

---

# TRANSGENESIS EN ANIMALES

## Definiciones

- ❑ **TRANSGÉNESIS:** Transferencia de genes a un organismo.
- ❑ **TRANSGÉNICO:** organismo en el cual se ha introducido un DNA exógeno, de modo que se mantenga estable de forma hereditaria afectando a todas las células del organismo.
- ❑ **TRANSGEN:** DNA exógeno.

---

# TRANSGENESIS EN ANIMALES

## Aplicaciones

- **Ingeniería genética de caracteres de interés.**
- **Modelos animales para la investigación de enfermedades en humanos.**
- **Sistemas animales como bioreactores para la producción de compuestos biológicos heterólogos (*pharming*),**

---

# 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:

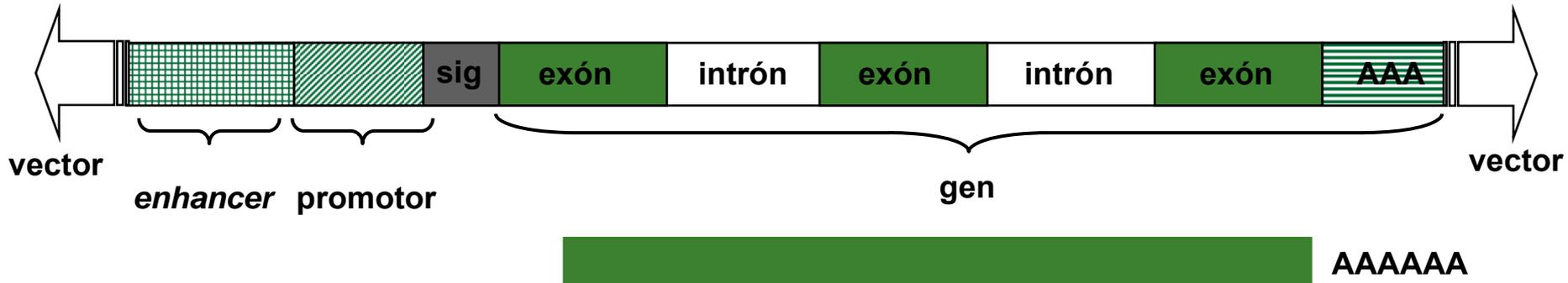
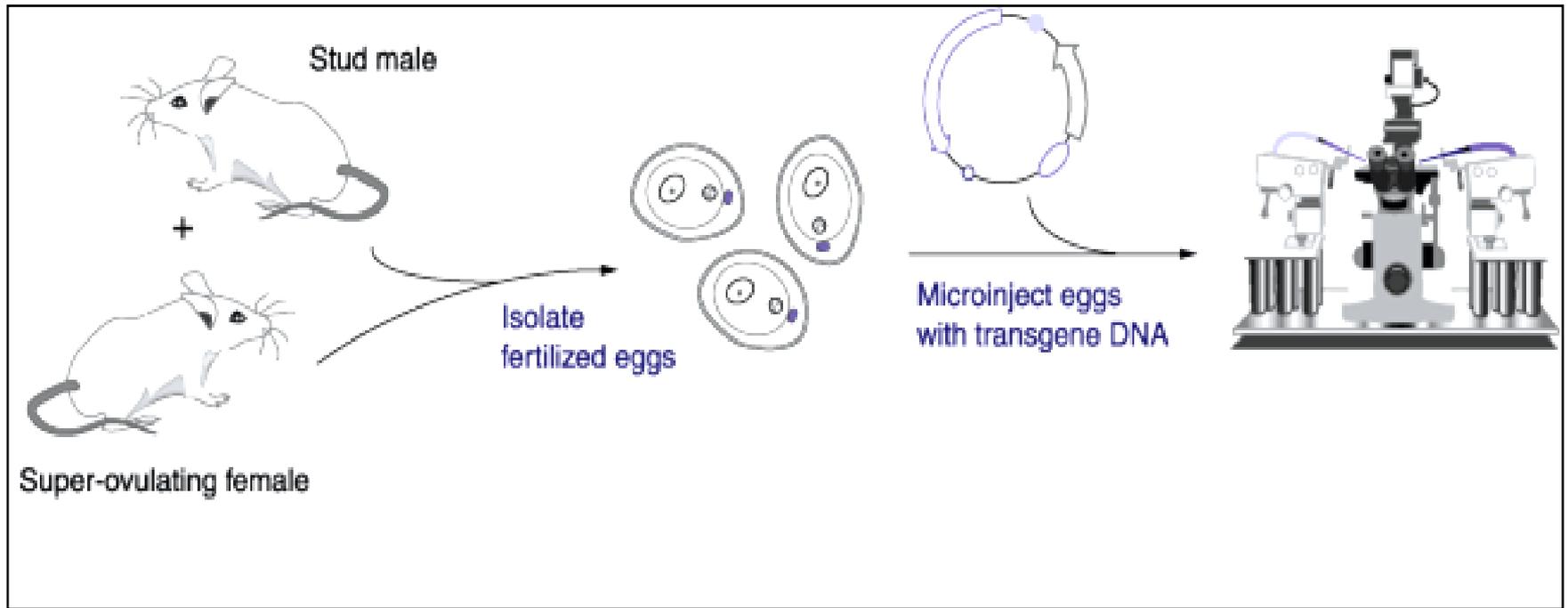
1. Adición de un nuevo gen ➡ Microinyección.
2. Inactivación de un gen ➡ Animales *knockouts* (KO).

---

# ESTRATEGIAS

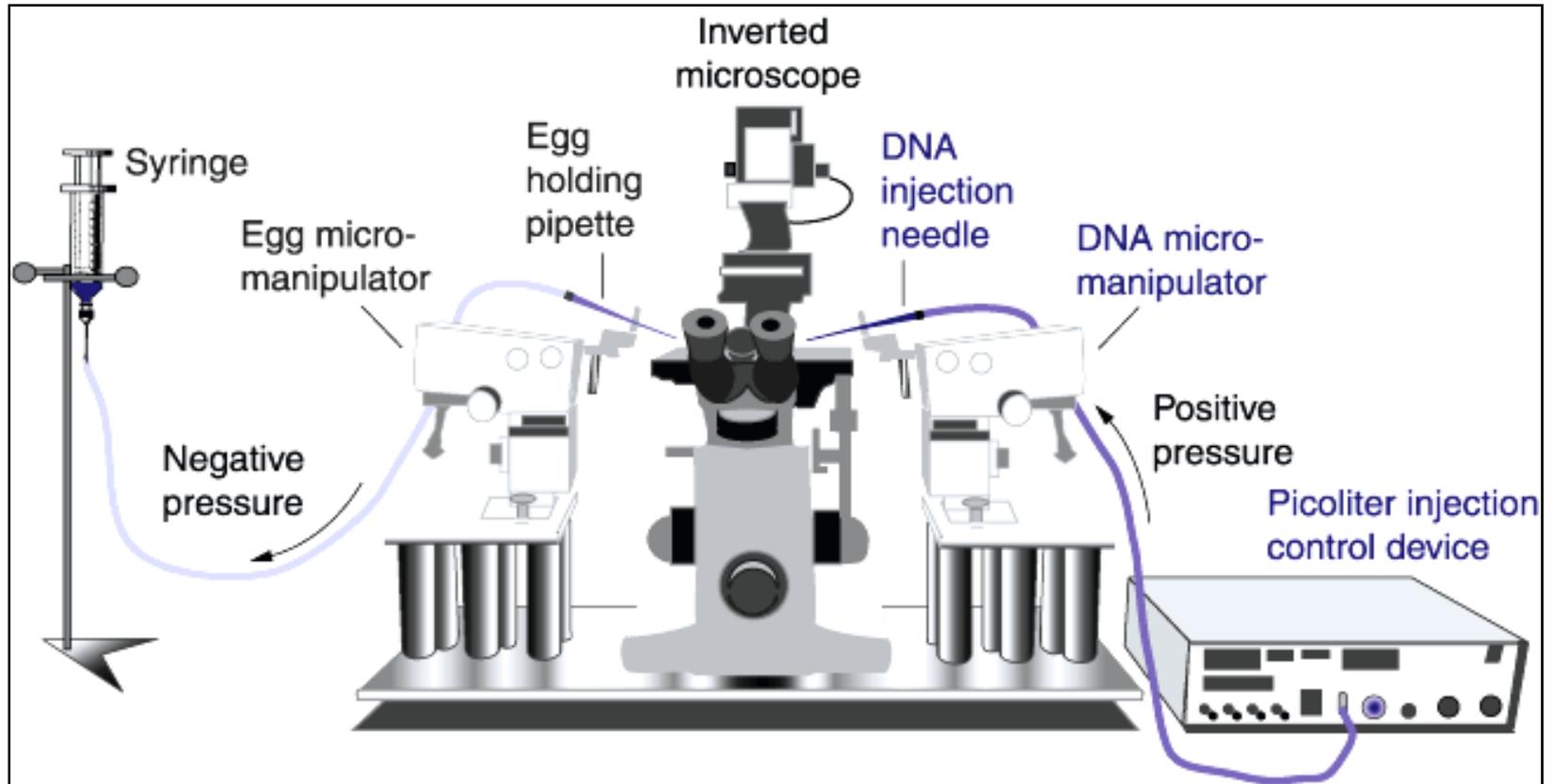
- **Microinyección de DNA en el pronúcleo del cigoto para producir ratones transgénicos que contienen una o más copias de un vector de expresión insertado al azar en el genoma.**
  - **En la primera fase, se aíslan un número grande de óvulos fertilizados, los que se consiguen sometiendo a las hembras a un tratamiento hormonal para provocar una mayor ovulación.**
  - **En la segunda fase, los cigotos 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.**

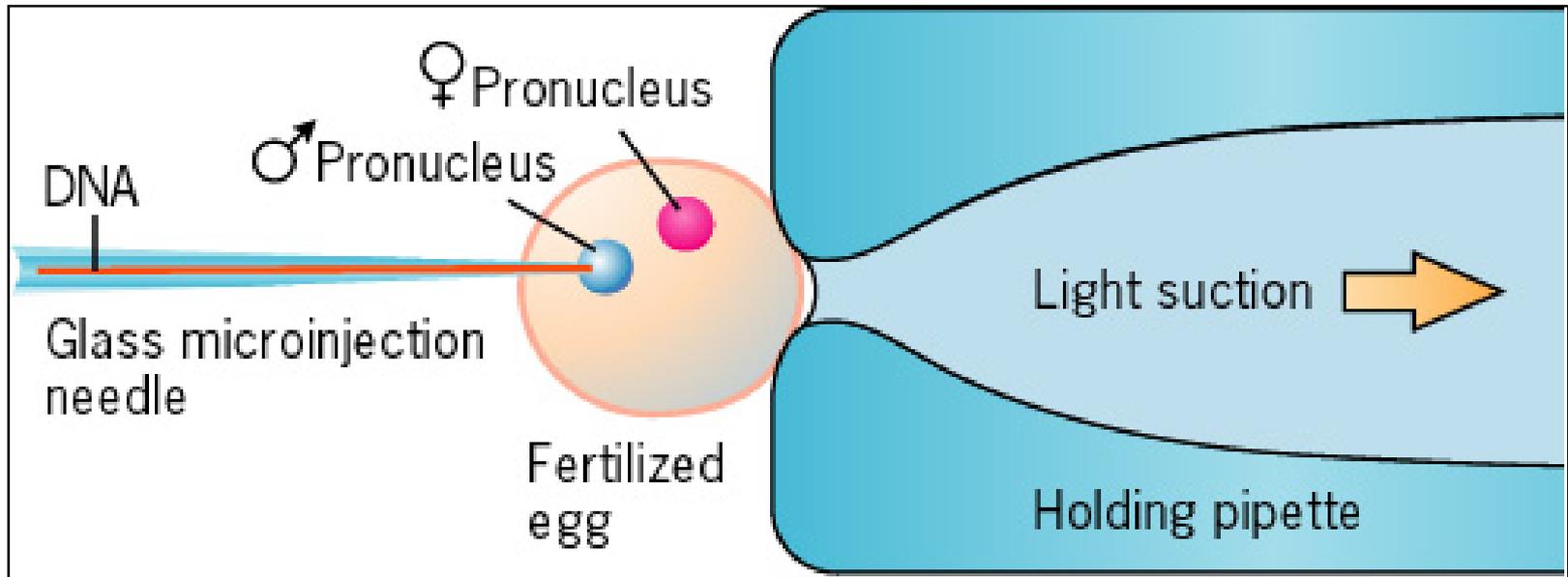
# GENERACION DE RATONES TRANSGENICOS MICROINYECCION DE DNA



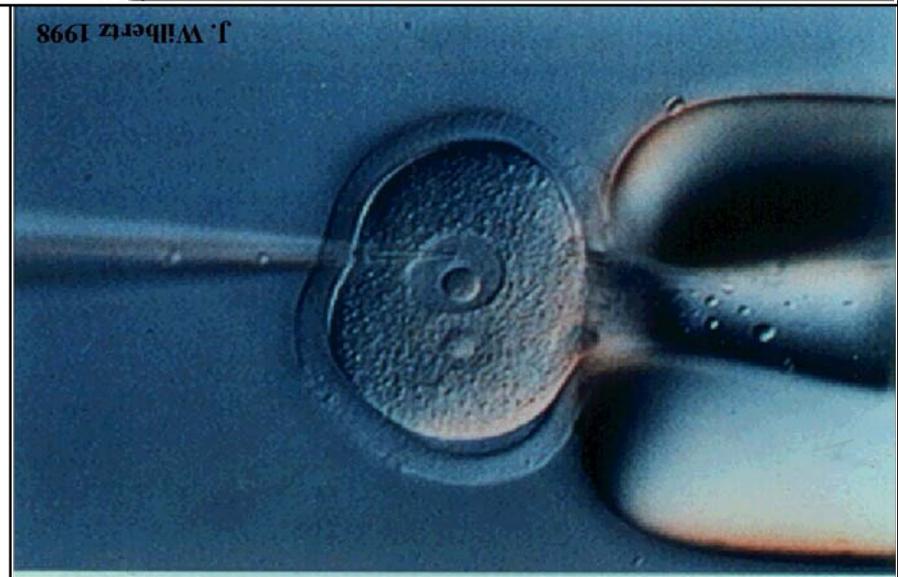
# GENERACION DE RATONES TRANSGENICOS

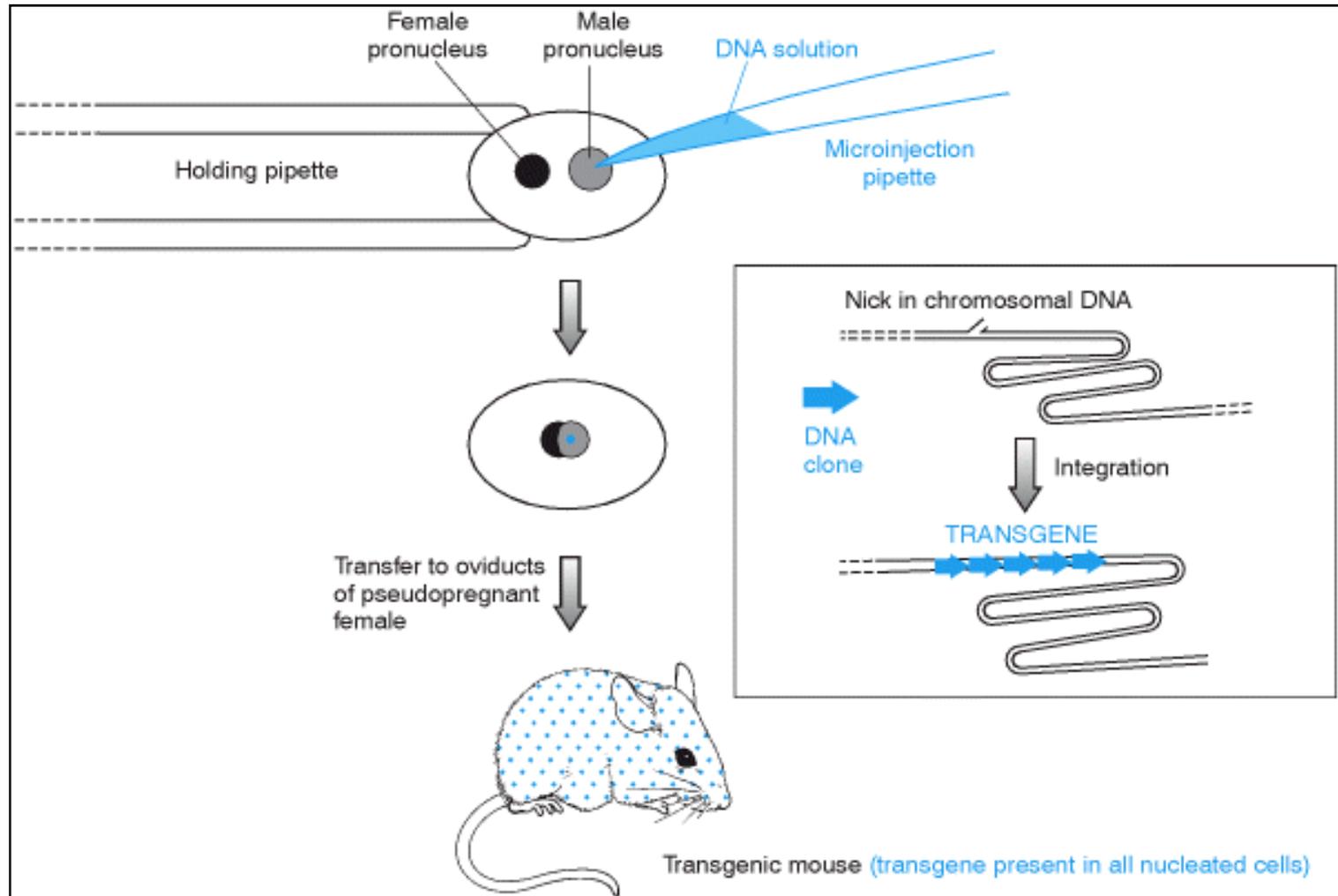
## MICROINYECCION DE DNA

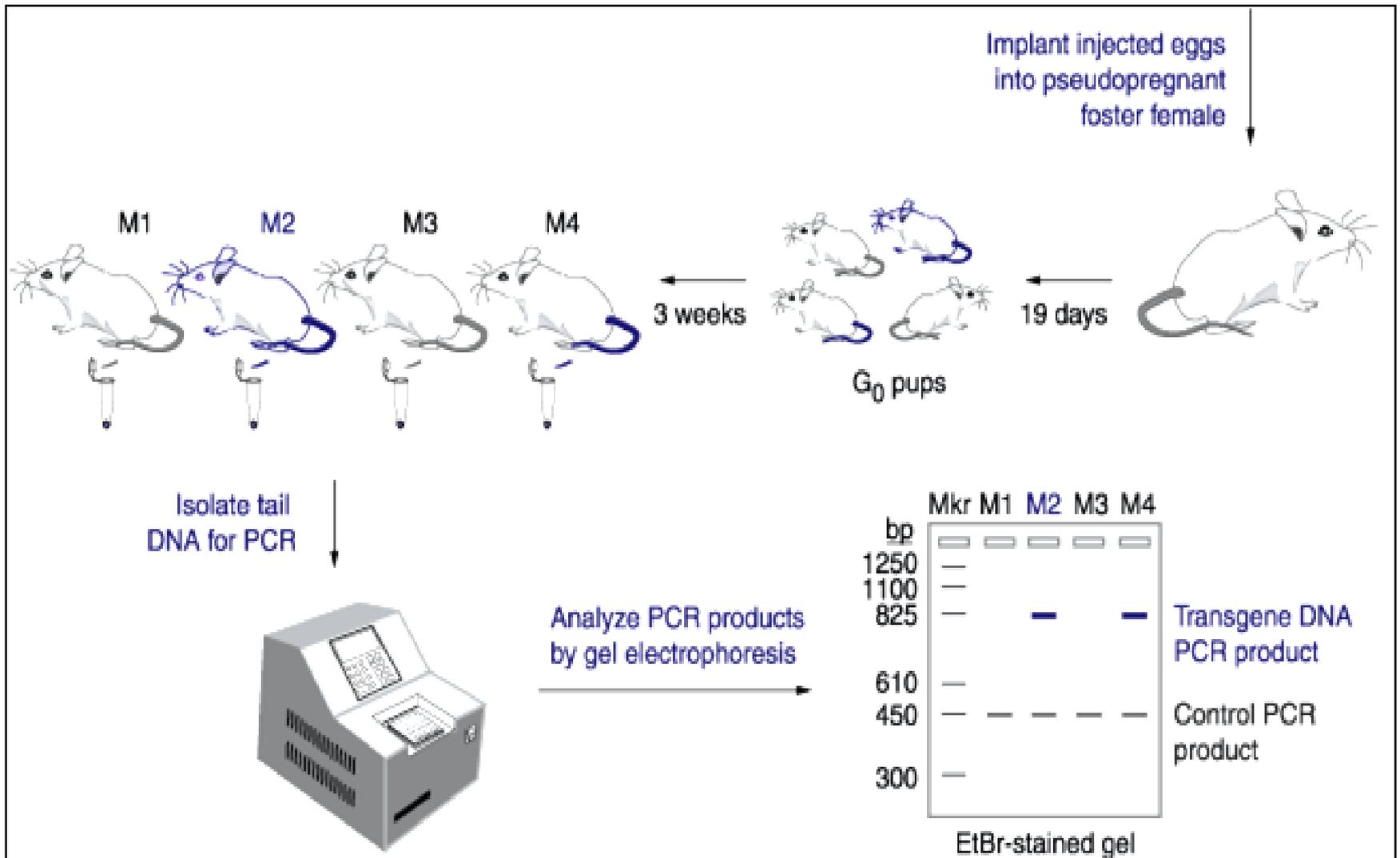


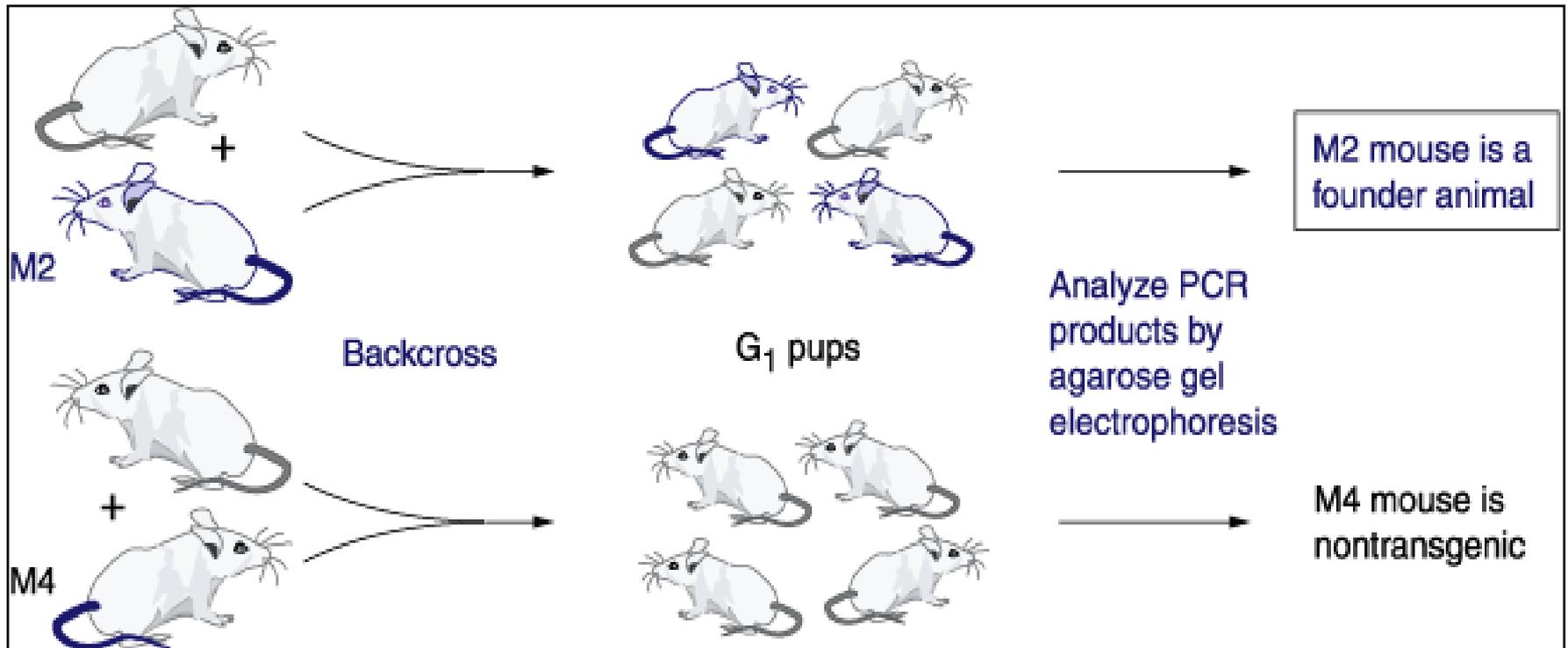


**El DNA purificado es inyectado directamente en el pronúcleo masculino de un cigoto, utilizando un micromanipulador acoplado a una pipeta con presión negativa y otro micromanipulador acoplado a una aguja de inyección.**









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, dando lugar a un patrón mendeliano de herencia del transgen.

---

# GENERACION DE RATONES TRANSGENICOS

## MICROINYECCION DE DNA

### **Eficiencia:**

- **Sobrevive el 60 a 80% de los ovocitos microinyectados**
- **10 a 30% se desarrolla**
- **10 a 30% de la progenie es transgénica**

---

# **GENERACION DE RATONES TRANSGENICOS**

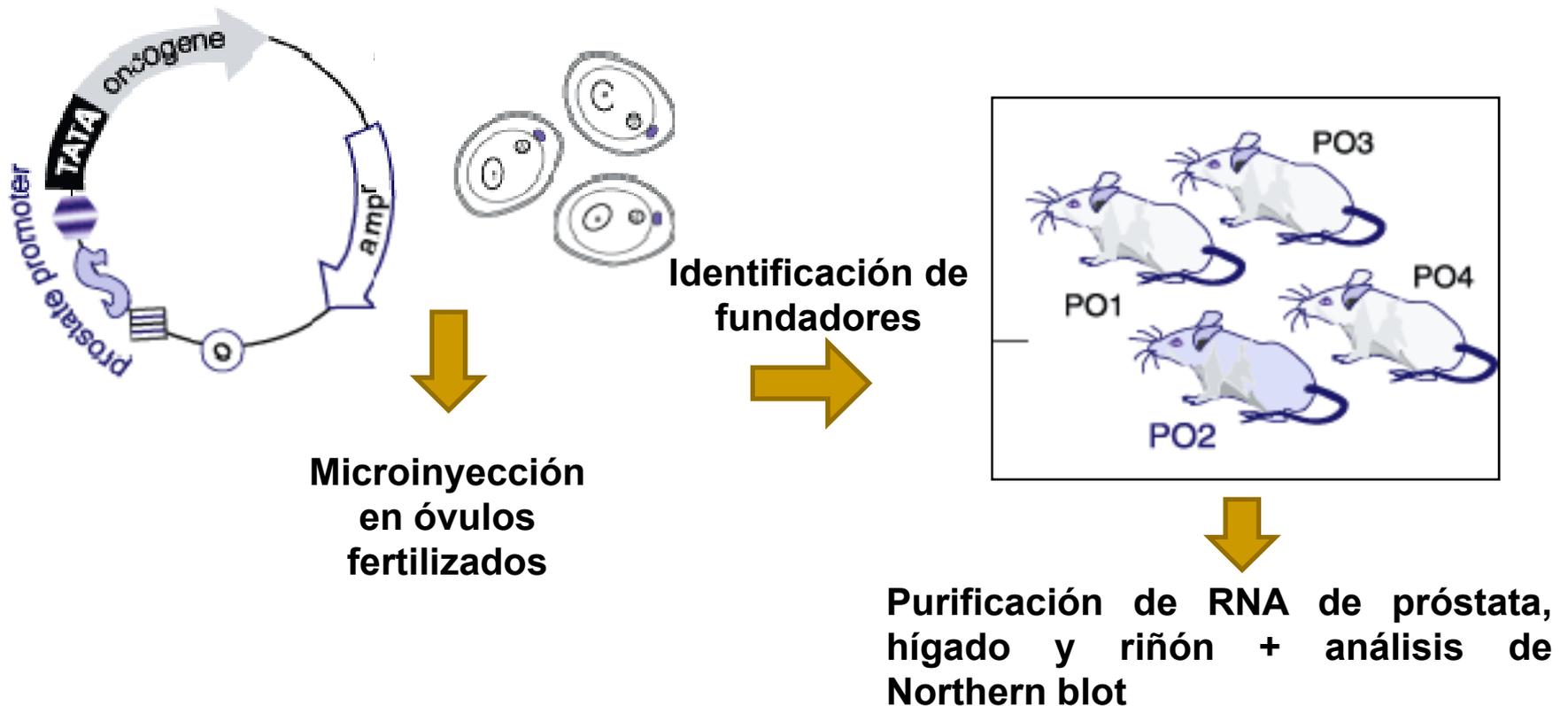
## **MICROINYECCION DE DNA**

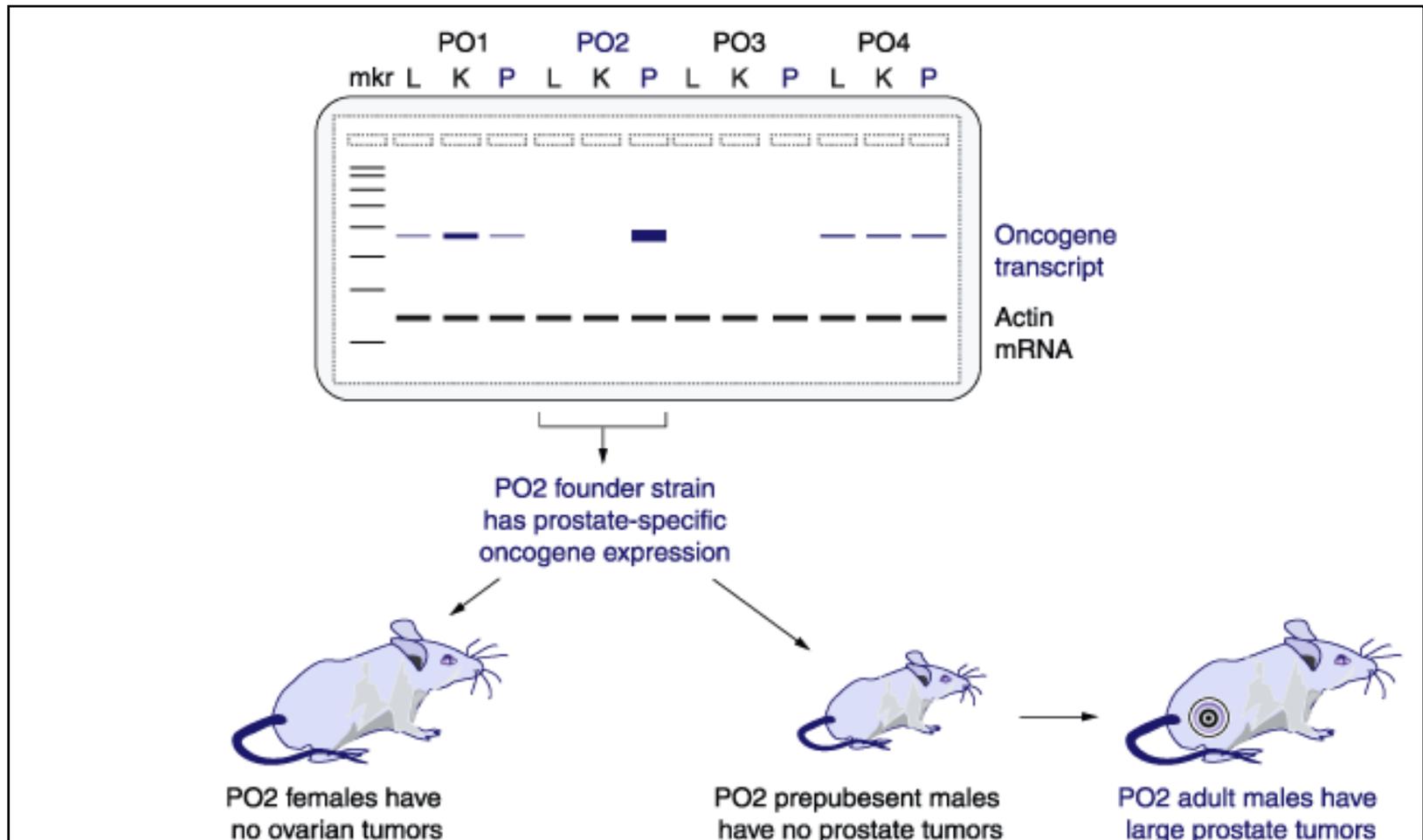
**Integración al azar del transgen.**

- **No es posible predecir el sitio de integración.**
- **Generalmente se integran múltiples copias en un sitio.**
- **Existe la posibilidad de inactivar un gene nativo.**
- **En general, no existe relación entre el numero de copias integradas y el nivel de expresión del transgen.**
- **Niveles variables de expresión.**

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

En este caso el *enhancer* de un gen expresado en la próstata es utilizado para generar ratones transgénicos que son modelos del cáncer prostático



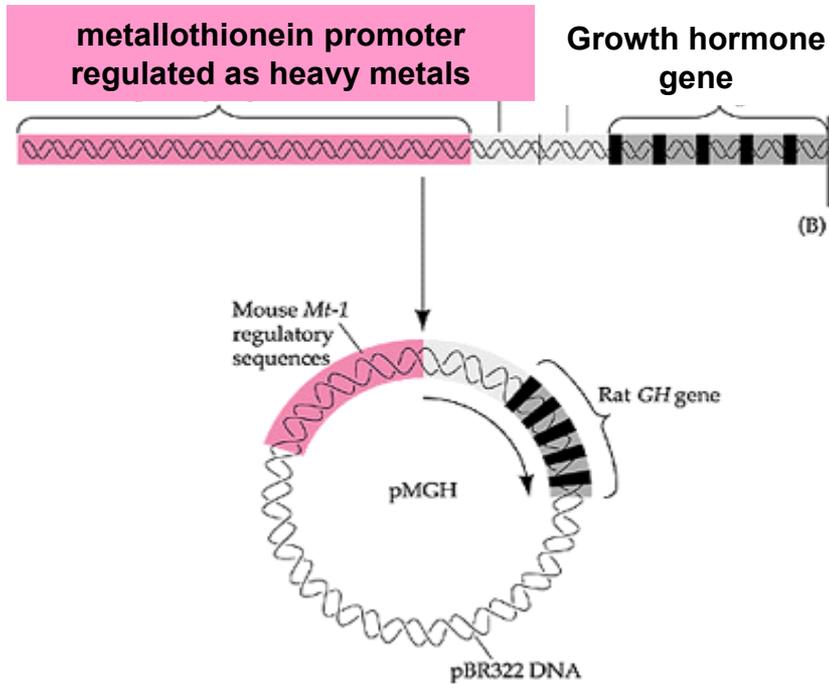


La caracterización del tejido prostático en los ratones fundadores permite determinar el efecto de la expresión del transgen en la generación de tumores.

# GENERACION DE RATONES TRANSGENICOS

## MICROINYECCION DE DNA

### Ejemplos



Mice fed heavy metals are 2-3 times larger

# GENERACION DE RATONES TRANSGENICOS

## MICROINYECCION DE DNA

### Ejemplos



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

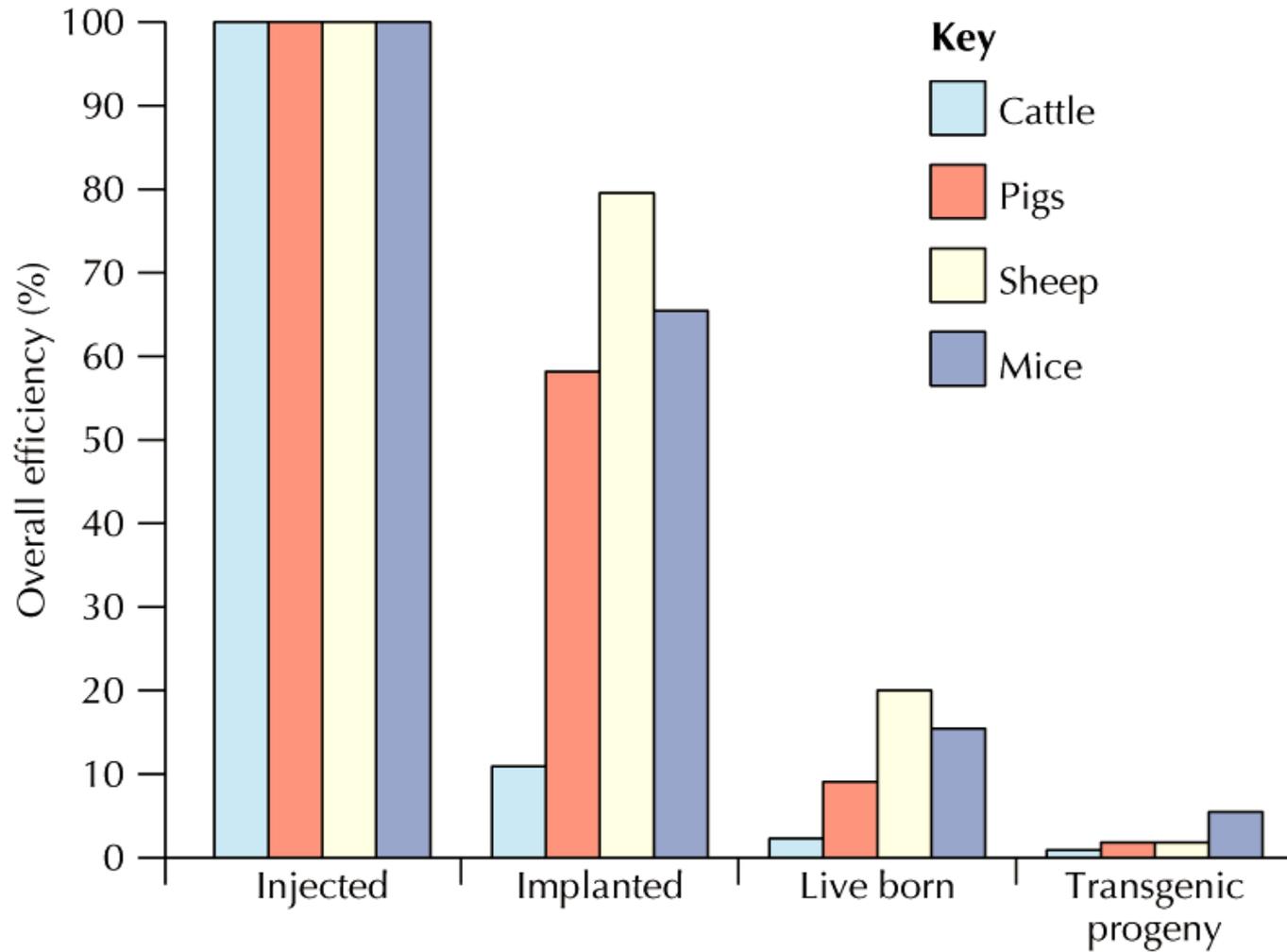
# GENERACION DE RATONES TRANSGENICOS

## MICROINYECCION DE DNA

### Ejemplos



# EFICIENCIA DE LA MICROINYECCION



---

# GENERACION DE RATONES TRANSGENICOS

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

1. Adición de un nuevo gen ➡ Microinyección.
2. Inactivación de un gen ➡ Animales *knockouts* (KO).

# ESTRATEGIAS

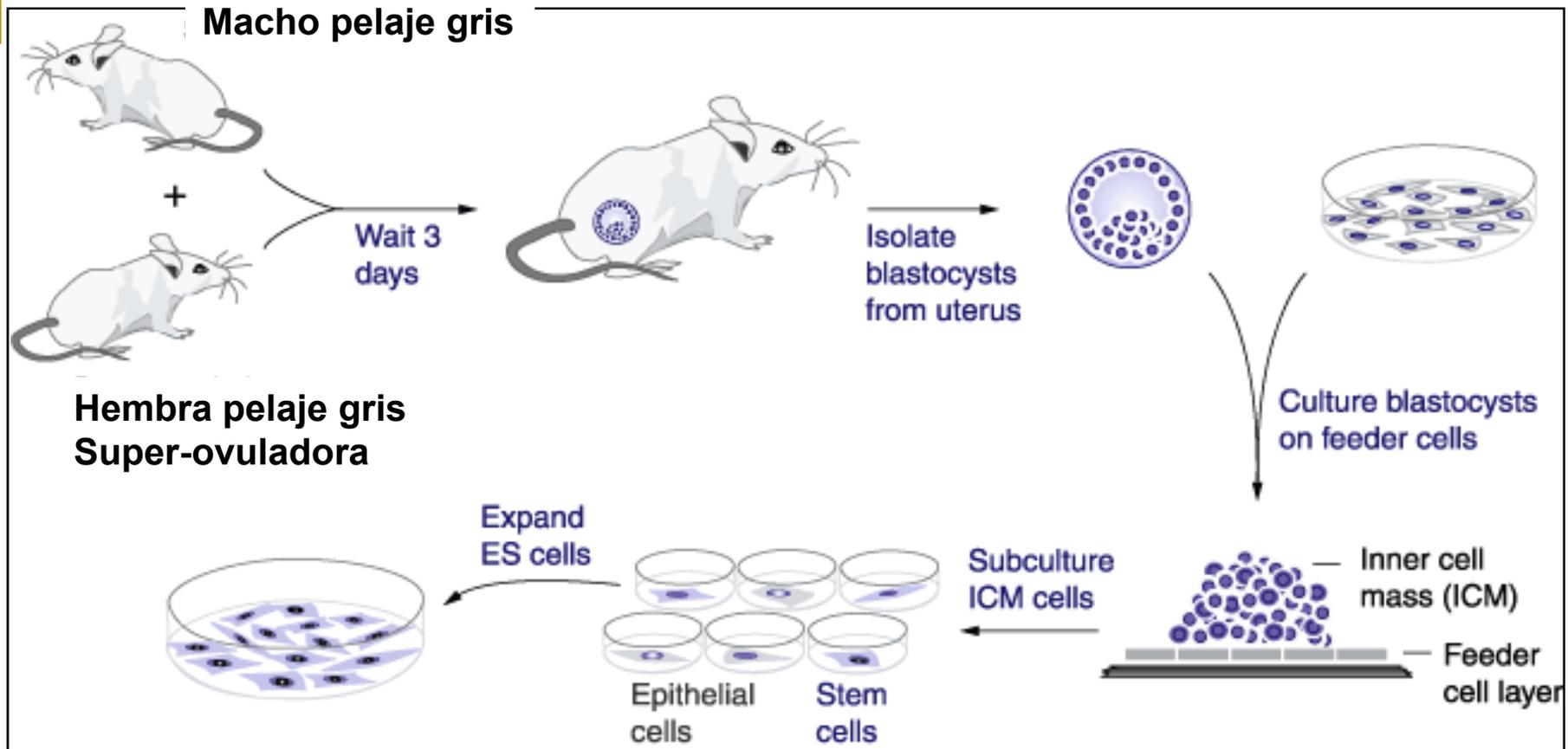
- **Recombinación homóloga en *loci* definidos para crear *knockouts* (KO) o reemplazar genes.**
  - **Esta estrategia implica introducir DNA en células embrionarias (células ES). Estas células se extraen del interior de la blástula en desarrollo y se incuban en un medio donde no se diferencian, manteniendo su estado embrionario.**
  - **El DNA se introduce en las células ES en cultivo, 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.**

---

## **GENERACION DE RATONES KNOCKOUTS RECOMBINACION HOMOLOGA EN CELULAS ES**

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

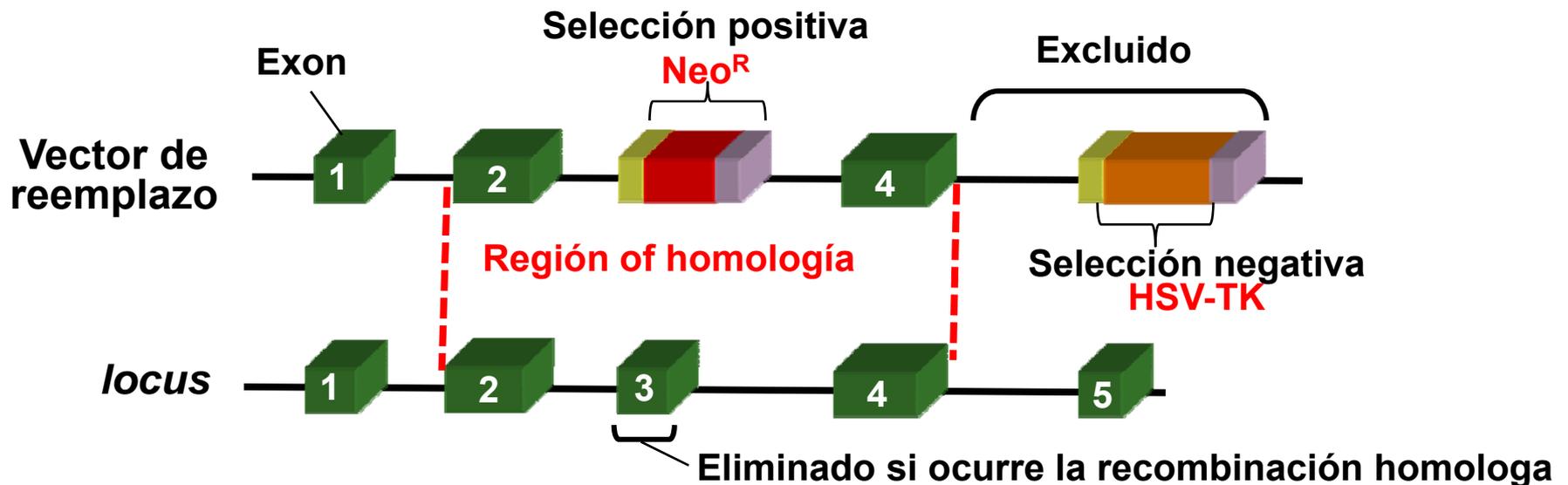
- 1) Procedimientos para el cultivo de células embrionarias totipotenciales (ES).
- 2) Generación de vectores de clonación y de estrategias de análisis que permitieran la identificación de aquellas células ES que han experimentado recombinación homóloga con el transgen.



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*.

El DNA experimental es transfectado de manera estable en las células ES mediante electroporación o lipofección, usando vectores que contienen marcadores de selección.

## Recombinación homóloga en las células ES



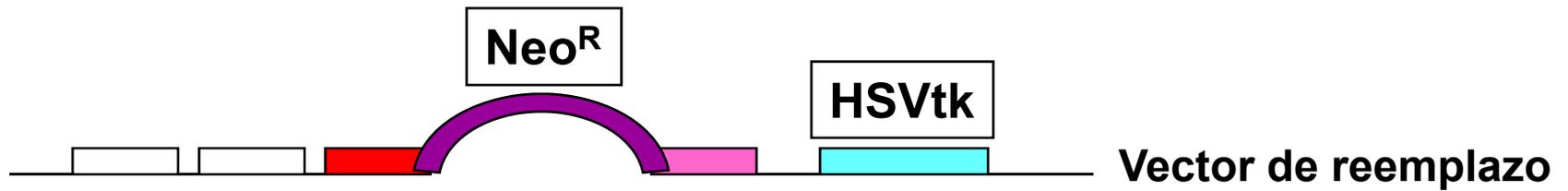
- La recombinación homóloga en células ES es poco frecuente ( $1 \times 10^{-5}$  a  $1 \times 10^{-6}$ ).

## **Recombinación homologa en las células ES**

**Reemplazo de genes, utilizando vectores que contienen dos marcadores de selección, lo que permite detectar dobles recombinaciones.**

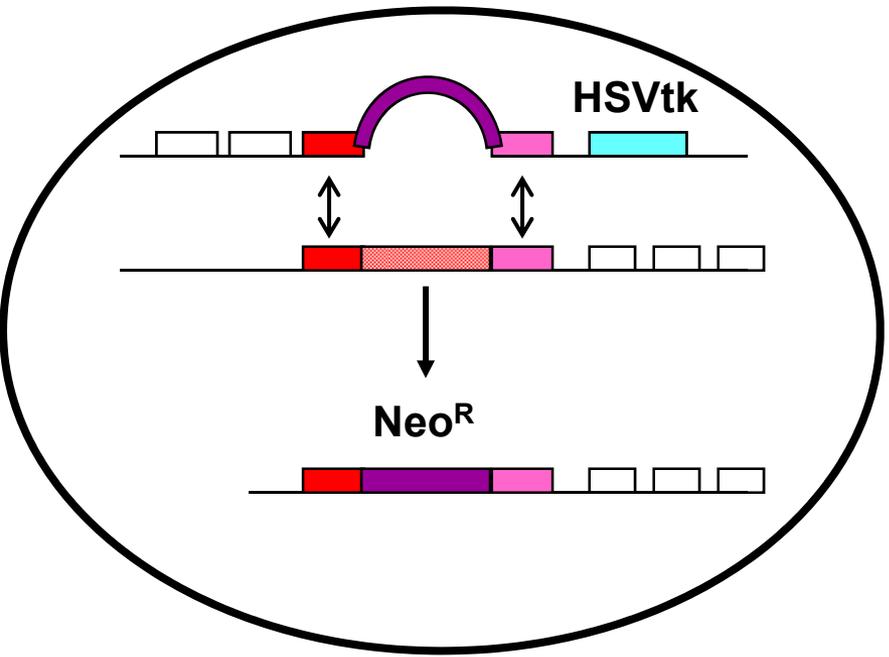
**a) Neomicina (neo<sup>r</sup>), permite una selección positiva de células resistentes al antibiotico G418.**

**b) Selección negativa - HSV-TK, permite identificar células que experimentan recombinaciones dobles con el gen blanco a través de su sobrevivencia en Ganciclovir (GC). HSV-TK fosforila a GC, un análogo al nucleótido timidina, de manera que la DNA polimerasa no puede discriminar e incorpora este nucleótido no-funcional en el DNA durante la replicación generando, así, la muerte de las células.**

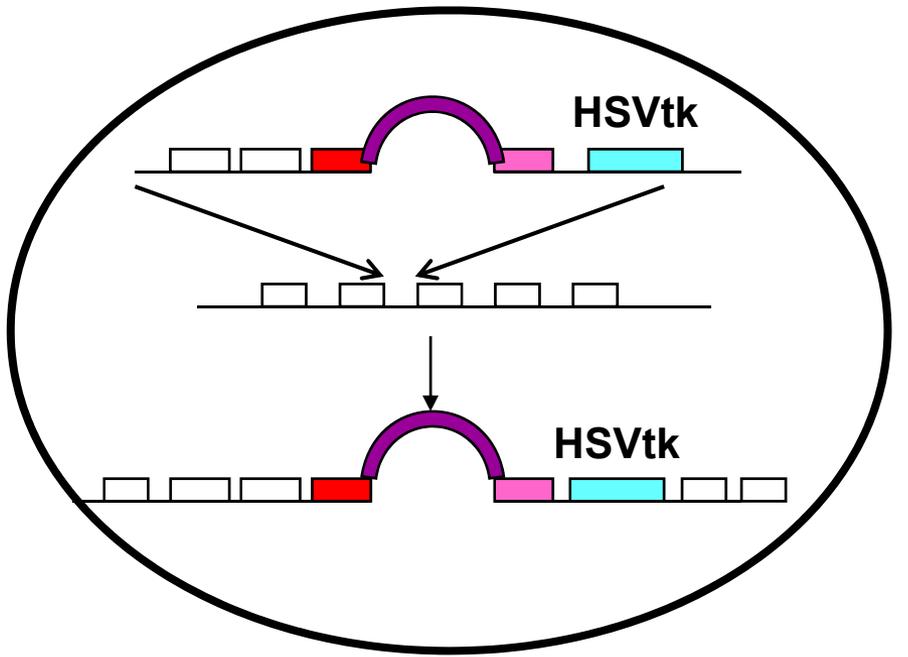


Recombinación homóloga

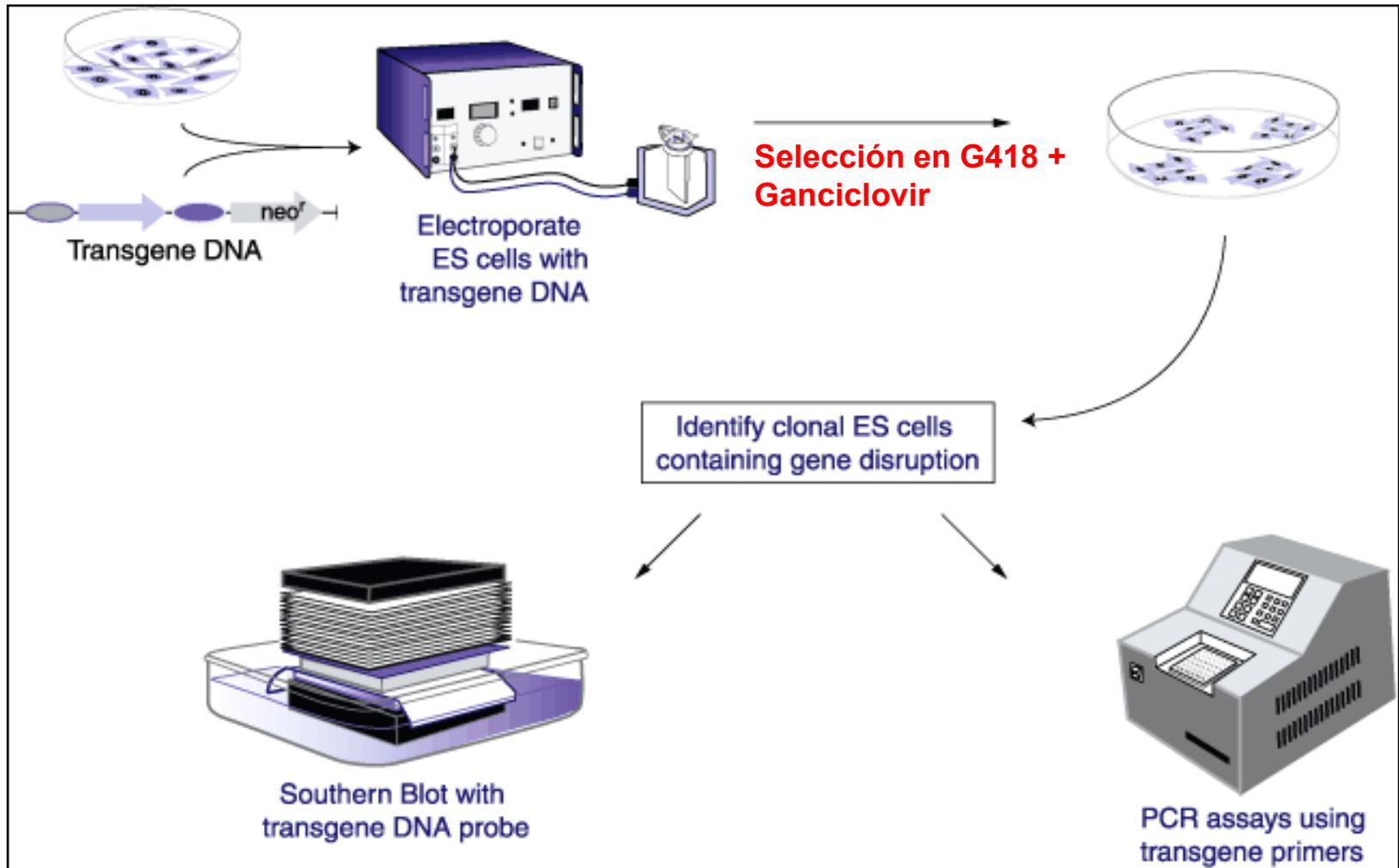
Integración al azar



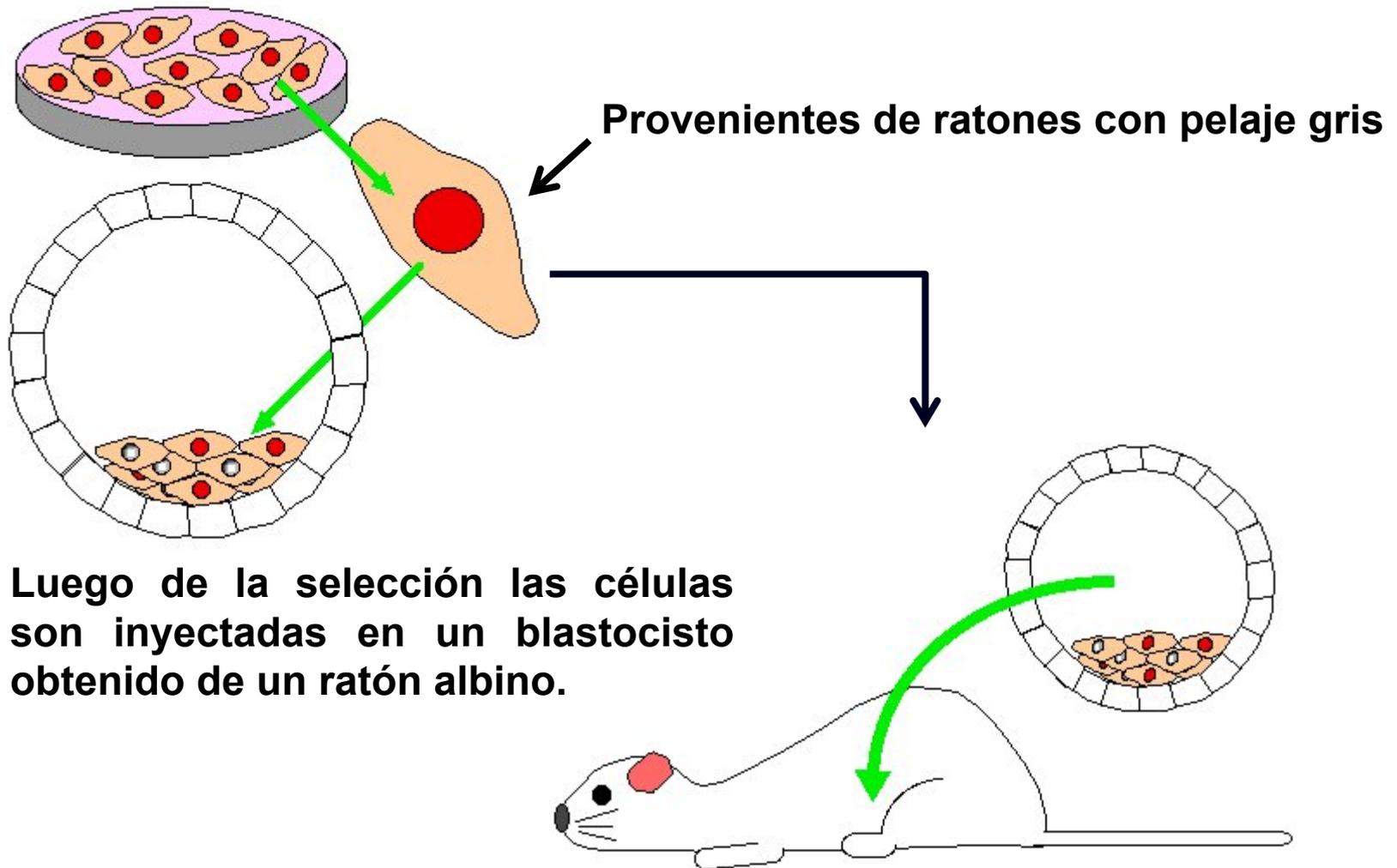
**Neo<sup>R+</sup>/ HSVtk<sup>-</sup>**



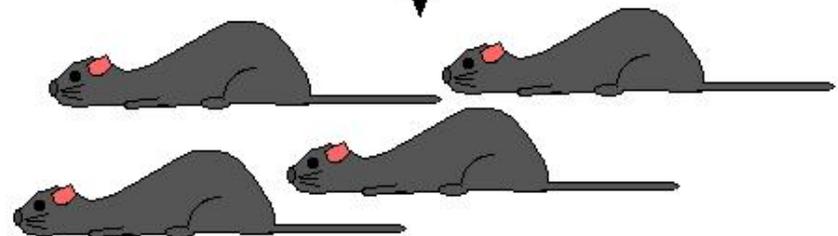
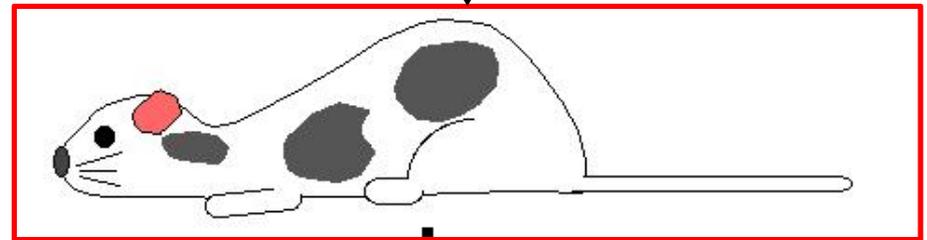
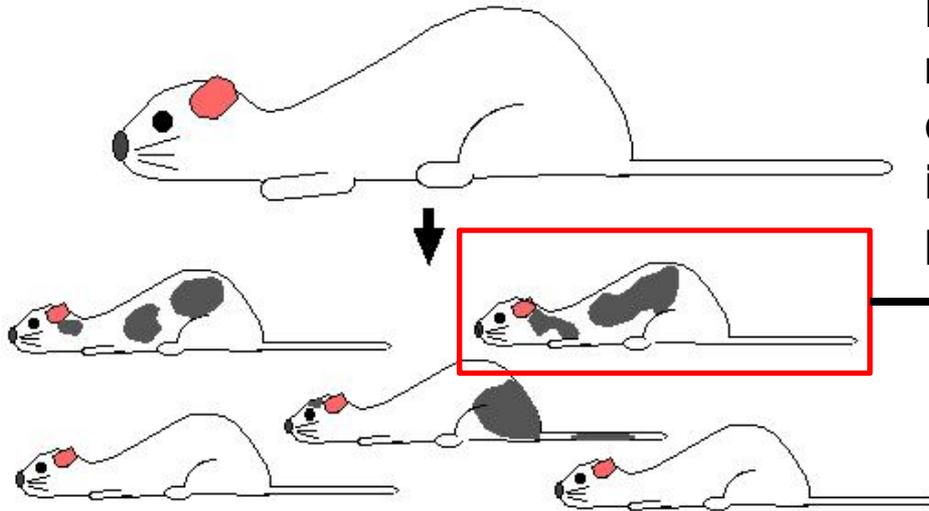
**Neo<sup>R+</sup>/ HSVtk<sup>+</sup>**



Análisis mediante PCR o Southern blots son utilizados para identificar sub-líneas clonales que contienen el DNA incorporado en su genoma.

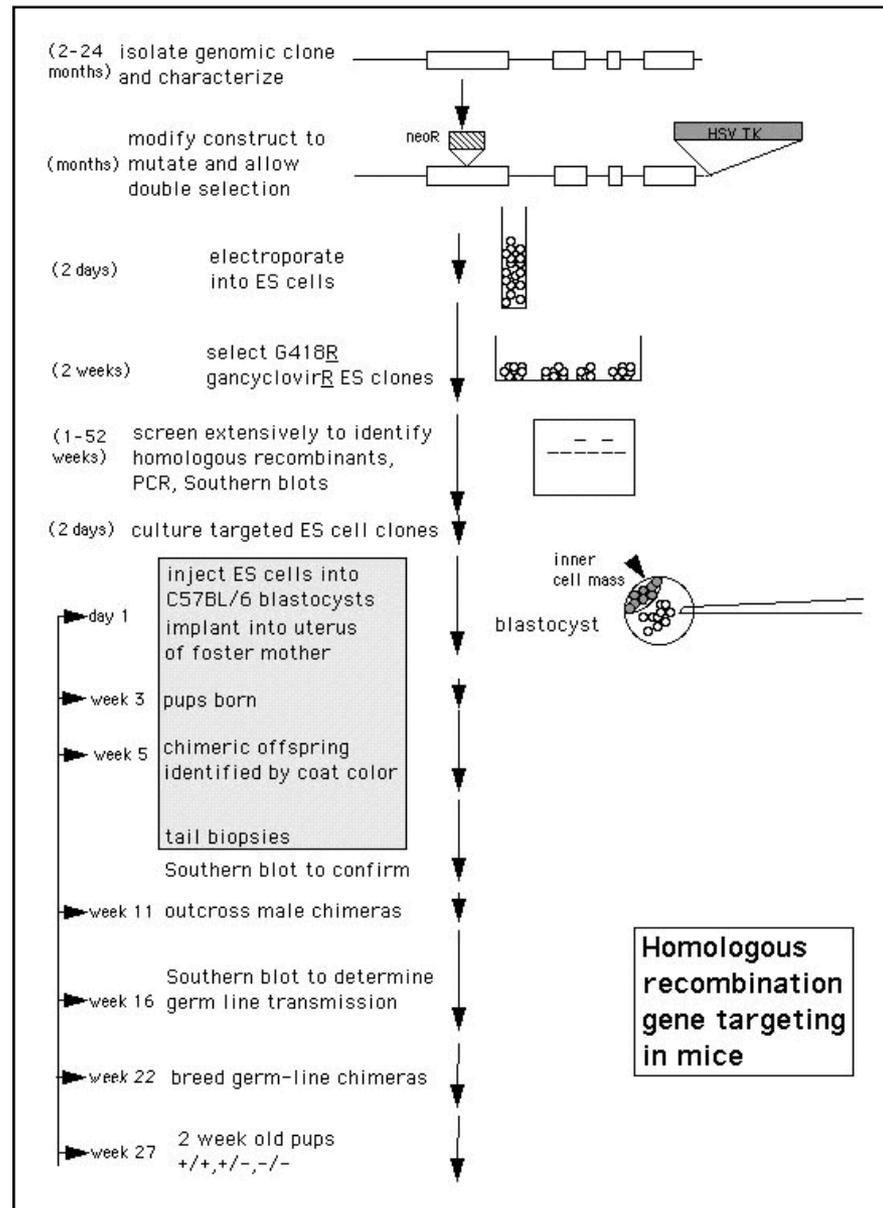


La descendencia posee un pelaje en mosaico reflejando el genotipo quimérico. Los fundadores son identificados por el color gris del pelaje.



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

Fundadores: Progenie de pelaje gris



---

# **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 generación 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.**

## Examples of transgenic or gene-targeted mouse models of human disease

Human disease or abnormal phenotype	Gene	Method of constructing model
Cystic fibrosis	<i>CFTR</i>	Insertional inactivation by gene targeting
$\beta$ -Thalassemia	<i>HBB</i> ( $\beta$ -globin)	Insertional inactivation by gene targeting
Hypercholesterolemia and atherosclerosis	Apolipoprotein genes, e.g. <i>APOE</i>	Insertional inactivation by gene targeting
Gaucher's disease		Insertional inactivation by gene targeting
Fragile-X syndrome	<i>FMR1</i>	Insertional inactivation by gene targeting
Gerstmann-Sträussler-Scheinker (GSS) protein gene with missense mutation syndrome	Prion protein gene ( <i>PRNP</i> )	Integration of mutant mouse prion gene
Spinocerebellar ataxia type 1 (SCA1)	<i>SCA1</i> (ataxin)	Integration of mutant human ataxin gene with expanded triplet repeat
Alzheimer's disease	<i>APP</i> ( $\beta$ -amyloid precursor protein)	Integration of mutant full-length <i>APP</i> cDNA under control of a platelet-derived growth factor promoter

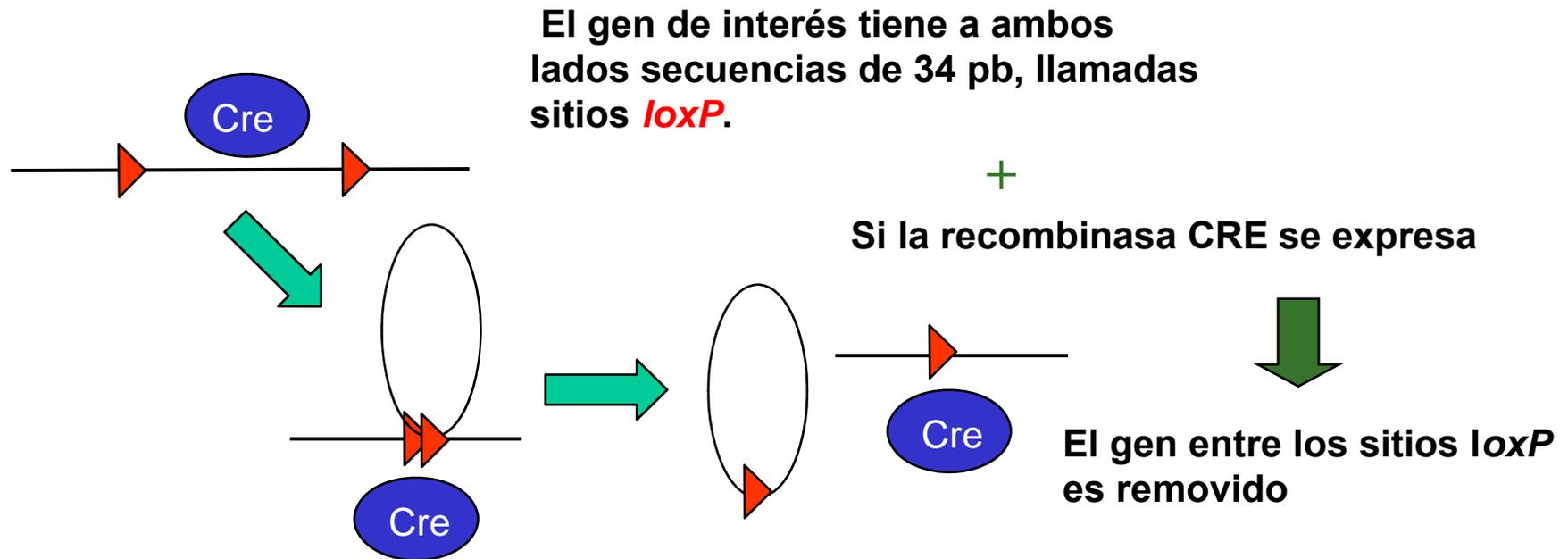
# Conditional knock-outs

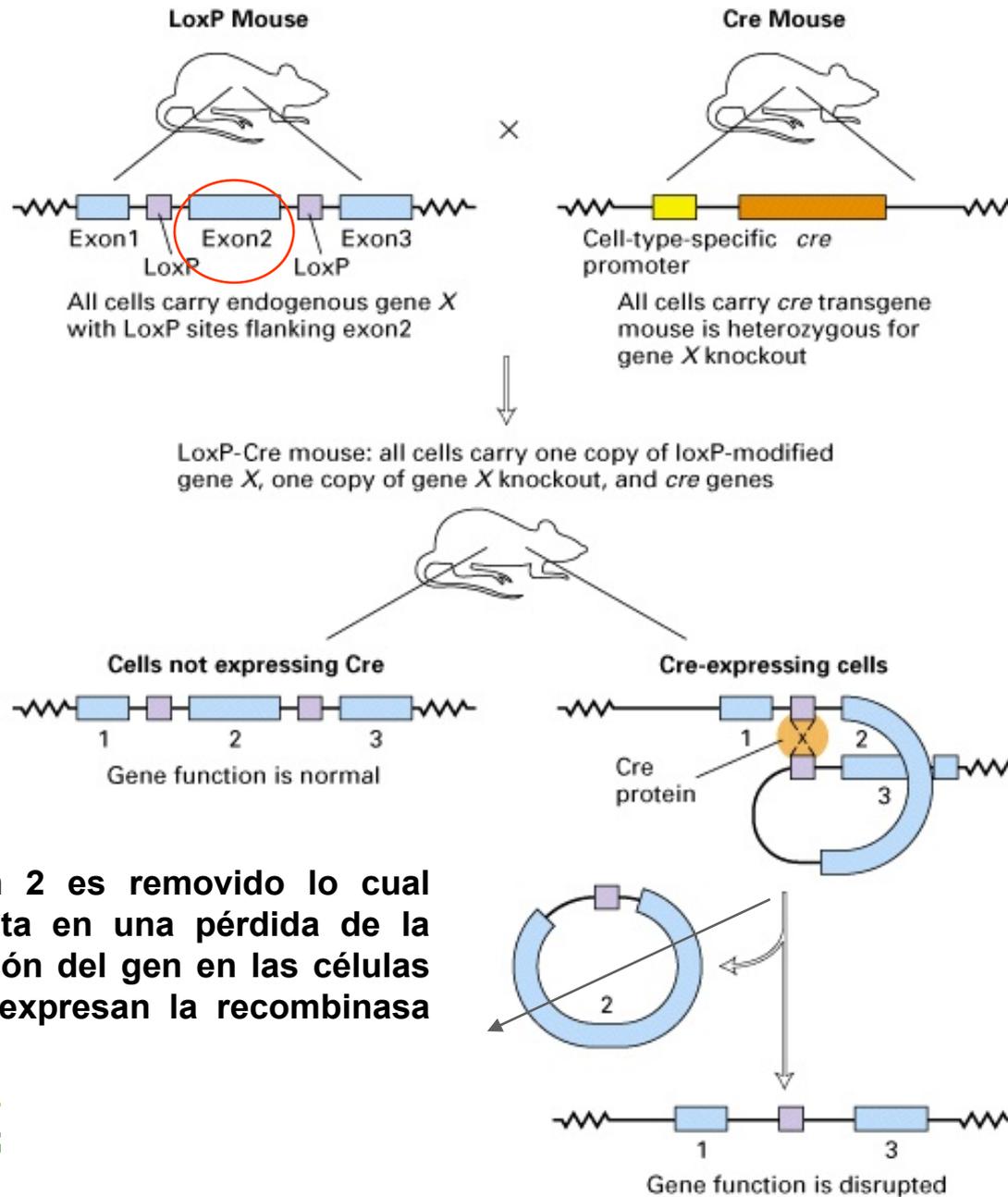
Permite inactivar un gen solo en tejidos particulares y/o a tiempos específicos durante el ciclo de vida.

## Cre-lox technology

Cre – recombinasa sitio-específica

Reconoce una secuencia de 34bp – loxP = 





Exon 2 es removido lo cual resulta en una pérdida de la función del gen en las células que expresan la recombinasa *Cre*.

---

**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 20 años utilizando técnicas estándares de microinyección basadas en los métodos inicialmente desarrollados en animales modelos como el ratón.**

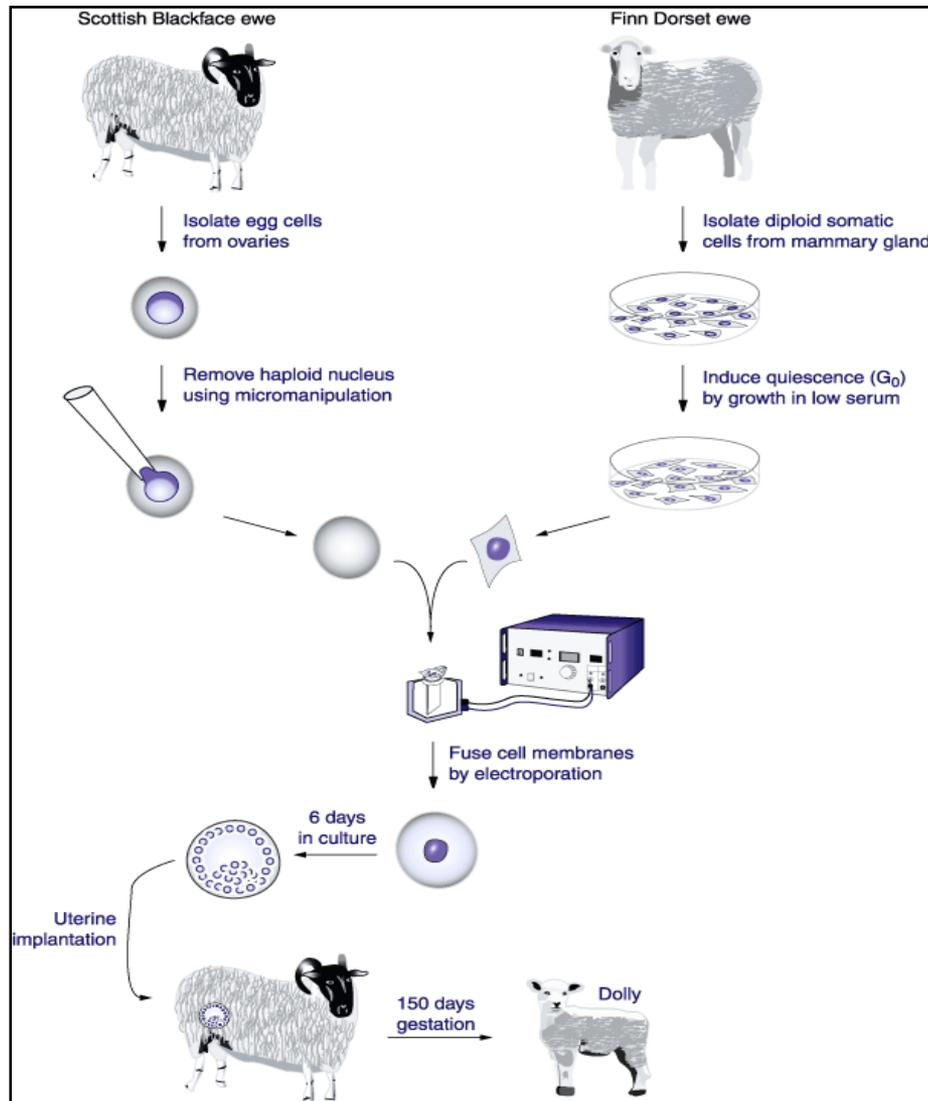
**Recientemente, la metodología de transferencia nuclear ha revolucionado este campo, a través de la clonación de animales. Esta técnica se basa en la habilidad de inyectar o fusionar óvulos carentes de núcleos con núcleos diploides derivados de células somáticas en cultivo. Estas células pueden ser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

# PRODUCCION DE MAMIFEROS TRANSGENICOS EN DIFERENTES ESPECIES

## Transgenic animals obtained

Species	% offspring	%embryos microinjected and transfered	Months to Obtain the F2	Estimated costs of one Transgenic animal	Protein produced in milk
<b>Mouse</b>	<b>17,3</b>	<b>2,6</b>	<b>7,5</b>	<b>121 \$</b>	<b>1 g</b>
<b>Rabbit</b>	<b>12,8</b>	<b>1,5</b>	<b>17</b>	<b>500 \$</b>	<b>1 Kg</b>
<b>Pig</b>	<b>9,2</b>	<b>0,9</b>	<b>38</b>	<b>25.000 \$</b>	
<b>Sheep</b>	<b>8,3</b>	<b>0,9</b>	<b>52</b>	<b>60.000 \$</b>	<b>100 Kg</b>
<b>Cattle</b>	<b>3,6</b>	<b>0,7</b>	<b>100</b>	<b>546.000 \$</b>	<b>1000 Kg</b>

# 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.

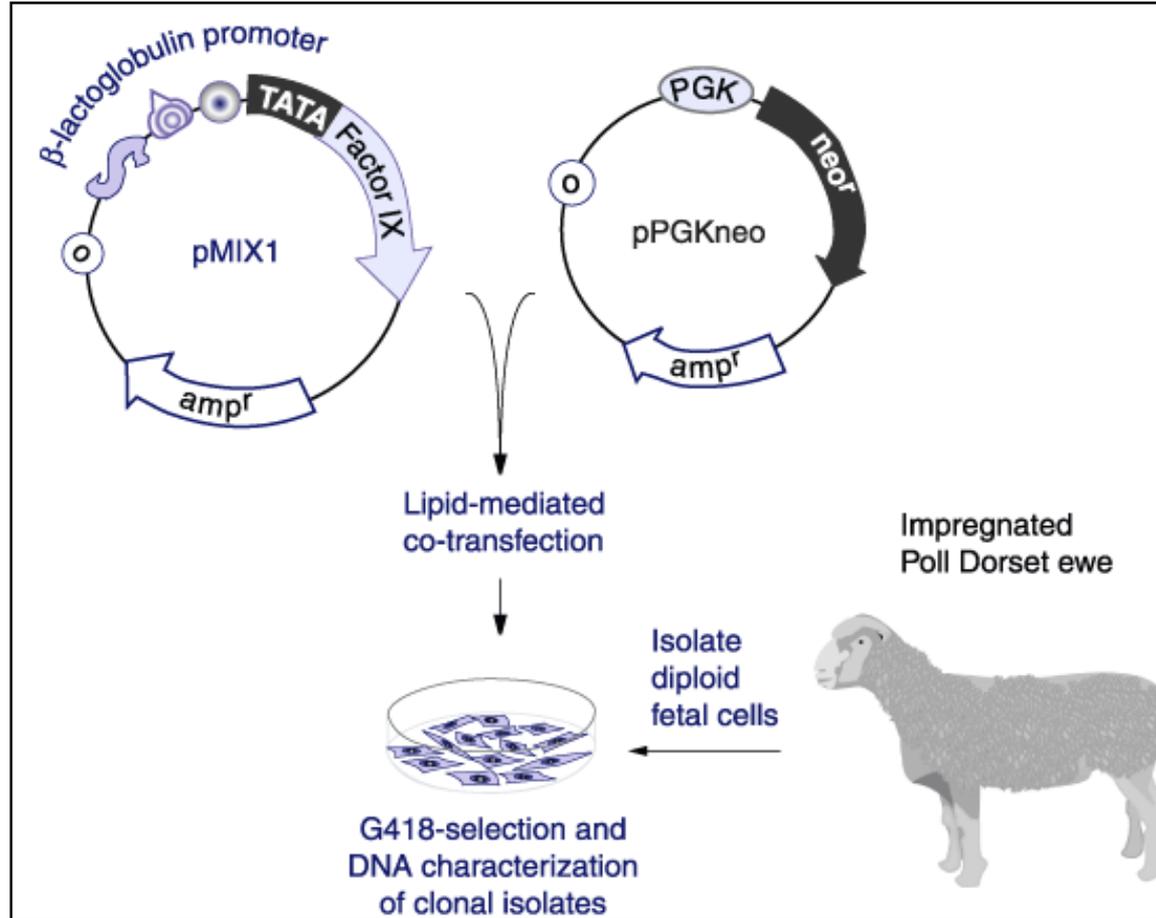
(tasa de éxito:1 de 227)



- 
- ❑ 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.**

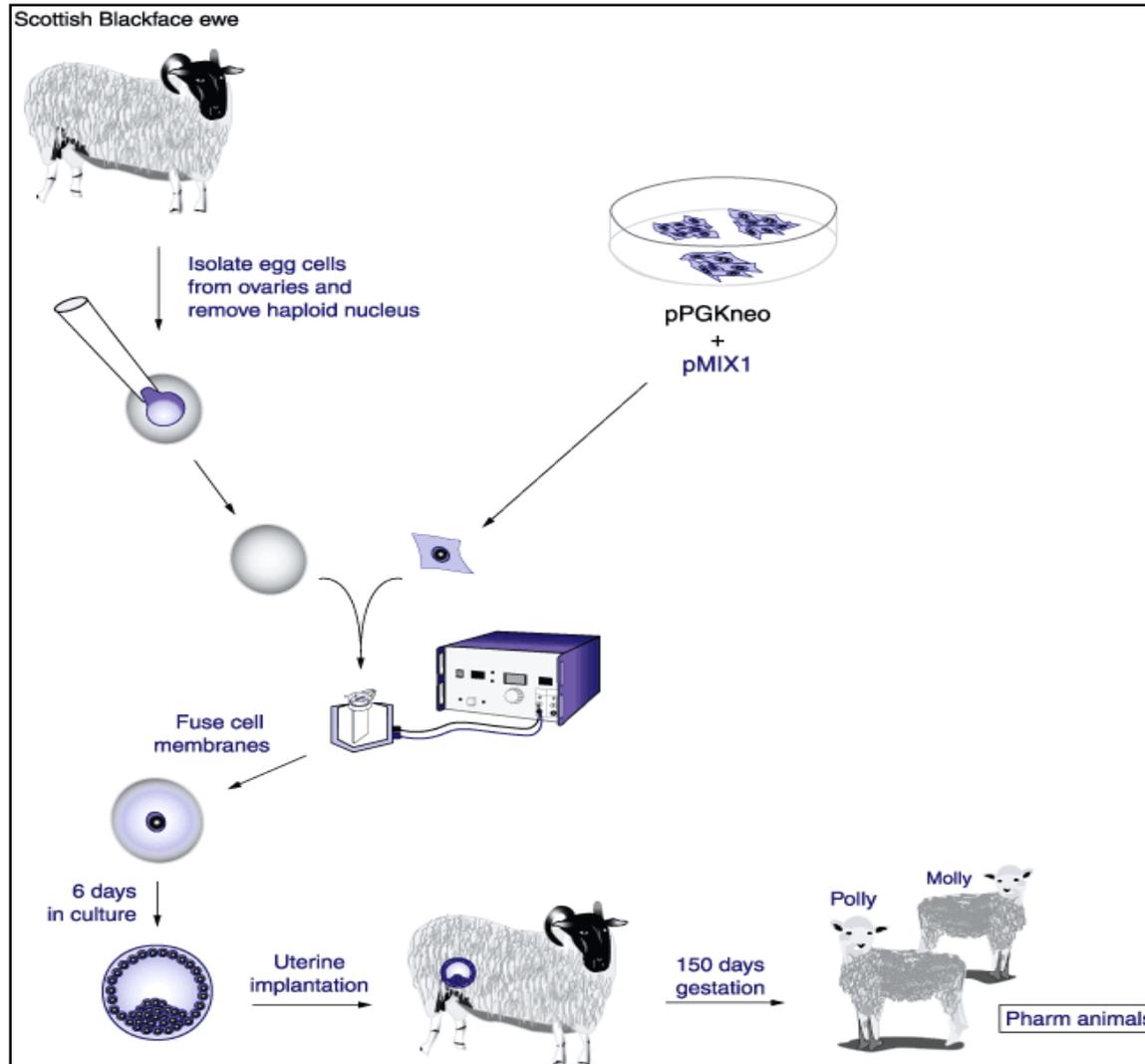
<b>Human gene</b>	<b>Pharmaceutical use</b>	<b>Mammary gland-specific promoter</b>	<b>Transgenic product animal</b>
Factor IX	blood clotting protein, treatment of hemophilia B.	sheep b-lactoglobulin	sheep
$\alpha$ -1-antitrypsin	protease inhibitor, treatment of emphysema and cystic fibrosis.	sheep b-lactoglobulin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

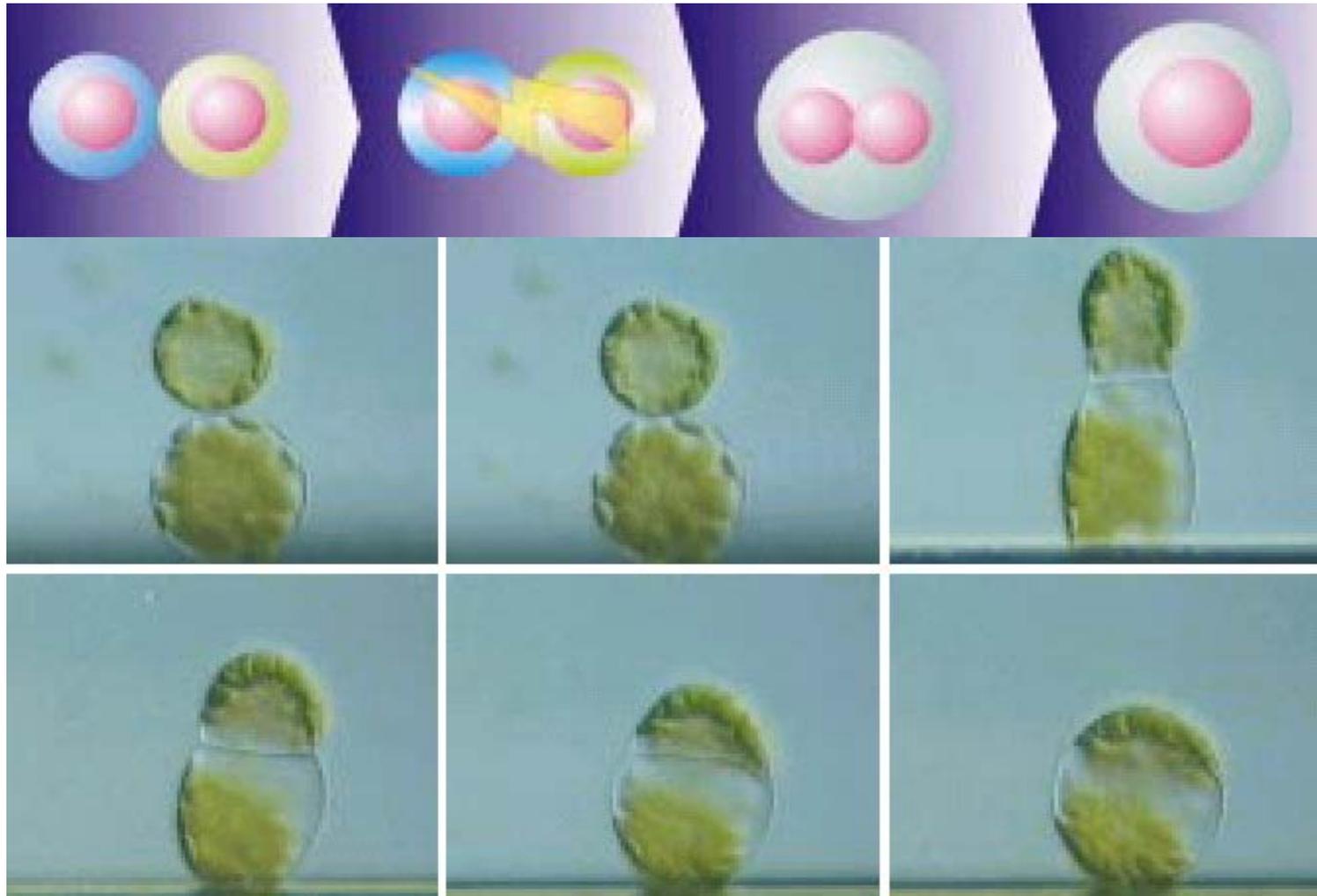
# TRANSFERENCIA NUCLEAR



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





# Sistemas de producción de proteínas recombinantes

	Amount	Extraction	Post-translational modifications
Bacteria	+	+	+
Yeast	+	+	+
Fungi	+	+	+
Transgenic Plants	+	+	+
Baculovirus	+	+	+
Mammalian cells	+	+	+
Transgenic animals	+	+	+

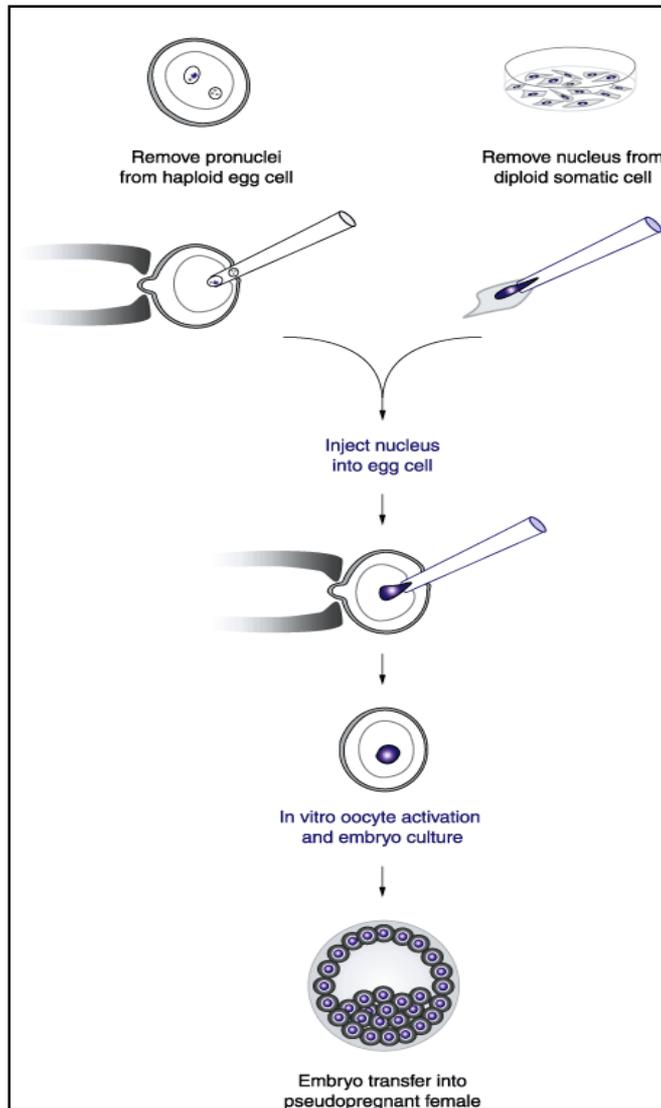
Each of these systems has advantages and drawbacks roughly estimated by the cross in the table.

---

# Modificaciones de las propiedades de la leche

- **Reduction of lactose content of milk.**
- **Suppression of  $\beta$ -lactoglobulin.**
- **Modifications of fat content or composition.**
- **Increased activity of mammary desaturase enzyme to increase unsaturated fatty acids in milk.**
- **Secretion of growth factors or other biologically active proteins to prepare milk for a specific therapeutic need.**

# 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.

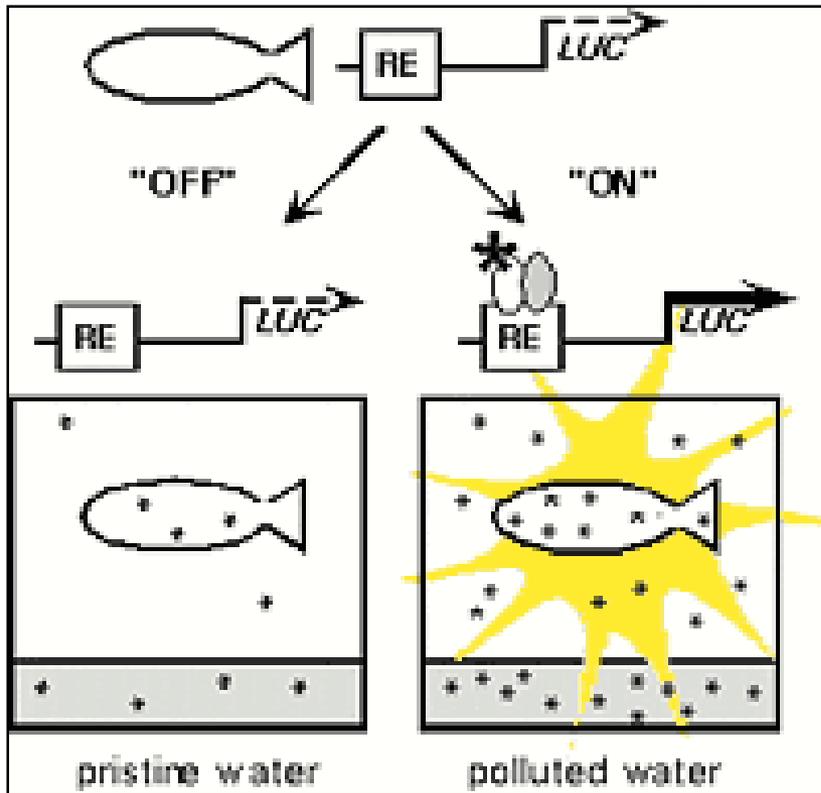
(tasa de éxito: 3 de 100)

Table 1

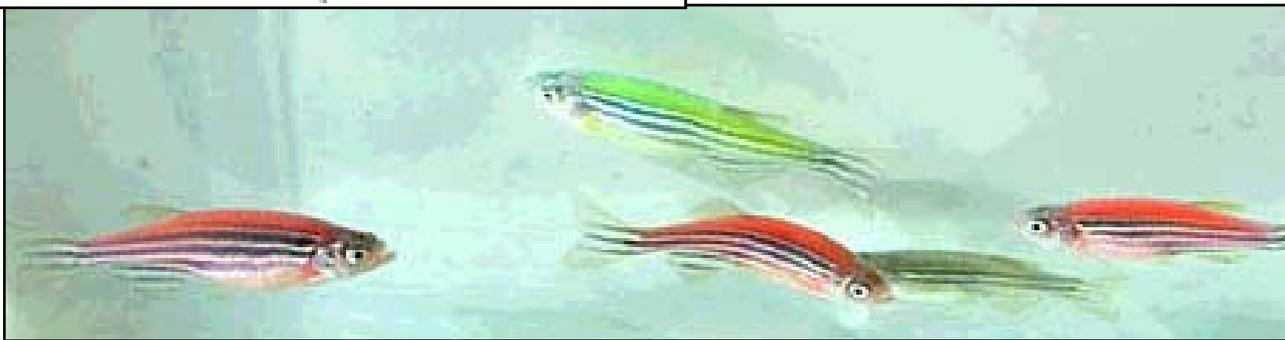
## Key features of a selected list of transgenic animals used in therapeutic protein production

Animal	Time of gestation (month)	No. of offspring	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, $\alpha$ -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, $\alpha$ 1-antitrypsin, growth hormone	10, 13, 16
Mice	19–21 days	10–12 L/ 3–4 weeks	1–2	1	0.015	750 $\mu$ 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, $\alpha$ -glucosidase, glucagon-like peptide	15, 16
Sheep	5	1–2	8	18	500	2.5	$\alpha$ 1-antitrypsin, factor VIII, factor IX, fibrinogen, insulin-like growth factor 1	16

## otras aplicaciones.....



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 luminómetro, sin necesidad de sacrificar al zebrafish.



Type of Transplant	Patients Waiting For Transplants
Kidney	54,944
Liver	17,843
Pancreas	1,328
Pancreas islet cell	301
Kidney-pancreas	2,651
Intestine	183
Heart	4,182
Heart-lung	208
Lung	3,849
<b>Total</b>	<b>85,489</b>
<i>Source: United Network for Organ Sharing, May 2000</i>	

**XENOTRASPLANTES:** trasplantes de órganos y tejidos desde un animal donante (generalmente primates y cerdos) a un humano receptor.



---

LABORATORIO DE BIOINFORMATICA Y EXPRESION GENICA-INTA

BioArts - Internet Explorer provided by Dell

http://www.bioarts.com/

BioArts

**BioArts**  
International

ABOUT US PRODUCTS & SERVICES R & D NEWS CONTACT



## New Life Science

Focusing on  
Unique & Untapped  
Biotech Markets

### Human

- Parentage Testing
- Disease Diagnostics
- Forensic ID

### Animal

- Pet Projects
- Premium Livestock
- Tissue & Embryo Shippers



**What if you could be best friends...again?**  
Special offer from BioArts: Bid to have your beloved dog cloned.

BioArts to Offer Dog Cloning Service at International Public Auction.  
BioArts International today announced that it will sell five dog cloning service slots to the general public via a worldwide, online auction to be held on July 5th. [Read more...](#)

©2008 BioArts International, Inc. All Rights Reserved. | [Site Map](#) | [Contact Us](#) | [Terms of Use](#) Design: Twist Studio, S.F.

http://www.bioarts.com/animal.htm Internet | Modo protegido: activado 100%

BioArts Products & Services Pet Projects - Internet Explorer provided by Dell  
http://www.bioarts.com/pet.htm

BioArts International

ABOUT US • **PRODUCTS & SERVICES** • R & D NEWS CONTACT

Human  
Overview  
Parentage Testing  
Disease Diagnostics  
Forensic ID

Animal  
Overview  
• **Pet Projects**  
Premium Livestock  
Tissue & Embryo Shippers



## PET PROJECTS

Our recently announced **Best Friends Again** program is the first in a series of "Pet Projects" - limited offerings of pet cloning services and specialty animals for the general public.

Although we're a new company, BioArts International has inherited key staff and intellectual property from Genetic Savings & Clone (GSC), which was the first company in the world to produce and deliver cloned pets (cats exclusively). We also have multiple scientific and engineering partnerships that extend our capabilities.

After about 11 years of effort, BioArts has successfully completed the internationally known "Missyplicity Project", an effort to clone a specific beloved dog named Missy. We invite you to read about the successful conclusion of the Missyplicity Project - or as we're calling it, "**Missy: Accomplished!**"

©2008 BioArts International, Inc. All Rights Reserved. | Site Map | Contact Us | Privacy Policy | Terms of Use

Internet | Modo protegido: activado 100%



Register Sign In Orders Contact Us Search



Genetic Savings & Clone enriches the lives of pet lovers through superior cloning technologies. Cat cloning available today; dog cloning under development.



- Our Clones**  
Meet our newest clones
- PetBank**  
Gene banking for every pet
- Latest News**  
From and about GSC
- Our Clients**  
and their exceptional pets
- Emergencies**  
If your pet dies unexpectedly
- Cat Adoption**  
Ready for Your Love
- Vet Info**  
Biopsy info & instructions
- Cat Cloning**  
Now available
- The Dish**  
Sign up for our newsletter



\$32,000

Click here to find out more. >

