

peratura de tratamiento, indica que actuará como agente preventivo de la alteración, tanto en los tratamientos convencionales como en el rango UHT.

AGRADECIMIENTOS

Este trabajo ha sido financiado por la CICYT, proyecto ALI 93-0239.

BIBLIOGRAFÍA

1. BRIGGS, A. y YAZDANY, S. (1970). Effect of sodium chloride on the heat and radiation resistance and on the recovery of heated or irradiated spores of the genus *Bacillus*. *J. Appl. Bacteriol.* **33**, 621-632.
2. CONDON, S., ARRIZUBIETA, M.J. y SALA, F.J. (1993). Microbial heat resistance determinations by the multipoints system with the thermoresistometer TR-SC. Improvement of this methodology. *J. Microbiol. Meth.*, **18**, 357-366.
3. COOK, A.M. y GILBERT, R.J. (1969). The effect of sodium chloride on heat resistance and recovery of heated spores of *Bacillus stearothermophilus*. *J. Appl. Bacteriol.*, **32**, 96-102.
4. FEEHERRY, F.E., MUNSEY, D.T. y ROWLEY, D.B. (1987). Thermal inactivation and injury of *Bacillus stearothermophilus* spores. *Appl. Environ. Microbiol.*, **365-370**.
5. IBARZ, P., PALOP, A., CONDON, S. y SALA, F.J. (1991). Adaptación de un contador automático de U.F.C. al recuento de placas densamente pobladas. *Libro de Resúmenes del XIII Congreso Nacional de Microbiología*. pp. 159. Salamanca, España.
6. LABBE, R.G. (1979). Recovery of spores of *Bacillus stearothermophilus* from thermal injury. *J. Appl. Bacteriol.*, **47**, 457-462.
7. LOPEZ, M., MAZAS, M., GONZALEZ, I. BERNARDO, A. y GONZALEZ, J. (1994). Effect of pH and sodium chloride on the thermal resistance of *Bacillus stearothermophilus* spores. *Microbiol. Alim. Nutr.*, **12**, 317-322.
8. LOPEZ, M., GONZALEZ, I., MAZAS, M. y BERNARDO, A. (1994). Efecto del contenido en calcio del medio de subcultivo sobre la recuperación de los esporos de *Bacillus stearothermophilus* tratados por el calor. *IX Congreso de Microbiología de los Alimentos*. p. 77. Lérida, España.
9. McKENZIE, H.A. y DAWSON, R.M.C. (1969). pH, buffers and physiological media. En: Data for biochemical research. pp 475-508. R.M.C. Dawson, D.C. Elliot, W.H. Elliot and K.M. Jones (Ed.). Oxford at the Clarendon Press, Oxford.
10. STEEL, R.G. y TORRIE, J.H. (1960). *Principles and procedures of statistics*. New York: Mcgraw-Hill Book Company.
11. ZECHMAN, L.G. y PFLUGG, I.J. (1991) *Bacillus stearothermophilus* spore recovery altered by media concentration and formulation. *J. Food Sci.*, **56**, 1408-1414.

PRODUCCIÓN ANIMAL Y TECNOLOGÍA DEL ADN ANIMAL PRODUCTION AND DNA TECHNOLOGY

J.M. Castro*

H. Sandoval**

Palabras clave: Marcadores moleculares, animales transgénicos, bioreactores, ovino.
Key words: Molecular markers, transgenic animals, bioreactors, ovine.

SUMMARY

Current limits for the possible role of biotechnology in animal production seem to be advancing further than what is ethically acceptable. In all areas of animal production, modern molecular genetics techniques find application. This review is an overview of the potential of modern biotechnology in animal production with special focus in sheep and goat production traits and animal health.

RESUMEN

Los límites en la aplicación de la biotecnología en producción animal, parecen avanzar mas allá de lo éticamente aceptable. Las modernas técnicas de Biología Molecular, están encontrando aplicación en todas las áreas de la producción animal. Esta revisión es una visión global del potencial que ofrece la moderna biotecnología en la Producción animal, con un énfasis especial en ganado ovino y caprino.

INTRODUCCIÓN

El desarrollo de nuevas tecnologías de Genética Molecular a la producción animal, se ha comenzado a aplicar en la presente década, y sin duda, será un tema cotidiano para un gran número de investigadores. Ya hoy en día, muchos de ellos, persiguen el aislamiento e identificación de marcadores de ADN que puedan estar asociados, o ligados a genes de importancia en producción o en la resistencia a enfermedades. Por este motivo se habla hoy de las técnicas "MAS", o selección asistida,

* Dpto. Ecología, Genética y Microbiología. Universidad de León.

** Estación Agrícola Experimental. CSIC. León.

An. Fac. Vet. León. 1994-96, 39, 81-97

mediante el uso de marcadores, con el objeto de acelerar y aumentar la precisión de los programas de selección.

El objetivo de este artículo es describir algunas contribuciones que la tecnología del ADN aporta, o puede aportar, a la producción animal, haciendo un cierto énfasis en el ganado ovino y caprino. Se recogen dos grandes apartados:

1. Los marcadores moleculares en producción/sanidad animal
2. Los animales transgénicos y su uso como bioreactores

MARCADORES MOLECULARES

Los cambios ocasionales que ocurren en la secuencia de los genes, pueden manifestarse en forma de enfermedad. Es ya clásico, el ejemplo del gen de la globina humana, gen muy conservado entre los mamíferos, y que presenta las características comunes a los genes eucarióticos, es decir, exones o secuencias codificantes e intrones. Hay mutaciones en este gen que producen, por ejemplo, la β -talasemia, pero esos cambios pueden pasar desapercibidos si no hay alteración de la secuencia de aminoácidos de la proteína, o si el cambio no es relevante para su funcionalidad. Sin embargo, esa mutación genera un nuevo alelo, o si se prefiere, se genera polimorfismo en ese gen. Aunque el polimorfismo puede generarse en regiones no codificantes del ADN, (la mayoría de hecho), es en todo caso heredable según las leyes de la genética mendeliana. Los diferentes alelos de un gen, ofrecen distintos patrones de restricción, según las combinaciones que se presenten en cada individuo. Los polimorfismos pueden usarse como marcadores útiles si están ligados a una región concreta del genoma como, por ejemplo, un gen defectuoso, o un gen de interés en producción animal, y su detección en un individuo es indicativo de que dicho individuo también ha heredado el gen defectuoso, o el alelo interesante en producción animal.

Las técnicas más conocidas basadas en el uso de marcadores para el análisis de polimorfismos, son la técnica de RFLP o polimorfismo en el tamaño de los fragmentos de restricción; la técnica de PCR o reacción en cadena de la polimerasa, la cual a su vez, tiene variantes como la técnica AS-PCR (amplificación específica de alelo); la técnica RAPD (ADN polimórfico amplificado al azar) o la PCR-RFLP, como combinación de las técnicas PCR y RFLP. Finalmente la técnica de Southern es un método de transferencia de ADN a membranas, e hibridación con sondas marcadas para la detección de secuencias específicas.

En cualquier caso, el polimorfismo es resultado de cambios genéticos, debidos a mutaciones que afectan a un par de bases, y a deleciones o inserciones de varios nucleótidos en la secuencia, o bien, debido a la presencia de secuencias altamente repetidas (microsatélites y minisatélites). Los microsatélites son repeticiones en un número variable de dinucleótidos, como por ejemplo, TG o CA, flanqueados por secuencias constantes. Estos microsatélites están presentes normalmente, aunque no siempre, en intrones. Los minisatélites son regiones que poseen un núcleo ("core"), de decenas o centenas de pares de bases, y que se repite en un número variable de veces. La Tabla 1 muestra el tipo de variación y el método de detección que puede usarse en el estudio de los polimorfismos.

TABLA 1. TÉCNICAS UTILIZADAS PARA LA DETECCIÓN DE POLIMORFISMOS DE ADN

TIPO DE POLIMORFISMO	TIPO DE VARIACIÓN	MÉTODO DE DETECCIÓN
Mutación puntual	Un nucleótido	RFLP-PCR, AS-PCR, RAPD
Inserciones/ Deleciones	Varios nucleótidos	RFLP-PCR, AS-PCR, RAPD
Microsatélites	Dinucleótidos repetidos	RFLP-PCR PCR
Minisatélites	Decenas/Centenas de nucleótidos repetidos	RFLP/Southern blot

La técnica RFLP consiste en la digestión del genoma con endonucleasas de restricción, que generan fragmentos de diferente tamaño, de ahí el nombre de la técnica (polimorfismo en el tamaño de los fragmentos de restricción). El polimorfismo aparece por la ausencia o presencia de una diana o secuencia específica reconocida por la enzima. La técnica no está exenta de problemas. La cantidad de material genético presente en diversos organismos, aumenta obviamente de acuerdo con su complejidad, hasta llegar a los mamíferos, así por ejemplo, una simple célula ovina tiene un contenido de unas 3000 Mb (la bacteria *E. coli* tiene "apenas" 4 Mb) estando repartido ese ADN en 27 pares de cromosomas (30 en caprino). Esta complejidad, hace necesario restringir el ensayo mediante el uso de sondas de ADN homólogas, a una región concreta del genoma. Para ello, se utiliza la técnica de Southern, en la cual se transfiere, a partir del gel de electroforesis en el que se han resuelto los fragmentos resultantes de la digestión, el ADN de cada banda resultante a una membrana. El ADN que se hace monocatenario, mediante tratamiento por calor, queda adherido a la membrana y se hibrida con dicha sonda, con el fin de detectar solamente aquellas bandas cuyo ADN tenga homología con la secuencia usada como sonda. La sonda debe estar marcada, bien radioactivamente o de forma no isotópica, para su posterior detección por autorradiografía. Se obtiene así una distribución discreta de fragmentos que permite su análisis.

Esta huella dactilar genética, puede aplicarse como método de identificación en especies de interés económico, de hecho, debería incluirse como requisito en el establecimiento de pruebas de paternidad y en los registros genealógicos e intercambios de material genético vivo, semen o embriones. Los métodos clásicos, se han basado en polimorfismos bioquímicos y grupos sanguíneos, pero hoy sabemos que esto puede ser insuficiente debido, por ejemplo, a la existencia de mutaciones silenciosas, además las proteínas representan a menos del 10% del genoma. La alternativa más fiable, es el análisis del polimorfismo del ADN, técnica que podría llegar a ser obli-

gatoria, en un futuro cada vez menos lejano. La tecnología puede aplicarse no sólo a la identificación genética y la determinación de parentesco o consanguinidad, sino también en el estudio y conservación de la diversidad genética, mediante la detección de individuos cuyos RFLPs sean muy diferentes del resto, y que por tanto aumenten la variabilidad. La variabilidad adquiere una importancia enorme cuando lo que se pretende, es incrementar la adaptabilidad o la resistencia a condiciones ambientales diversas.

La segunda técnica básica para la detección de polimorfismos genéticos, es la técnica de PCR. Ésta consiste en una amplificación, en tubo de ensayo, de un segmento de ADN por acción de una polimerasa termoestable que copia la secuencia comprendida entre dos primers o secuencias oligonucleotídicas, situados a ambos extremos del fragmento a amplificar. Cada ciclo de PCR consiste en tres pasos: Desnaturalización térmica del ADN molde, anillamiento a una temperatura inferior de los primers y polimerización con la enzima. Se genera así, una amplificación exponencial del número de copias del fragmento deseado, por ejemplo, 40 ciclos de amplificación de una secuencia generan aproximadamente un billón de copias. Dicho fragmento puede ahora resolverse y purificarse mediante electroforesis en geles de agarosa o poliacrilamida. Esta técnica se está adoptando cada día más, y a buen seguro, será de uso rutinario en los próximos años en diversos campos de la producción animal. La Tabla 2 recoge algunos ejemplos de polimorfismos estudiados en ganado ovino y/o caprino. Se han escogido, aquellos descritos en la literatura, que pueden tener mayor influencia en producción animal, como los relacionados con factores de crecimiento, de producción de leche y lana o de resistencia y/o susceptibilidad a enfermedades.

TABLA 2. EJEMPLOS DE POLIMORFISMOS ESTUDIADOS EN GANADO OVINO POR TÉCNICAS DE RFLP y/o PCR

Enzima de restricción	Característica analizada/locus
<i>PvuII</i>	Hormona del crecimiento ³⁹
<i>BglII</i>	Factor de crecimiento semejante a insulina ²⁴
<i>EcoRI</i>	Factor miogénico ²⁵
Varias	β -lactoglobulina ³³
<i>BsrI</i>	Proteína b2c de la lana ³⁰
<i>MspI</i>	Filamento intermedio de la queratina ³¹
<i>TaqI-PvuII</i>	Asociación entre genes MHC II y el pedero ¹⁷
Varias	Espaciador RNAr en <i>Trichostrongilus spp</i> ⁴¹
Varias	Distinción cepas de <i>Haemonchus contortus</i> ³²

La técnica PCR tiene variantes que conviene reseñar. En cuanto al objetivo de este artículo, una de las más interesantes es la técnica PCR-RFLP, combinación de las dos grandes técnicas comentadas anteriormente. En esencia, consiste en la amplificación de un fragmento, que se digiere con enzimas, para detectar polimorfismos

ocasionados por la ausencia o presencia de una diana o secuencia específica reconocida por dichas enzimas. Otra variante, es la amplificación específica de alelo o AS-RFLP en la que al menos, uno de los iniciadores discrimina el lugar donde la secuencia entre los alelos es diferente, o la técnica de RAPD, en este caso se usa un solo primer, corto y no específico, de modo que se generan típicamente, no uno, sino 10 ó 20 fragmentos. Los polimorfismos, resultan de la diferencia de secuencia en los sitios homólogos al iniciador en los diferentes individuos, lo que se visualiza por la presencia o ausencia de alguna de las bandas.

GENOTIPO DE PROTEÍNAS LÁCTEAS

De especial interés y actualidad, resulta la aportación de la Genética Molecular al estudio de las proteínas lácteas. Una de las características de la leche como fluido biológico, es su alto contenido proteico, que determina en gran medida su valor nutritivo y tecnológico. En la leche de rumiantes, existen al menos 6 proteínas principales que representan el 90% del total y que pueden clasificarse en dos grandes grupos, las caseínas, en torno al 80% y las proteínas séricas, α -lactoalbúmina y β -lactoglobulina. Se conoce aún muy poco sobre los variantes presentes en ovino o caprino, y hasta el momento, se refieren fundamentalmente al estudio de la frecuencia de polimorfismos en el gen de la caseína caprina α S1, así como algunas lactoproteínas ovinas. En la Tabla 3, se muestra el efecto que los distintos genotipos de las proteínas lácteas en bovino, tienen sobre las propiedades tecnológicas de la leche, como la obtención de una cuajada consistente en la variante C de la α 1-Cn, una mayor sensibilidad a renina en la variante B de la β caseína, o una mayor termoresistencia en la variante A de la β -lactoglobulina.

TABLA 3. EFECTO DEL TIPO DE LACTOPROTEÍNA SOBRE LAS CARACTERÍSTICAS DE LA LECHE

PROTEÍNA	VARIANTE	CARACTERÍSTICAS RESEÑABLES
Alfa 1-Cn	C	Cuajada consistente. Óptima para queso Difícil procesamiento.
Beta-Cn	B	Menor tiempo coagulación. Mayor rendimiento.
Kappa-Cn	B	Mayor cantidad K-Cn. Micelas pequeñas. Mayor termoestabilidad y rendimiento.
Beta-Lg	A	Más apta para consumo. Menos grasa. Mayor termoresistencia.

Podemos fijarnos, a modo de ejemplo, en la κ -Cn bovina que es la única κ -Cn, cuyo gen está totalmente secuenciado hasta el momento. Las variantes A y B de este gen difieren, en dos posiciones aminoacídicas debido a sustituciones nucleotídicas. Un cambio de adenina por citosina en la posición 148 correspondiente al aminoácido

aspártico (GAT), crea ahora un codón que codifica para alanina (GCT) en la variante B, generando además, un sitio de reconocimiento para la endonucleasa de restricción *HindIII* (5'-AAGCTT 3'), que no está presente en A. Se presenta así, un polimorfismo en el tamaño de los fragmentos de restricción producidos por esta enzima. Teniendo en cuenta la existencia de variaciones simples en la secuencia, y utilizando la técnica de PCR-RFLP, se han desarrollado métodos para identificar de forma rápida y precisa, el genotipo de cualquier individuo, a partir de células nucleadas presentes en muestras de semen, sangre e incluso leche. El mismo abordaje, puede hacerse en ovino y caprino, pues la posibilidad de tener sondas de origen bovino permite, con relativa facilidad, localizar y estudiar RLPFs ovinos sin necesidad de secuenciar el gen correspondiente²⁰. Ya se sabe, que en al menos parte de los genes lácteos, las regiones promotoras y las que codifican para el péptido líder, se encuentran muy conservadas. Conviene recordar aquí, que obtener el genotipo de moruecos por la metodología clásica, mediante el análisis de muchas muestras de leche de pares de madre-hija, puede tardar una media superior a los tres años, lo que limita su uso en programas de mejora, sin embargo, este problema puede resolverse, mediante el genotipado de los machos, utilizando la técnica descrita por ejemplo, para la κ -caseína ovina, que ya se conoce, o aplicada para otras proteínas lácteas.

SEXAJE

La identificación del sexo, por ejemplo de embriones, es una técnica que ya está bien establecida por su rapidez y precisión. Se ha localizado al menos un gen, candidato para ser usado como diana de ADN en esta determinación. El gen ZFY ("zinc-finger" o dedo de zinc), codifica para una proteína reguladora que une zinc, y que se localiza en el brazo corto del cromosoma Y. Un gen homólogo presente en el cromosoma X denominado ZFX, presenta hibridación cruzada con ZFY. Existe ya un método que usa la técnica PCR para amplificar fragmentos de los genes ZFX y ZFY, a partir de ADN genómico de machos y hembras de ganado ovino y caprino para determinar su sexo¹. La técnica, consiste en el uso de iniciadores deducidos a partir de secuencias conservadas de dichos genes, en hombre y ratón. Usando esos dos iniciadores, se ha podido amplificar un fragmento de unos 445 pares de bases, tanto en machos como en hembras de ovino y caprino. Por hibridación con una sonda apropiada, se ha confirmado la identidad del fragmento amplificado. La digestión de dicho fragmento con *SacI*, discrimina entre machos y hembras. En otras palabras, ZFY no es digerido por la enzima mientras que ZFX si lo es, lo que permite el sexaje con una prueba sencilla.

El sexaje de embriones presenta un gran beneficio económico por ejemplo, en los programas de transferencia, o en los programas de pluriovulación y trasplante de embriones. En el primer caso, tiene especial relevancia en el sector lechero. Al obtener gestaciones del sexo femenino, el número de partos necesarios para obtener el mismo número de hembras será el 50%. Por otro lado, la transferencia es hoy, el sistema más seguro para importar y transferir genética. Cabe la posibilidad, si la legislación lo permite, de crear bancos de embriones sexados como método de conservación de razas en peligro de extinción y para preservar, en definitiva, la diversidad genética.

DIAGNÓSTICO DE ENFERMEDADES

La posibilidad de encontrar marcadores moleculares asociados con una determinada enfermedad, ya sea de origen genético o bien producida por organismos infecciosos o parásitos, permite hoy, hacer diagnóstico molecular por análisis del ADN. En no pocos casos, éste ha sido un primer paso para la caracterización directa del gen responsable de la anomalía, y el estudio de su función. Podemos citar como ejemplo, un gen que curiosamente siendo responsable de una hipertrofia muscular en oveja, es sin embargo, una característica deseable en producción animal, nos referimos al gen del "hermoso trasero" o "callipyge" (CLPG), que afecta a la eficiencia de producción y calidad de la carne. Este gen tiene una herencia autosómica y dominante, de manera que los individuos homocigotos presentan una mayor masa muscular, del orden del 30%, sobre todo en el cuarto trasero, así como un 8% menos de grasa. La característica tiene un gran potencial, en cuanto a poder modificar la composición de la carne de ovino. En este sentido, se ha identificado un marcador de tipo microsatélite, ligado a dicho gen, lo que permitirá estudiar este carácter y facilitar su introducción en otras poblaciones ovinas. Cabe mencionar aquí, que ya se conoce, que este carácter fenotípico, es producto de la acción de genes diferentes a los presentes en bovino o cerdo, donde también se presenta.

La técnica de PCR se ha utilizado en el diagnóstico de diversas enfermedades de etiología bacteriana vírica o parasitaria (Tabla 4). En todos los casos el diagnóstico se basa en el uso de iniciadores específicos con la técnica de PCR.

TABLA 4. TECNOLOGÍA DEL ADN APLICADA AL DIAGNÓSTICO DE ENFERMEDADES OVINAS Y/O CAPRINAS

ETIOLOGÍA	AGENTE	ENFERMEDAD
Bacteriana	<i>Dichelobacter nodosus</i>	Pedero ¹⁰
	<i>Chlamydia psitacci</i>	Abortos ³⁸
	Enterotoxinas de <i>E. coli</i>	Diarreas ⁴²
	<i>M. paratuberculosis</i>	Tuberculosis ⁸
Vírica	RSV	Respiratorio sincitial ²³
	Lentivirus caprino	Artritis-encefalitis ⁴⁴
	Lentivirus ovino	Maedi-Visna ⁴⁴
	Hespesvirus ovino 2 (OHV-2) BTV	Fiebre catarral maligna ¹ Lengua azul ^{2,19}
Parasitaria	<i>Trichostrongylus colubriformis</i>	Trichostrongilosis ¹¹
	<i>Haemonchus contortus</i>	Helmintosis ¹¹
	<i>Toxoplasma gondii</i>	Aborto ⁴⁰
	<i>Echinococcus granulosus</i>	Helmintosis ^{4,15}

Una parte de los iniciadores se ha diseñado tras el estudio de secuencias que se repiten en el genoma, por ejemplo, en secuencias correspondientes a genes que codifican para ARN ribosomal. La lista incluye agentes como *Dichelobacter nodosus* (antiguamente *Bacteroides nodosus*), responsable del pedero, enfermedad muy frecuente en el ganado ovino, o como especies del género bacteriano *Chlamydia*, que junto a parásitos del género *Toxoplasma*, suelen ser causantes de abortos. En el caso de las enfermedades víricas, los iniciadores se basan obviamente, en secuencias específicas de cada virus para discriminar por ejemplo, entre los lentivirus responsables de la artritis encefalitis caprina, y el virus Maedi-Visna que comparten entre sí, un alto grado de homología a nivel de sus ácidos nucleicos. También, se recogen algunas enfermedades parasitarias producidas por nematodos (*Trychostrongylus*, *Haemonchus*), y cestodos (*Echinococcus*). Una enfermedad de interés más reciente, es el "scrapie" o tembladera, que pertenece al grupo de enfermedades conocidas como encefalopatías transmisibles espongiiformes, pues parece confirmada su capacidad de transmisión, entre distintas especies animales, por los priones, partículas proteináceas infecciosas, codificadas por genes que también están presentes en individuos sanos. Una posible línea de trabajo, es amplificar por PCR este gen en diversas razas ovinas¹⁶, especialmente aquellas más resistentes, y tras su secuenciación y análisis, seleccionar individuos no susceptibles.

ANIMALES TRANSGÉNICOS Y SU USO COMO BIOREACTORES

Un animal transgénico es aquel que se le ha introducido un gen exógeno, (o transgen), a fin de mejorar o cambiar características existentes, o bien introducir nuevos caracteres. Lo que se pretende, mediante ingeniería genética, es aislar y clonar un gen determinado de origen diverso, e introducirlo en el genoma de la misma, o de otra especie, durante las primeras etapas del desarrollo, para que pueda así ser transmitido a la descendencia. Posteriormente, se analiza la expresión de ese gen en el desarrollo de los individuos, y los efectos que comporta tal manipulación y con ello, las posibilidades de aplicación. La potencialidad de la aplicación de los animales transgénicos, abarca muchos campos, aunque se podría hablar de dos grandes áreas: En la primera se trata de aplicaciones básicas, como el estudio del mecanismo de expresión y regulación génica, la producción de modelos para el estudio de enfermedades genéticas, o el estudio de mutaciones causadas por inserción. En estos casos, el animal de elección es el ratón, debido a su coste económico y el tiempo necesario para obtener resultados. La segunda área tendría un efecto sobre la producción animal, en este caso, puede incluirse el incremento de la productividad, potenciando genes endógenos, bien por un incremento cuantitativo, bien por una mejora cualitativa del producto animal. También se incluye en esta área, la producción de nuevas funciones, introduciendo genes exógenos que produzcan proteínas de interés, o que confieran resistencia a enfermedades. Antes de comentar algunos ejemplos, conviene recordar, que para la obtención de un animal transgénico son necesarias varias etapas:

1. Elección y aislamiento del gen deseado
2. Clonación en un vector apropiado

3. Introducción en el animal
4. Expresión correcta del gen
5. Transmisión del gen a la descendencia

La elección del gen supone conocer éste, tanto en su parte estructural como en su parte reguladora, pues esta última va a determinar cuánto, cómo y dónde se va a expresar. En numerosas ocasiones, ambas partes están formando lo que se denomina genes de fusión, es decir, la parte reguladora y el gen estructural, tienen diferentes orígenes, incluso pueden provenir de diferentes especies. Conviene resaltar el hecho, de que el lugar donde se va a expresar una determinada proteína, depende esencialmente, aunque con matices importantes, de la secuencia(s) situada(s) corriente arriba del gen estructural para dicha proteína. Por esta razón, la mayoría de los genes de fusión interesantes, utilizan una secuencia reguladora correspondiente a una lactoproteína, asegurando así su expresión en glándula mamaria. Ejemplos de genes de fusión, (en los que no necesariamente alguna de las partes es de origen ovino), introducidos como transgenes en oveja, se recogen en la Tabla 5.

TABLA 5. TRANSGENES DE FUSIÓN INTRODUCIDOS EN OVEJA

PROMOTOR	GEN ESTRUCTURAL
Metalotioneína de ratón	Hormona humana del crecimiento ¹⁸
"	Hormona bovina del crecimiento y factor liberador de la hormona ²⁶
Metalotioneína ovina	Hormona ovina del crecimiento ²¹
Transferrina de ratón	Hormona bovina del crecimiento ²⁷
Seroalbúmina de ratón	Hormona humana del crecimiento ²⁷
Proteína acídica del suero de ratón	Superóxido dismutasa humano ¹⁴
β-lactoglobulina ovina	Factor VIII de coagulación humano ^{22,26}
"	Factor IX de coagulación humano ^{6,35}
"	Alfa-1 antitripsina humana ^{6,35}
"	Activador del plasminógeno tisular ³⁷
"	Superóxido dismutasa humano ¹⁴

Desde el momento, en el que en 1982 se presentó la imagen del primer ratón transgénico, se ha intentado desarrollar diversas técnicas, para la introducción de genes en células de distintas especies animales. Estas técnicas, hacen uso de herramientas como los vectores, (plásmidos, virus, transposones, espermatozoides), las células totipotentes, la transferencia biolística (o método del bombardeo con partículas de ADN), o la microinyección de ADN en pronúcleos o núcleos embrionarios. Sin embargo, y a pesar de este despliegue técnico, el método que hasta ahora ha mostrado alguna utilidad en animales vivos, en producción animal, es la microinyección. La técnica fue descubierta ya hace 20 años, y aplicada poco más tarde con éxito en oocitos de rana. En embriones de mamífero se utilizó por primera vez en 1980, y en 1985 se consiguieron las primeras ovejas transgénicas. El método consiste, en inyectar diariamente, unas pocas copias de ADN que contenga el gen foráneo (1-200 copias). Se fija el embrión con una micropipeta de vacío por un extremo, mientras que por el

extremo contrario, se perfora la membrana pelúcida y el citoplasma (con ayuda de una micropipeta), en cada núcleo de las células de un embrión temprano, o más normalmente en uno de los núcleos haploides (pronúcleos), antes de su fusión, o en una etapa temprana de desarrollo del cigoto, ya que si se hace en estadíos más avanzados, aumentaría la probabilidad de aparición de individuos mosaico (constituídos por células con gen integrado y otros sin él), además, ese método nos aseguraría que dicho gen va a formar parte del genoma de las células sexuales y por lo tanto, se transmitiría a la descendencia, algo que por razones éticas, obvias, no está permitido en humano.

La microinyección, junto al desarrollo de la técnica de transferencia de embriones, constituyen la tecnología clave, que permite a los ganaderos multiplicar las características genéticas de los animales de granja, especialmente destacados, bien por su productividad, por su resistencia a las enfermedades o por su rusticidad. Puede provocarse la superovulación en hembras, mediante la inyección de hormonas, los óvulos producidos son entonces, susceptibles de ser fecundados fuera del útero y microinyectados con ADN exógeno, produciéndose embriones transgénicos que son reimplantados en "madres de alquiler". Si el embrión alcanza el estadio de mórula, se puede mezclar o fusionar con la mórula de otro animal, para obtener una quimera (ser que comparte tejidos de dos especies diferentes). Esto se ha conseguido, entre oveja y cabra, generando una "ovicabra", que comparte características de ambas especies. Pero la mórula, puede también diseccionarse con un utensilio adecuado, para dar lugar a varios animales clónicos idénticos. Es ya clásica, la imagen de algunos propietarios americanos de explotaciones agropecuarias, que son especialistas en transferencia de embriones, sosteniendo la foto de la madre de alquiler que gestó a varios terneros, fecundados "in vitro" e hijos genéticos de campeones.

Las condiciones usadas para el cultivo "in vitro" de oocitos y embriones son aún pobres, aproximaciones al ambiente natural presente en oviducto y útero, sin embargo, lo cierto es que en estos últimos años, se ha sofisticado la técnica hasta el punto de permitir su cultivo el tiempo suficiente, unos días, como para que se formen blastocitos (de 64-128 células). En esta etapa, puede mediante microdissección, hacerse una biopsia embrionaria (bastan aproximadamente 20 células), para determinar el sexo e identificar aquellos embriones que sean transgénicos, lo que reduce de forma muy considerable el esfuerzo posterior.

La ventaja del método de microinyección, es que no existen limitaciones en el tamaño del fragmento de ADN a introducir, y que los animales transgénicos se obtienen en la primera generación. La desventaja, es que la integración de tales fragmentos en el genoma, es preferentemente al azar, si además, consideramos que no sólo se integra una copia del gen, sino un número variable, puede producirse una inactivación insercional de algún gen, un mecanismo bien conocido en procariontes. Otra posibilidad, aunque remota, es que se activen funciones perjudiciales, por ejemplo, oncogenes. Por lo demás, la eficacia del método es, según la bibliografía, del orden del 1% en ovejas. Hasta el momento, es la única técnica usada con éxito para la obtención de animales transgénicos, en especies ganaderas. Para evitar la inserción al azar, se está desarrollando una técnica, que consiste en que el gen exógeno reconozca uno endógeno, y por un fenómeno de recombinación homóloga sea sustituido

por él. Queda no obstante, mucho por hacer para conseguir una técnica infalible de "gene targeting" o dirección asistida del gen. Sin embargo, con esta técnica puede guiarse la expresión de un transgen, si se tienen las construcciones genéticas adecuadas, en tejidos específicos. Tenemos así un biorreactor. Los fluidos biológicos como sangre o leche, y posiblemente los órganos de animales transgénicos, son a priori las mejores fuentes de proteínas recombinantes. La sangre es abundante y es un subproducto del matadero, sin embargo, su composición es relativamente compleja y las proteínas recombinantes pueden alterar la salud de los animales. La leche es muy abundante y su composición es relativamente simple, es pobre en enzimas proteolíticas y además, puede colectarse fácilmente. Los órganos, serían adecuados solamente, cuando lo que se requiere es un tipo particular de célula, para la biosíntesis de proteínas recombinantes. En resumen, la leche es hoy por hoy, la mejor fuente de proteínas recombinantes a partir de animales transgénicos. El método no obstante, tiene dos limitaciones teóricas: En primer lugar, algunas de las proteínas secretadas en leche pueden no haber sido procesadas correctamente, de igual modo que ocurre de forma natural. Hasta ahora, los experimentos realizados, indican que la célula mamaria es capaz de glicosilar de modo correcto las proteínas. En segundo lugar, una proporción significativa de las proteínas recombinantes, migran desde el compartimento alveolar de la glándula mamaria a circulación sanguínea, con los posibles riesgos que esto conlleva. Como se ha comentado anteriormente, los transgenes deben contener las regiones regulatorias (promotor, péptido líder), de uno de los genes para proteínas de la leche, y la parte codificante del gen que se pretende expresar, de modo que se secreten por la glándula mamaria¹³. Ello es de gran interés, si consideramos que ovejas y cabras pueden llegar a los 250 y 800 litros, respectivamente, de leche al año, y que las nuevas proteínas pueden producirse a niveles de gramos por litro de leche.

Hasta el momento, y a pesar de todas las dificultades que presenta la obtención de transgénicos, podemos recordar el primer ejemplo práctico. La Compañía Bayer, compró hace algún tiempo, los derechos exclusivos de la leche de una oveja llamada Tracy, por unos 1800 millones de pesetas. Esta oveja transgénica, proporciona en su leche, una notable cantidad de α -antitripsina⁵ (usada en el tratamiento del enfisema pulmonar, contra la fibrosis quística y en determinados fallos hepáticos). Una oveja semejante ha sido capaz de producir factor IX de coagulación, factor necesario en el tratamiento de ciertos casos de hemofilia. También, se ha obtenido una cabra transgénica en la Universidad de Massachusetts, que produce en su leche un activador del plasminógeno tisular (tPA), que es capaz de diluir los coágulos presentes de las arterias coronarias que causan el infarto. Si bien, en el último caso, los resultados no han sido tan espectaculares como en el anterior, en cuanto a rendimiento, sin embargo, ya hay compañías biotecnológicas que ofrecen, entre sus servicios, la posibilidad de expresar una proteína de interés en estos animales. Por otro lado, existen proyectos, uno de los cuales ha sido financiado por la CEE, que intentan cambiar la composición de lípidos de los animales de consumo, introduciendo en su genoma el gen de una enzima como la Δ -12 desaturasa, procedente de levaduras, así se podría teóricamente, esperar un nivel mayor de grasas poliinsaturadas (que no tienen el mismo efecto negativo sobre el sistema cardiovascular que las grasas saturadas),

abundantes en la carne y en la mantequilla, que son responsables de la arterioesclerosis y de su consecuencia, el infarto de miocardio. En la actualidad, existe ya una base de datos llamada TBASE⁴³, que proporciona información sobre los animales transgénicos, utilizando recursos de los laboratorios nacionales de Oak Ridge y de la Universidad John Hopkins.

A pesar, de que los avances más relevantes se han concentrado en la utilización de la glándula mamaria como bioreactor, no hay que olvidar la gran complejidad biológica, la mayor de la naturaleza, que tiene un mamífero como sujeto de modificación genética. Este hecho, conlleva una gran dificultad a nivel genético para caracterizar y manipular los genes implicados en la producción animal (carne, leche, lana), que suelen ser cuantitativos, es decir múltiples o de naturaleza poligénica. Sin embargo, se pueden anticipar avances, en el campo de la producción animal ovina y caprina en relación con diversas características de interés. Algunos posibles usos de ovejas y cabras transgénicas se recogen en la Tabla 6.

TABLA 6. POSIBLES USOS DE OVEJAS Y CABRAS TRANSGÉNICAS EN PRODUCCIÓN Y SANIDAD ANIMAL*

TRANSGEN	CARACTERÍSTICA
Boroolla (Feb B)	Prolificidad
Celulasa	Transgénesis de la flora ruminal
Síntesis de aminoácidos esenciales	"
Reconducción del flujo de hidrógeno	Menor formación de metano
Citoquinas diversas	Resistencia a enfermedades
Diversas proteínas víricas	"
ARNm antisentido del ARNm vírico	"
Quitinasa	Digestión cutícula de insectos
β-galactosidasa	Leche sin lactosa
ARNm antisentido de la ilactoalbúmina	"
Queratina	Incremento de lana
Cys E/Cys M (serina/cisteína)	"

* Datos extraídos en su mayoría del trabajo de Robinson y McEvoy²⁹

Uno de los factores que influyen decisivamente en la productividad del ganado ovino, es el número de corderos nacidos vivos. Se han descrito varios genes, que influyen sobre la prolificidad ovina. El gen Boroolla (Fec B) en ganado merino, es el más estudiado. Este gen puede considerarse como "transgen natural" y por lo tanto, cabe esperar que sea el objetivo de un programa de transgénesis, para aumentar la tasa de ovulación. Puede interesar, no modificar el animal en sí, sino la flora de su rumen, en este sentido, ya se están realizando experimentos de introducción de genes, con actividad celulasa, en diversas especies del género *Bacteroides*, que forman parte de la flora presente en el intestino, de modo que, es cuestión de tiempo, que una transferencia similar se consiga con microorganismos del rumen. Un objetivo específico de los biólogos moleculares del rumen, es la creación de una cepa de

Prevotella ruminicola, que sea celulolítica y ácido tolerante, como medio para combatir los efectos inhibidores de la administración de concentrados, sobre la digestión de la fibra y la incorporación de forraje. Otros objetivos, se dirigen hacia el incremento en la producción de aminoácidos esenciales, así como en la reconducción del flujo de hidrógeno para reducir la formación de metano. Hay algunas evidencias de que la población de bacterias transgénicas en el rumen permanece estable, es decir, compete con el resto de bacterias.

Una dimensión importante en la producción animal, es la resistencia a enfermedades. Durante los últimos años, se han clonado diversas citoquinas ovinas, como varias interleucinas³⁴, interferón, factor α de la necrosis tumoral y el factor estimulador del crecimiento de granulocitos/macrófagos³⁹, entre otros, lo que ha abierto el camino para el uso de los ADN's correspondientes, y de las proteínas codificadas por ellos, como sondas de diagnóstico y agentes profilácticos/terapéuticos, respectivamente. Una aplicación más sutil de la transferencia genética en relación con la prevención de enfermedades, tiene que ver con el hecho, de que la expresión de genes que codifican para proteínas de la envoltura o de la cápsida de virus dañinos, puede reducir, por un mecanismo de competitividad, la unión de los viriones a las proteínas receptoras del animal susceptible. Este abordaje, se ha usado para producir ovejas transgénicas resistentes al lentivirus Visna, agente responsable de encefalitis, neumonía y artritis en la población ovina⁷. Con el mismo objetivo, pueden fabricarse transgénicos que expresen genes para ARNm antisentido del ARNm vírico, o genes para quitinasa, con el fin de que el animal exprese en su piel esta actividad y ataque la cutícula de larvas de insectos dañinos. Conseguir leche sin lactosa, es posible si se logra expresar la β-galactosidasa de origen bacteriano, o un gen ARNm antisentido del ARNm de la α-lactoalbúmina. También, será posible, incrementar la cantidad de lana, insertando genes de queratina, o dos genes que convierten serina en cisteína, aminoácido limitante de la producción³⁶. Ya se ha conseguido la expresión de esos genes, procedentes de *Salmonella*, en células animales ovinas. Es cuestión de tiempo que se consiga en el animal entero.

El uso de animales transgénicos puede tener riesgos^{12,28}. Uno de los casos más ilustrativos, es el de la inserción de genes reguladores del crecimiento en ovejas transgénicas, que eran genes de fusión, conteniendo por un lado, promotores diseñados para la expresión en diversos tejidos como riñón, hígado o intestino, y por otro, los genes de la hormona del crecimiento ovina, o el factor de liberación de dicha hormona. La expresión de dichos genes, produjo una canal con menor contenido en grasa, pero con aparición de diabetes, produciéndose la muerte de los animales a la edad de un año. Otras publicaciones, resaltaron efectos positivos de incremento de masa muscular y crecimiento acelerado, en contradicción con los resultados previos, sin embargo, los resultados resaltan la necesidad de regular adecuadamente la expresión de los genes insertados mediante, por ejemplo, el uso de genes marcadores o "reporter", como el gen de la β-galactosidasa, cuya expresión confiere un fenotipo azul característico en los tejidos donde se expresa.

Los genes pueden dirigirse para su expresión en tejidos específicos, pero se necesita conocer mejor los genes a transferir, así como, el control por el hombre del tiempo y del tejido donde ese gen debe expresarse.

Hay un conocimiento escaso de los genes que tienen influencia en el crecimiento animal, la adaptación ambiental, la composición de la carne o la leche, o la resistencia a enfermedades¹¹. Su identificación se facilitará debido al creciente esfuerzo por mapear el genoma de los animales domésticos. Según datos extruídos de la base de datos GeneBank/EMBL, se han detectado hasta ahora cerca de 200 marcadores ovinos o caprinos, de modo que la densidad de conocimientos sobre el mapa genético ovino, es unas 100 veces menor que la que se posee del mapa humano o de ratón, o 3 veces menor que los mapas porcino o bovino. Sin embargo, se está confirmando que muchos genes se encuentran relativamente conservados, como cabía esperar, en su secuencia de nucleótidos entre especies, y en su disposición en el genoma, hecho que simplifica enormemente el trabajo. Una novedad reseñable de interés en producción animal, se basa en el aislamiento del gen "obeso"⁴⁵, uno de los genes que regula el balance energético. Mutaciones en este gen, producen en ratón obesidad y diabetes de tipo II. El producto del gen, puede ser un factor de saciedad que permita al tejido adiposo regular el depósito de grasa en el cuerpo. El gen parece estar conservado e híbrida entre otros con el ADN de oveja. También, es cuestión de tiempo, que este estudio se aplique en varias especies de interés. La última novedad, se acaba de publicar en la revista Nature⁴¹, sobre la transferencia de núcleos derivados de células de epitelio mamario, fibroblasto fetal y células embrionarias en ovocitos enucleados y no fertilizados, en un trabajo dirigido por el Dr. Ian Wilmut en el Instituto Roslin de Edimburgo. El hecho de que la ya mundialmente famosa oveja Dolly sea "hija" de una célula adulta, confirma que la diferenciación de esa célula no implica, según los autores, una modificación irreversible del material genético requerido para que ocurra el desarrollo.

Las consecuencias de todo tipo que los últimos hallazgos conllevan, prometen ser objeto de discusiones acaloradas en los próximos años. En conclusión, nadie duda ya, que estas nuevas tecnologías prometen cambiar drásticamente la producción animal en las próximas décadas.

BIBLIOGRAFÍA

1. AASEN, E.; MEDRANO, F. Amplification of the zfy and zfx genes for sex identification in humans, cattle, sheep and goats. (1990). *Biotechnology*. **8**:1279-1281.
2. AKITA, G.Y.; GLENN, J.; CASTRO, A.E.; OSBURN, B.I. (1993). Detection of bluetongue virus in clinical samples by polymerase chain reaction. *J. Vet. Diag. Invest.* **5**:2, 154-158.
3. BAXTER, S.I.F.; POW, Y.; BRIDGEN, A.; REID, H.W. (1993). PCR detection of the sheep associated agent of malignant catarrhal fever. *Arch. Virol.* **133**: 1/2, 145-159.
4. BOWLES, J.; MCMANUS, D.P. (1993). Rapid discrimination of *Echinococcus* species and strains using a polymerase chain reaction-based RFLP method. *Mol. Biochem. Parasitol.* **57**:2, 231-239.

5. CARVER, A.S.; DALRYMPLE, M.A.; WRIGHT, G.; COTTOM, D.S.; REEVES, D.B.; GIBSON, Y.H.; KEENAN, J.L.; BARRASS, J.D.; SCOTT, A.R.; COLMAN, A.; GARNER, Y. (1993). Transgenic livestock as bioreactors: stable expression of human alpha-1-antitrypsin by a flock of sheep. *Biotechnology*. **11**:1263-1271.
6. CLARK, A.J. Transgenic animals and the manipulation of milk composition. *Anim. Gen.* **20**:3, 327-328.
7. CLEMENTS, J.E.; WALL, R.J.; NARAYAN, O.; HAUER, D.; SCHOBORG, R.; SHEFFER, D.; POWELL, A.; CARRUTH, L.M.; ZINK, M.C.; REXROAD, C.E. (1994). Development of transgenic sheep that express the visna virus envelope gene. *Virology*. **200** (2): 370-380.
8. COLLINS, D.M.; HILBINK, F.; WEST, D.M.; HOSIE, B.D.; COOKE, M.M.; LISLE, G.W.; De-LISLE, G.W. (1993). Investigation of *Mycobacterium paratuberculosis* in sheep by faecal culture, DNA characterization and the polymerase chain reaction. *Vet. Rec.* **133**: 24, 599-600.
9. FIRST, N.L. (1990). New animal breeding techniques and their application. *J. Reprod. fertil. Suppl.* **41**: 3-14.
10. FONTAINE, S. LA; EGERTON, J.R.; ROOD, J.I.; LA-FONTAINE, S. (1993). Detection of *Dichelobacter nodosus* using species specific oligonucleotides as PCR primers. *Vet. Microbiol.* **35**:1/2, 101-117.
11. GASSER, R.B.; CHILTON, N.B.; HOSTE, H.; STEVENSON, L.A. (1994). Species identification of trichostrongyle nematodes by PCR-linked RFLP. *Int. J. Parasitol.* **24**:2, 291-293.
12. GRAHAM, N.M.; MARGAN, D.E. (1988). Energy and nitrogen utilization in growth hormone transgenic sheep. *Pro. Nutr. Soc. Australia.* **13**. 151.
13. GROENEN, M.A.M.; VAN DER POEL, J. (1994). Regulation of expression of milk protein: a review. En: *Livestock Production Science* **38**:61-78.
14. HANSSON, L.; EDLUND, M.; EDLUND, A.; JOHANSSON, T.; MARKLUND, S.L.; FROMM, S.; STROMQVIST, M.; TORNELL, J. (1994). Expression and characterization of biologically active human extracellular superoxide dismutase in milk of transgenic mice. *J. Biol. Chem.* **269** (7): 5358-5363.
15. HOPE, M.; BOWLES, J.; MCMANUS, D.P. (1991). A reconsideration of the *Echinococcus granulosus* strain situation in Australia following RFLP analysis of cystic material. *Int. J. Parasitol.* **21**:4, 471-475.
16. LAPLANCHE, J.L.; CHATELAIN, J.; WESTWAY, D.; THOMAS, S.; DUSSAUCY, M.; BRUGERE-PICOUX, J.; LAUNAY, J.M. (1993). PrP polymorphisms associated with natural scrapie discovered by denaturing gradient gel electrophoresis. *Genomics.* **15**: 1, 30-37.
17. LITCHFIELD, A.M.; RAADSMA, H.W.; HULME, A.D.; BROWN, S.C.; NICHOLAS, F.W.; EGERTON, J.R. (1993). Disease resistance in Merino sheep. II. RFLP in class II MHC and their association with resistance to footrot. *J. An. Breeding Gen.* **110**:5, 321-334..

18. LOWELL-BADGE, R.H. (1985). Transgenic animals. New advances in the field. *Nature*, **315**: 6021, 628.
19. MACLACHLAN, N.J.; NUNAMAKER, R.A.; KATZ, J.B.; SAWYER, M.M.; AKITA, G.Y.; OSBURN, B.I.; TABACHNICK, W.J. (1994). Detection of blue-tongue virus in the blood of inoculated calves: virus isolation, PCR assay and in vitro feeding of *Culicoides variipennis*. *Arch. Virol.* **136**: 1/2, 1-8.
20. MONTGOMERY, G.W.; SISE, J.A.; PENTY, J.M.; TOU, H.M.; HILL, D.F. (1992). Sheep linkage mapping: restriction fragment length polymorphism detection with heterologous cDNA probes. *Animal Gen.* **23**: 5, 411-416.
21. MURRAY, J.D.; NANCARROW, C.D.; MARSHALL, J.T.; HAZELTON, I.G.; WARD, K.A. (1989). Production of transgenic merino sheep by microinjection of ovine metallothionein-ovine growth hormone fusion genes. *Reprod. Fertil. dev.* **1**(2): 147-155.
22. NIEMANN, H.; PAUL, HALTER, R.; CARNWATH, J.; ESPANION, G.; HERRMANN, D.; LEMME, E.; D. (1993). Strategies to express factor VIII gene constructs in the ovine mammary gland. *Proc. Ann. Conf. Int. Embryo Transfer Soc.* Ed. por Neemann, H. *Theriogenology*. **39**: 137-149.
23. OBERST, R.D.; HAYS, M.P.; EVERMANN, J.F.; KELLING, C.L. (1993). Characteristic differences in reverse transcription-polymerase chain reaction products of ovine, bovine, and human respiratory syncytial viruses. *J. Vet. Diag. Invest.* **5**:3, 322-328.
24. OHLSEN, S.M.; DEAN, D.M.; WONG, E.A. (1993). Characterization of multiple transcription initiation sites of the ovine insulin growth factor-Y gene and expression profiles of three alternatively spliced transcripts. *DNA Cell Biol.* **12**:3, 243-251.
25. PHUA, S.H.; WOOD, N.J. (1993). The myogenic factor 5 (MYF5) locus in sheep carries a rare EcoRI RFLP. *Animal Gen.* **24**: 3, 220.
26. PURSEL, V.G.; REXROAD, C.E. Jr; BOLT, D.J.; MILLER, K.F.; WALL, R.J.; HAMMER, R.E.; PINKERT, C.A.; PALMITER, R.D.; BRINSTER, R.L. (1987). Progress on gene transfer in farm animals. *Vet. Immunol. Immunopathol.* **17** (1-4): 303-312.
27. REXROAD, C.E. Jr. (1991). Production of sheep transgenic for growth hormone genes. *Biotechnology*. **16**: 259-263.
28. REXROAD, C.E. JR.; HAMMER, R.E.; BEHRINGER, R.R.; PALMITER, R.D.; BRINSTER, R.L. (1990). Insertion, expression and physiology of growth-regulating genes in ruminants. *J. Reprod. Fertil. Suppl.* **41**: 119-124.
29. ROBINSON, J.J.; McEVOY, T.G. (1993). Biotechnology-the possibilities. *Anim. Prod.* **57**: 335-352.
30. ROGERS, G.R.; HICKFORD, J.G.; BICKERSTAFFE, R.; WOODS, J.L. (1993a). BsrI RFLP in the gene for the ovine B2C high-sulphur wool protein. *Animal Gen.* **24**:1, 69.
31. ROGERS, G.R.; HICKFORD, J.G.; BICKERSTAFFE, R. (1993b). MspI RFLP in the gene for a type Y intermediate filament wool keratin. *Anim. Gen.* **24**:3, 218.
32. ROOS, M.H.; GRANT, W.N. (1993). Species-specific PCR for the parasitic nematodes *Haemonchus contortus* and *Trichostrongylus colubriformis*. *Int. J. Parasitol.* **23**:3, 419-421.
33. SCHLEE, P.; ROTTMANN, O. Sheep beta-lactoglobulin: determination of alleles A and B by PCR and RFLP analysis using plucked hair as a source of DNA. En: *Genetic conservation of domestic livestock*. Vol. 2. Ed. by Alderson, L.; Bodo, I. 243-246.
34. SEOW, H.F.; ROTHEL, J.S.; WOOD, P.R. (1993). Cloning and sequencing an ovine interleukin-4-encoding cDNA. *Gene*. **124**: 2, 291-293.
35. SIMONS, J.P.; WILMUT, I.; CLARK, A.J.; ARCHIVALD, A.L.; BISHOP, J.O.; LATHE, R. (1988). Gene transfer into sheep. *Biotechnology*. **6**: 2, 179-183.
36. SIVAPRASAD, A.V.; KUCZEK, E.S.; BAWDEN, C.S.; ROGERS, G.E. (1992). Coexpression of the cysE and cysM genes of *Salmonella typhimurium* in mammalian cells: a step towards establishing cysteine biosynthesis in sheep by transgenesis. *Transgenic-Res.* **1**(2): 79-92.
37. THERRE, H. (1991). Mammary gland with added value. *Biofutur*. **107**, 55-58.
38. THIELE, D.; WITTENBRINK, M.M.; FISCHER, D.; KRAUSS, H. (1992). Evaluation of the polymerase chain reaction (PCR) for detection of *Chlamydia psittaci* in abortion material from ewes. *Zentral. Bakt.* **277**:4, 446-453.
39. VALINSKY, A.; SHANI, M.; GOOTWINE, E. (1990). Restriction fragment length polymorphism in sheep at the growth hormone locus is the result of variation in gene number. *Animal Biotechnol.* **1**:2, 135-144.
40. WASTLING, J.M.; NICOLL, S.; BUXTON, D. (1993). Comparison of two gene amplification methods for the detection of *Toxoplasma gondii* in experimentally infected sheep. *J. Med. Microbiol.* **38**: 5, 360-365.
41. WILMUT, I.; SCHNIEKE, A.E.; McWHIR, J.; KIND, A.J.; CAMPBELL, K.H.S. (1997). Viable offspring derived from fetal and adult mammalian cells. *Nature*. **385**: 810-813.
42. WOODWARD, M.J.; CARROLL, P.J.; WRAY, C. (1992). Detection of enterotoxin and verocytotoxin genes in *E. coli* from diarrhoeal disease in animals using the polymerase chain reaction. *Vet Microbiol.* **31**:2-3, 251-261.
43. WOYCHIK, R.P.; WASSOM, J.S.; KINGSBURY, D. (1993). TBASE: a computerized database for transgenic animals and targeted mutations. *Nature*, **363**:375-376.
44. ZANONI, R.G.; NAUTA, I.M.; KUHNERT, P.; PAULI, U.; POHL, B.; PETERHANS, E. (1992). Genomic heterogeneity of small ruminant lentiviruses detected by PCR. *Vet. Microbiol.* **33**:1-4, 341-351.
45. ZHANG, Y.; PROENCA, R.; MAFFEI, M.; BARONE, M.; LEOPOLD, L.; FRIEDMAN, J.M. (1994). Positional cloning of the mouse obese gene and its human homologue. *Nature*. **372**:425-431.