

TRANSGENESIS EN ANIMALES

La transgénesis se puede definir como la introducción de DNA exógeno en un genoma, de modo que se mantenga estable de forma hereditaria afectando a todas las células del organismo. Generalmente el DNA extraño, llamado transgen, se introduce en los cigotos. Los embriones que integren este ADN en su genoma, antes de la primera división, producirán un organismo que pasará el transgen a las siguientes generaciones a través de la línea germinal (gametos).

TRANSGENESIS EN ANIMALES

Aplicaciones

- **Ingeniería genética de caracteres de interés**
- **Rápida generación de líneas puras con idéntica progenie (clones)**
- **Modelos animales para la investigación de enfermedades en humanos**
- **Sistemas animales como bioreactores para la producción de compuestos biológicos heterólogos (“pharming”)**

ESTRATEGIAS PARA LA TRANSGENESIS

1. Transgénesis por microinyección de cigotos

Esta técnica se realiza de la siguiente forma:

- En la primera fase, se aíslan un número grande de óvulos fertilizados, los que se consiguen sometiendo a las hembras a un tratamiento hormonal para provocar una mayor ovulación.**
- En la segunda fase, los ovocitos recién fertilizados se manipulan uno a uno y con una micropipeta a modo de aguja, se introduce una solución que contiene DNA.**
- En la tercera fase, estos óvulos son reimplantados en hembras que actuarán como nodrizas permitiendo el termino de la gestación.**

ESTRATEGIAS PARA LA TRANSGENESIS

2. Transgénesis por manipulación de células embrionarias.

Esta estrategia implica la introducción de DNA extraño en células embrionarias totipotentes (células ES). Estas células se extraen del interior de la blástula en desarrollo y se incuban en un medio donde las células no se diferencian, manteniendo su estado embrionario.

El DNA extraño se introduce en las células ES mediante diversas técnicas de transfección, posteriormente las células transfectadas son reintroducidas en una blástula y ésta reimplantada en una hembra.

Con esta técnica los neonatos son quimeras.

Cuando la integración del transgén ocurre después de la primera división celular, el animal es quimérico, es decir sus células tienen diferentes características, según tengan o no el transgén.

RATONES TRANSGENICOS

Aplicaciones

- **Manipular la expresión génica *in vivo*.**
- **Estudiar la función de genes específicos.**
- **Estudiar a nivel molecular el desarrollo embrionario y su regulación.**

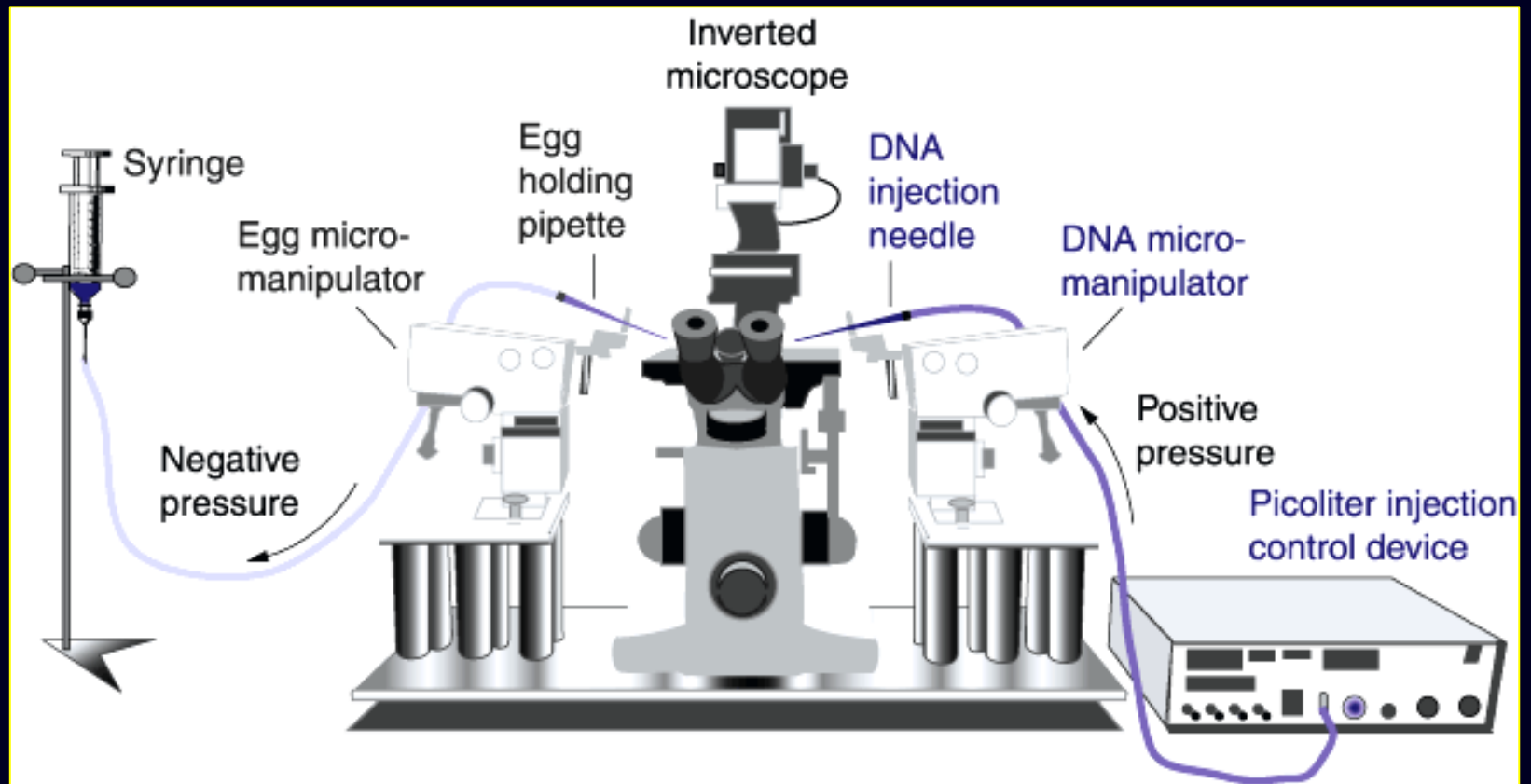
GENERACION DE RATONES TRANSGENICOS

Dos aproximaciones experimentales se han utilizado para la generación de ratones transgénicos:

- 1. Microinyección de DNA en ovocitos recién fertilizados para producir ratones transgénicos conteniendo una o más copias de un vector de expresión insertado al azar en el genoma.**
- 2. Recombinación homóloga en *loci* definidos para crear knockouts (KO) o reemplazar genes.**

GENERACION DE RATONES TRANSGENICOS

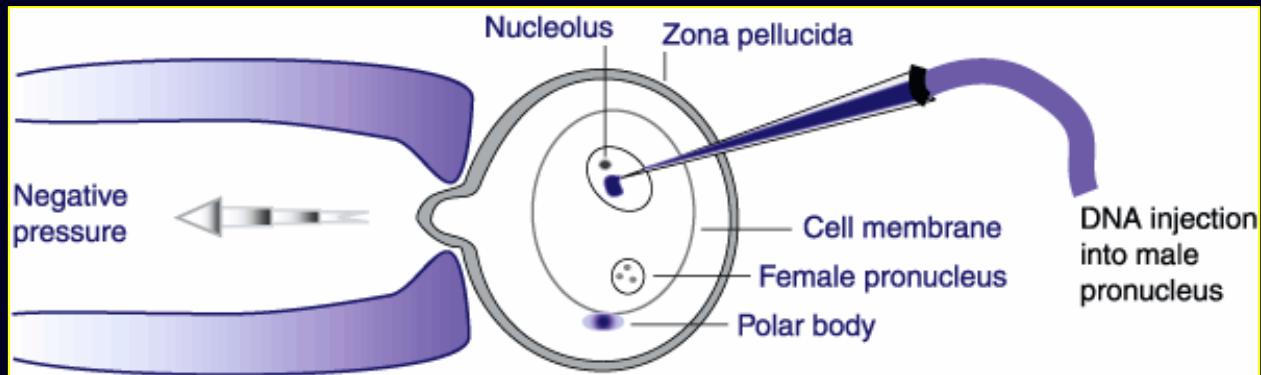
INYECCION DE DNA



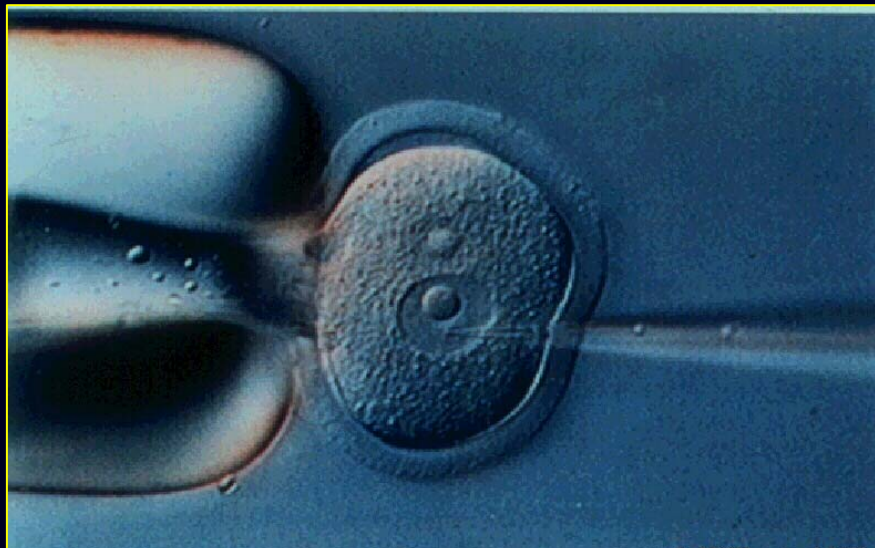
El DNA purificado es inyectado directamente en el pronúcleo masculino de un cigoto, utilizando un micromanipulador acoplado a una pipeta con presión negativa y otro micromanipulador acoplado a una aguja de inyección.

GENERACION DE RATONES TRANSGENICOS

INYECCION DE DNA

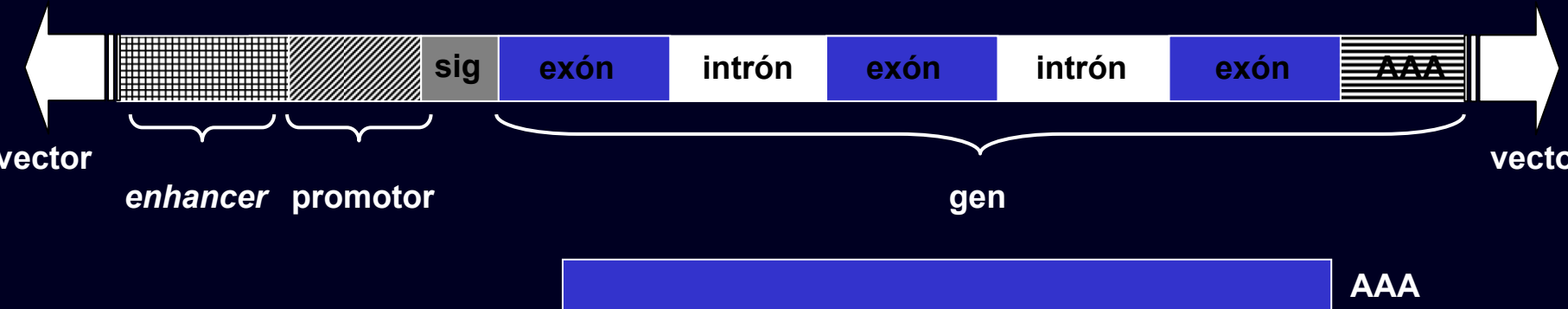
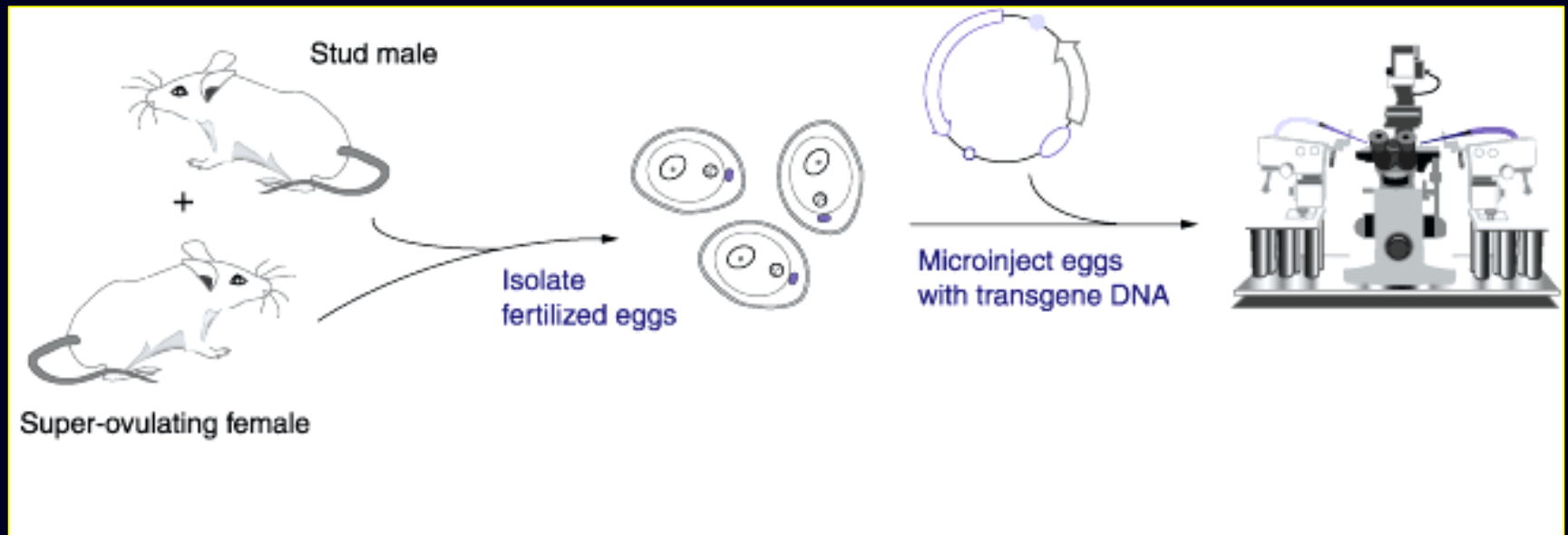


El pronúcleo masculino es inyectado con picolitros de DNA purificado (1ug/ml), mientras el cigoto es inmovilizado por la presión negativa de la pipeta. El éxito de la inyección depende del tiempo de la fertilización y de la precisión en el proceso.



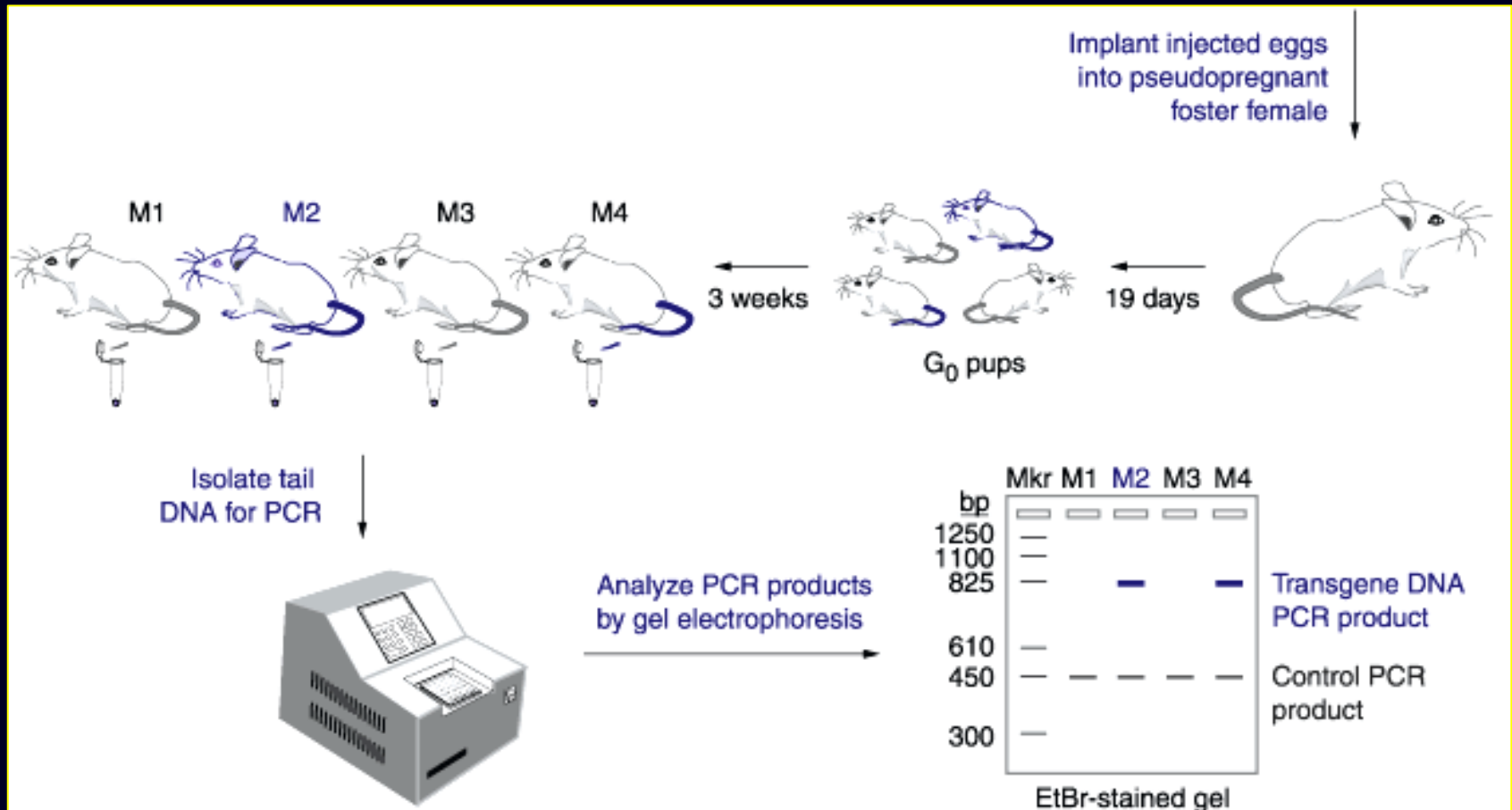
GENERACION DE RATONES TRANSGENICOS

INYECCION DE DNA



GENERACION DE RATONES TRANSGENICOS

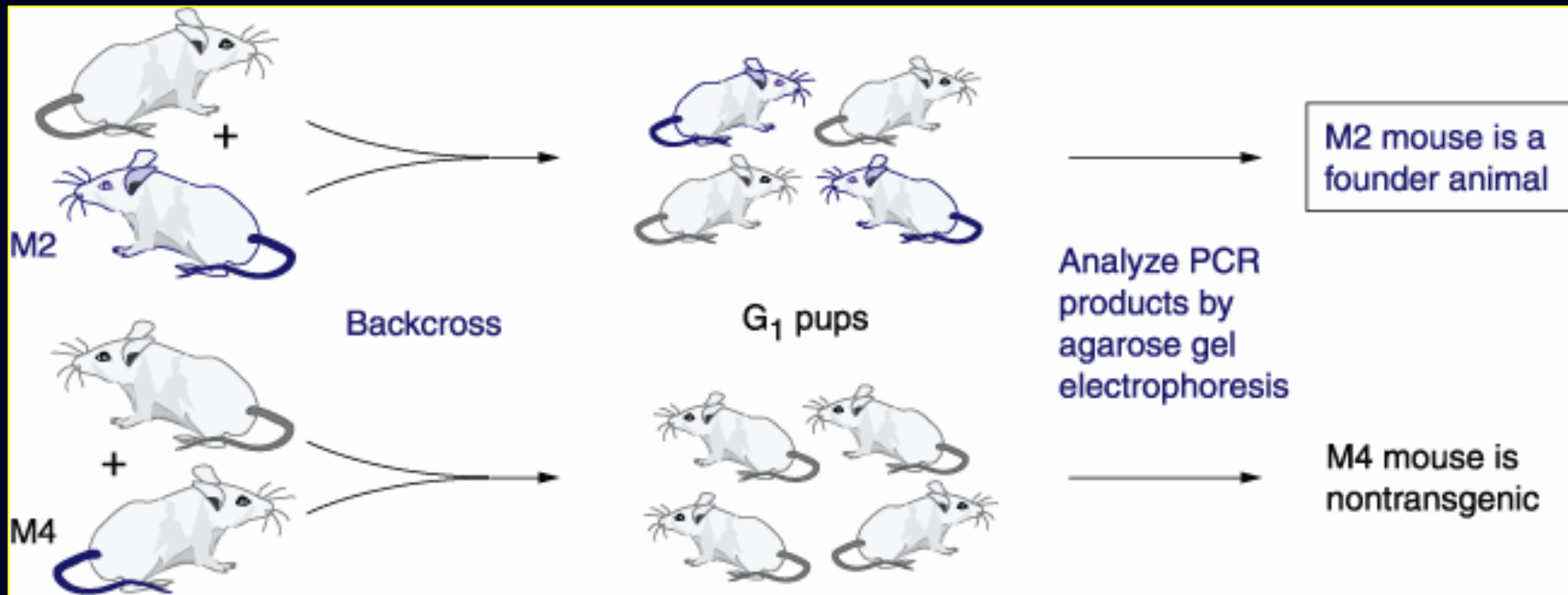
INYECCION DE DNA



Luego de la microinyección, 20-30 cigotos son implantados en el oviducto de una hembra pseudo-preñada (recientemente apareada con un macho vasectomizado). Esto resulta, 19 días más tarde, en la generación de 5-8 crías,. Los animales transgénicos son identificados mediante análisis de PCR a partir de DNA extraído de las colas a las tres semanas de vida. Los transgénicos son, posteriormente, verificados mediante Southern blots.

GENERACION DE RATONES TRANSGENICOS

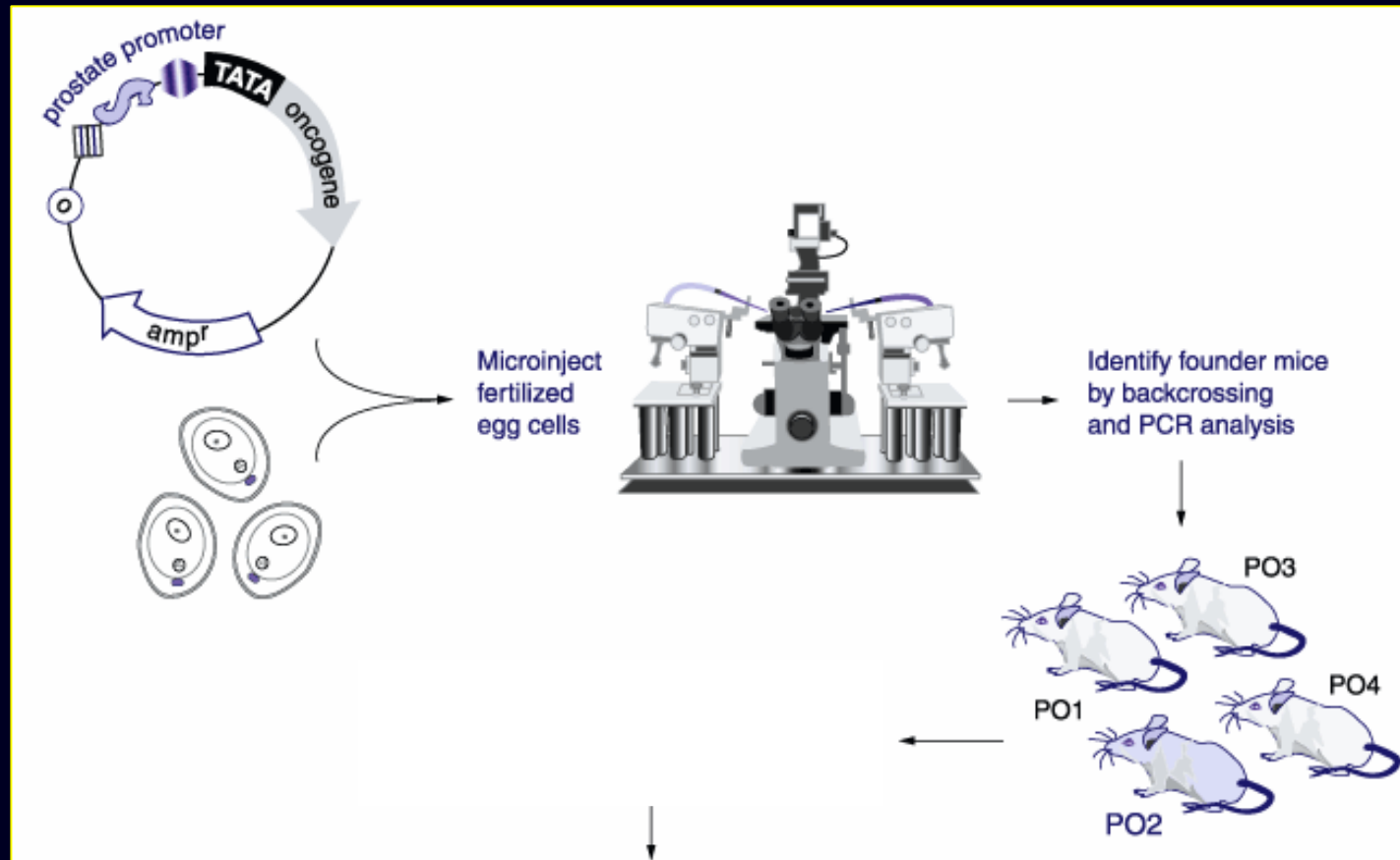
INYECCION DE DNA



Los ratones positivos para el ensayo de PCR son cruzados con animales controles para identificar los fundadores, es decir, aquellos que contienen el DNA integrado en su línea germinal, lo que da lugar a un patrón Mendeliano de herencia del transgen.

GENERACION DE RATONES TRANSGENICOS

INYECCION DE DNA

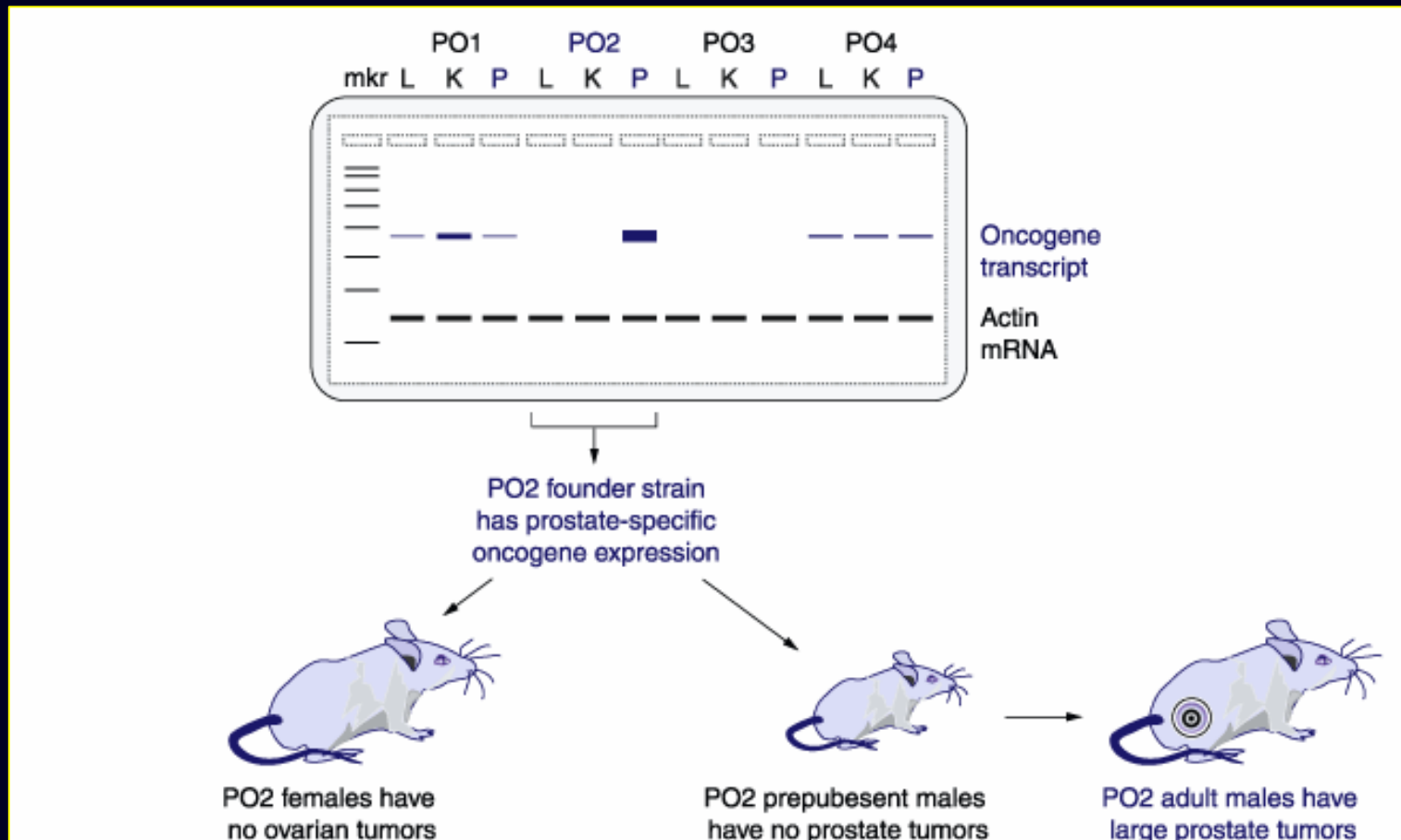


Regiones *enhancer* que controlan la expresión tejido-específica de un gen pueden ser utilizadas para dirigir la expresión de un gen foráneo en tejidos de interés.

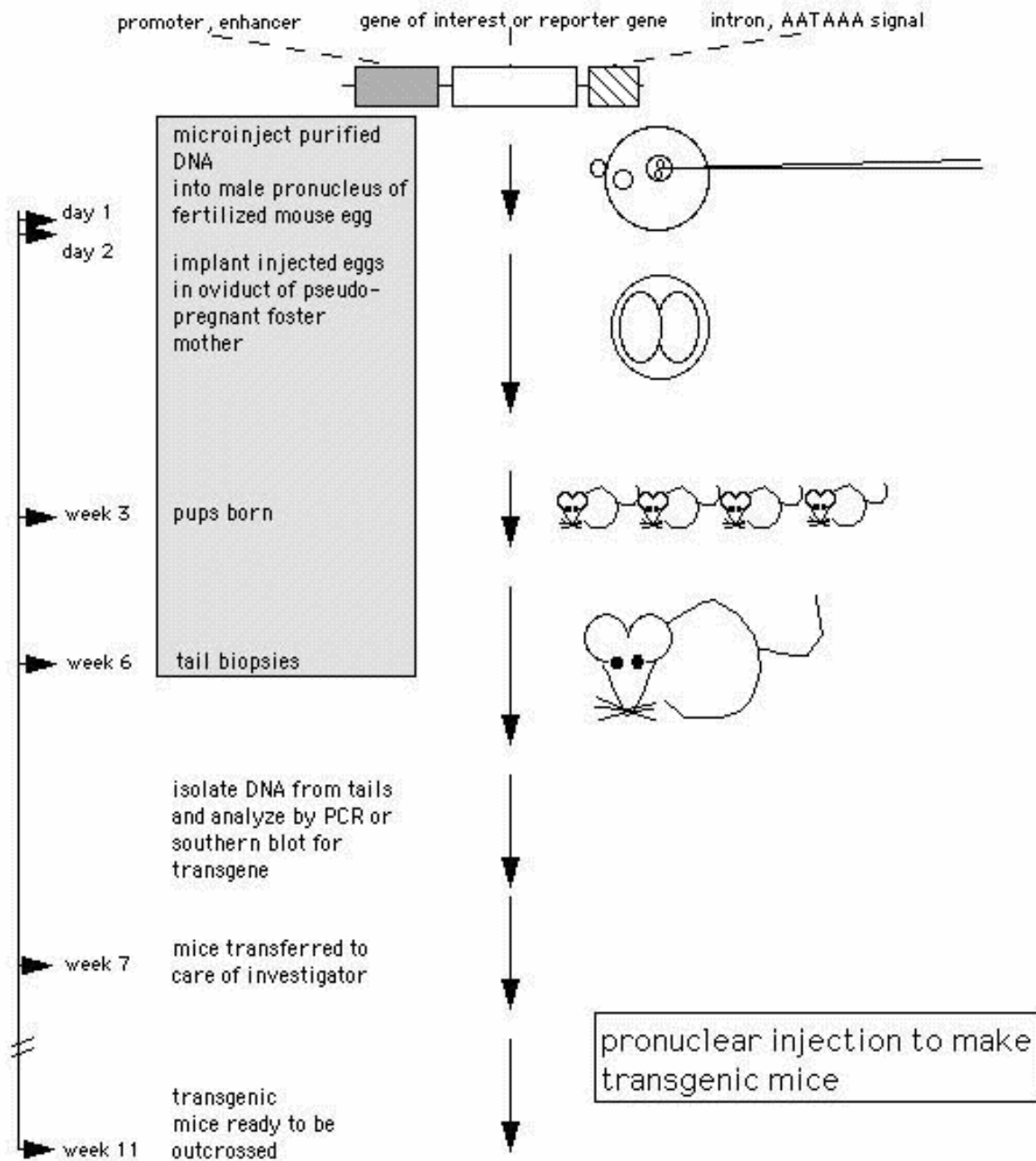
Este esquema ilustra como el promotor de un gen expresado en la próstata puede ser utilizado para generar ratones transgénicos que son modelos del cáncer de próstata.

GENERACION DE RATONES TRANSGENICOS

INYECCION DE DNA



Análisis por Northern blot son necesarios para identificar el animal fundador. La caracterización del tejido prostático en los ratones fundadores permite determinar el efecto de la expresión del transgen en la generación de tumores.



GENERACION DE RATONES TRANSGENICOS

INYECCION DE DNA

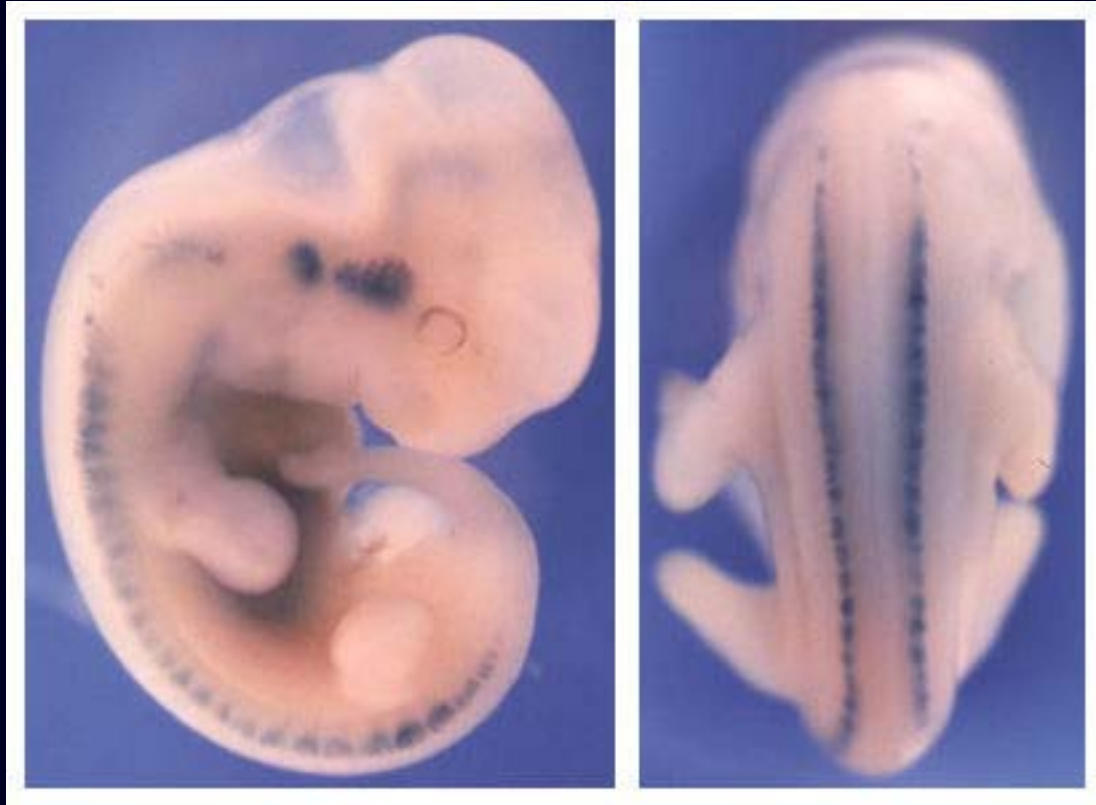
Un ejemplo



GENERACION DE RATONES TRANSGENICOS

INYECCION DE DNA

Un ejemplo

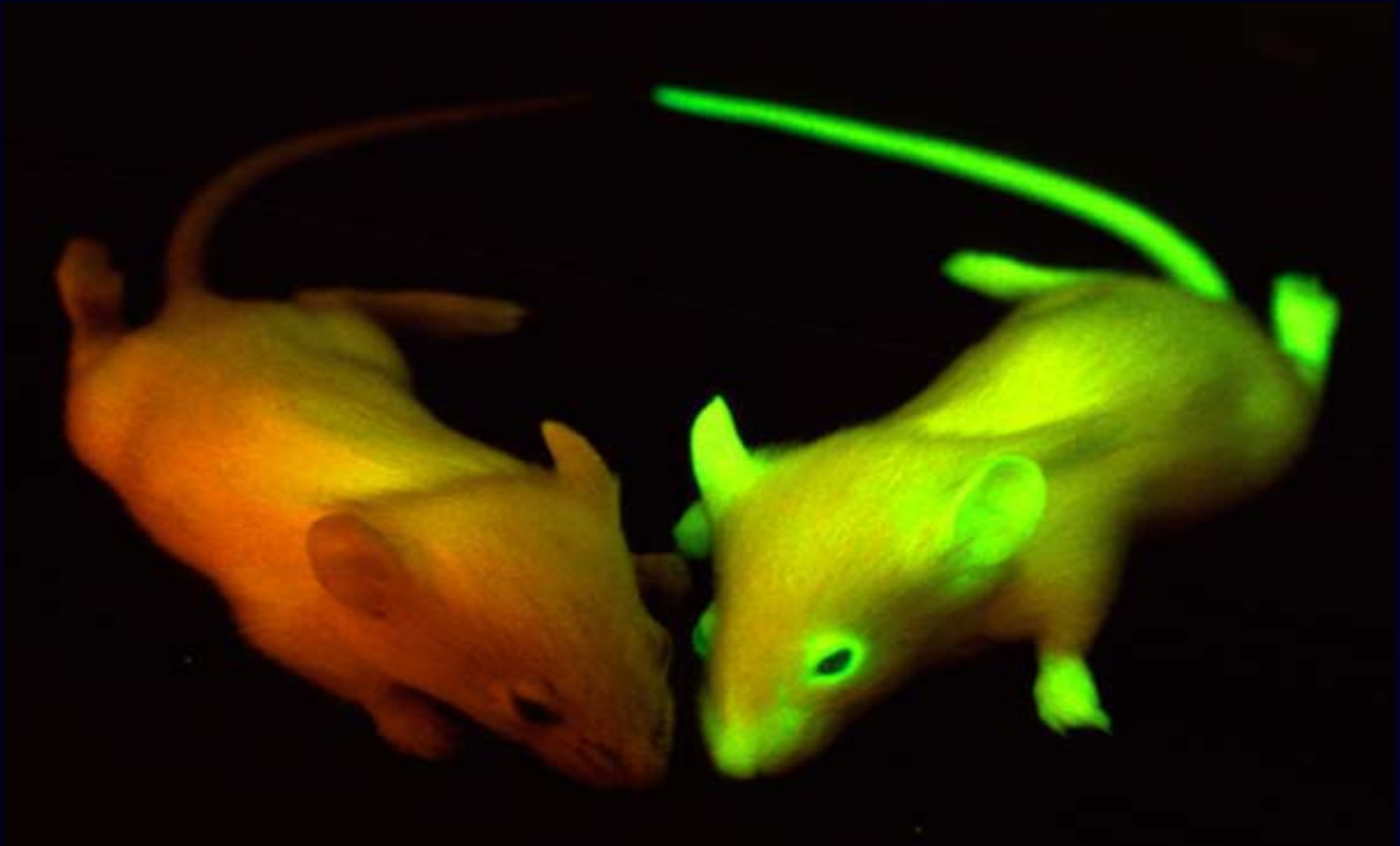


El promotor para un gen expresado en las células precursoras neuronales (neurogenina 1) controla la expresión de un gen reportero, beta-galactosidasa.

GENERACION DE RATONES TRANSGENICOS

INYECCION DE DNA

Un ejemplo

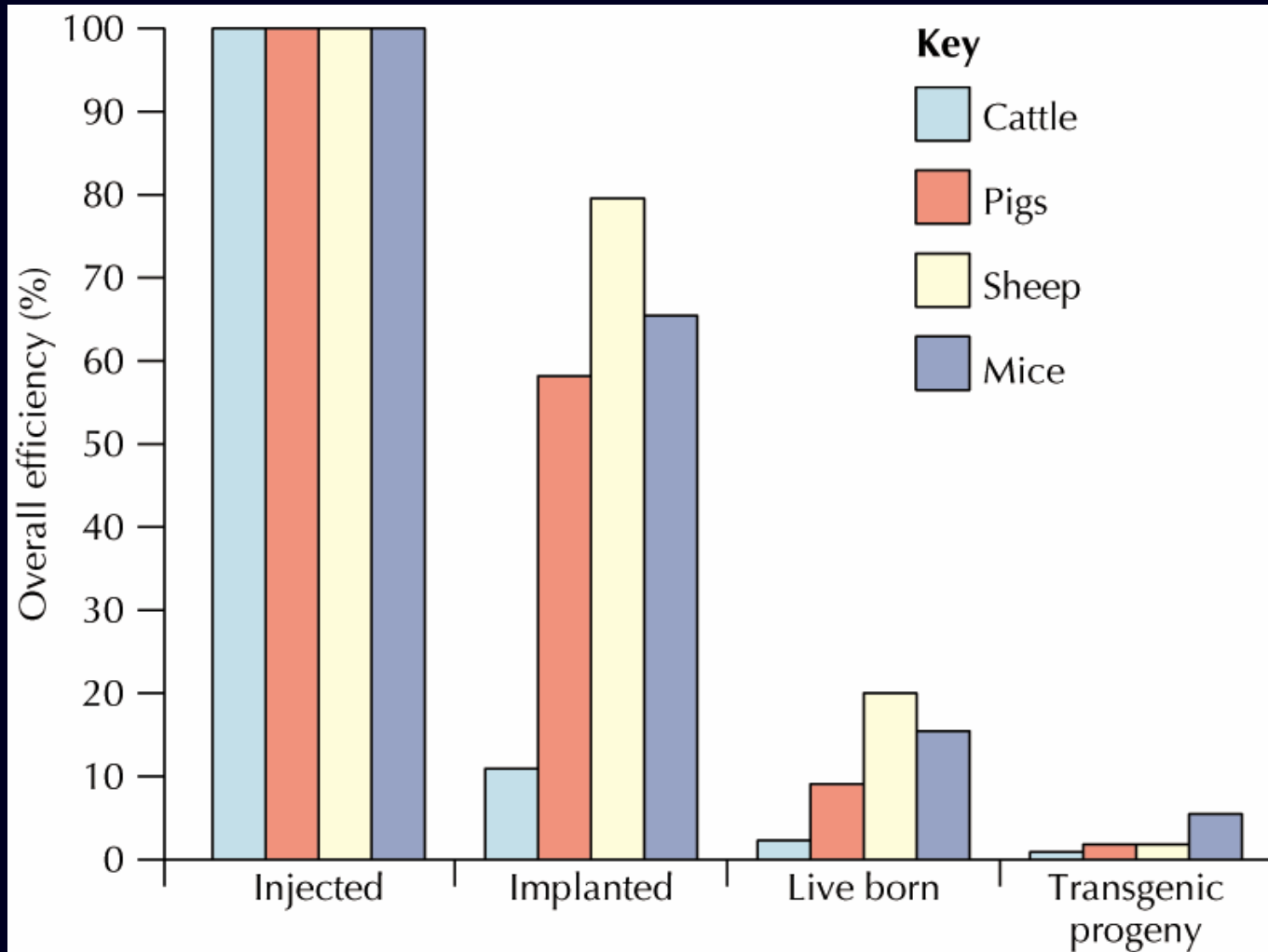


GENERACION DE RATONES TRANSGENICOS

INYECCION DE DNA

- **Baja eficiencia de transgénesis (< 5%)**
- **El transgene inyectado se integra al azar en el genoma del animal**
- **Niveles variables de expresión**

EFICIENCIA DE LA MICROINYECCION



GENERACION DE RATONES KNOCKOUTS

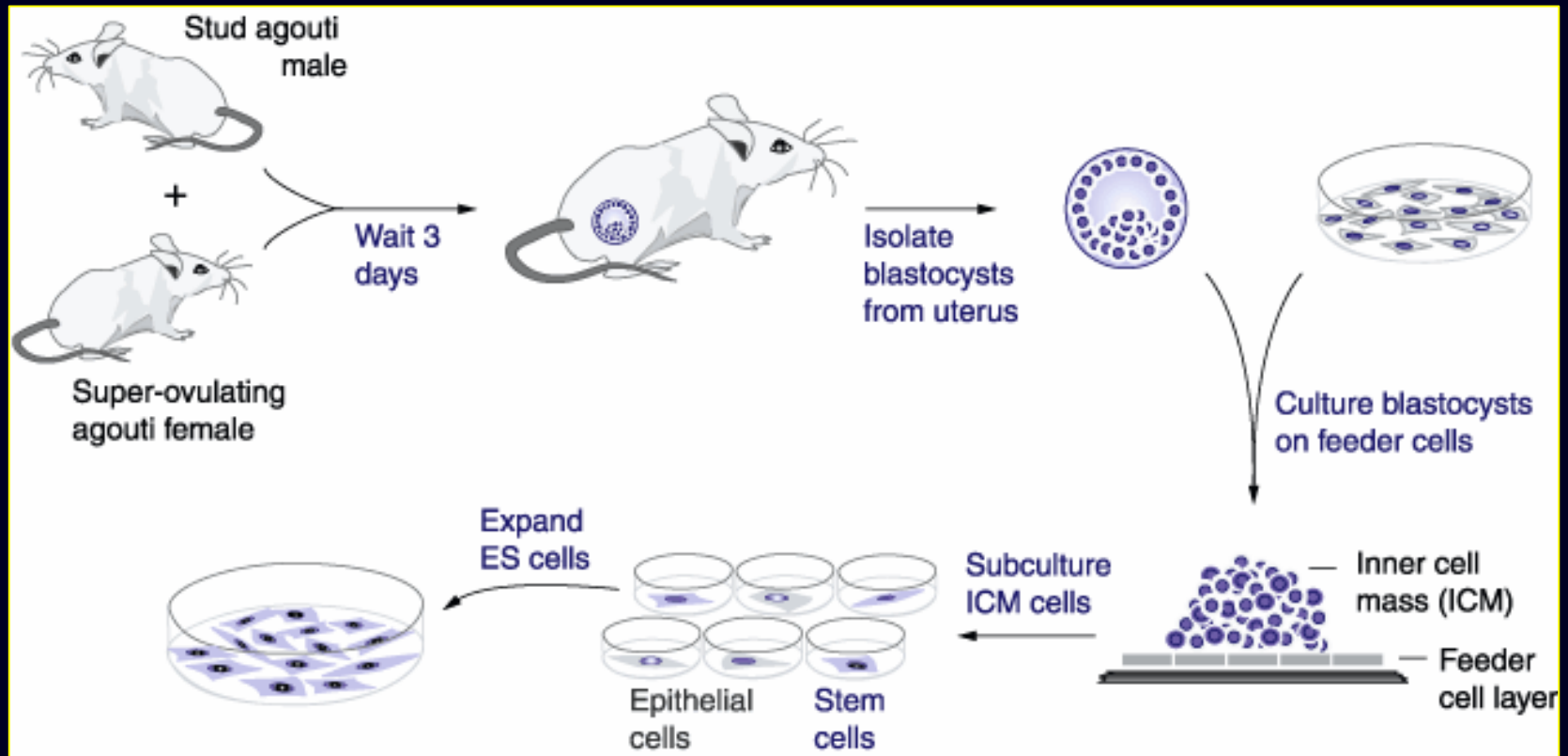
RECOMBINACION HOMOLOGA EN CELULAS ES

Para la generación de ratones knockouts (KO) fue necesario implementar dos metodologías:

- 1) Procedimientos para el cultivo de células embrionarias totipotentes (ES).
- 2) La generación de vectores de clonación y de estrategias de análisis que permitieran la identificación de aquellas células ES que han experimentado recombinación homóloga con el transgen.

GENERACION DE RATONES KNOCKOUTS

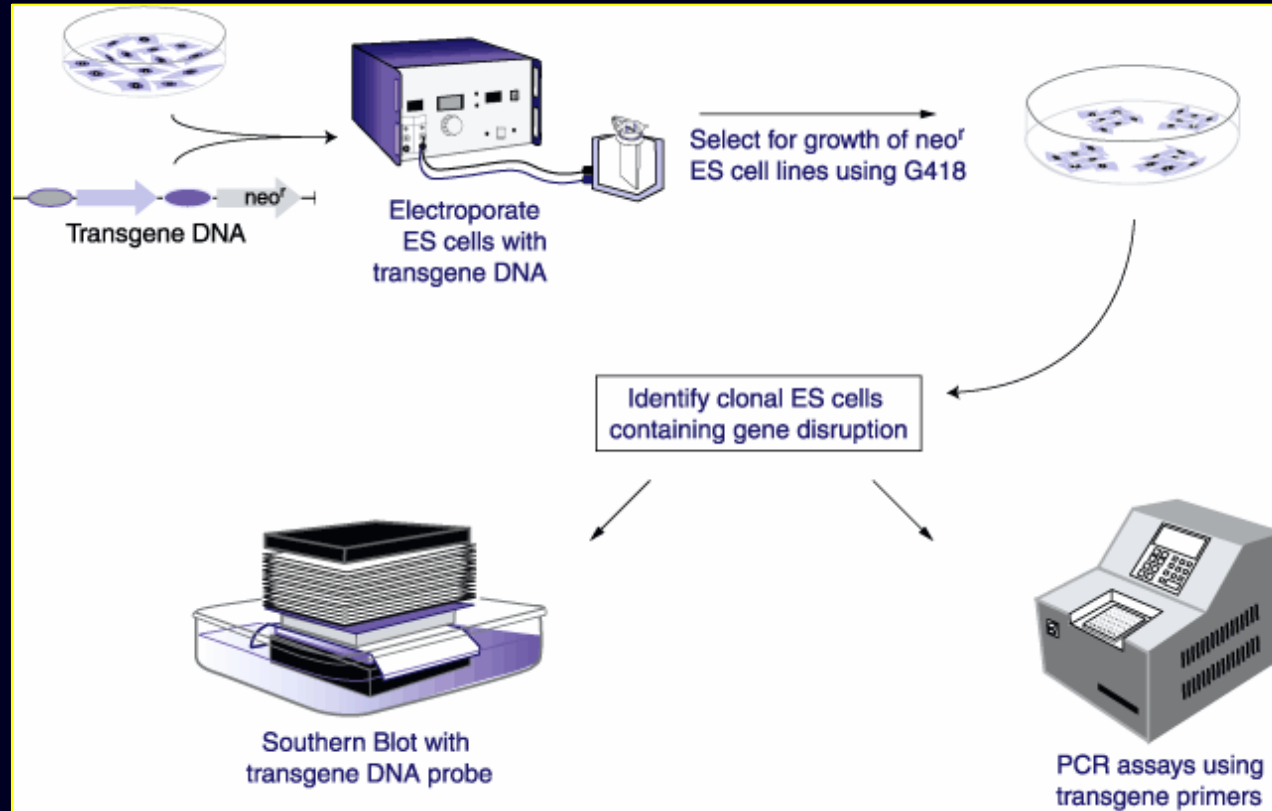
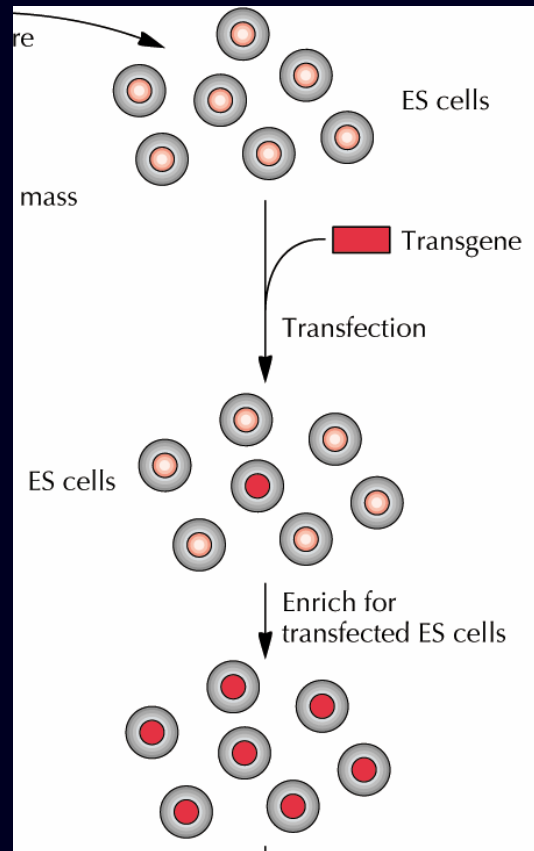
RECOMBINACION HOMOLOGA EN CELULAS ES



Las células ES derivan de la masa celular interna (ICM) de blástulas de ratón y son obtenidos del útero de la hembras al tercer día post-fertilización. Las células ES son cultivadas en placas conteniendo fibroblastos embrionarios incapaces de dividirse, llamados “feeder cells”.

GENERACION DE RATONES KNOCKOUTS

RECOMBINACION HOMOLOGA EN CELULAS ES



El DNA experimental es transfectado de manera estable en las células ES mediante electroporación o lipofección, usando vectores que contienen un marcador de selección. Análisis mediante PCR o Southern blots son utilizados para identificar sublíneas clonales que contienen el DNA incorporado en su genoma.

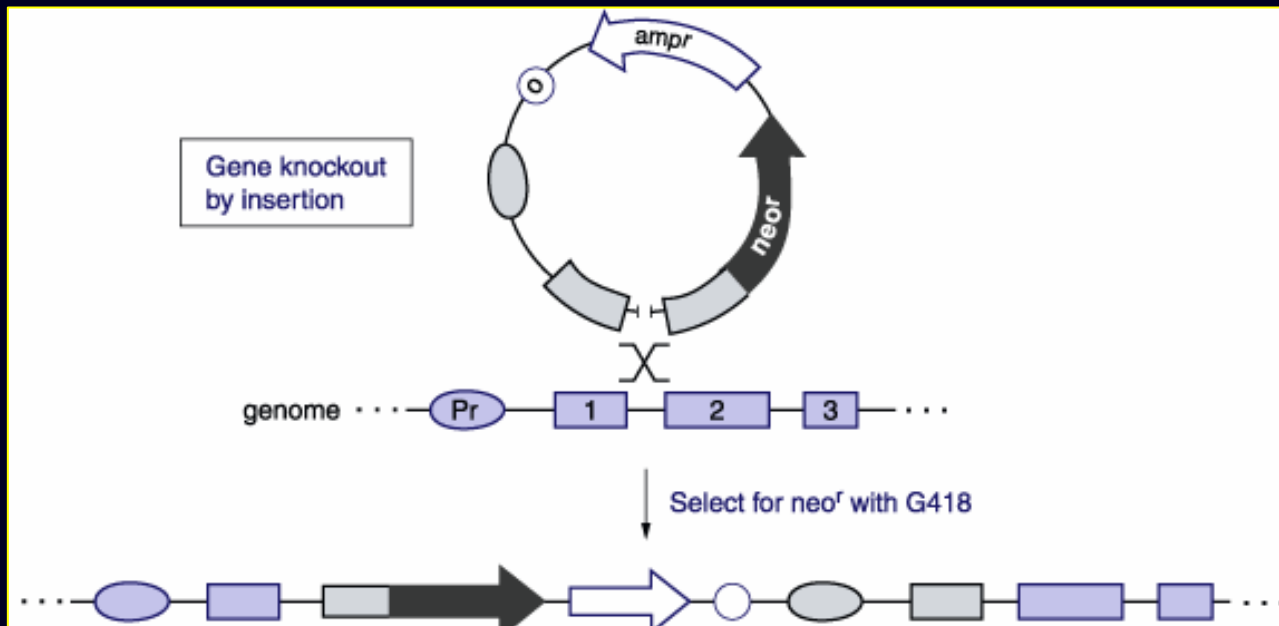
GENERACION DE RATONES KNOCKOUTS

RECOMBINACION HOMOLOGA EN CELULAS ES

Avances en la generación de vectores de clonación y en las estrategias para la selección de células transfectadas han conducido a implementar dos estrategias básicas.

1) Un proceso de inserción génica que requiere de la recombinación homóloga entre secuencias del vector y secuencias genómicas.

La inserción génica conduce a la interrupción del gen y a la incorporación de la región codificadora del gen para neomicina.



GENERACION DE RATONES KNOCKOUTS

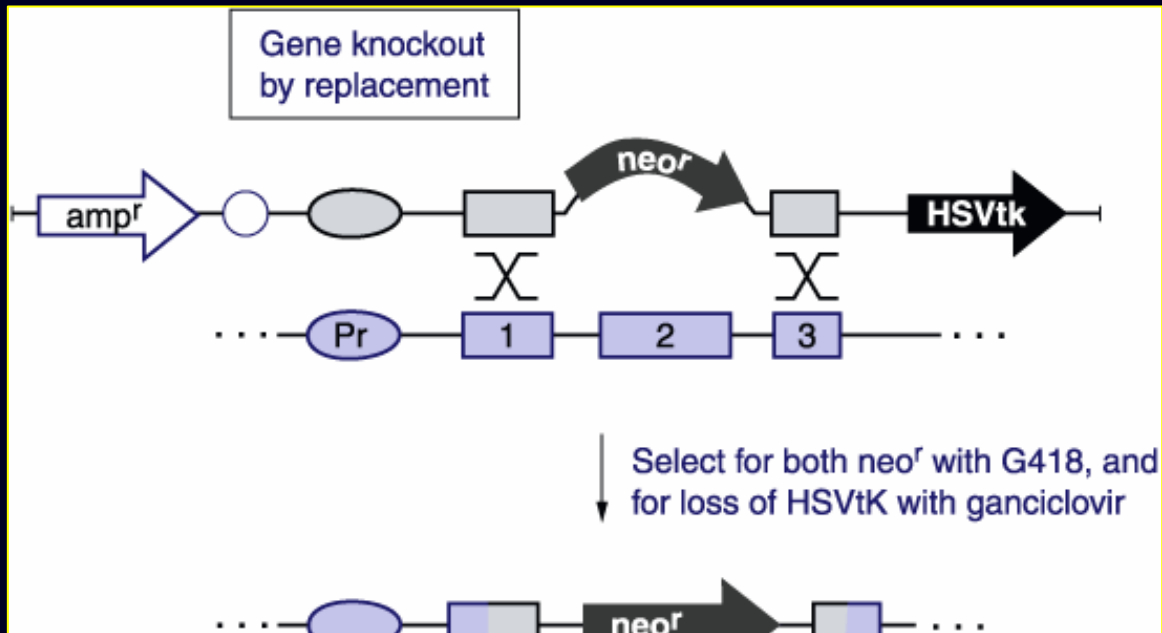
RECOMBINACION HOMOLOGA EN CELULAS ES

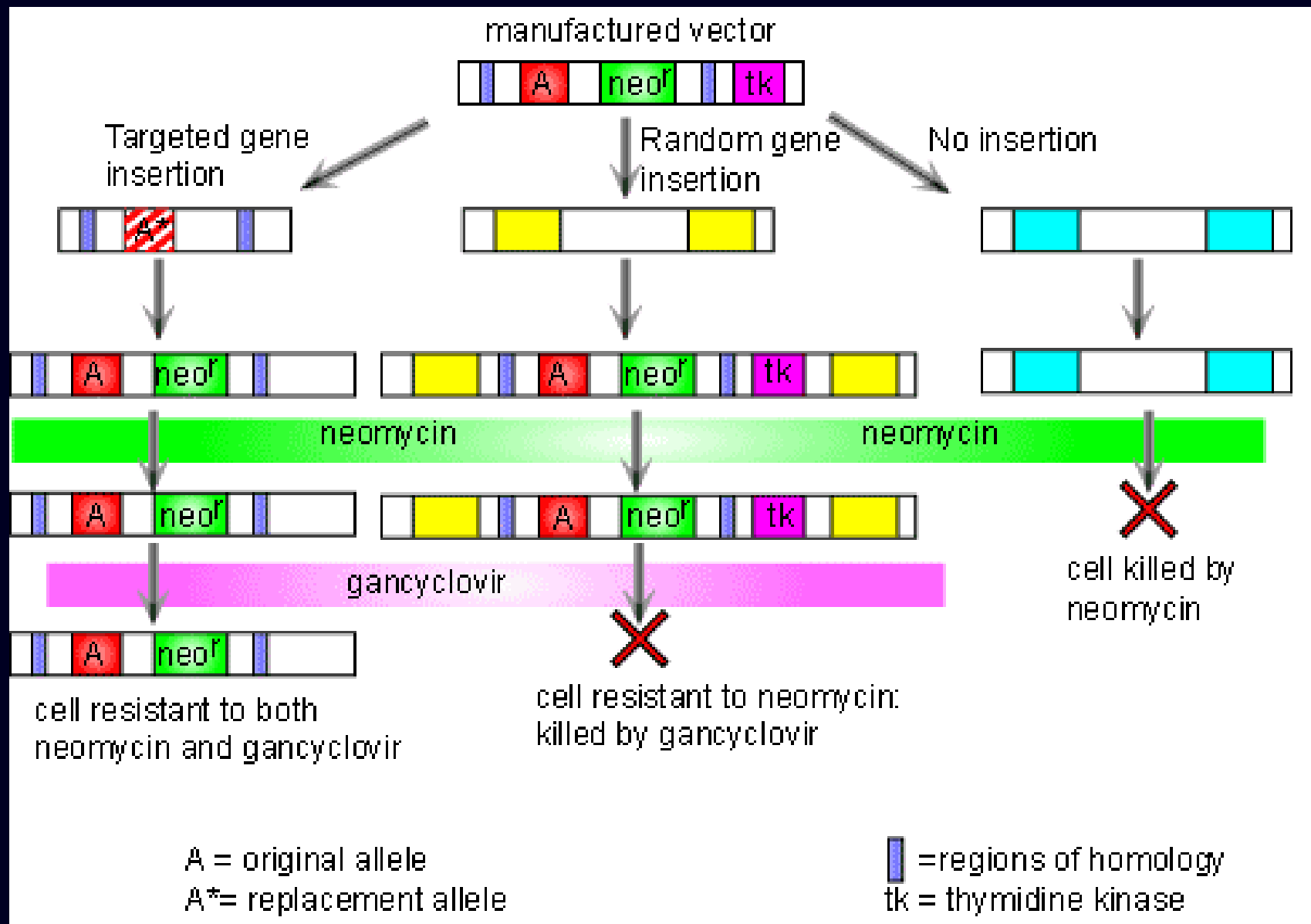
2) Una estrategia de reemplazo de genes, utilizando vectores que contienen dos marcadores de selección, lo que permite detectar dobles recombinaciones.

a) Resistencia a neomicina (neo^r), permite una selección positiva de células resistentes a G418.

b) HSV-TK, permite identificar células que experimentan recombinaciones dobles con el gen blanco por la ausencia de la actividad timidina-quinasa

HSV-TK genera muerte celular en presencia de Ganciclovir (GC). Este es un nucleótido suicida, análogo a timidina que es fosforilado por HSV-TK pero que no es sustrato de las timidinas kinasas de mamíferos.

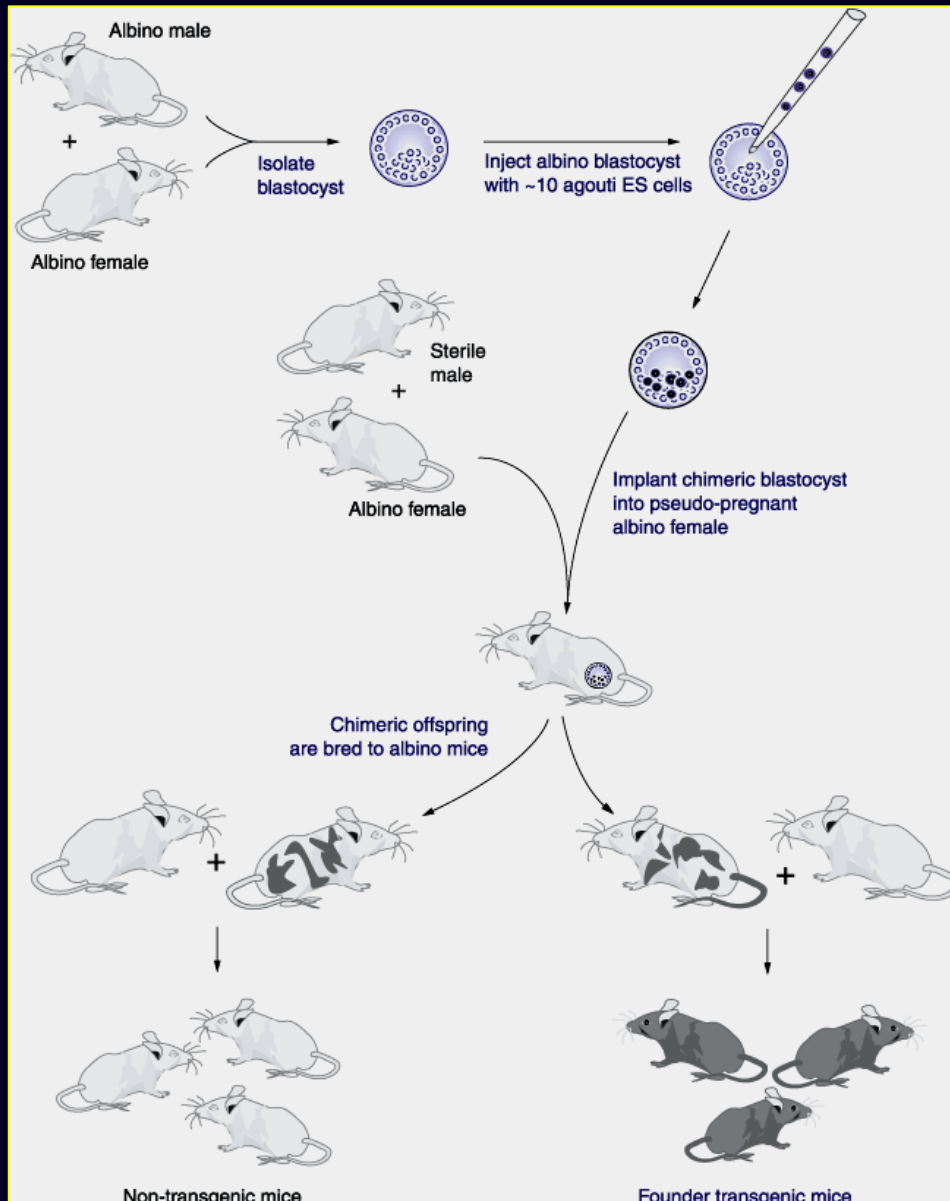




Formación de células ES conteniendo una mutación knockout

GENERACION DE RATONES KNOCKOUTS

RECOMBINACION HOMOLOGA EN CELULAS ES



Diferencias en el color del pelaje entre el ratón donador de las células ES y el ratón donador de la blástula son usadas para identificar a los animales fundadores de la línea transgénica.

La descendencia posee un pelaje en mosaico reflejando el genotipo quimérico. Los fundadores son identificados por el color agoutí del pelaje.

(2-24 months) isolate genomic clone and characterize

modify construct to mutate and allow double selection

(2 days) electroporate into ES cells

(2 weeks) select G418^R gancyclovir^R ES clones

(1-52 weeks) screen extensively to identify homologous recombinants, PCR, Southern blots

(2 days) culture targeted ES cell clones

day 1

week 3

week 5

week 11

week 16

week 22

week 27

inject ES cells into C57BL/6 blastocysts
implant into uterus of foster mother

pups born

chimeric offspring identified by coat color

tail biopsies

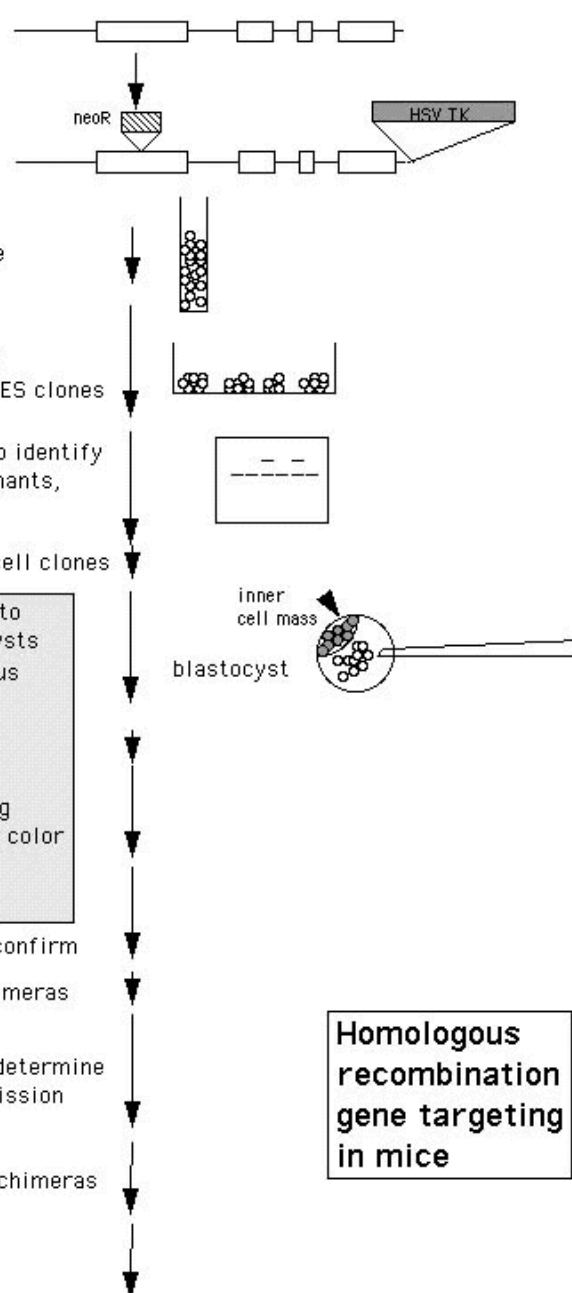
Southern blot to confirm

outcross male chimeras

Southern blot to determine germ line transmission

breed germ-line chimeras

2 week old pups
+/+, +/-, -/-



GENERACION DE RATONES KNOCKOUTS

RECOMBINACION HOMOLOGA EN CELULAS ES

Ventajas

- **Transfección eficiente en cultivo**
- **Selección positiva/negativa y enriquecimiento de las células ES en cultivo**
- **Inserción dirigida en el genoma del ratón**
- **Eliminación del gen blanco y desarrollo de líneas knockout**

GENERACION DE RATONES KNOCKOUTS

RECOMBINACION HOMOLOGA EN CELULAS ES

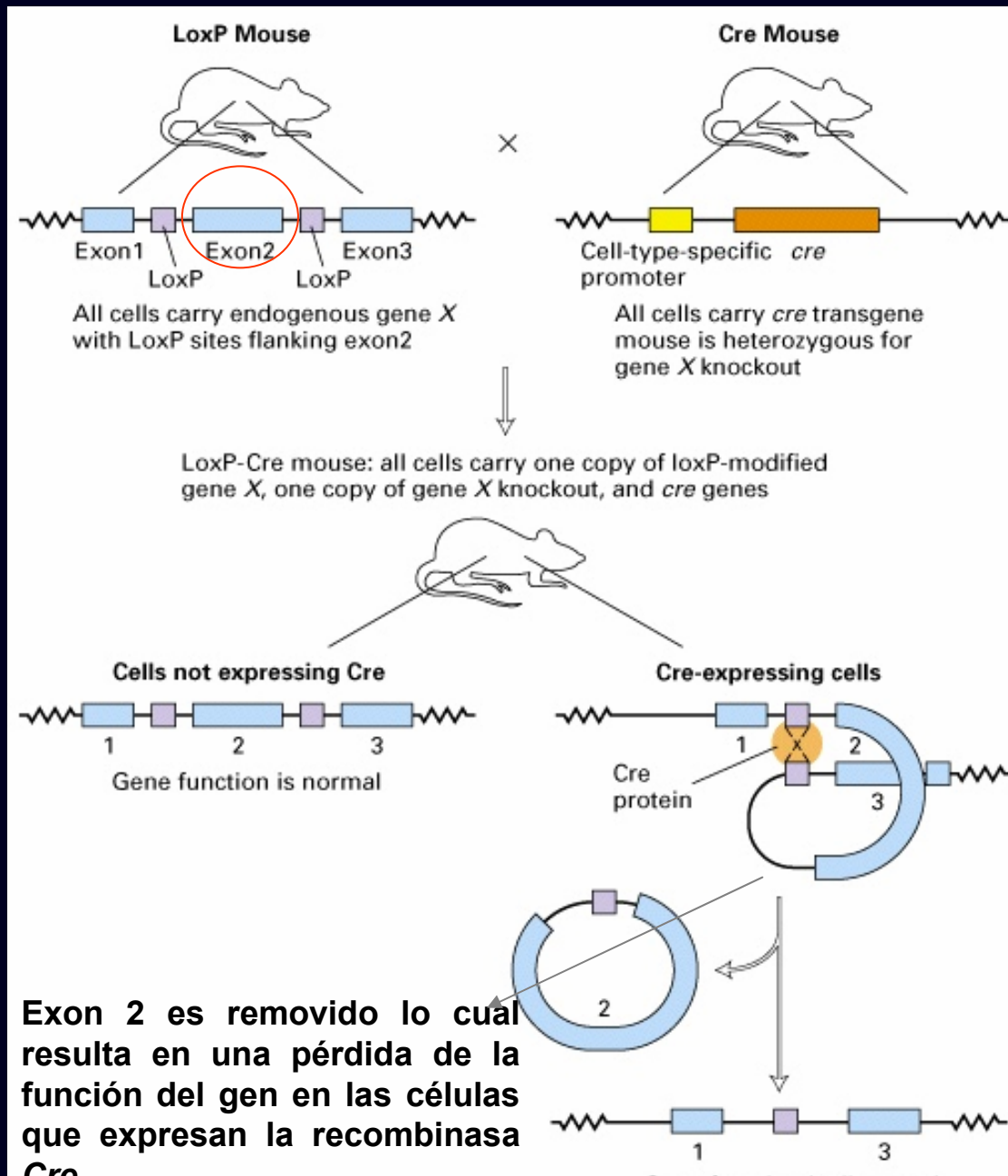
Desventajas

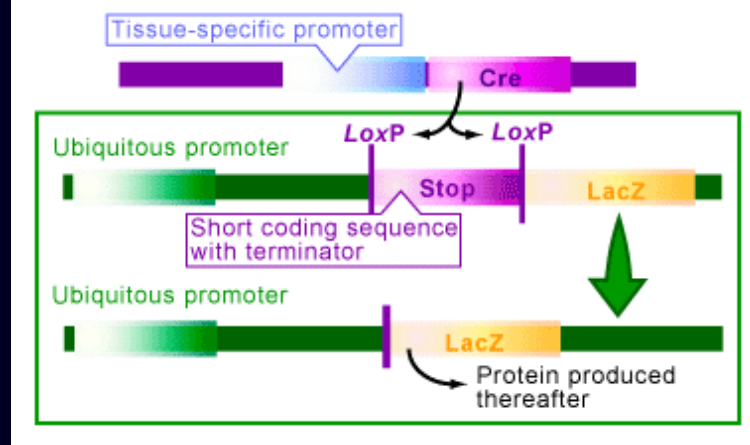
La frecuencia de recombinación homóloga es $\sim 10^{-5}$. Los factores que afectan esta recombinación son:

- 1) El largo de las secuencias homólogas en el vector.**
- 2) El grado de homología entre las secuencias genómicas contenida en el vector y las secuencias blanco.**
- 3) La ubicación cromosómica del gen blanco.**

Type of disorder	Human disease	Altered mouse gene	Gene locus
<i>metabolic</i>			
<i>diseases</i>	Familial hypercholesterolemia	Low density lipoprotein receptor	<u><i>Ldlr</i></u>
	Hyperlipoproteinemia	Apolipoprotein E	<u><i>Apoe</i></u>
	Tay-Sachs disease	Hexokinase A	<u><i>HexA</i></u>
	Gaucher disease	Glucocerebrosidase	<u><i>Gba</i></u>
	Gout	Urate oxidase	<u><i>Uox</i></u>
<i>hematological</i>			
<i>diseases</i>	α -thalassemia	α -globin gene cluster	<u><i>Hba</i></u>
<i>neurological</i>			
<i>diseases</i>	Huntington disease	Huntington disease gene homologue	<u><i>Hdh</i></u>
	Ataxia telangiectasia	Ataxia telangiectasia	<u><i>Atm</i></u>
<i>oncological</i>			
<i>diseases</i>	Li-Fraumeni syndrome	Protein 53	<u><i>Trp53</i></u>
	Familial retinoblastoma	Retinoblastoma-1	<u><i>Rb1</i></u>

Ejemplos de modelos de ratones transgénicos para el estudio de enfermedades en humanos





LacZ-staining on a frontal brain section of a NEX-CRE*LoxP-LacZ-indicator mouse
 Frontal cerebral section of a double transgenic NEX-Cre**LacZ*-indicator mouse at the age of 55 days. *LacZ* staining corresponds exactly to the known expression domains of the NEX gene like hippocampus and neocortex.

La Biotecnología ha incorporado la transgénesis animal con los fines tales como:

- Mejoramiento de caracteres productivos**
- Resistencia a enfermedades**
- Modelos animales de enfermedades humanas (por ejemplo, ratones knockout)**
- Animales transgénicos como biorreactores para la síntesis de proteínas de alto valor (proteínas terapéuticas): Las "granjas farmacéuticas" o "granjas moleculares"**
- Donación de órganos: Xenotransplantes**

Los animales transgénicos pueden ser utilizados como biorreactores para la producción de proteínas recombinantes con aplicaciones terapéuticas.

Animales transgénicos (ovejas, cabras, cerdos, vacas, peces etc.) han sido generados durante los últimos 15 años utilizando técnicas estándares de microinyección basadas en los métodos inicialmente desarrollados en animales modelos como el ratón.

Recientemente, la metodología de transferencia nuclear ha revolucionado este campo, a través de la clonación de animales. Esta técnica se basa en la habilidad de inyectar o fusionar óvulos carentes de núcleos con núcleos diploides derivados de células somáticas en cultivo. Estas células pueden ser transfectadas de manera estable y proporcionar una manera de obtener cientos de animales idénticos en una generación.

PRODUCCION DE MAMIFEROS TRANSGENICOS EN DIFERENTES ESPECIES

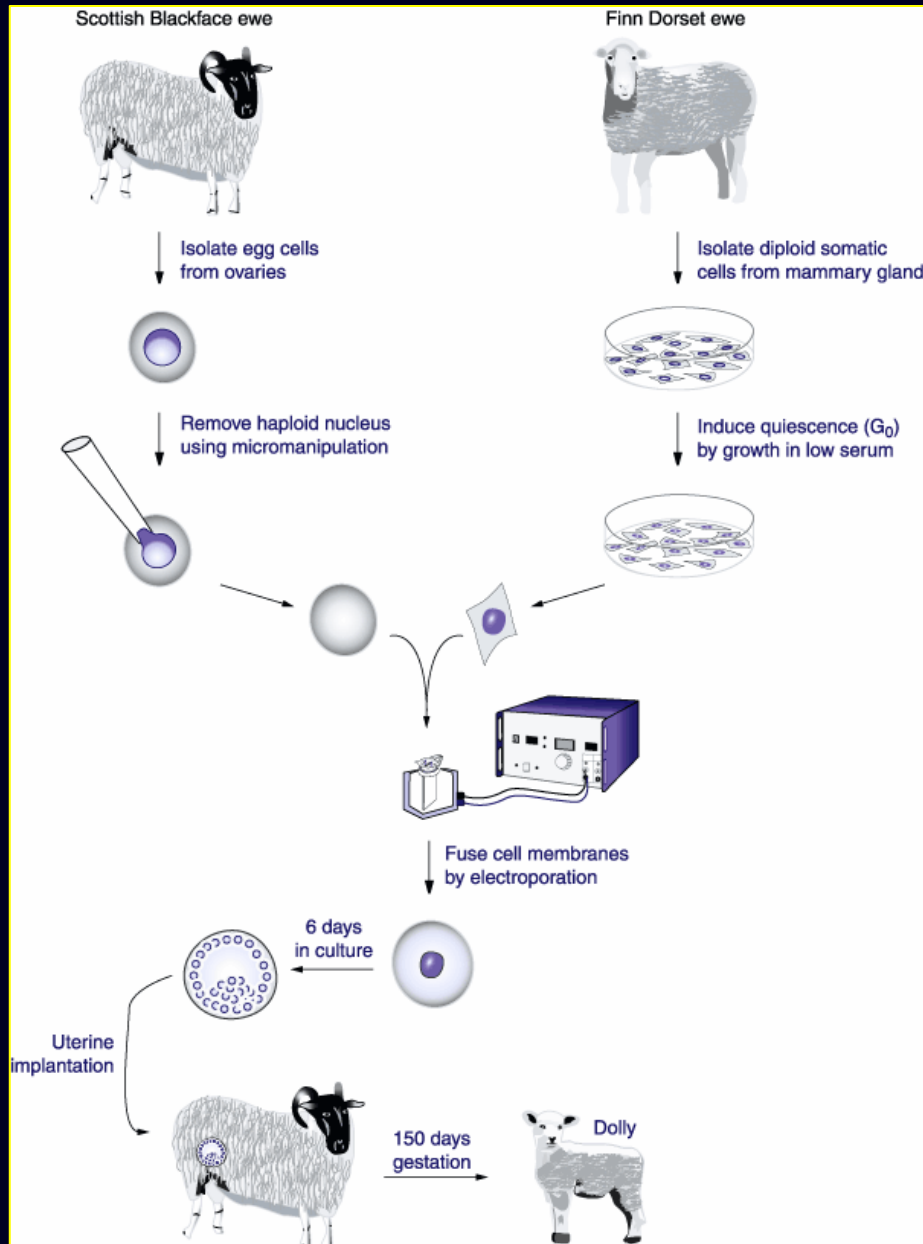
Especie	Animales transgénicos producidos		Meses para obtener la F2	Costo en \$ estimado de cada animal transgénico	Proteína producida en la leche (por lactación)
	% descendencia	% embriones inyectados y transferidos			
Ratón	17,3	2,6	7,5	121 \$	1 g
Conejo	12,8	1,5	17		1 Kg
Porcino	9,2	0,9	38	25.000 \$	
Ovino	8,3	0,9	52	60.000 \$	100 Kg
Bovino	3,6	0,7	100	546.000 \$	1.000 Kg

Varias estrategias exitosas han explotado las propiedades de la leche como un recurso renovable para la producción de enzimas, anticuerpos y proteínas estructurales. La aproximación experimental consiste en utilizar los promotores transcripcionales de genes específicos de la glándula mamaria para dirigir la expresión de proteínas transgénicas solubles.

Ejemplos de proteínas humanas que han sido expresadas en la leche de animales transgénicos.

Human gene product	Pharmaceutical use	Mammary gland-specific promoter	Transgenic animal
Factor IX	blood clotting protein, treatment of hemophilia B.	sheep b-lactogloblin	sheep
a-1-antitrypsin	protease inhibitor, treatment of emphysema and cystic fibrosis.	sheep b-lactogloblin	sheep
antithrombin III	blood clotting protein, treatment of ATIII deficiency disease and use in open heart surgery.	cow casein	goat
tissue plasminogen	dissolves blood clots, used as an acute treatment of heart attacks.	mouse whey acidic protein	goat
activator lactoferrin	iron transport protein, infant formula additive.	cow a-S-casein	cow
protein C	anticoagulant, treatment of hemophilia and used for surgery	mouse whey acid protein	pig

TRANSFERENCIA NUCLEAR

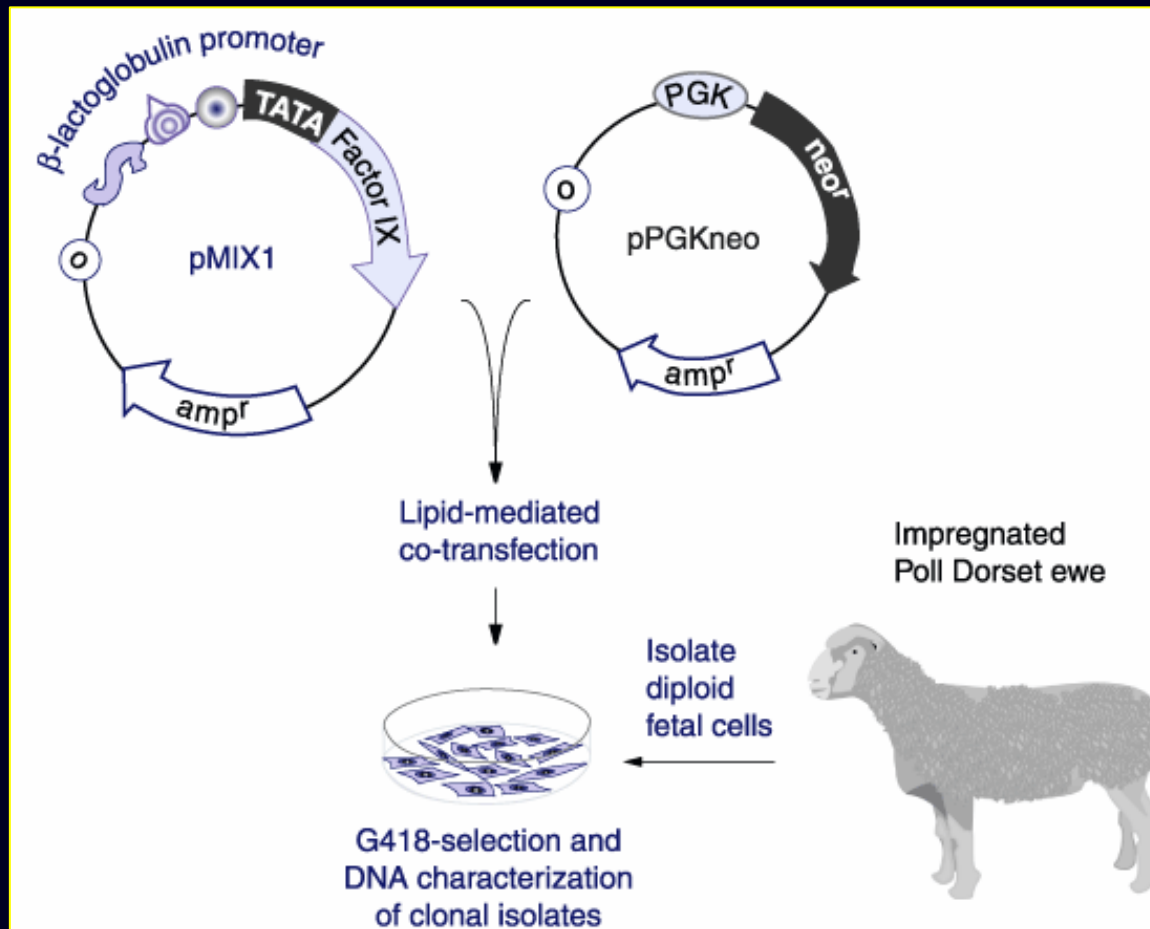


Esquema de la clonación de la oveja Dolly, utilizando el material genético derivado de células aisladas de la glándula mamaria de una oveja adulta.

(tasa de éxito:1 de 227)



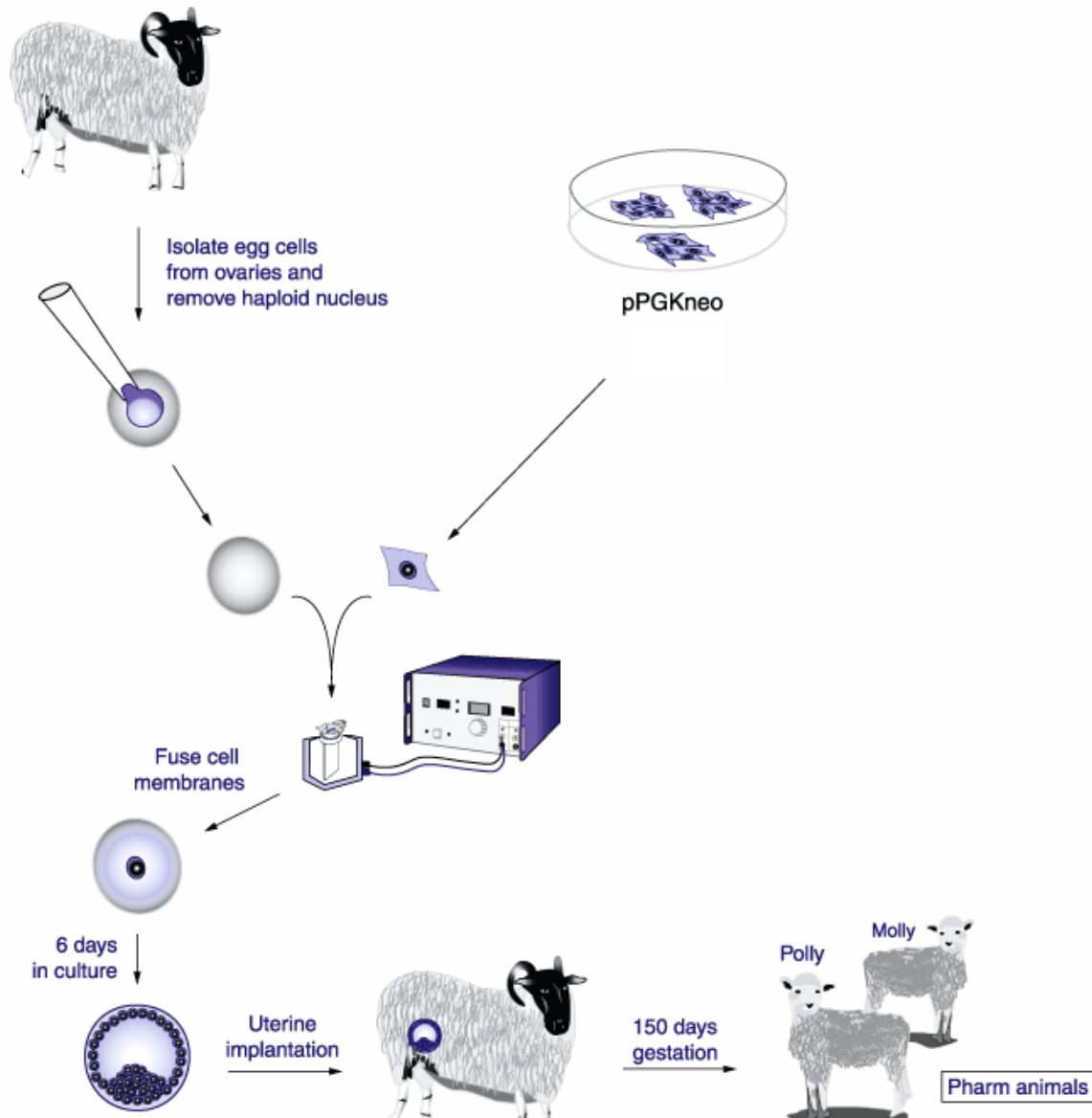
TRANSFERENCIA NUCLEAR



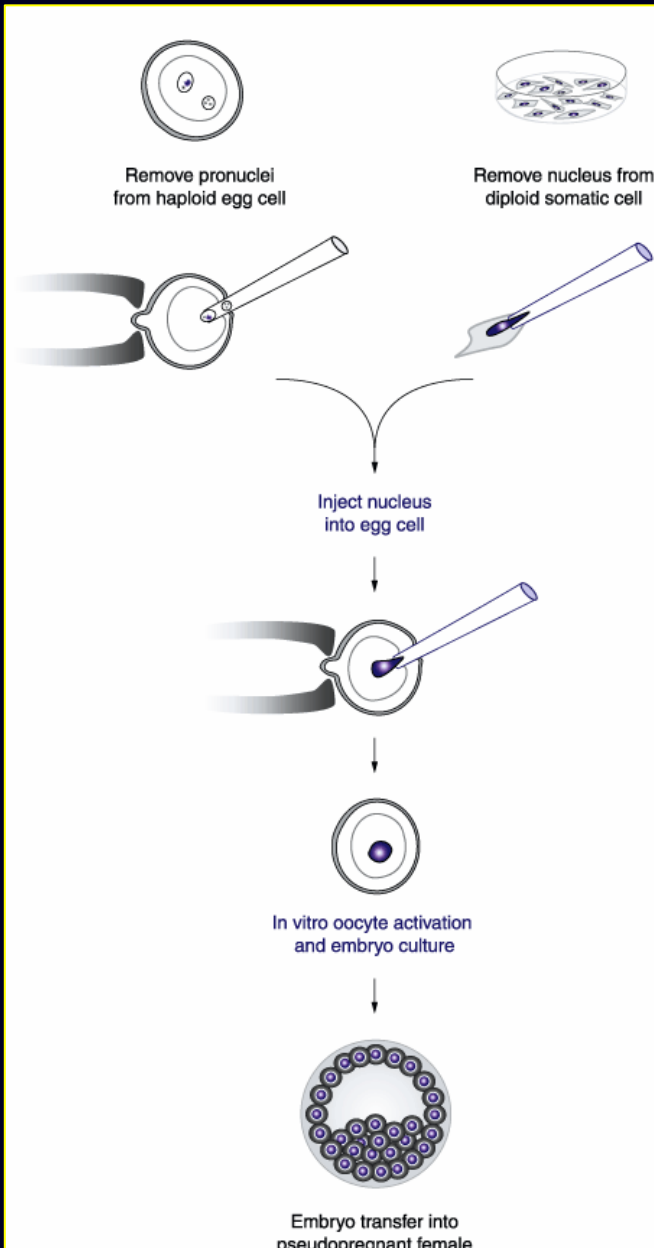
Transfección estable de células diploides con un vector que contiene el cDNA del Factor IX y un promotor que dirige su expresión específicamente en las glándulas mamarias (pMIX1).

TRANSFERENCIA NUCLEAR

Scottish Blackface ewe

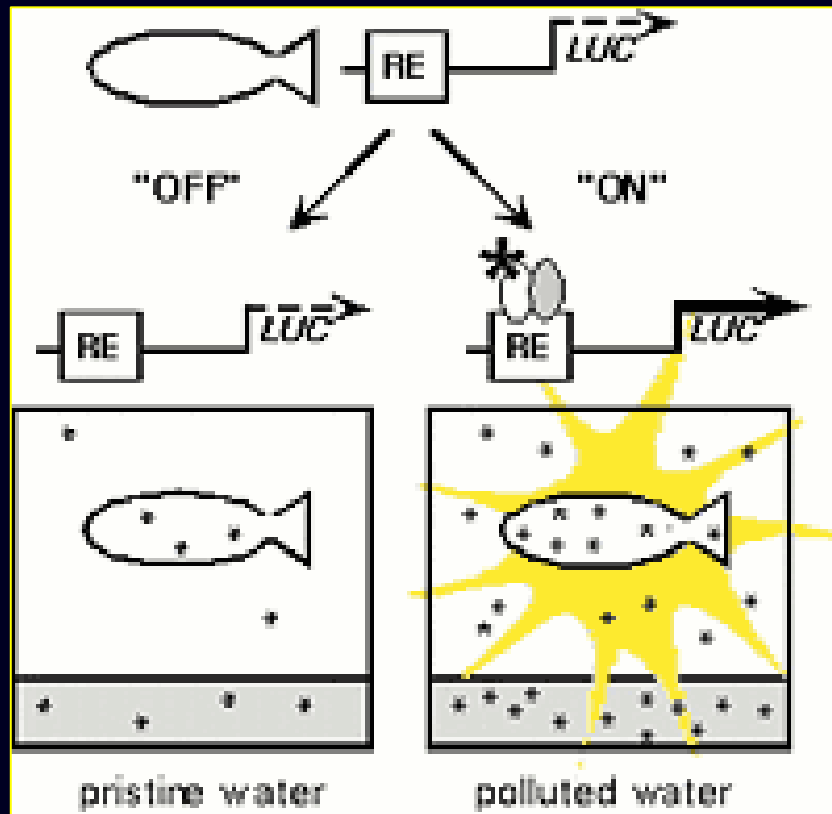


TRANSFERENCIA NUCLEAR



La técnica de transferencia nuclear *Honolulu* utiliza la microinyección para generar células diploides. La activación *in vitro* del ovocito tiene lugar mediante su incubación en un medio sin calcio que contiene estroncio y citocalasina B para prevenir la formación del cuerpo polar.

(tasa de éxito: 3 de 100)



Zebrafish transgénico con elementos de respuesta a contaminantes del agua. Los contaminantes se concentran (1.000- to 100.000 veces en los tejidos del zebrafish y activan elementos de respuesta (RE) que inducen la expresión de luciferasa. Los zebrafish son incubados con luciferina la que es rápidamente incorporada por sus tejidos. La luciferina es oxidada por la luciferasa y genera luz. Esta luz es cuantificada con un luminiómetro, sin necesidad de sacrificar al zebrafish.



Table 1

Key features of a selected list of transgenic animals used in therapeutic protein production

Animal	Time of gestation (month)	No. of off-spring	Time to sexual maturity (month)	Lactation period (month)	Annual milk production (L)	Annual yield of recombinant protein per female (kg)	Recombinant proteins expressed	Companies (numbers correspond to footnote)*
Cattle	9	1	16	33	8000–9000	40–80	Lactoferrin, α -lactalbumin	2, 7, 9, 11, 15
Chickens	20 days	250/yr	6			0.25 kg	Monoclonal antibodies, lysozyme, growth hormone, insulin, human serum albumin	4, 8, 18, 19, 20, 21
Goats	5	1–2	8; 3–6 months in BELE** goats	18	800–1000; 365 in BELE goats	4	Antithrombin III, tissue plasminogen activator; monoclonal antibodies, α 1-antitrypsin, growth hormone	10, 13, 16
Mice	19–21 days	10–12 L/ 3–4 weeks	1–2	1	0.015	750 μ g–3 mg	Fibrinogen surfactant Protein B, procollagen recombinant antibodies	1, 12
Pigs	4	10	6	16	300	1.5	Factor VIII, Protein C, hemoglobin	3, 5, 14, 16, 17
Rabbits	1	8	5	7	4–5	0.02	Calcitonin, extracellular superoxide dismutase, erythropoietin, growth hormone, insulin-like growth factor 1, interleukin 2, α -glucosidase, glucagon-like peptide	15, 16
Sheep	5	1–2	8	18	500	2.5	α 1-antitrypsin, factor VIII, factor IX, fibrinogen, insulin-like growth factor 1	16

*1. **Abgenix** (Fremont, CA); 2. **Advanced Cell Technology** (Worcester, MA); 3. **Alexion** (New Haven, CT); 4. **Avigenics** (Athens, GA); 5. **Biotransplant** (Charlestown, MA); 6. **Chromos Molecular Systems** (Burnaby, Canada); 7. **Gala Design** (Sauk City, WI); 8. **Gene Works** (Ann Arbor, MI); 9. **Genetic Savings and Clone** (College Station, TX); 10. **Genzyme Transgenics** (Framingham, MA); 11. **Infigen** (DeForest, WI); 12. **Medarex** (Annandale, NJ); 13. **Nexia Biotechnologies** (Montreal, Canada); 14. **Nexttran** (Princeton, NJ); 15. **Pharming** (Leiden, The Netherlands); 16. **PPL Therapeutics** (Roslin, Scotland); 17. **ProLinia** (Athens, GA); 18. **Origen Therapeutics** (Burlington, CA); 19. **Sima Biotechnology** (Minneapolis, MN); 20. **TranXenoGen** (Shrewsbury, MA); 21. **Vivalis** (Roussay, France).

**Breed Early Lactate Early.

Source: Nature Biotechnology, October 2000.

Table 1. Companies producing bioproducts using transgenic domestic livestock

System	Company	Website	Products	Status
Goats	GTC (USA)	http://www.transgenics.com	Antithrombin III	Completed European efficacy study (ATIII)
			Monoclonal antibodies	Other products in preclinical
	Nexia (Canada)	http://www.nexiabiotech.com	Malaria vaccine Spider silk protein	Fiber development
Cattle			Human butyrylcholinesterase	Research
	Hematech (USA)	http://www.hematech.com	Human polyclonal antibodies (vaccines)	Research
Sheep	GTC (USA)	http://www.transgenics.com	Human serum albumin	Research
	PPL (UK)	http://www.ppl-therapeutics.com	Alpha 1-antitrypsin	Trials postponed Assets/business being sold
Rabbits	Pharming (Netherlands)	http://www.pharming.com	C1-inhibitor	Phase II clinical trials
	BioProtein Technologies (France)	http://www.bioprotein.com	Recombinant proteins	Research
Chickens	Vivalis (France)	http://www.vivalis.com	Recombinant proteins	Research
	Avigenics, Inc. (USA)	http://www.avigenics.com		
	TranXenoGen (USA)	http://www.tranxenogen.com		
	Virage(USA)	http://www.viragen.com		

TRASPLANTES DE ORGANOS DE ANIMALES A HUMANOS					
Donante	Organo	Sobrevivencia	Número de trasplantes	Autor	Año
Chimpancé	Riñón	Un paciente, nueve meses	12	Reemtsma	1964
Mono mico	Riñón	10 días	1	Reemtsma	1964
Mandrill	Riñón	4 días y medio	1	Hitchcock	1964
Mandrill	Riñón	Un paciente, dos meses	6	Starzl	1964
Chimpancé	Corazón	Extirpado	1	Hardy	1964
Chimpancé	Hígado	Un paciente, 14 días	3	Starzl	1969-74
Mono	Corazón	Fracasó (sin datos)	1	Yacoub	1975
Mandrill	Corazón	Rechazo agudo	1	Barnard	1977
Chimpancé	Corazón	4 días	1	Barnard	1977
Mandrill	Corazón	3 semanas	1	Bailey	1985
Mandrill	Hígado	70 días	1	Starzl	1992
Cerdo	Hígado	34 horas	1	Nakowka	1992
Mandrill	Hígado	26 días	1	Starzl	1993
Mandrill	Médula ósea	El paciente vive, pero el trasplante fracasó	1	Deeks e Ildstat	1995
Fuente: Unidad de trasplantes del Hospital General de Massachussetts, USA			Total: 32		



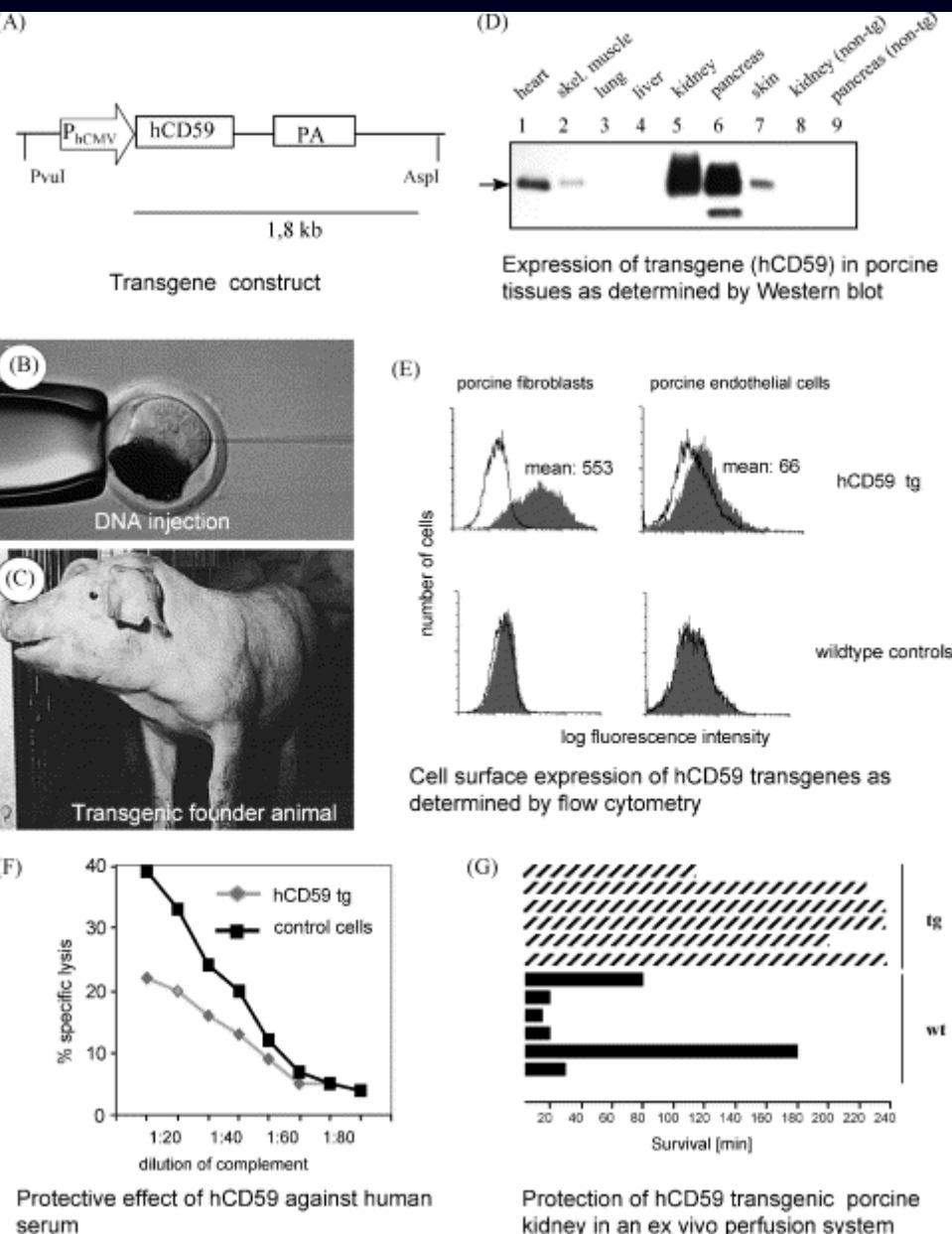

















































































Fig. 1. Generation of transgenic pigs for xenotransplantation. (A) Minigene construct for microinjection, P_{hCMV}: cytomegalovirus immediate early promoter, hCD59: human CD59 (regulator of complement) cDNA, PA: polyadenylation site, PvuI and AspI: flanking restriction enzyme sites. (B) DNA microinjection into one pronucleus of a porcine zygote. (C) Transgenic founder animal identified by Southern blotting of an ear sample. (D) Organ-specific expression of hCD59 protein in an F1-offspring animal determined by Western blotting with a specific monoclonal antibody. (E) Cell surface expression of hCD59 in porcine primary cells as determined by flow cytometry. Grey shaded curves demonstrated presence of hCD59 by usage of a monoclonal antibody, white curves indicate background values by usage of an isotype matched control antibody. (F) Functional expression of human CD59 on transgenic porcine cells as demonstrated by cytotoxicity assay. Porcine cells were incubated with heat treated human serum and a dilution series of human complement. Specific lysis of porcine cells were measured by chromium release. (G) Ex vivo perfusion of porcine kidneys from F1-animals with human blood. Nearly all transgenic porcine kidneys could be perfused for 4 h, whereas non-transgenic control kidneys failed soon after onset of perfusion due to hyperacute rejection. Mean survival times were 207.5 min for transgenic and 57.5 min for wildtype kidneys ($P < 0.005$).

		In vitro fertilization procedure	Embryo develops after nuclear transfer	Embryo implants after	Live births	Transgene possible	Gene targeting	Commercial use
Sheep								
Cow								
Pig								
Goat								
Chicken				NA				
Rabbit								
Mouse								
Dog								
Cat								
Nonhuman primate								
Human	