

ANIMALES MODIFICADOS GENÉTICAMENTE:

(I) TÉCNICAS DE OBTENCIÓN

M^a DE LOS ÁNGELES PEÑARRANDA¹, FERNANDO RSENSIO²

¹ **Doctora en Veterinaria**

² **Doctor en Veterinaria**

Hospital General Universitario Gregorio Marañón, Madrid

I. INTRODUCCIÓN

Desde el principio de los tiempos, el hombre ha intentado modificar las características de los animales domésticos intentando incrementar aquellas que mejoraban sus condiciones como animales de compañía, de producción, de trabajo o de abasto, mediante la selección de los más aptos y el cruzamiento de los ejemplares que presentaban mejores características: mayor producción de leche o carne o más fuerza y resistencia. Se seleccionaban aquellos ejemplares con características deseables, apareándolos entre sí y con su descendencia, para perpetuar los rasgos de interés, recurriendo al mestizaje cuando se advertía la aparición de características fenotípicas indeseadas debido a la consanguinidad.

Hoy en día, gracias a la reproducción asistida y a la biotecnología, se planifican y dirigen los procesos reproductivos, se transmiten los rasgos deseados y se acelera la mejora genética. El intervalo intergeneracional puede reducirse sensiblemente gracias a la combinación de la inseminación artificial, que es la más antigua y utilizada de las técnicas de reproducción asistida, con las técnicas más recientes como son: el estro sincronizado, la superovulación, la extracción de óvulos de hembras sexualmente inmaduras aun fuera de la época de cría, o la producción de embriones "in vitro" y la transferencia de embriones. Además, es posible seleccionar el sexo de la proge-

nie con semen sexado para la inseminación; se puede realizar la selección genética de individuos mediante marcadores moleculares asociados a caracteres de interés. También se puede modificar el genoma de los organismos: introduciendo genes de interés (organismos transgénicos); modificando los genes (organismos transgénicos "knockins"); o eliminando o silenciando genes concretos (organismos transgénicos "knockouts"). Y se puede llevar a cabo la clonación de animales por transferencia nuclear de células somáticas, germinales o embrionarias.

En este trabajo, y en su continuación que aparecerá en el próximo número, se pretende hacer una revisión de las técnicas de Ingeniería Genética que se emplean actualmente para la obtención de OMGs (Organismos Modificados Genéticamente), con el objetivo de explicar de una manera sencilla y clara las bases conceptuales de cada una de ellas, sus ventajas e inconvenientes y su utilidad práctica.

2. LA INGENIERÍA GENÉTICA

El enorme avance de la investigación biotecnológica en los últimos años ha favorecido el desarrollo de técnicas que permiten introducir, eliminar o modificar de forma específica un gen, o determinados tipos de genes, en el genoma de un organismo para producir seres vivos (animales, plantas y microorganismos) con nuevas y mejores características. Este tipo de técnicas, se encuadran dentro de lo que se denomina Ingeniería Genética y los seres vivos que así se obtienen son los llamados Organismos Modificados Genéticamente.

La Ingeniería Genética incluye un conjunto de métodos que permiten aislar y fraccionar el DNA, y ensamblar los fragmentos obtenidos con otras moléculas de DNA. El resulta-

En ganadería, la transgénesis ofrece un método más rápido de mejora genética que las técnicas de selección y reproducción tradicionales



Figura 1: La oveja Dolly y su primera cordera Bonnie. (Fuente: Roslin Institute).

do de estas manipulaciones se conoce como DNA recombinante y es un DNA híbrido que contiene el fragmento de DNA de interés que se desea expresar en una célula, unido a un DNA vector mediante un enlace covalente. Los genes de interés (contenidos en fragmentos de DNA) se obtienen cortándolos de su cadena de DNA originaria mediante enzimas de restricción. Posteriormente, se unen al DNA que actúa como vector mediante enzimas ligasas.

A continuación, se describen las técnicas utilizadas para la generación de animales modificados genéticamente: la transgénesis y la transferencia nuclear.

3. TRANSGÉNESIS

La transgénesis es un procedimiento biotecnológico por el que se introduce un gen foráneo (transgén) en el genoma de un ser vivo. En la transgénesis se busca que el transgén se integre en la línea germinal (gametos) de una manera estable, asegurando así que ese nuevo gen incorporado pueda ser heredado por la descendencia.

En los animales superiores, la información genética se transmite por reproducción sexual. Es lo que se conoce como transmisión genética vertical. Sin embargo, en 1981, Gordon y Ruddle demostraron la integración y transmisión estables (a través de la línea germinal) de genes inyectados en pronúcleos de cigotos de ratón obtenidos por fecundación "in vitro". Eran los primeros ratones transgénicos. Es decir, se trataba de una transmisión genética horizontal, que se denominó transgénesis.

El paso siguiente consistió en probar que también se podían obtener ratones transgénicos que incorporaran en su genoma un gen (transgén) de otra especie. Así, en 1982, Palmiter y col. obtuvieron ratones transgénicos gigantes al inyectar en el pronúcleo de un cigoto de ratón el gen de la rata que codifica la hormona del crecimiento. Incluso, estos mismos investigadores, obtuvieron también ratones transgénicos gigantes cuando el transgén introducido, que codificaba la hormona del crecimiento, era de origen humano.

Los ratones fueron los primeros animales en los que se consiguió la transgénesis

A los experimentos con ratones, siguieron los mismos procedimientos con conejos, ovejas y cerdos, en un intento de aumentar su tamaño (Hammer y col., 1985). Sin embargo, este avance no tuvo aplicación zootécnica porque la presencia del transgén modificaba la fisiología del animal transgénico, produciendo efectos colaterales perjudiciales para su desarrollo.



Los ratones fueron los primeros animales en los que se consiguió la transgénesis

En ganadería, la transgénesis ofrece un método más rápido de mejora genética que las técnicas de selección y reproducción tradicionales. Permite la introducción de genes nuevos y deseables en los animales domésticos sin tener que recurrir al cruzamiento entre los mismos.

Un transgén es una construcción de ácido desoxirribonucleico (DNA) que contiene: una secuencia que codifica una proteína específica que es la que aporta la mejora genética deseada (exón); una región que confiere a esta secuencia la capacidad de expresarse de forma ubicua o en tejidos específicos (promotor); y una serie de secuencias aisladoras y reguladoras que protegen y modulan la expresión del gen introducido. Para conseguir una buena expresión del gen de interés, es necesario incluir todas las secuencias que modulan su expresión, de manera que se necesita un vector que admita grandes transgenes. Para ello, se han desarrollado los transgenes genómicos, basados en cromosomas artificiales de levaduras y bacterias, que son capaces de transportar grandes fragmentos de DNA

en los que se pueden incluir todos los elementos reguladores del gen. Estos transgenes son los YACs y los BACs (cromosomas artificiales de levaduras y cromosomas artificiales de bacterias, respectivamente)

De las técnicas utilizadas para la producción de animales transgénicos, es decir, para introducir el transgén en el genoma, destacan las siguientes:

- Microinyección pronuclear de transgenes en pronúcleos de óvulos fertilizados (cigotos).
- Vectores virales, que transfectan las células integrando



Ratón "nude" (desnudo), modificado genéticamente.

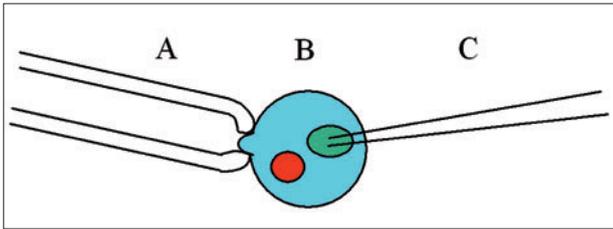


Figura 2. Microinyección de DNA en ovocito fertilizado. A) pipeta de sujeción; B) ovocito fertilizado en el que se evidencian los dos pronúcleos (rojo y verde); C) pipeta de inyección, a través de la cual se inyecta la solución que contiene el DNA del transgén de interés en uno de los pronúcleos.

en ellas su genoma previamente modificado (virus recombinantes).

- Transferencia de DNA exógeno mediada por espermia durante la fertilización (SMGT, "sperm-mediated gene transfer").
- Inyección, en la cavidad de blastocistos, de células madre embrionarias (ES "cells", "embryonic stem cells") y/o células germinales embrionarias (EG, embryonic germ cells"), previamente modificadas genéticamente mediante la técnica de "gene targeting".
- Transferencia nuclear (NT, "nuclear transfer") con células somáticas, ES o EG que previamente han sido modificadas genéticamente.

También se puede facilitar la entrada del transgén en las células mediante otras técnicas como el uso de liposomas y de la electroporación. Además, en la actualidad, están en desarrollo nuevas técnicas para generar transgénesis, como el uso de transposomas (secuencias de DNA capaces de autoreplicarse e integrarse aleatoriamente en sitios adicionales del genoma) y la tecnología del RNA interferente (RNAs de doble cadena que inhiben genes endógenos). De esta última técnica hay una animación interesante en:

<http://www.nature.com/focus/rnai/animations/animation/animation.htm>

3.1 MICROINYECCIÓN PRONUCLEAR

En esta técnica, la introducción del transgén se realiza mediante la microinyección de esta construcción de DNA en el pronúcleo de un ovocito fertilizado (figura 2). El procedimiento sería el siguiente:

- Se extraen óvulos de hembras en las que se ha inducido una superovulación y han sido fertilizadas "in vivo", o bien se fertilizan posteriormente "in vitro".
- Utilizando un microscopio, con una micropipeta, se inmoviliza el óvulo fecundado y se inyecta en uno de sus pronúcleos una solución que contiene muchas copias del transgén.
- Posteriormente, estos óvulos fecundados y microinyectados se introducen en madres receptoras, previamente sincronizadas hormonalmente, para gestarlos, aplicando la técnica de la transferencia de embriones.
- Finalmente, los recién nacidos son examinados para ver si en ellos se ha producido la incorporación del transgén.

La microinyección es un método para generar animales transgénicos muy ineficiente, debido a que conlleva la integración aleatoria del gen foráneo en el genoma receptor con las siguientes consecuencias:

- El transgén se introduce en el genoma receptor de forma aleatoria, por lo que sólo en un pequeño porcentaje se sitúa en el lugar adecuado para conseguir una buena expresión en el animal transgénico.
- No todos los animales que nacen han incorporado a su genoma el transgén (no son transgénicos, por tanto).
- El gen exógeno puede insertarse en un lugar erróneo, por ejemplo en medio de un gen del genoma receptor, interrumpiéndolo y causando su mutación y, con ello, la muerte del embrión o alteraciones en el animal transgénico nacido.
- Se produce un patrón variable de expresión del gen exógeno en la progenie transgénica, a menudo en mosaico.

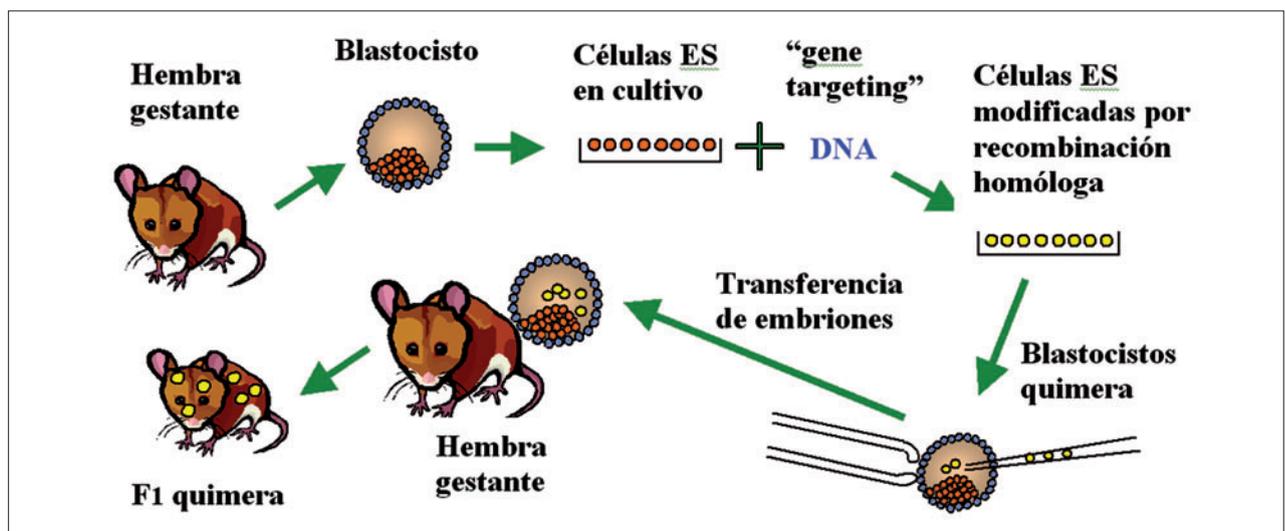


Figura 3. Técnica de "gene targeting" sobre células ES de ratón. La explicación de esta técnica de modificación dirigida del genoma viene en la página 19 del texto. El Nobel de Medicina y Fisiología de este año 2007 ha sido concedido a Martin Evans, Mario Capecchi y Oliver Smithies por sus trabajos de obtención, cultivo y manipulación genética de células ES, que les permitieron obtener el primer ratón Knockout.

- En ocasiones, el transgén microinyectado no es heredable porque no se inserta en la línea germinal del animal transgénico.
- No se pueden encontrar dos animales transgénicos fundadores con el transgén insertado en el mismo lugar, por lo cual, para conseguir animales homocigóticos para este gen exógeno sólo pueden ser fabricados mediante el cruce de los nacidos de un único animal fundador (en el caso de la vaca, la producción de una línea homocigótica a partir de un único fundador requiere alrededor de 5 años).

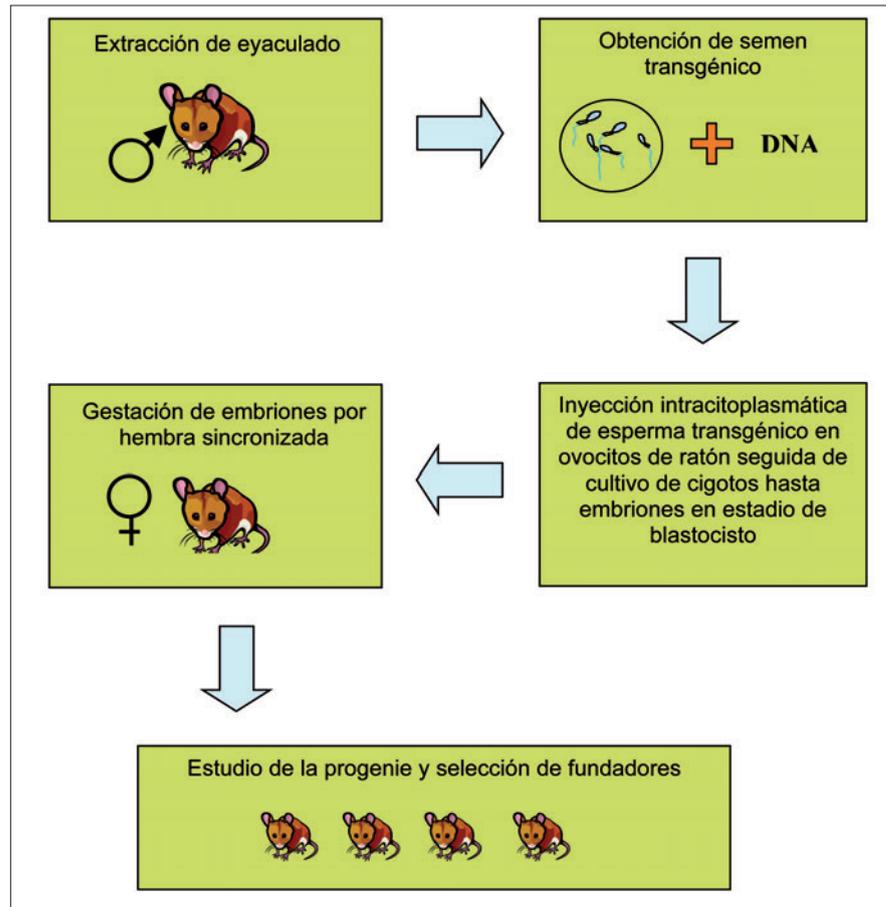


Figura 4. Producción de ratones modificados genéticamente mediante SMGT

La microinyección de DNA en cigotos es una de las técnicas más extendidas en la generación de ratones transgénicos. Sin embargo, esta técnica tiene un éxito limitado en mamíferos superiores, debido a problemas específicos inherentes y a su baja eficacia. Así, para producir un único animal fundador, son necesarios cerca de 1000 cigotos en el caso de los bóvidos, 300 cigotos en el de los óvidos y 200 en el de las cabras. Por ello, el coste de producción de animales de granja mediante microinyección pronuclear de DNA es altísimo y, en la práctica, inabordable.

3.2 VECTORES VIRALES

Un método alternativo es la transgénesis viral: el uso de virus recombinantes para introducir genes en el embrión. Los vectores retrovirales han sido estudiados extensamente para terapia génica humana. Estos vectores han demostrado transferir eficientemente genes en embriones murinos, bovinos y porcinos. Sin embargo, los retrovirus están sometidos a modificación epigenética y la expresión retroviral se corta durante la embriogénesis o es breve después del nacimiento.

Se ha conseguido una mejora sustancial con el uso de vectores derivados de lentivirus, que proceden de una familia de retrovirus complejos. Estos vectores tienen la capacidad de atravesar la membrana nuclear y alcanzar el genoma de las células, cualquiera que sea la fase del ciclo

celular en la que se encuentren, incluyendo células quiescentes y embrionarias, y cualquiera que sea el tipo celular. Los vectores lentivirales han demostrado que transducen células madre embrionarias humanas y embriones de ratón y rata pre-implantación. En el caso de los cerdos, se ha conseguido la expresión ubicua de los genes portados por vectores lentivirales en los distintos tejidos del animal y con una correlación lineal entre la expresión del transgén y el número de provirus que se ha integrado en el genoma.

En animales de granja, la eficiencia de la transgénesis con vectores lentivirales es 50 veces superior a la que se consigue con la microinyección pronuclear de DNA. Su mayor limitación es que no pueden transportar transgenes con más de 8-9 kb de DNA y, además, los sitios en los que se produce su integración de forma preferente son regiones codificantes de los genes de las células que infectan.

El procedimiento podría ser así: embriones pre-implantación son expuestos "in vitro" a soluciones concentradas de virus recombinantes (virus a los que previamente se les ha introducido el gen de interés), o son incubados sobre una monoca-

La microinyección de DNA en cigotos es una de las técnicas más extendidas en la generación de ratones transgénicos

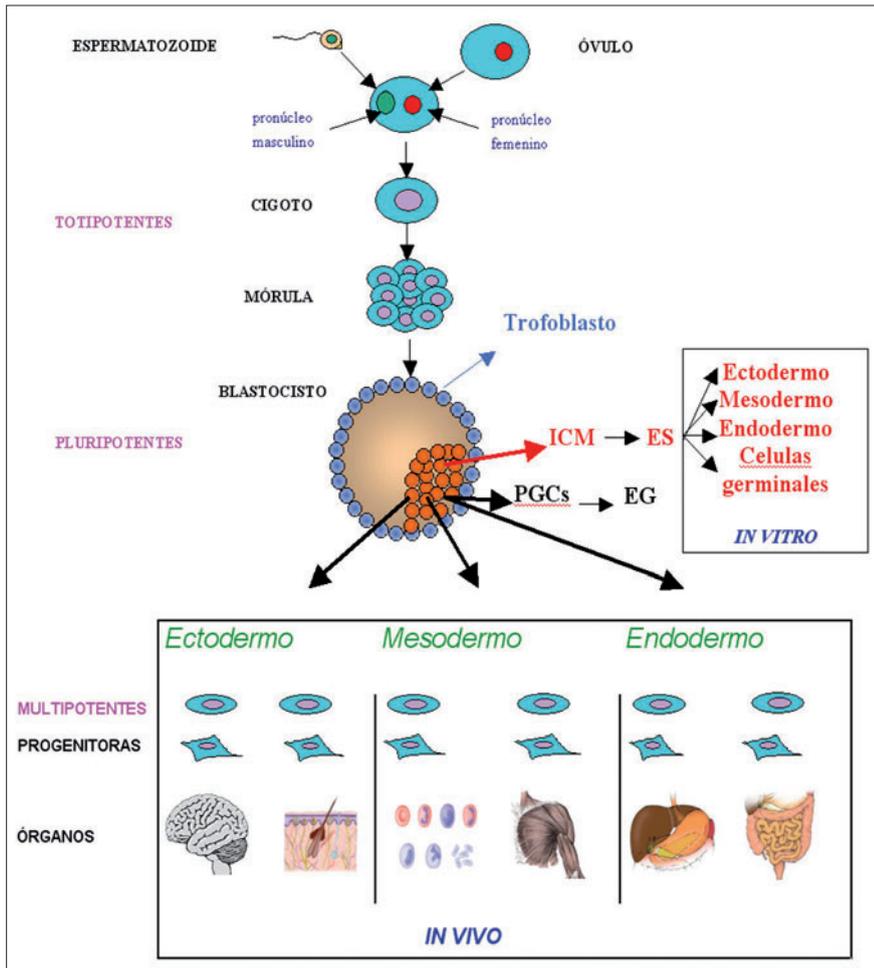


Figura 5. Origen de las células madre ("stem cells"), basado en Wobus y col., 2005

pa de células infectadas con estos virus. A continuación de la exposición a los virus, los embriones infectados "in vitro" son transferidos a hembras receptoras para completar la gestación.

3.3 TRANSFERENCIA DE GENES MEDIADA POR ESPERMA (SMGT)

Hoy en día, los métodos más extendidos para la producción de animales de granja transgénicos son: la inyección directa de DNA en uno de los pronúcleos de ovocitos fertilizados; las construcciones basadas en virus (sobre todo retrovirus) como vectores para la introducción de DNA exógeno en embriones; y la transferencia nuclear (descrita más adelante) utilizando células somáticas o embrionarias modificadas genéticamente. Todos estos métodos están afectados por una baja eficiencia, un elevado manejo y la necesidad de la manipulación de embriones en estadios tempranos del desarrollo. Además, el uso de retrovirus presenta dudas en cuanto a su seguridad.

La clonación es una tecnología que puede ser utilizada para la producción de un gran número de animales genéticamente idénticos entre si

En 1989, se describió por primera vez un nuevo método para la generación de animales transgénicos: la transferencia de genes mediada por espermatozoides de unirse e internalizar DNA exógeno que, posteriormente, podrá ser transferido al huevo durante la fertilización. Esta habilidad de los espermatozoides por capturar DNA exógeno fue descubierta en 1971 (Brackett, 1971), pero el hallazgo, con sus importantes implicaciones, fue ignorado durante cerca de 20 años.

El primer procedimiento de SMGT se realizó en un modelo de animal pequeño, el ratón, y demostró ser muy eficiente. Posteriormente, esta técnica se adaptó a grandes animales, siendo exitosa en la generación de diversas líneas de cerdos transgénicos. Se considera que la SMGT puede ser utilizada en todas las especies animales con reproducción sexual mediada por gametos, siendo una técnica de aplicación potencialmente universal.

En síntesis, la aplicación de la SMGT consiste en (figura 4):

- Obtención del eyaculado a partir de animales previamente seleccionados.
- Conversión de los espermatozoides del eyaculado en células transgénicas mediante la incubación conjunta del espermatozoides con el plásmido que contiene el DNA de interés. En este proceso se suceden las siguientes etapas: a) la unión del DNA exógeno a la superficie del espermatozoide; b) seguida de la internalización de este DNA en el espermatozoide; c) y, posteriormente, la integración del transgén en el genoma del espermatozoide (hecho que se ha demostrado que no ocurre al azar, sino en lugares concretos del genoma).
- Inseminación artificial, con el espermatozoides transgénico, de hembras previamente sincronizadas (en cerdos) o inyección intracitoplasmática de espermatozoides (ICSI, "intracytoplasmic sperm injection") transgénico en ovocitos para generar embriones que posteriormente sean transferidos a hembras sincronizadas para gestarlos (en ratones).
- Obtención de las camadas, seguida del estudio de la eficiencia de la



La segregación genética produce, a veces, diferencias en la capa. (Fuente: Roslin Institute).

transgénesis en ellas, seleccionando los animales transgénicos fundadores que serán capaces de transmitir el transgén a las sucesivas generaciones.

3.4 "GENE TARGETING"

La mayoría de las técnicas utilizadas para la introducción de DNA exógeno en células producen una integración aleatoria en el genoma celular del DNA introducido, con los consiguientes inconvenientes que se han descrito en el apartado 3.1. La técnica de "gene targeting" evita esos problemas, al generar una modificación genética dirigida, específica y controlada, basada en la introducción o en la eliminación de DNA en lugares precisos del genoma, utilizando la recombinación homóloga de esas secuencias de DNA foráneas con los genes autóctonos.

Esta técnica requiere la utilización de células madre embrionarias (ES "cells", "embryonic stem cells"), que son pluripotentes y que, una vez modificadas genéticamente, son inyectadas en blastocistos para generar embriones quimera.

En este punto, antes de seguir con el "gene targeting", conviene aclarar algunos aspectos sobre el origen de las células ES, siguiendo el esquema de la figura 5:

- El cigoto y los estadios de división celulares tempranos, hasta el estadio de mórula, son definidos como totipotentes, porque pueden generar un organismo completo.

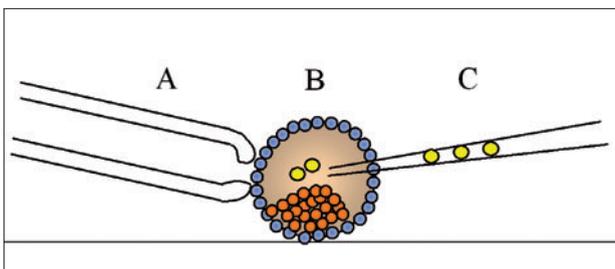


Figura 6. Inyección de células ES en blastocistos. A) pipeta de sujeción; B) blastocisto en cuya cavidad se inyectan células ES que previamente han sido modificadas genéticamente (en el dibujo son las de color amarillo); C) pipeta de inyección, a través de la cual se inyectan las células ES.

- En el estadio de blastocisto, sólo las células de la masa celular interna (ICM, "inner cell mass") son pluripotentes, es decir, mantienen la capacidad de generar las tres capas embrionarias primarias (ectodermo, mesodermo y endodermo) así como las células germinales primordiales (PGCs, "primordial germ cells") que son las células precursoras de los gametos masculinos (espermatozoides) y femeninos (óvulos). Las células ES derivan de la ICM del blastocisto y tienen la capacidad de diferenciarse "in vitro" en células de todos los linajes celulares somáticos y también en células germinales masculinas y femeninas.
- En tejidos y órganos adultos, existen células madre multipotentes y células progenitoras para reemplazar las células perdidas o dañadas. En la actualidad, se desconoce en qué medida las células madre adultas pueden transformarse en células de otros linajes (transdiferenciarse) o qué factores pueden aumentar su capacidad de diferenciación.

La tecnología de "gene targeting" necesita el establecimiento del cultivo de células ES. Estas células tienen, por una parte, la capacidad de autorenovarse en cultivo manteniendo su pluripotencialidad y, por otra, la capacidad de diferenciarse en todas las células somáticas y germinales (gametos). Por ello, las modificaciones genéticas introducidas en células ES generan individuos con gametos que llevan la modificación genética y que, por tanto, pueden generar descendencia que porte esa modificación. Una importante limitación para el uso de esta técnica es que estas células ES no se han conseguido cultivar, hasta el momento, en animales de producción. Por ello, el "gene targeting" casi sólo se realiza de forma exclusiva en ratón, especie para la que sí existen líneas de células madre embrionarias establecidas.

La técnica de "gene targeting" tiene las siguientes fases (figura 3):

- Obtención de embriones de ratón en fase de blastocistos.
- Aislamiento de células ES de los blastocistos.
- Cultivo "in vitro" de las células ES.
- Introducción de la modificación genética, mediante "gene targeting", en las células ES en cultivo.
- Selección de clones individuales de las células ES

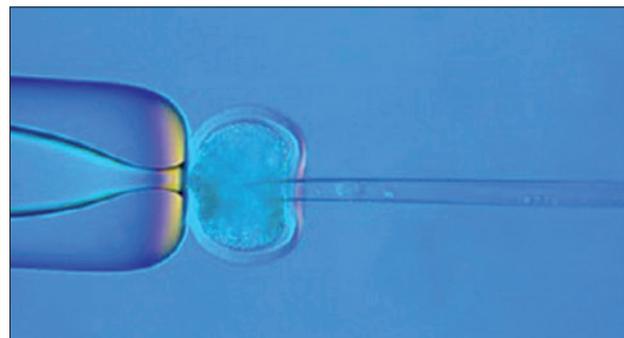


Figura 7. Enucleación de un ovocito (Fuente: Roslin Institute).

Año	Animal clonado	Procedencia células donantes de los núcleos para la transferencia nuclear	Referencia
1996	oveja	embrionaria	Campell et al., 1996
1997	oveja	fetal	Wilmut et al., 1997
	oveja (Dolly)	adultas (células de glándula mamaria)	
	mono	embrionaria	Meng et al., 1997
1998	vaca	fetal	Cibeli et al., 1998
	vaca	adulta	Kato et al., 1998
	ratón	adulta	Wakayama et al., 1998
1999	ratón	embrionaria	Wakayama et al., 1999
	cabra	fetal	Baguisi et al., 1999
2000	cerdo	adulta	Polejaeva et al., 2000
2001	muflón	adulta	Loi et al., 2001
2002	gato	adulta	Shin et al., 2002
	conejo	adulta	Chesne et al., 2002
	pez cebra	embrionaria	Lee et al., 2002
2003	rata	fetal	Zhou et al., 2003
	mulo	fetal	Wods et al., 2003
	caballo	adulta	Galli et al., 2003
2005	perro	adulta	Lee et al., 2005
2006	Hurón	adulta	Li et al., 2006

Tabla 1. Animales clonados mediante transferencia nuclear a partir de núcleos de células donantes de naturaleza embrionaria, fetal o adulta (revisado por Meissner y col., 2006).

en cultivo y realización de réplicas para mantener stock congelado a -80°C y para screening de DNA genómico.

- f) Screening de DNA genómico de los clones de células ES, para comprobar cuál ha conseguido introducir la modificación genética en el sitio deseado, así como análisis del cariotipo y de la presencia de micoplasmas.
- g) Generación de los embriones quimera: se inyectan las células ES, que portan la modificación genética deseada, en la cavidad de un blastocisto (figura 6).
- h) Transferencia de estos blastocistos resultantes, con ES modificadas y ES originales, a hembras sincronizadas para gestarlos.
- i) Estudio de las quimeras generadas (animales con dos tipos de células: algunas con la modificación genética, porque proceden de las microinyectadas en los blastocistos, y otras no).
- j) Realización de cruces entre machos y hembras heterocigotos para el gen modificado, con el fin de obtener homocigosis en dicho gen.

Los tipos de modificaciones genéticas que se pueden obtener por "gene targeting" son:

- "Knockouts" o inactivación génica. Si se bloquea la expresión de un gen concreto (eliminando un fragmento del mismo o introduciendo una mutación en su secuencia que

impida su traducción), estamos produciendo una inactivación génica y generando un animal knockout. Este animal permite estudiar qué ocurre cuando se elimina un gen concreto y, así, conocer su función.

- "Knockins": si se introduce una mutación en un gen o se sustituye un gen por otro.

En ocasiones, la modificación genética que introducimos puede causar la letalidad del embrión. Para evitarlo, se puede controlar la expresión de la modificación genética introducida en lugar y tiempo:

- "Knockouts" o "knockins" específicos de tejido. En ellos la modificación sólo se expresa en los tejidos que nos interesa, utilizando promotores específicos de tejido (por ejemplo que el gen se exprese en hígado y no en adipocitos).

- "Knockouts" o "knockins" condicionales o inducibles. En ellos controlamos el momento de la expresión de la modificación genética. Por ejemplo, una vez que el animal ya haya nacido (con lo que evitamos la posible muerte embrionaria por la modificación introducida).

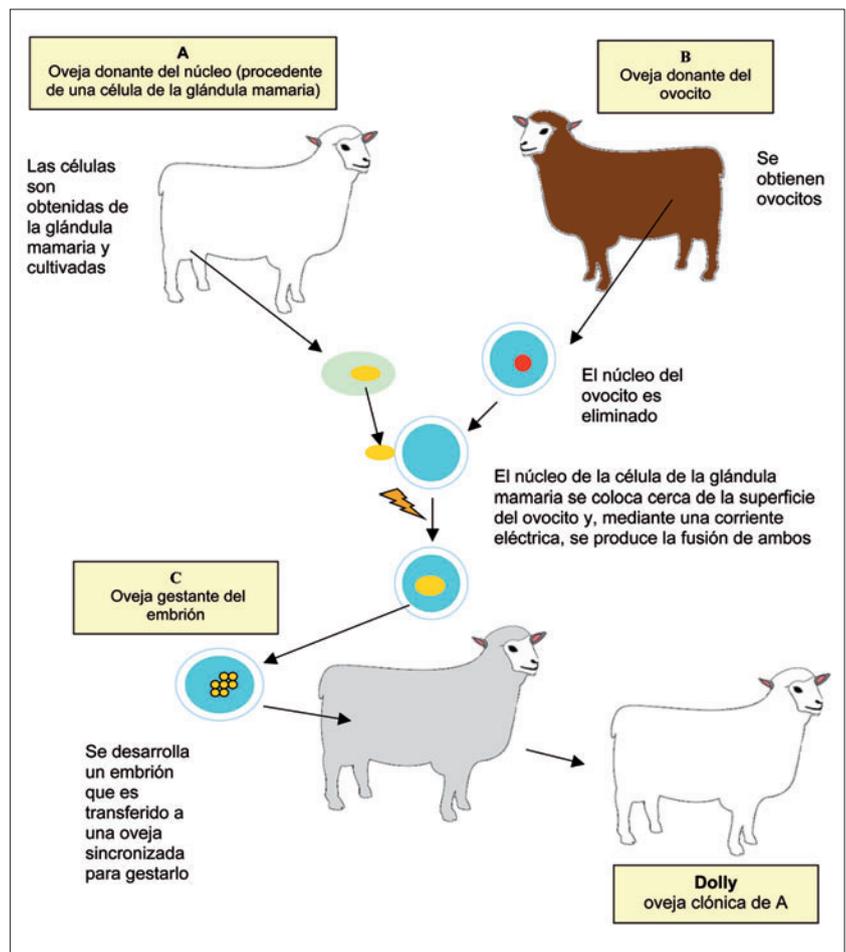


Figura 8. Esquema de la generación de Dolly (basado en EIBE, 1998)

4. TRANSFERENCIA NUCLEAR

En la transferencia nuclear (NT) se utiliza el núcleo de una célula procedente del animal que queremos clonar para introducirlo en un ovocito receptor previamente enucleado (figura 7). Este ovocito se activa eléctricamente, o por otros métodos, para que re programe al núcleo y éste comience la generación de un embrión que tendrá un 98-99% de la información genética procedente del núcleo del animal a clonar y un 1-2% procedente del DNA contenido en las mitocondrias y otras organelas presentes en el citoplasma del óvulo receptor. Consecuentemente, el organismo resultante no será un clon exacto del animal donante del núcleo.

Durante el desarrollo, el contenido genético de cada célula se mantiene, con unas pocas excepciones, idéntico al que tenía el cigoto. Por lo tanto, las células diferenciadas (adultas) poseen en su núcleo toda la información necesaria para generar un organismo completo. Esto es lo que se conoce como totipotencia nuclear. En sus inicios, la transferencia nuclear (NT) se desarrolló como un medio de comprobar, de forma experimental, este concepto de totipotencia, mediante la clonación de animales a partir de células adultas. Los núcleos de estas células adultas se reprograman con la información que hay en el citoplasma del ovocito, de manera que se silencian algunos genes y comienzan a funcionar otros, produciéndose la parada de la fase adulta para encenderse la embrionaria. Esta reprogramación permite que las células donantes de los núcleos para la NT puedan ser fetales, embrionarias o somáticas (tabla 1).

Como es posible obtener un número ilimitado de células somáticas a partir de un animal, la clonación constituye una tecnología que puede ser utilizada para la producción de un gran número de animales genéticamente idénticos entre sí (clonación reproductiva), aunque difieran en algo de su progenitor donante del núcleo. Muchos animales de granja, tales como vacas, cerdos y ovejas, han sido clonados de forma satisfactoria utilizando esta técnica. La oveja Dolly (figura 1), en 1996, fue el primer animal clonado a partir de una célula somática adulta (célula de la glándula mamaria de una oveja de 6 años, Wilmut y col., 1997, figura 8).

Las líneas celulares obtenidas a partir de células somáticas permiten la manipulación de los genomas de los animales de granja "in vitro", lo cual permite crear células transgénicas de ovejas, cerdos y vacas cuyos núcleos, posteriormente, pueden ser transferidos a un ovocito enucleado para generar un animal



Figura 9. Polly (clonada y transgénica) junto a sus hermanas (Fuente: Roslin Institute).

El coste de producción de animales de granja mediante microyección pronuclear de DNA es altísimo y, en la práctica, inabordable

transgénico mediante transferencia nuclear: clonación a partir de una célula transgénica. Polly (figura 9) es la primera oveja transgénica producida por transferencia nuclear (Schnieke y col. 1997). Fue generada a partir de fibroblastos fetales que fueron previamente modificados genéticamente mediante la adición del gen humano que codifica el factor IX de coagulación, introducido en un vector que portaba un promotor que dirigía la expresión a la glándula mamaria. Polly excretaba el factor IX de coagulación humano en su leche.

Por otra parte, si un embrión obtenido por NT de células somáticas se detiene en fase de blastocisto y de él se obtienen células ES, éstas pueden cultivarse "in vitro" para diferentes usos potenciales (clonación terapéutica): terapias de reemplazo y regeneración celular; investigación médica; e, incluso, se puede realizar la modificación genética de estas células ES para corregir un defecto genético del individuo donante.

5. GLOSARIO DE TÉRMINOS

Alelo. Cada una de las formas alternativas de un gen dado concernientes al mismo carácter. En una célula diploide, los miembros de un par alélico ocupan posiciones

correspondientes sobre un par de cromosomas homólogos. Si estos alelos son genéticamente idénticos (están en homocigosis), la célula o el organismo son homocigóticos; si son diferentes (están en heterocigosis), se trata de organismos heterocigóticos. Tres o más alelos de un gen dado constituyen una serie alelomórfica.

Blastocisto. Blástula. Fase de diferenciación embrionológica, originada a partir de la mórula, consistente en una esfera hueca formada por una sola capa de células indiferenciadas que forman el blastodermo.

Célula diploide. Célula que tiene el número normal de cromosomas característico del organismo al que pertenece (2n).

Célula germinal. Cada uno de los gametos o sus células formadoras.

Cigoto. Célula formada por fusión de los gametos. Sinónimo: huevo.

Clonación. Producción de individuos genéticamente idénticos

DNA recombinante. DNA híbrido obtenido mediante la unión covalente de un fragmento de DNA, que se desea expresar en una célula, a un DNA vector.

Enzimas de restricción. Las enzimas de restricción son endonucleasas que reconocen una secuencia entre 4-8 pares de bases en el DNA. El sitio de reconoci-

miento se llama sitio de restricción, y la enzima rompe un enlace fosfodiéster en la hebra de arriba y otro enlace fosfodiéster en la hebra complementaria.

Enzimas ligasas. Cada uno de los miembros de la clase enzimas que catalizan la unión de dos moléculas de DNA por acoplamiento, con la liberación de pirofosfato a partir de ATP.

Exón. Fragmento de DNA en los organismos superiores, capaz de expresarse en una proteína a través del sistema DNA-RNA-proteínas. Los exones se localizan en los genes, separados por otros fragmentos que no se transcriben (intrones).

Fenotipo. Expresión o manifestación externa de un genotipo en un ambiente determinado.

Gen. Fragmento de DNA que constituye la más pequeña unidad funcional.

Genoma. Conjunto de genes que especifican todos los caracteres potencialmente expresables de un organismo dado, sin connotación alguna de la naturaleza alélica de los genes integrantes.

Genotipo. Constitución genética contenida en los cromosomas de un individuo, referida a todos o a parte de los caracteres diferenciales. Por lo general, se refiere a la composición específica alélica de un gen particular o serie de genes en cada célula de un organismo, aunque puede referirse al genoma total.

Haploide. Organismo, célula o núcleo con un juego sencillo de cromosomas. El número haploide se designa por *n*. Las células reproductoras, formadas como resultado de la meiosis, son haploides. La fusión de dos de estas células restaura el número diploide normal.

Línea germinal. Conjunto de las células de un individuo que tienen la capacidad de llevar a cabo la meiosis y dar origen a gametos.

Promotor. Secuencia de DNA situada en el comienzo 5'-terminal de un gen, al que se une la RNA polimerasa para la iniciación de la transcripción.

Pronúcleo masculino. Núcleo del espermatozoide, ya introducido en el citoplasma del óvulo, y antes de que tenga lugar su fusión con el núcleo de éste.

Transgénesis. Incorporación de genes foráneos al genoma de una célula receptora.

6. BIBLIOGRAFÍA

- **Basrur PK, King WA.** Genetics then and now: breeding the best and biotechnology. *Rev Sci Tech* 2005;24(1):31-49.
- **Betthausen J, Forsberg E, Augenstein M, Childs L, Eilertsen K, Enos J, et al.** Production of cloned pigs from in vitro systems. *Nat Biotechnol*

**Polly, la primera
oveja transgénica
producida por
transferencia nuclear,
excretaba en
su leche el factor IX
de coagulación
humano**



2000;18(10):1055-9.

• **Brackett BG, Baranska W, Sawicki W, Koprowski H.** Uptake of heterologous genome by mammalian spermatozoa and its transfer to ova through fertilization. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1971;68(2):353-7.

• **Hammer RE; Pursel VG; Rexroad CE, Jr.; Wall RJ; Bolt DJ, Ebert KM; et al.** Production of transgenic rabbits, sheep and pigs by microinjection. *Nature* 1985; 315:680-683.

• **Hofmann A, Kessler B, Ewerling S, Weppert M, Vogg B, Ludwig H, et al.** Efficient transgenesis in farm animals by lentiviral vectors. *EMBO Rep* 2003;4(11):1054-60.

• **Gordon JW, Ruddle FH.** Integration and stable germ line transmission of genes injected into mouse pronuclei. *Science* 1981; 214: 1244-1246.

• **Lavitrano M, Busnelli M, Cerrito MG, Giovannoni R, Manzini S, Vargiolu A.** Sperm-mediated gene transfer. *Reprod Fertil Dev* 2006;18(1-2):19-23.

• **Meissner A, Jaenisch R.** Mammalian nuclear transfer. *Dev Dyn* 2006;235(9):2460-9.

• **Melo EO, Canavessi AM, Franco MM, Rumpf R.** Animal transgenesis: state of the art and applications. *J Appl Genet* 2007;48(1):47-61.

• **Nuno P; Fernández R; Rizos D; Ramírez M; Pérez M; Gutiérrez A;** Inadvertent transgenesis by conventional ICSI in mice. *Hum rep* 2005; 12:3313-3317.

• **Nagy AG, M; Vintersten, K; Behringer; Richard;** Manipulating the mouse embryo. A laboratory manual. *Cold spring Harbor Laboratory Press* 2003.

• **Niemann HK, W. ; Carnwath, J.W.** Transgenic farm animals: present and future. *Rev Sci Tech Off. int. Epiz.* 2005;24 (1):285-298.

• **Palmiter RD; Brinster RL; Hammer RE, Trumbauer ME; Rosenfeld MG; Bimberg NC, Evans RM.** Dramatic growth of mice that develop from eggs microinjected with metallothionein-growth hormone fusion genes. *Nature* 1982; 300: 611-615.

• **Polejaeva IA, Chen SH, Vaught TD, Page RL, Mullins J, Ball S, et al.** Cloned pigs produced by nuclear transfer from adult somatic cells. *Nature* 2000;407(6800):86-90.

• **Schnieke AE; Kind AJ; Ritchie WA, Mycock K; Scott AR, Ritchie M; Wilmut I, et al.** Human factor IX transgenic sheep produced by transfer of nuclei from transfected fetal fibroblasts. *Science* 1997; 278: 2130-2133.

• **Wilmut I, Schnieke AE, McWhir J, Kind AJ; Campbell KH.** Viable offspring derived from fetal and adult mammalian cells. *Nature* 1997; 385: 810-813.

• **Wobus AM; Boheler K;** Embryonic Stem Cells: Prospects for Developmental Biology and cell Therapy. *Physiol Rev* 2005: 635-678.