

BIOTECNOLOGÍA ANIMAL

Transgénesis en animales de granja

Margarita M. Marqués, Marta F. Baro, Silvia Nicolás, Yolanda Bayón

Instituto de Desarrollo Ganadero y Sanidad Animal y Dpto. de Producción Animal, Facultad de Veterinaria, Campus de Vegazana s/n, 24071 León.

La transgénesis en animales de granja ha experimentado una importante evolución desde sus inicios en la década de los años 80. La eficiencia de las técnicas ha aumentado considerablemente y, a las primeras experiencias llevadas a cabo mediante microinyección pronuclear en el cigoto, le han seguido otras metodologías como la transferencia nuclear de células somáticas, que ha tenido particular importancia en estas especies domésticas. Además, en los últimos años, se han desarrollado herramientas de edición del genoma que permiten una alta especificidad en la modificación genética. Entre las numerosas aplicaciones de los animales transgénicos, se encuentra la producción de proteínas de uso terapéutico humano. También, cabe destacar las investigaciones con objeto de generar animales modificados genéticamente para ser utilizados como modelos de enfermedades humanas, o bien destinados a proporcionar órganos para xenotrasplante. Además, en el ámbito estricto de la Producción Animal se está explorando la utilización de la transgénesis para incrementar la resistencia de los animales a enfermedades o mejorar la cantidad y calidad de sus productos.

Palabras clave:

Biotecnología, metodologías, modificación genética, animales domésticos, aplicaciones

La Biotecnología Animal agrupa un conjunto de tecnologías que aplican la potencialidad de las células y organismos animales, mediante su modificación selectiva y programada, a la obtención de productos, bienes y servicios. Uno de los aspectos centrales de esta disciplina está constituido por las técnicas de transgénesis. En sentido amplio, el término transgénesis hace referencia a los procedimientos que permiten alterar el genoma, de forma permanente, mediante adición, delección o modificación de genes específicos.

Los primeros animales transgénicos se generaron en el año 1980, cuando Jon Gordon y colaboradores demostraron que un DNA exógeno podía ser introducido en el genoma del ratón mediante la microinyección directa de una solución de DNA en el cigoto (Gordon et al., 1980). Posteriormente, estos autores

probaron que el DNA introducido se transmitía a la descendencia y, un año más tarde, Palmiter et al. (1982) conseguían modificar el fenotipo de los animales, expresando el gen de la hormona del crecimiento y obteniendo ratones con tasas de crecimiento muy superiores a las normales. Estas publicaciones no sólo atrajeron gran interés internacional, sino que motivaron el inicio de investigaciones similares en especies de interés ganadero. De este modo, en 1985, se publicaba el primer trabajo sobre conejos, ovejas y cerdos transgénicos, que tenían insertado en su genoma el gen humano de la hormona de crecimiento (Hammer et al., 1985).

Un animal transgénico presenta una modificación genética heredable. Para conseguir este objetivo, el transgén debe ser transferido al embrión, de forma directa (microinyección), o a través de los gametos. Es lo que denominaremos transgénesis en embriones. De modo alternativo, el DNA puede ser introducido en células somáticas en cultivo que, posteriormente, contribuirán al desarrollo del nuevo animal.

Transgénesis en embriones

La primera técnica utilizada para la generación de animales transgénicos (microinyección pronuclear, **Fig. 1**) implica la inyección directa del transgén en uno de los pronúcleos del cigoto que, seguidamente, es transferido a una hembra receptora “pseudogestante”. Una de sus principales limitaciones es la baja eficiencia, que desciende por debajo del 5% cuando se trata de animales de granja.



Figura 1. Microinyección pronuclear. Imagen cortesía del Dr. Johannes Wilbertz (Instituto Karolinska, Suecia) a través de la *International Society for Transgenic Technologies* (ISTT).

Por este motivo, se acogió con gran interés la utilización de nuevas herramientas para la transferencia génica en embriones, como el empleo de genomas virales modificados, convertidos en vectores portadores del transgén. Entre estos vectores destacan los lentivirus, que pueden inyectarse en el espacio perivitelino del cigoto, o bien en el oocito para después realizar fecundación *in vitro*. Con este tipo de vectores se han generado, entre otros, cerdos, pollos y vacas transgénicos con elevada eficiencia (Park, 2007).

Existen otras alternativas para la transgénesis en embriones en animales de granja, como son la transferencia génica mediada por espermatozoides

combinada con la inyección intracitoplasmática del espermatozoides (SMGT-ICSI) o la utilización de transposones (Ivics et al., 2014).

Los transposones (*Sleeping Beauty*, *piggyBac*, etc.) son secuencias de DNA capaces de moverse a lo largo del genoma, característica que se aprovecha para utilizarlos como vectores, preparando construcciones “transposón + transgén”, que se microinyectan en los embriones, al tiempo que se suministra la transposasa (**Fig. 2**).

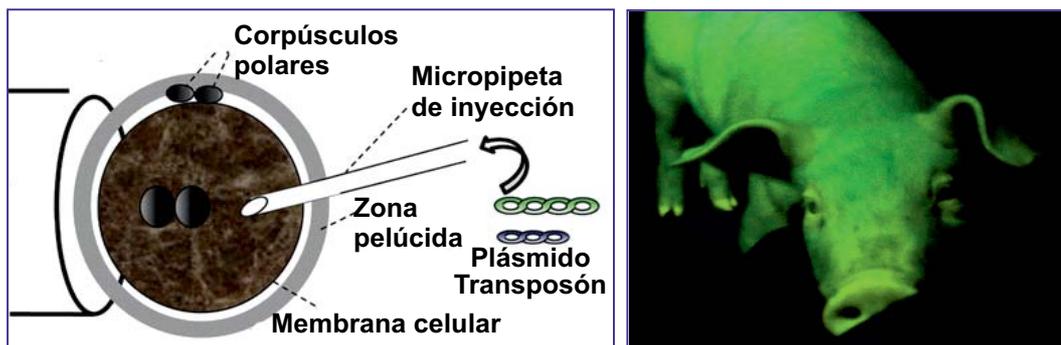


Figura 2. Transgénesis mediada por transposones. Esquema de la inyección de la construcción “transposón+transgén” y del vector de expresión para la transposasa en el cigoto (izda.). Cerdo transgénico que expresa la proteína fluorescente *Venus*, generado con el transposón *Sleeping Beauty* (dcha.) (Ivics et al., 2014).

Los procedimientos descritos presentan las siguientes limitaciones:

- No es posible generar animales en los que se ha inactivado un gen de forma específica (*knock-out* o KO): el DNA sólo puede ser añadido.
- No existe control sobre el número de copias que se integran ni sobre el lugar de integración del transgén, por lo que no hay garantía de que el animal transgénico fundador y su descendencia expresen unos niveles adecuados del gen. Además, las integraciones múltiples al azar tienen la desventaja de incrementar la probabilidad de efectos secundarios no deseados, causados por la activación de oncogenes o por mutagénesis insercional.
- Pueden originarse animales mosaico si el transgén no se incorpora durante la primera división celular. Este fenómeno es más frecuente en animales de granja.

Estas limitaciones impulsaron el desarrollo de tecnologías basadas en la utilización de células para la generación de animales transgénicos.

Transgénesis en células somáticas y Transferencia Nuclear

Coincidiendo con el desarrollo de la tecnología de microinyección pronuclear, Evans y Kaufman (1981) establecieron el cultivo de células troncales o células madre embrionarias (células *stem*, ES), a partir de la masa celular

interna de blastocistos murinos. Las características únicas de estas células (capacidad de auto-renovación y pluripotencialidad), junto con la posibilidad de manipular su genoma de manera específica utilizando el mecanismo de recombinación homóloga o *gene targeting*, han revolucionado el estudio de la función génica (Capecchi, 2005), dando lugar, a lo largo de los últimos 25 años, a la aparición de multitud de modelos animales murinos.

Sin embargo, en animales de granja, los numerosos intentos de derivar células ES han resultado infructuosos y, aunque algunos autores han descrito la generación de animales quiméricos a partir de células con características “*ES-like*”, en ningún caso se ha observado la contribución de estas células a la línea germinal. En los últimos años, los intereses han estado dirigidos a la derivación de células pluripotentes inducibles (iPS), que ya es una realidad en todas las especies ganaderas, aunque todavía no se ha confirmado el beneficio de la utilización de estas células en transgénesis.

Al no disponer de células ES, el desarrollo de la tecnología de transferencia nuclear a partir de células somáticas en cultivo -SCNT- (Campbell et al., 1996), abrió nuevas posibilidades para la transgénesis en animales de granja, además de poner de manifiesto el potencial de la reprogramación nuclear. Esta técnica implica la reconstrucción de un embrión, mediante transferencia del núcleo de una célula donante a un oocito receptor en el que el material genético nuclear ha sido eliminado. El cigoto generado es activado para que se inicie el desarrollo embrionario y, tras ser cultivado *in vitro* o *in vivo*, es transferido a una hembra receptora sincronizada hormonalmente, encargada de llevar la gestación a término.

De este modo, desde el nacimiento en 1997 de *Dolly* (**Fig. 3**), clonada a partir de una célula de glándula mamaria de una oveja adulta (Wilmut et al., 1997), la tecnología SCNT ha permitido la clonación no sólo en todas las especies de animales domésticos, sino también en otras como hurones o camellos. La eficiencia global de la técnica varía mucho entre especies (por ejemplo, es del 8-10% en oveja), existiendo numerosos factores críticos, como la maduración de los oocitos *in vitro*, el método de enucleación, el procedimiento de activación, el tipo celular reprogramado, el estado epigenético del núcleo donante o la problemática asociada a la gestación.

Figura 3. Oveja *Dolly*, primer mamífero clonado a partir de una célula adulta, junto con su primer cordero, *Bonnie*. Imagen cortesía del Instituto Roslin (Edimburgo, Reino Unido).



Como se ha mencionado, la SCNT abrió una nueva ruta para la generación de animales de granja transgénicos, ya que las células donantes del núcleo podían ser modificadas genéticamente antes de ser utilizadas en transferencia nuclear (Fig. 4). La prueba de esta hipótesis vino dada por la generación de ovejas transgénicas a partir de fibroblastos fetales que expresaban el factor de coagulación IX humano (Schnieke et al., 1997).

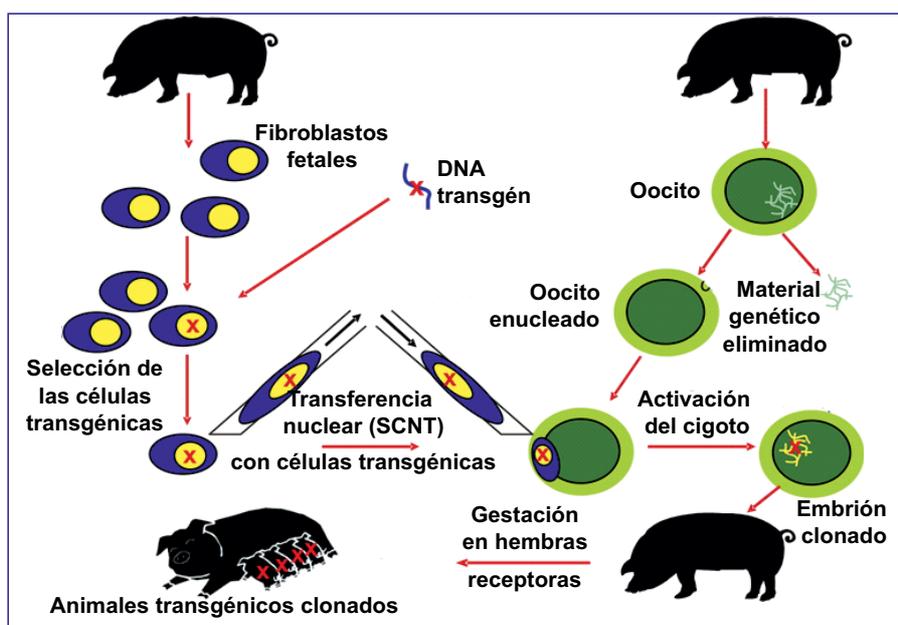


Figura 4. Esquema de la obtención de animales transgénicos clonados mediante la técnica SCNT (adaptado de Rogers et al., 2008).

La transgénesis en células somáticas vía SCNT presenta importantes ventajas, entre las que se incluyen las siguientes:

- La estructura y la expresión del transgén en las células donantes del núcleo pueden ser analizadas por técnicas moleculares antes de realizar la transferencia nuclear. De esta manera, se asegura que el 100% de los animales producidos son transgénicos, y que cada célula del animal clonado contiene el transgén, evitando el mosaicismo, y asegurando la transmisión a la línea germinal.
- Se pueden realizar modificaciones genéticas precisas mediante *gene targeting* en las células que van a ser utilizadas en SCNT.
- Se pueden llevar a cabo modificaciones genéticas secuenciales, realizando SCNT con las células modificadas y aislando nuevos fibroblastos fetales susceptibles de modificación.
- Se puede predeterminar el sexo del animal clonado, utilizando como donantes de núcleo células procedentes de un macho o de una hembra y, además, el transgén puede introducirse en células con una dotación genética de interés.

- Se pueden generar rebaños de animales transgénicos (clonados) sin necesidad de recurrir a la cría convencional, a partir de un animal fundador, con el consiguiente ahorro en tiempo y dinero.

Edición del genoma

En los últimos años, el campo de la transgénesis ha experimentado una auténtica revolución a consecuencia de la aparición de las herramientas de edición del genoma. Estas herramientas comprenden las ZFNs (*Zinc Finger Nucleases*), TALENs (*Transcription Activator-like Effector Nucleases*) y, más recientemente, el sistema CRISPR/Cas9 (*Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats/Cas9*) (Gaj et al., 2013).

Las nucleasas ZFNs y TALENs presentan un dominio de unión al DNA (del tipo dedos de zinc en el caso de las ZFN, o bien, del tipo efector TAL en TALENs) que debe ser diseñado para reconocer secuencias específicas del gen a modificar, mientras que con el sistema CRISPR/Cas9, la unión de la nucleasa Cas9 a la secuencia diana está dirigida por un RNA guía complementario. En todos los casos se genera un corte de la doble cadena de DNA en la secuencia de interés que, al ser reparado por la maquinaria de la célula, da lugar a la modificación genética deseada, ya sea mediante unión no homóloga (produciéndose deleciones), o por recombinación homóloga (*gene targeting*). Estas herramientas pueden utilizarse tanto en la transgénesis en embriones como en células somáticas en combinación con transferencia nuclear (**Fig. 5**), y están permitiendo la generación eficiente de animales de granja con modificaciones precisas (Lilico et al., 2013; Ni et al., 2014).

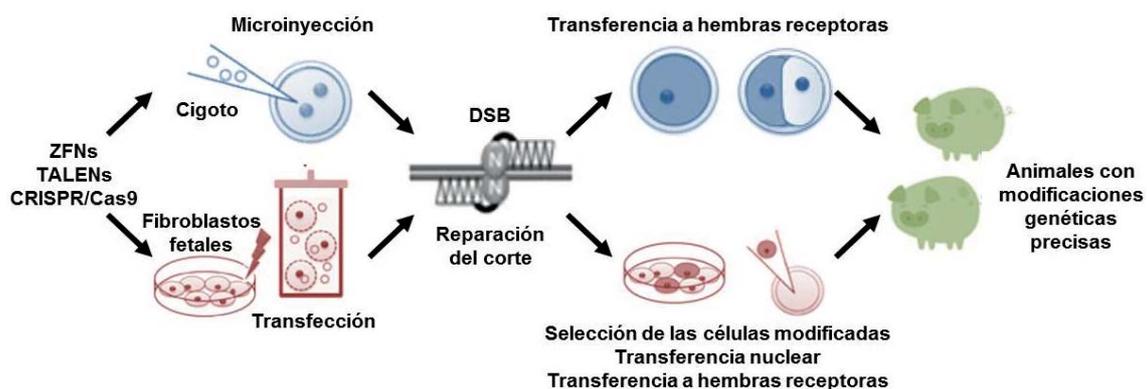


Figura 5. Técnicas de *edición del genoma* en la generación de animales de granja transgénicos (modificado de Hauschild-Quintern et al., 2013).

Principales aplicaciones de la transgénesis en animales

Estudio de la función génica

Los animales transgénicos son una herramienta muy útil para investigar en qué tipos celulares y en qué momento del desarrollo se expresan diferentes genes. Así mismo, la inactivación de genes en ratones *knockout* ha permitido estudiar la función de dichos genes en el organismo. De igual forma, los animales modificados genéticamente pueden ser utilizados para obtener modelos de enfermedades humanas, en los que poder analizar, de forma más directa y efectiva, los mecanismos moleculares de la enfermedad y el efecto de nuevas terapias.

El ratón es un buen modelo animal puesto que el 99% de los genes humanos tiene homología con los murinos, y la organización de ambos genomas está altamente relacionada. Sin embargo, la anatomía, fisiología y ciclo de vida del ratón difieren significativamente de los humanos, por lo que los modelos murinos no siempre reproducen el fenotipo de la enfermedad humana. Como ejemplo, se puede citar la fibrosis quística, enfermedad autosómica recesiva para la que no existe un tratamiento curativo. En este caso, a pesar de existir diversos modelos en ratón con mutaciones precisas en el gen *CFTR*, responsable de la fibrosis quística, en ninguno de ellos se observa la forma pulmonar o pancreática de la enfermedad, responsable de la elevada mortalidad en la especie humana. Por este motivo, se ha impulsado el desarrollo de modelos de la enfermedad en otras especies animales, como oveja, cerdo o hurón.

Las enfermedades neurodegenerativas son también objeto de gran interés. Por ejemplo, Jacobsen et al. (2010) han generado un modelo de la enfermedad de Huntington en oveja con el que se espera poder profundizar en el estudio de esta enfermedad. Otro modelo, en el que hay muchas expectativas en relación con el desarrollo de nuevas terapias, es el establecido en cerdos miniatura para la enfermedad de Alzheimer y que está comercializado por la empresa *PixieGene*.

Un campo de investigación en el que también se están empleando animales transgénicos como modelo es el de las enfermedades metabólicas. De este modo, se han utilizado cerdos y conejos transgénicos para el estudio de la arterioesclerosis (Al-Mashhadi et al., 2013) y otros desórdenes del metabolismo lipídico. También se ha generado un modelo para el estudio de la homeostasis de la glucosa y la secreción de insulina: se trata de cerdos transgénicos en los que se ha alterado la función de la incretina GIP (polipéptido inhibidor gástrico) (Renner et al., 2010). Recientemente, se ha publicado la obtención de cerdos miniatura modificados genéticamente para el estudio de trastornos de los ritmos circadianos (Liu et al., 2013).

Obtención de productos de alto valor añadido

A diferencia de lo que ocurre en ratones, las particulares características productivas de los animales de granja, implican que la inversión a realizar para generar un animal transgénico debe tener como contrapartida un elevado beneficio. Por esta razón, la obtención de proteínas recombinantes de interés farmacéutico ha sido la principal aplicación de los animales de granja transgénicos. Los costes de producción de biomoléculas en bacterias no son elevados, pero las proteínas que requieren modificaciones post-traduccionales (glicosilaciones, principalmente) deben ser sintetizadas en sistemas celulares de mamíferos para obtener biomoléculas activas. Sin embargo, estos sistemas son extremadamente caros, lo que despertó, desde el primer momento, el interés por utilizar los animales de granja transgénicos como “biorreactores”, ya que se estima que, aplicando el concepto de *biopharming*, los costes de producción podrían reducirse a la octava parte (Dyck et al., 2003).

Entre las numerosas proteínas humanas expresadas en la glándula mamaria de animales de granja transgénicos se pueden citar desde la -antitripsina en oveja (primer ejemplo en 1991), a la albúmina sérica humana en vacas (Moghaddassi et al., 2014), entre otros. En la actualidad, dos medicamentos producidos en la leche de animales transgénicos cuentan ya con autorización para su comercialización: ATryn® (obtenido en cabras transgénicas, y utilizado para el tratamiento de tromboembolias en pacientes con deficiencia hereditaria de antitrombina) (**Fig. 6**) y Ruconest™ (producido en conejos transgénicos, y que se emplea para el tratamiento del angioedema hereditario).



Figura 6. Cabras transgénicas clonadas en 1998, que producen antitrombina humana en la leche (foto tomada de Blash et al., 2012).

Además de en la leche, las proteínas recombinantes pueden ser producidas en una gran variedad de fluidos biológicos tales como la sangre, orina, saliva, fluido seminal o el suero. El otro método de producción a gran escala es el huevo. Los avances en transgénesis aviar, derivados del empleo de vectores lentivirales, han permitido la obtención de aves transgénicas que sintetizan en el oviducto proteínas de interés farmacéutico, como el interferón- β , que se incorporan a la clara del huevo (Kwon et al., 2010).

Al hablar de transgénesis y productos de alto valor añadido, no se puede olvidar la modificación genética de animales de granja con el fin de obtener una fuente alternativa de órganos que puedan utilizarse en trasplantes humanos (xenotrasplantes). La investigación se ha centrado, principalmente, en el cerdo, ya que su anatomía y fisiología es compatible con la humana, y presenta ciclos reproductivos cortos y camadas numerosas. Los mayores obstáculos para el éxito de los xenotrasplantes son de tipo inmunológico: la reacción hiperaguda de rechazo (HAR), minutos después del trasplante, y el rechazo vascular agudo (AVR), en los días siguientes. La HAR es desencadenada por la presencia del disacárido galactosa- α (1,3) galactosa. La síntesis de este epitopo en la superficie celular está catalizada por la enzima α (1,3) galactosil transferasa, la cual está presente en todos los mamíferos y monos del nuevo mundo, y ausente en la especie humana y monos del viejo mundo. Por este motivo, se han realizado numerosos estudios para conseguir la inactivación de este gen, obteniéndose animales en los que los dos alelos están inactivados (**Fig. 7**). Sin embargo, y aunque bioprótesis derivadas de estos animales estén dando resultados satisfactorios, todavía existen problemas inmunológicos por resolver para poder trasplantar experimentalmente órganos de los cerdos GalT-KO (Bottino et al., 2014). En combinación con las investigaciones descritas, se están abordando estrategias para controlar el AVR.



Figura 7. Primer cerdito heterocigótico (izda.) y cerdos homocigóticos (dcha.) α 1,3 gal-KO (Lai et al., 2002 y *PPL Therapeutics*).

Mejora de la producción animal

El primer carácter que fue manipulado en animales de granja transgénicos fue la producción cárnica, mediante transferencia del gen de la hormona del crecimiento -GH-, con la intención de producir cerdos con mejores índices de crecimiento y con una canal más magra. Estos incrementos fueron modestos si se considera los obtenidos en acuicultura transgénica, uno de cuyos productos, el salmón *AquAdvantage*® (Fig. 8), se encuentra en espera para su comercialización. Durante los últimos años, el interés se ha centrado en obtener canales de composición más “cardiosaludable” para el consumidor (Tang et al., 2014), mediante la expresión de desaturasas de ácidos grasos procedentes de espinacas o de nematodos.



Figura 8. Salmón *AquAdvantage*® comparado con un ejemplar no transgénico de su misma edad (*Aquabounty Technologies*).

Sin duda, la aplicación de mayor relevancia ha sido la manipulación de la composición de la leche, con el fin de mejorar sus propiedades nutricionales o tecnológicas. Uno de los objetivos ha sido la obtención de leche hipoalérgica, con bajo contenido en lactosa o en β -lactoglobulina. Con el fin de incrementar el rendimiento quesero, también se han obtenido vacas transgénicas que sobreexpresan en la leche copias adicionales de las proteínas lácteas β - y κ -caseína, originando un incremento del 13% en el contenido proteico de la leche (Laible y Wells, 2006).

“Humanizar” la leche bovina o caprina también puede suponer beneficios importantes para la salud humana. Un ejemplo es la expresión de lactoferrina humana (hLF) en la leche de vaca (Yang et al., 2008). Se ha demostrado que esta proteína tiene propiedades antibacterianas, antivirales e inmunomoduladoras entre otras y, por consiguiente, existe una demanda creciente para su utilización como nutraceutico. Otro ejemplo, en el que se tienen puestas grandes expectativas, es la producción de lisozima humana en la leche de cabras transgénicas, leche que podría utilizarse para paliar las diarreas infantiles en los

países en vías de desarrollo, debido a las propiedades antibacterianas de esta proteína. Maga y colaboradores desarrollaron una estirpe de cabras transgénicas que producen niveles adecuados de lisozima en la leche y, posteriormente, han demostrado que su administración a lechones tiene un efecto beneficioso frente a las diarreas producidas por *E. coli* (Cooper et al., 2013).

La generación de animales resistentes a enfermedades es otra de las áreas de aplicación de gran interés en Producción Animal, tanto por el beneficio para la Sanidad y Bienestar Animal, como por su impacto económico sobre la producción, o sus repercusiones sobre la salud humana y sobre el medio ambiente (reducción del uso de antibióticos). Entre las estrategias que se han abordado se encuentran tanto la introducción de genes que incrementan la resistencia a enfermedades o la inmunidad innata, como la inactivación de genes asociados a susceptibilidad a enfermedades. Por ejemplo, la generación de ovejas, cabras y vacas en las que se ha inactivado o silenciado el gen de la proteína priónica PRNP ha abierto la puerta para la creación de animales no susceptibles a las encefalopatías espongiformes. Además, en vacas transgénicas se ha demostrado la eficacia de la expresión de genes de proteínas anti-bacterianas en la glándula mamaria, como la lisostafina (**Fig. 9**), efectiva frente a mastitis causadas por *S. aureus* (Wall et al., 2005).



Figura 9. Vaca transgénica que produce lisostafina en la leche (Wall et al., 2005).

Otro modelo de interés, por su repercusión medioambiental, es el *EnviroPig*TM (Golovan et al., 2001). Se trata de cerdos transgénicos que expresan una fitasa bacteriana en la glándula salivar, lo que les permite metabolizar los fitatos del pienso. Estos animales utilizan eficientemente el fósforo de la dieta, lo que se traduce en mejores índices de crecimiento y en purines menos contaminantes, ya que excretan hasta un 75% menos de fosfato. Esto supone una

reducción significativa de la contaminación procedente de la industria porcina y su impacto medioambiental

Finalmente, aunque sin implicar transgénesis, el uso de la tecnología SCNT puede permitir la clonación de individuos élite con el fin de utilizarlos como sementales, así como la clonación de genotipos de interés o de animales con valor sentimental. La transferencia nuclear también puede ser una herramienta que ayude a la conservación de razas o especies, como ha demostrado la clonación del único ejemplar existente de la raza *Enderby Island* en Nueva Zelanda, o los intentos de clonación del toro salvaje asiático “gaur” (*Bos gaurus*) o del bucardo, subespecie extinta de cabra pirenaica.

Conclusiones

Como se ha expuesto, la capacidad de modificar el genoma de los animales de manera precisa es fundamental para el desarrollo de una gran variedad de aplicaciones en Biomedicina y en Producción Animal. Aunque las tecnologías para la obtención de animales de granja transgénicos han ido perfeccionándose a través de los años, el control espacio-temporal preciso de la expresión de transgenes continúa siendo un aspecto a mejorar. Por otro lado, la aplicación de la tecnología de gene targeting para la generación de animales transgénicos no está exenta de dificultades, debidas principalmente a la senescencia replicativa de las células somáticas y la menor frecuencia de recombinación homóloga en estas células, en comparación con las células ES. Para contrarrestar estas limitaciones, las líneas de iPS obtenidas en las especies ganaderas constituyen una opción prometedora, y las nuevas técnicas de edición del genoma, que están dando ya sus frutos en estos animales, se perfilan como las herramientas de elección en el ámbito de la transgénesis animal; tanto es así que la revista *Nature Methods* las ha considerado, recientemente, como una de las metodologías más relevantes de la última década.

Es previsible que la revolución genómica observada desde la secuenciación del genoma humano, en combinación con el uso de estas metodologías (sobre todo del sistema CRISPR/Cas9), permitirá generar en los próximos años nuevos modelos de gran relevancia en animales de granja, así como conseguir avances biomédicos relacionados con lo que algunos autores ya denominan la *microcirugía de los genes*.

Bibliografía

- Al-Mashhadi, R.H., Sorensen, C.B., Kragh, P.K., Christoffersen, C., Mortensen, M.B. et al. 2013. Familial hypercholesterolemia and atherosclerosis in cloned minipigs created by DNA transposition of a human *PCSK9* gain-of-function mutant. *Science Translational Medicine* 5: 166ra1.
- Blash, S., Schofield, M., Echelard, Y. y Gavin, W. 2012. Update on the first cloned goats. *Nature Biotechnology* 30: 229-230.
- Bottino, R., Wijkstrom, M., Windt D.J., Hara, H., Ezzelarab, M., Murase, N., Bertera, S., He., J., Phelps, C., Ayares, D., Cooper, D.K.C. y Trucco., M. 2014. Pig-to-monkey islet xenotransplantation using multi-transgenic pigs. *American Journal of Transplantation* 14: 2275-2287.
- Campbell, K.H., McWhir, J., Ritchie, W.A. y Wilmut, I. 1996. Sheep cloned by nuclear transfer from a cultured cell line. *Nature* 380: 64-66.
- Capecchi, M.R. 2005. Gene targeting in mice: functional analysis of the mammalian genome for the twenty-first century. *Nature Reviews Genetics* 6: 507-512.
- Cooper, C.A., Garas Klobas, L.C., Maga, E.A. y Murray, J.D. 2013. Consuming transgenic goats' milk containing the antimicrobial protein lysozyme helps resolve diarrhea in young pigs. *PloS One* 8: e58409.
- Dyck, M.K., Lacroix, D., Pothier, F., y Sirard, M.A. 2003. Making recombinant proteins in animals--different systems, different applications. *Trends in Biotechnology* 21: 394-399.
- Evans, M.J. y Kaufman, M.H. 1981. Establishment in culture of pluripotential cells from mouse embryos. *Nature* 292: 154-156.
- Gaj, T., Gersbach, C.A., y Barbar, C.F. 2013. ZFN, TALEN, and CRISPR/Cas-based methods for genome engineering. *Trends in Biotechnology* 31: 397-405.
- Golovan, S.P., Meidinger, R.G., Ajakaiye, A., Cottrill, M. et al. 2001. Pigs expressing salivary phytase produce low-phosphorus manure. *Nature Biotechnology* 19: 741-745.
- Gordon, J.W., Scangos, G.A., Plotkin, D.J., Barbosa, J.A. y Ruddle, F.H. 1980. Genetic transformation of mouse embryos by microinjection of purified DNA. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 77: 7380-7384.
- Hammer, R.E., Pursel, V.G., Rexroad, C.E., Wall, R.J., Bolt, D.J., Ebert, K.M., Palmiter, R.D. y Brinster, R.L. 1985. Production of transgenic rabbits, sheep and pigs by microinjection. *Nature* 315: 680-683.
- Hauschild-Quintern, J., Petersen, B., Cost, G.J. y Niemann, H. 2012. Gene knockout and knockin by zinc-finger nucleases: current status and

- perspectives. *Cellular and Molecular Life Sciences* 70: 2969-2983.
- Ivics, Z., Garrels, W., Mátés, L., Yau, T.Y., Bashir, S., Zideck, V., Landa, V., Geurts, A., Ravenec, M., Rüllicke, T., Kues, W.A. y Izsváck, Z. 2014. Germline transgenesis in pigs by cytoplasmatic microinjection of sleeping beauty transposons. *Nature Protocols* 9: 810-827.
- Jacobsen, J., Bawden, C.S., Rudiger, S.R., McLaughlan, C.J., Reid, S.J., Waldovogel, H.J., MacDonald, M.E. et al. 2010. An ovine transgenic Huntington's disease model. *Human Molecular Genetics* 19: 1873-1882.
- Kwon, S.C., Choi, J.W., Jang, H.J., Shin, S.S., Lee, S.K. et al. 2010. Production of biofunctional recombinant human interleukin 1 receptor antagonist (rhIL1RN) from transgenic quail egg white. *Biology of Reproduction* 82: 1057-1064.
- Lai, L., Kolber-Simonds, D., Park, K.W., Cheong, H.T., Greenstein, J.L., Im, G-S., Samuel, M., Bonk, A., Rieke, A., Day, B. et al. 2002. Production of alpha-1,3-galactosyltransferase knockout pigs by nuclear transfer cloning. *Science* 295: 1089-10926.
- Laible, G. y Wells, D.N. 2006. Transgenic cattle applications: the transition from promise to proof. *Biotechnology & Genetic Engineering Reviews* 22: 125-150.
- Lillico, S.G., Proudfoot, C., Carlson, D.F., Stverakova, D., Neil, C., Blain, C., King, T.J., Ritchie, W.A., Tan, W., Mileham, A.J., McLaren, D.G., Fahrenkrug, S.C. y Whitelaw, C.B. 2013. Live pigs produced from genome edited zygotes. *Scientific Reports* 3:2847.
- Liu, H., Li, Y., Wei, Q., Liu, C., Bolund, L., Vajta, G., Dou, H., Yang, W., Xu, Y., Wang, J., Yang, H., Satunstrup, N.H., y Du, Y. 2013. Development of transgenic minipigs with expression of antimorphic human crytochrome 1. *PLoS One* 10: e76098.
- Moghaddassi, S., Eyestone, W. y Bishop, C.E. 2014. TALEN-mediated modification of the bovine genome for large-scale production of human serum albumin. *PLoS One* 9: e89631.
- Ni, W., Qiao, J., Zhao, X., Regouski, M., Yang, M., Polejaeva, I.A. y Chen, C. 2014. Efficient gene knockout in goats using CRISPR/Cas9 system. *Plos One* 9: e106718.
- Palmiter, R.D., Brinster, R.L., Hammer, R.E., Trumbauer, M.E., Rosenfeld, M.G., Birnberg, N.C. y Evans, R.M. 1982. Dramatic growth of mice that develop from eggs microinjected with metallothionein-growth hormone fusion genes. *Nature* 300: 611-615.

- Park, F. 2007. Lentiviral vectors: are they the future of animal transgenesis? *Physiological Genomics* 31: 159-173.
- Renner, S., Fehlings, C., Herbach, N., Hofmann, A., Waldthausen, D.G., Kessler, B. et al. 2010. Glucose intolerance and reduced proliferation of pancreatic beta-cells in transgenic pigs with impaired glucose-dependent insulinotropic polypeptide function. *Diabetes* 59: 1228-1238.
- Rogers, C.S., Hao, Y., Rokhlina, T., Samuel, M., Stoltz, D.A., Li, Y., Petroff, E., Vermeer, D.W., Kabel, A.C., Yan, Z., Spate, L., Wax, D. et al. 2008. Production of CFTR-null and CFTR-DeltaF508 heterozygous pigs by adeno-associated virus-mediated gene targeting and somatic cell nuclear transfer. *Journal of Clinical Investigation* 118: 1571-1577.
- Schnieke, A.E., Kind, A.J., Ritchie, W.A., Mycock, K., Scott, A.R., Ritchie, M., Wilmut, I., Colman, A., y Campbell, K.H. 1997. Human factor IX transgenic sheep produced by transfer of nuclei from transfected fetal fibroblasts. *Science* 278: 2130-2133.
- Tang, M., Qian, L., Jiang, S., Zhang, J., Song, P., Chen, Y., Cui, W. y Li, K. 2014. Functional and safety evaluation of transgenic pork rich in omega-3 fatty acids. *Transgenic Research* 23: 557-571.
- Wall, R.J., Powell, A.M., Paape, M.J., Kerr, D.E., Bannerman, D.D., Pusell, V.G., Wells, K.D., Talbot, N. y Hawk, H.W. 2005. Genetically enhanced cows resist intramammary *Staphylococcus aureus* infection. *Nature Biotechnology* 23: 445-451.
- Wilmut, I., Schnieke, A.E., McWhir, J., Kind, A.J. y Campbell, K.H. 1997. Viable offspring derived from fetal and adult mammalian cells. *Nature* 385: 810-813.
- Yang, P., Wang, J., Gong, G., Sun, X., Zhang, R., Du, Z., Liu, Y., Li, R., Ding, F. et al. 2008. Cattle mammary bioreactor generated by a novel procedure of transgenic cloning for large-scale production of functional human lactoferrin. *PLoS One* 3: e3453.



Margarita M. Marqués es licenciada y doctora en Veterinaria por la Universidad de León. En el año 2000 se incorporó al grupo del Dr. Jim McWhir en el Roslin Institute, donde disfrutó de una beca Marie Curie para caracterizar la expresión de transgenes en células ovinas destinadas a transferencia nuclear. En el año 2003 regresó a la ULE como investigadora del Programa Ramón y Cajal y, desde el 2009, es Profesora Contratada Doctor Permanente. Actualmente, imparte docencia en el Grado en Biotecnología y colabora en proyectos de investigación en los que aporta su experiencia en técnicas de manipulación genética, y en el cultivo y diferenciación de células troncales.

Marta F. Baro y **Silvia Nicolás** se licenciaron en Biología y Veterinaria (respectivamente), y ambas desarrollaron su Tesis Doctoral en el Dpto. de Producción Animal de la Universidad de León. El trabajo de la Dra. F. Baro (*in memoriam*) se centró en la modificación genética de células somáticas para la integración dirigida de transgenes. El proyecto de la Dra. Nicolás consistió en analizar la eficiencia de aisladores genómicos en cultivos primarios ovinos. Desde el año 2011, la Dra. Nicolás pertenece al Cuerpo Superior de Veterinarios de la Junta de Castilla y León.



Yolanda Bayón es licenciada y doctora en Veterinaria por la Universidad de León (anteriormente Universidad de Oviedo) y profesora de la misma desde 1979, siendo en la actualidad Titular de Universidad. Está integrada en el Departamento de Producción Animal e imparte materias en el ámbito de la Genética y Mejora Animal, en el cual está también circunscrita sus líneas de investigación.