IX (hemofilia), fibrinógeno (quemaduras, cirugía), hemoglobina humana (transfusiones), proteína C (deficiencia de proteína C), y el activador de plasminógeno de tejido (TPA) (ataques cardiacos, trombosis, embolismo pulmonar) (Rucker, comunicación personal). Los niveles de producción fluctúan entre 100-200 mg por día hasta más de 100 gramos diarios de la proteína de interés pura. Con niveles de producción de 100 gramos diarios, se calcula que dos animales transgénicos serían suficientes para satisfacer la necesidad de factor IX de la humanidad. Esto afectaría los costos de factor IX de una manera casi inconcebible con reducciones de precio de más de 1.000% (de US\$1.000/mg a US\$1/mg). Aunque existe la tecnología para la generación de estos animales, los costos de producción limitan su aplicación a proteínas de muy alto valor comercial.

### Animales Transgénicos en la Producción Animal

Debido a los altos costos de producción de animales transgénicos en el momento, la aplicación de esta tecnología es muy limitada. Inicialmente hubo mucho interés en la manipulación del crecimiento a través de la inyección de la hormona de crecimiento en cerdos (Pursel et al., 1989; Ebert et al., 1991; Wall, 1996). Desafortunadamente, los resultados de estos experimentos demostraron que, simultáneamente con el

aumento en la eficiencia de utilización del alimento y en el nivel de crecimiento, aparecían en el animal tratado con la hormona problemas físicos que no permitían su comercialización. Recientemente, se han obtenido cerdos transgénicos conteniendo IGF-I y el oncogene cSKI; sin embargo, como en el caso anterior, no se alcanzaron los resultados positivos logrados con la aplicación de esta tecnología en ratones transgénicos. Es así como, a pesar de más de 15 años de investigación en esta área no existe un animal transgénico de valor comercial con un nivel de crecimiento modificado (Wall, 1996).

Otra área de investigación en el sector pecuario, es la producción de animales resistentes a enfermedades específicas. Aunque esta tecnología ha dado resultado en ratones, hasta ahora no se ha podido reproducir exitosamente en especies domésticas. Recientemente, Clements et al. (1994), reportaron la producción de ovejas transgénicas produciendo partículas del virus visna. Resultados preliminares indican que las ovejas contienen anticuerpos dirigidos a este virus, mas no indican todavía si la expresión de esta proteína confiere resistencia a la enfermedad.

En la actualidad, la aplicación más promisoría de animales transgénicos, parece ser la producción de lana modificada en ovejas. Recientemente se reportó la producción de una oveja transgénica expresando IGF-I controlado por el regulador de la queratina (Bullock et al., 1995). La producción de lana fué 10% mayor en ovejas transgénicas que en las no-transgénicas. Actualmente, se está analizando la calidad de la lana, y si se demuestra que esta se mantiene, sería el primer animal transgénico de valor comercial en sistemas de producción pecuaria.

Tal vez las razones principales del lento progreso en la producción de animales domésticos transgénicos son, el alto costo de esta tecnología y su concentración en muy pocos laboratorios. Esto limita no solo el número de experimentos que se pueden desarrollar en un cierto tiempo, sino también, la masa crítica disponible para el avance de esta área científica.

### Tecnologías en Desarrollo

Como se mencionaba anteriormente, el problema con la producción de animales transgénicos usando inyección pronuclear, es la imposibilidad de predecir el nivel de regulación y de expresión del animal resultante. Debido a los altos costos de producción de estos animales en especies domésticas, se percibe que solo aquellos

laboratorios con altos recursos o la industria privada puedan emprender programas de este tipo.

En el momento los costos de producción de una vaca transgénica se calculan en US \$250,000 y de un cerdo US \$50,000. La conjunción entre los altos costos y la incertidumbre de los resultados, explican el bajo uso de esta tecnología. Obviamente, la habilidad para determinar los cambios exactos ocurridos luego de una modificación genética y la capacidad de usar los reguladores endógenos, hace pensar que el uso de la recombinación homóloga aumentaría la eficacia de producción de animales transgénicos.

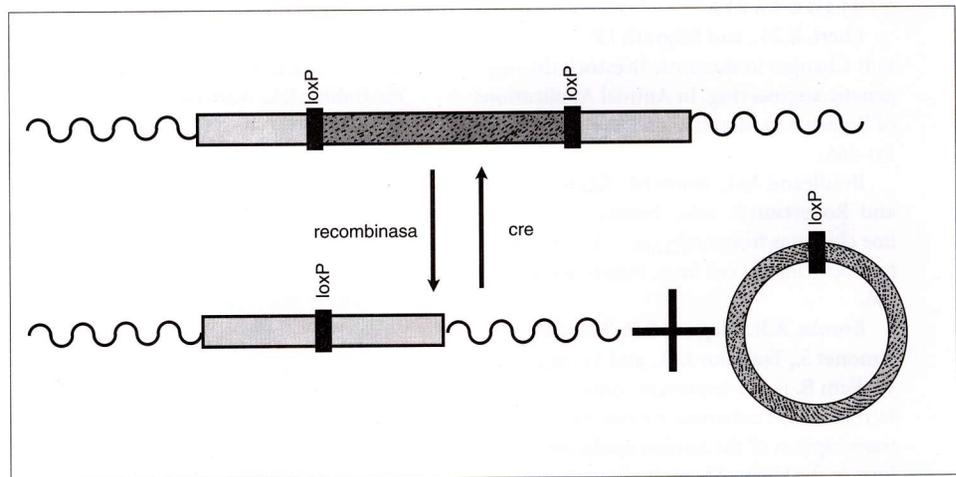
Desafortunadamente, en el momento esta técnica solo se ha podido utilizar en roedores, debido a la dificultad de aislar las células EM en otras especies. Investigaciones previas (Piedrahita et al., 1990a; 1990b) han demostrado la posibilidad de aislar células EM en porcinos; sin embargo, no se ha logrado identificar las condiciones que ayuden a mantener estas células EM en un estado genéticamente estable por largos períodos de tiempo. En bovinos, los problemas técnicos son similares; algunos grupos reportan, la capacidad de aislar las células pero no han tenido éxito en mantener su estado pluripotencial. Solo un grupo ha reportado la obtención de progeñie utilizando células en cultivo y la técnica de transferencia nuclear (Simms y First, 1993). A pesar de la intensa investigación realizada por varios laboratorios, no ha sido posible replicar estos resultados. En este momento la investigación en el área de aislamiento de las células EM en bovinos, ovinos y porcinos, se enfoca al descubrimiento de proteínas embrionarias o uterinas que permitan la proliferación e inhiban la diferenciación de estas células EM *in vitro*. Recientemente se reportó la que ciertas citoquinas como la interleukina-6, oncostantina-M, el factor inhibitorio de leucemia (LIF), y el factor ciliar neurotrófico (CNTF), pueden facilitar el aislamiento de las células EM en ratones (Yoshida et al., 1994). En nuestro laboratorio se ha desarrollado un sistema utilizando embriones de cerdo que permite evaluar los efectos de estas proteínas sobre el desarrollo de la masa celular interna (Moore y Piedrahita, 1996). Utilizando este sistema y proteínas obtenidas de ratones o humanos, hemos observado la incapaci-

cidad de estas proteínas para actuar sobre el embrión porcino. Esto significa, que las proteínas heterólogas no son activas en el cerdo, o que el cerdo no tiene los receptores para aquellas proteínas. Para resolver esa pregunta hemos aislado los genes de CNTF y el LIF porcino y estamos en el proceso de expresar las proteínas para determinar su bioactividad en el embrión porcino. Paralelamente, estamos utilizando métodos basados en la reacción en cadena de la polimerasa que nos permitan analizar la expresión de los receptores para este tipo de proteínas en un solo embrión.

Alternativamente, el desarrollo de células embrionarias madres en ratones, se puede conseguir utilizando no solo embriones sino también células germinales obtenidas de embriones antes de la diferenciación sexual (Matsui et al., 1992). Utilizando técnicas similares, y nuestra experiencia sobre el efecto de ciertas citoquinas en el estado de diferenciación del embrión porcino, hemos obtenido varias líneas celulares con morfología y marcadores de diferenciación similares a aquellos detectados en las células embrionarias madres. Actualmente, estamos investigando la capacidad de estas líneas celulares para participar en la formación de una quimera una vez inyectada en un embrión huésped. A pesar de no contar todavía con los resultados finales de esta investigación, el hecho de haber logrado mantener la morfología y la expresión de marcadores específicos por varias semanas, indica que estamos aproximándonos a las condiciones necesarias para el aislamiento de este tipo de líneas celulares.

Dado que el desarrollo de las células EM en especies domésticas, posiblemente, no se logre en el corto plazo, varios laboratorios incluyendo el nuestro, están buscando alternativas de producción de animales transgénicos para incrementar la eficiencia y el control de regulación existente, sin hacer uso de las células embrionarias madres. Debido a los altos costos de investigación, este tipo de trabajos está limitado en esta etapa a ratones. Los dos enfoques principales en esta investigación son, el desarrollo de técnicas que bloqueen el efecto posicional, y el desarrollo de técnicas que incrementen la proporción de embriones inyectados que incorporen el transgene.

Para reducir el efecto posicional,



**Figura 4.** Recombinación mediada por la enzima cre. La recombinasa cre identifica una región de 32 nucleótidos llamada loxP. Una vez reconocido este sitio, la enzima puede inducir una inserción o una delección. Para que esta reacción ocurra es necesario la presencia de dos secuencias loxP. Es decir, la enzima es capaz tanto de causar inserción de ADN en un lugar marcado por loxP, como de remover un área de ADN enmarcada por dos loxP.

McKnight et al. (1992), incluyeron en el transgene las secuencias de la región de fijación a la matriz (MAR) obtenidas del gene de la lisozima. Estas regiones de fijación aíslan físicamente una región de cromatina de la otra y teóricamente pueden evitar que niveles de expresión de una de ellas afecten la expresión en otra región. Sus resultados demostraron que en el caso del gene WAP, las regiones MAR fueron capaces de aislar el gene de una manera significativa. El porcentaje de fetos vivos que expresaban el transgene aumentó del 60% sin MAR al 100% con MAR. Lamentablemente, los niveles de producción de la proteína exógena no se aumentaron y alcanzaron solo un 10-20% de los niveles endógenos. Estos resultados indican que este tipo de "aisladores" podrá mejorar el nivel de regulación y proteger contra el efecto posicional, sin embargo, se requiere su estudio en especies domésticas. También indican, que para aumentar el nivel de expresión se deben identificar secuencias diferentes a los MAR.

Con el fin de mejorar la eficiencia de producción de animales transgénicos, nuestro grupo está adelantando los estudios iniciales para establecer la posibilidad de usar una enzima llamada cre para aumentar el número de eventos insercionales (Sauer y Henderson, 1994; Rucker y Piedrahita, 1995). La técnica está basada en la observación de que la enzima cre es capaz de identificar una secuencia de ADN de 32 bases, llamada loxP, y de catalizar la recombinación de dos moléculas conteniendo cada una de ellas un secuencia loxP (figura 4). Esto trae dos beneficios: primero, que al integrar inicialmente un gene con la secuencia loxP, el gene, o el área

cromosómica, queda "marcada" para el evento secundario; y segundo, que la inserción es catalizada por una enzima, proceso que es más eficiente que las inserciones no enzimáticas, como la que ocurre durante la recombinación homóloga o recombinación ilegítima. La combinación de la habilidad para introducir el transgene en áreas específicas, a través de la inserción de una secuencia loxP en el área de interés, y el incremento en la eficiencia por el uso del cre, permitirá optimizar la producción de animales transgénicos con mejor regulación.

A pesar de las dificultades existentes se prevé que en los próximos 5 años se van a dilucidar las condiciones que permitan el aislamiento de células EM en los bovinos, ovinos, y porcinos. Una vez las células EM sean aisladas, no se anticipa ninguna dificultad para producir los cambios genéticos por medio de recombinación homóloga, ya que se ha demostrado que las enzimas responsables de facilitar este tipo de recombinación están conservadas en las especies mamíferas. Estos avances, y los obtenidos en el aumento de la eficiencia y el control de regulación de animales transgénicos producidos por la inyección pronuclear, indican que la investigación en esta área de la producción resultará en la generación de animales de gran beneficio para la humanidad. Es el momento de que Colombia decida si se limita a ser comprador de los productos de esta tecnología o invierte en la capacitación del recurso humano y en la infraestructura física necesaria para el desarrollo de su propia industria; una industria destinada a revolucionar los sistemas agropecuarios y biomédicos en el siglo XXI.

## BIBLIOGRAFÍA

- Ebert, K.M., and Selgrath J.P. 1991. Changes in domestic livestock through genetic engineering. In *Animal Applications of Research in Mammalian Development*. pp. 233-266.
- Bradleand AM, Evans M, Kaufman M and Robertson E. 1984. Formation of germ-line chimeras from embrando-derived teratocarcinoma cell lines. *Nature* 309:255-256.
- Brooks, A.R., Nagand B.P., Taandlor S., Simonet S., Taandlor J.M., and Levand-William B. 1994. Sequences containing the second intron enhancer are essential for transcription of the human apolipoprotein B gene in the livers of transgenic mice. *Mol. Cell Biol.* 14:2243-2256.
- Bullock, D.W., Damak S., Jaand N.P., Su H.A.N.D., and Barrel G.K. 1995. Improved wool production from transgenic sheep expressing insulin-like growth factor driven band the keratin promoter. In: Miller (ed) *Biotechnologand's Role in the Genetic Improvement of Farm Animals*. Beltsville Sandmposium XX, pg.88.
- Clements, J.E., Wall R.J., Naraandan O., Haver D., Schomberg R., Sheffer D., Powell A., Carroth L.M., Zink M.C., and Rexroad C.E. 1994. Development of transgenic sheep that express the visna virus envelope gene. *Virologand* 200:370-380.
- Evans M and Kaufman MH: 1981. Establishment in culture of pluripotent cells from mouse embrandos. *Nature* 292:154-156.
- Klintworth G.K. 1990. Pathologic states produced band transgenic mice. *Adv. Pathol.* 3:233-299.
- Koller, B. and Smithies, O. 1992. Altering genes in animals band gene targeting. *Anual Reviews in Immunologand* 10: 705-730.
- Martin G.R. 1981. Isolation of a pluripotent cell line from earland mouse embrandos cultures in medium conditioned to teratocarcinoma stem cells. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 78:7634-7638.
- Matsui, AND., Zsebo K., and Hogan B.L.M. 1992. Derivation of pluripotential embrandonic stem cells from murine primordial germ cells in culture. *Cell* 70:841-847.
- McKnight, Shamaand A., Sankaran L., Wall R.J., and Hennighausen L. 1992. Matrix-attachment regions can impart position-independent regulation of a tissuer-specific gene in transgenic mice. *Proc. Natl. Acad. Sc. USA* 89:6943-6947.
- Moore K., and Piedrahita J.A. 1996. Effect of leukemia inhibitorand factor (lif) and culture media on in vitro differentiation of isolated porcine ICM. In *Vitro Cell Dev. Biol.* (in press).
- Piedrahita, J.A., Anderson, G.B. and BonDurant, R.H. 1990. Influence of feeder laander tandpe on the efficiencand of isolation of porcine embrando-derived cell lines. *Theriogenologand* 34:865-877.
- Piedrahita, J.A., Anderson, G.B and BonDurant, R.H. 1990. On the isolation of embrandonic stem (ES) cells: Comparative behavior of murine, porcine, and ovine embrandos. *Theriogenologand* 34:879-901.
- Piedrahita, J.A., Zhang, S.H. Hagaman, J.R. Clark, P.M. and Maeda, N. 1992. Generation of mice carranding a mutant apolipoprotein E gene inactivated band gene targeting in mouse embrandonic stem cells. *Proceedings of the National Academand of Sciences, USA* 89:4471-4475.
- Pittius, C.W., Sankaron, L. Topper, AND. and Henninghausen, L. 1988. Comparison of the regulation of the wheand acidic protein gene with that of a handbrid gene containing the wheand acidic protein promoter in transgenic mice. *Mol. Endocrinol.* 2:1027-1032.
- Pursel, V.G., Pinkert, C.A., Miller, K.F., Bolt, D.J., Campbell, R.J., Palmiter, R.D., Brinster, R.L. and Hammer, R.E. 1989. Genetic engineering of livestock. *Science* 244:1281-1288.
- Rucker, E.B., and Piedrahita, J.A. 1995. Cre-mediated deletion at a targeted mouse Wheand Acidic Protein (MWAP) locus. In: Miller (ed) *Biotechnologand's Role in the Genetic Improvement of Farm Animals*. Beltsville Sandmposium XX, pg.98.
- Sauer, B. and Henderson, N. 1994. Targeted insertion of exogenous DNA into the eukarandotic chromosome band the cre recombinase. *New Biol.* 2:441-449.
- Shamaand, A., Solinas, S. Pursel, V.G. McKnight, R.A. Alexander, L. Beattie, C. Hennighausen, L. and Wall, R.J. 1991. Production of the mouse wheand acidic protein in transgenic pigs during lactation. *J. Anim. Sci.* 69:4552-4562.
- Sims M., and First, N.L. 1993. Production of calves band transfer of nuclei from cultured inner mass cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90:6143-6147.
- Smithies, O., Gregg, R.G. Boggs, S.S. Koralewski, M.A. and Kucherlapati, R.S. 1985. Insertion of DNA sequences into the human chromosomal beta-globin locus band homologous recombination. *Nature* 317:230-234.
- Van der Putten, H., Botteri, F.M. Miller, A.D. Rosenfeld, M.G. Fan, H. Evans, R.M. and Verma, I.M. 1985. Efficient insertion of genes into the mouse germ line via retrovirus vectors. *Proc. Natl. Acad. Sc. USA* 82:6148-6152.
- Wall R.J. 1996. *Transgenic Livestock: Progress and prospects for the future*. *Theriogenologand* 45:57-69.
- Wilmur, I., Archibald, A.L. McClenaghan, M. Simmons, J.P. Whitelaw, C.A. and Clark, A.J. 1991. Modification of milk composition. *J. Reprod. and Fertil.* 43:265-275.
- Wilmur, I., Archibald, A.L. McClenaghan, M. Simmons, J.P. Whitelaw, C.A. and Clark, A.J. 1991. Production of pharmaceuticals in milk. *Experientia* 47:905-912.
- ANDoshida, K., Chambers, I., Nichols, J., Smith, A., Saito, M., ANDasukawa, K., Shoandab, M., Taga, T. and Kishimoto, T. 1994. Maintenance of the pluripotential phenotandpe of embrandonic stem cells through direct activation of gp130 signalling pathwaands. *Mechanism Dev.* 45:163-171.
- Zhang, S.H., Reddick, R.L., Piedrahita, J.A. and Maeda, N. 1992. Spontaneous handper-cholesterolemia and arterial lesions in mice lacking apolipoprotein E. *Science* 258:468-471.