

APLICACIÓN E IMPACTO DE LA TRANSGÉNESIS ANIMAL

Grettel Jaily Avila-Beltran

Universidad Cooperativa de Colombia,
Facultad de medicina Veterinaria y
Zootecnia, Ibagué, Colombia.
orcid: 0000-0003-3477-9860

Ana Milena Montealegre-Angarita

Universidad Cooperativa de Colombia,
Facultad de medicina Veterinaria y
Zootecnia, Ibagué, Colombia.
orcid: 0000-0002-2711-9605)

Andrés Mejía-Gallego

Grupo de investigación IMPRONTA,
Universidad Cooperativa de Colombia,
Facultad de medicina Veterinaria y
Zootecnia, Ibagué, Colombia.
orcid: 0000-0003-1520-317X

Lilian Bonilla León

Grupo de investigación IMPRONTA,
Universidad Cooperativa de Colombia,
Facultad de medicina Veterinaria y
Zootecnia, Ibagué, Colombia.
orcid: 0000-0002-0841-051X

Ricaurte Lopera-Vásquez¹

Grupo de investigación IMPRONTA,
Universidad Cooperativa de Colombia,
Facultad de medicina Veterinaria y
Zootecnia, Ibagué, Colombia.
orcid: 0000-0001-6792-1961

All content in this magazine is licensed under a Creative Commons Attribution License. Attribution-Non-Commercial-Non-Derivatives 4.0 International (CC BY-NC-ND 4.0).



1. Este trabajo se deriva de la monografía “Aplicación e impacto de la transgénesis en animales” presentada por Grettel Jaily Avila Beltran y Ana Milena Montealegre Angarita para optar al título de Médico Veterinario Zootecnista en la Universidad Cooperativa de Colombia-Sede Ibagué.

Resumen: Desde el nacimiento de la ingeniería genética, grandes avances a nivel científico se han generado, dentro de ellos destaca la transgénesis, que en los últimos 50 años ha cambiado de manera radical los beneficios generados por algunas especies animales hacia la humanidad. El objetivo es dar a conocer el papel de la tecnología transgénica, las técnicas que lo componen, así como su aplicación y desarrollo a través del tiempo aunado a la producción animal. A través de un amplio número de herramientas biotecnológicas como la microinyección pronuclear, transferencia nuclear y mediada por células madre, se ha modificado el ADN de especies como ratones, cerdos, vacas, ovejas y conejos con genes exógenos, generando un avance en áreas como la producción animal, salud humana y ambiental. Así, ciertas especies animales se han consolidado como modelo de estudio de enfermedades humanas, en la producción de proteínas de importancia clínica, como donantes de órganos en pacientes con enfermedades orgánicas terminales, y en el marco de la producción animal en el estudio de la clonación de animales de alto valor genético, en la producción de animales libres de enfermedades y la producción de menos residuos contaminantes. Como conclusión, a pesar de los grandes avances en la generación de animales transgénicos, es necesario centrar los esfuerzos en la sofisticación de los procesos técnicos asociados, con la finalidad de disminuir el costo de producción y aumentar la eficiencia, para de este modo aportar productos animales para una población humana creciente que requiere una calidad de vida mejor.

Palabras clave: animales transgénicos, ingeniería genética, producción animal, vectores genéticos.

INTRODUCCIÓN

Antes del desarrollo la biología molecular, la manipulación de las características genéticas en los animales se realizaba mediante la selección de los rasgos hereditarios a transmitirse a su progenie (Van Eenennaam, 2017). No obstante, en 1953, después del descubrimiento de la estructura del ácido desoxirribonucleico (ADN) nació la ingeniería genética. Un campo que busca desarrollar técnicas de manipulación del ADN con efecto en ciencia, medicina, producción y economía y a través de la identificación, reproducción, modificación y transferencia de material genético en células, tejidos y organismos (Lanigan et al., 2020).

La transgénesis animal, mediante la implantación de genes funcionales procedentes organismos exógenos, permite modificar la expresión génica en determinados procesos celulares y fisiológicos. Esto ha impactado en el estudio de los mecanismos genéticos de desarrollo, organogénesis, envejecimiento, enfermedades (humanas y animales), desarrollo de proteínas recombinantes, inclusión de resistencia a enfermedades y características productivas valiosas en mejoramiento animal (Gama Sosa et al., 2010).

El primer abordaje a la transgénesis se realizó sobre 1970, a través de la transferencia de genes mediante un retrovirus como vector, luego en 1982 se reportaron las primeras microinyecciones de ADN en ratones para generar proteínas y hormonas de crecimiento transgénicas (Bihon Asfaw & Assefa, 2019). Para 1997, mediante la transferencia nuclear se originó la oveja Dolly (el primer animal clonado) y en el 2022, se reportó el primer xenotrasplante de corazón proveniente de un cerdo a un humano (Reardon, 2022).

Las técnicas transgénicas poseen una expresión limitada del gen de interés en la progenie y un elevado costo. Kind & Schnieke

(2008), reportan que un cerdo transgénico cuesta cerca de \$20 000 USD y un bovino \$250 000 USD. Esto mantiene a los roedores como el modelo predominante en la transgénesis por su bajo costo, su corto intervalo generacional y su cercanía genética con los humanos (Uzoeto et al., 2019). Existe un interés permanente por incrementar la eficiencia, y promover el su consciente de la transgénesis. El objetivo de la presente revisión es dar a conocer el papel de la tecnología transgénica, las técnicas que lo componen, así como su aplicación y desarrollo a través del tiempo aunado a la producción animal.

ASPECTOS GENERALES DE LA TRANSGÉNESIS

La transgénesis, es una parte de la Ingeniería genética que busca modificar organismos a través de la inserción y manipulación de fragmentos de ADN (Ménoret et al., 2017). Estas fracciones de ADN o “transgenes” de organismos exógenos en un genoma tienen la finalidad de expresar uno o varios genes en particular, con características de interés, para que se mantengan estables en un organismo receptor, convirtiéndolo en un organismo transgénico portador de ADN exógeno, u organismo modificado genéticamente (OMG) (Asaye et al., 2014)

Para generar un individuo transgénico se deben tener en cuenta varios aspectos como: a) la elección del gen candidato de importancia económica o sanitaria, b) la clonación del gen de interés, c) la determinación del constructo transgénico efectivo para transferir el gen, d) la inserción del transgén, y e) la determinación de la presencia y de la expresión del transgén (Niemann et al., 2011)

MODELOS ANIMALES PARA LA TRANSGÉNESIS

El ratón ha sido el modelo animal por excelencia, debido a su similitud genética con el humano, ya que el 80 % de sus genes poseen la misma función y por los bajos costo de mantenimiento y cortos intervalos generacionales (Rajoriya et al., 2013). Esto ha hecho que los principales avances se realizaran en este modelo (Pusta et al., 2010). Su relevancia ha permitido extrapolar varias técnicas a otras especies (comercial e investigación), por ejemplo: peces resistentes a enfermedades (Dunham et al., 2002), anfibios transgénicos (transposones) (Sinzelle et al., 2006), y huevos de gallinas con eritropoyetina humana (Kwon et al., 2018). En la Cuadro 1 se abordan los principales estudios asociados a la transgénesis en diferentes modelos animales a lo largo de los años.

CONSTRUCCIÓN DE UN TRANSGÉN

Una construcción o constructo de ADN, es un segmento de ADN diseñado artificialmente, acoplado a un vector que es incorporado en un tejido o célula diana (Polites et al., 2014). La transfección es el proceso por el que se introducen ácidos nucleicos en células foráneas. Los protocolos y las técnicas varían, e incluyen la transfección por lípidos, métodos químicos y físicos (electroporación) (Kim & Eberwine, 2010).

El constructo contiene el inserto / transgén (clonado naturalmente o sintético) y pueden ser pequeños (pocos de miles de pares de bases (kpb), o de tamaño superior. Las funciones de un constructo son a) expresar genes o proteínas de tipo salvaje, b) inhibir la expresión génica, y/o c) expresar proteínas mutantes. Los constructos de ADN son importantes en técnicas de secuenciación de ADN, expresión de proteínas y estudios de ARN (Carter & Shieh, 2010b).

Otra parte esencial en un transgén son los

Año	Implementación	Referencia
1961	Primer ratón quimera producido a través de la combinación de dos embriones en el estadio temprano de desarrollo	Tarkovski (1961)
1974	Primer ratón transgénico producido a través de un vector retroviral	Jaenisch & Mintz (1974)
1980	Primera transferencia génica en ratón a través de microinyección pronuclear	Gordon et al. (1980)
1987	Producción del activador de plasminógeno humano en leche de ratonas transgénicas	Gordon et al. (1987)
1991	Generación de ovinos transgénicos por la fusión del gen promotor de b-lactoglobulina a antitripsina humana	Wright et al. (1991)
1994	Expresión de un inhibidor del complemento humano en cerdos para evitar rechazo hiperagudo de órganos	Fodor et al. (1994)
1997	Primera oveja clonada a partir de la transferencia nuclear de una célula adulta	Wilmut et al. (1997)
2001	Expresión de fitas salivales en cerdos transgénicos para la reducción de la excreción del 75 % del fósforo fecal	Golovan et al. (2001)
2003	Primer reporte de producción de interferón humano α -2b mediante huevos de gallinas transgénicas	Rapp et al. (2003)
2003	Bovinos transgénicos productores de altos niveles de beta y kappa caseína en leche	Brophy et al. (2003)
2005	Inyección intracitoplasmática de espermatozoides para generar ratones transgénicos por recombinasas bacterianas	Kaneko et al. (2005)
2007	Producción de ganado transgénico libre de proteína priónica	Richt et al. (2007) such as PrP(BSE)
2011	Generación de gatos transgénicos con factores de restricción antivirales contra el virus de la inmunodeficiencia felina	Wongsrikeao et al. (2011)
2015	Primera oveja con un gen de miostatina knock-out a través de CRISPR-cas9	Crispo et al. (2015)
2017	Uso de lentivirales para la expresión de un transgén del factor IX en hepatocitos de caninos afectados por hemofilia B	Cantore et al. (2015)
2020	Patogénesis del SARS-COV-2 en ratones transgénicos que expresan la enzima convertidora de angiotensina 2	Jiang et al. (2020)

Cuadro 1. Cronología del desarrollo e implementación transgénica en diferentes especies animales. Universidad Cooperativa de Colombia-Sede Ibagué, Grupo de investigación IMPRONTA, Ibagué, Colombia. 2022.

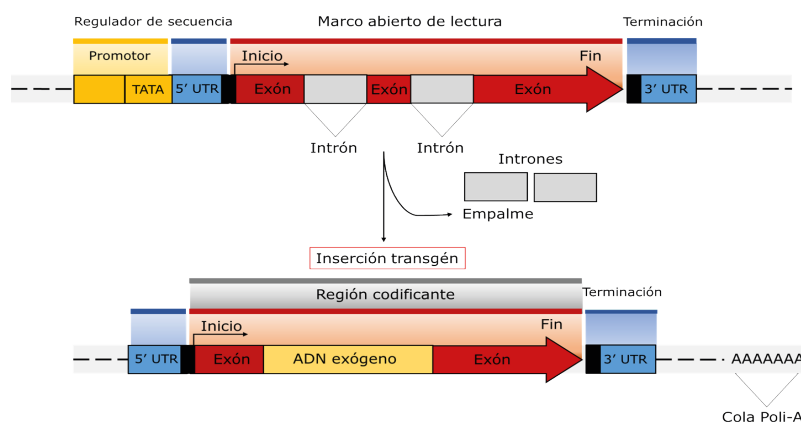


Figura 1. Estructura general de un vector transgénico. Universidad Cooperativa de Colombia-Sede Ibagué, Grupo de investigación IMPRONTA, Ibagué, Colombia. 2022.

Estructura general del transgén con secuencias intrónicas posteriormente eliminadas.

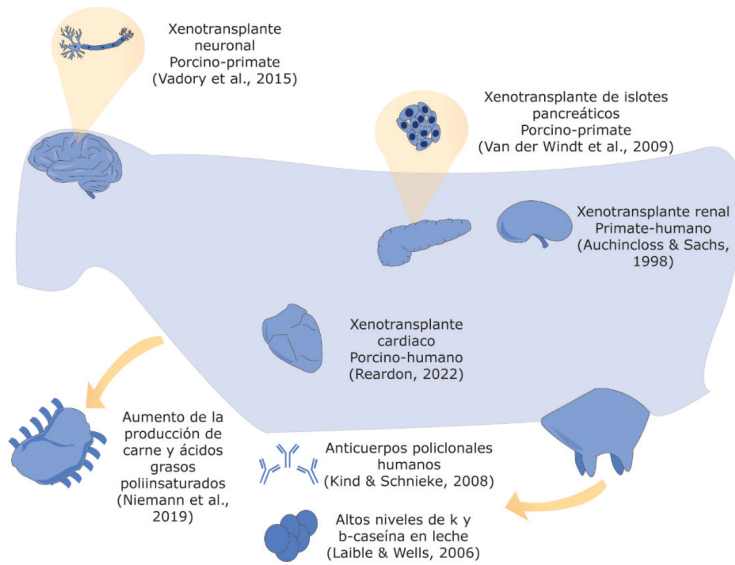


Figura 2. Principales avances clínicos y productivos de la transgénesis animal en los últimos años. Universidad Cooperativa de Colombia-Sede Ibagué, Grupo de investigación IMPRONTA, Ibagué, Colombia. 2022.

mecanismos de inclusión del constructo de ADN, denominados Vectores. Generalmente, estos vectores constan de: a) un origen de replicación, b) un sitio de clonación múltiple y c) un marcador de selección (Carter & Shieh, 2010b). De hecho, algunos vectores transportan elementos reguladores adicionales como plásmidos o bacteriófagos, o elementos de cientos de kpb para estudios genómicos (Carter & Shieh, 2010a) Existen vector virales (adenovirus, retrovirus y lentivirus), y no virales (plásmidos, cromosomas artificiales y transposones) que buscan la inserción del transgén en el genoma de la célula huésped (Liu, 2013) (Figura 1).

Además, existen estructuras que regulan el funcionamiento del transgén como lo son promotores de b-actina, virus 40T de simio, el promotor H4 o promotores ubicuos (Acquaah, 2004). Por otra parte, se requieren sitios de restricción para aislar el fragmento transgénico como enzimas de restricción + marcadores genéticos: tags de epítomos, secuencias de proteínas recombinantes: verde fluorescente o genes de resistencia a antibióticos) y se requiere una cola de finalización de secuencia de poliadenilación (Poli A) (Bednarczyk et al., 2018).

TÉCNICAS PARA LA OBTENCIÓN DE ANIMALES TRANSGÉNICOS

Existen diferentes técnicas para generar un animal transgénico y su aplicación depende del tipo de modificación genética que se desee realizar, ya sea introducir, modificar o inactivar un gen. Entre los métodos existentes se encuentran:

- **Microinyección pronuclear**

Como la primera técnica exitosa de transgénesis, logró producir animales domésticos transgénicos como conejos (Buhler et al., 1990), ovejas (Wright et al., 1991), cabras (Ebert et al., 1991), vacas

(Krimpenfort et al., 1991) y cerdos (Wall et al., 1991), siendo altamente exitosa en ratones debido al manejo sencillo del pronúcleo y el uso de hembras superovuladas (Galli et al., 2012).

La microinyección busca la transfección de ADN mediante la adición e integración no dirigida de material genético de interés en un pronúcleo haploide del cigoto del organismo blanco, buscando una integración y transmisión germinal estable del transgén para obtener líneas transgénicas (Burgstaller & Brem, 2017). Para esta técnica, el transgén debe contener la unidad de transcripción (región codificante) y sus elementos reguladores. El transgén inyecta a los cigotos a través de un sistema de pipetas de vidrio (soporte y aguja) (Cherenek et al., 2010). Esta aguja perfora la zona pelúcida y membrana celular hasta llegar al pronúcleo de los cigotos, para descargar el contenido. Los cigotos continúan su desarrollo *in vitro*, para luego ser transferidos a una hembra receptora (Bazinet & Braxton, 2005).

En esta técnica, la expresión del transgén suele ser aleatoria por lo que se requiere alta precisión en la inserción y concentración del ADN exógeno, que influye sobre los mecanismos de reparación del ADN y actividad transcripcional del embrión, generando mutaciones y alteraciones en la expresión génica causando muerte embrionaria en grandes proporciones (Burgstaller & Brem, 2017).

Si bien, la microinyección pronuclear se considera altamente efectiva, el 15 % de los cigotos manipulados llegan a integrar el transgén en su genoma, y solo el 5 % de los embriones transferidos llegan convertirse en crías (Brüggemann et al., 2015). Someramente, pueden requerirse cerca de 1000 cigotos bovinos y 300 cigotos ovinos para poder generar un animal transgénico (Melo et al., 2007). Según el grado de

expresión del transgén, los primogénitos se pueden aparear con animales no transgénicos para generar híbridos para el transgén, y luego se podrán cruzar los heterocigotos logrando homocigosis para el gen (Manmohan & Niraj, 2010).

- **Transferencia nuclear de células somáticas**

La transferencia nuclear de células somáticas (SCNT) ha permitido la clonación animales existentes a través de la transferencia del núcleo de una célula donante (somática) a un ovocito al que previamente se le ha extraído su núcleo (enucleado), permitiendo la reprogramación e inserción de transgenes presentes en esas células somáticas (Galli et al., 2012). Las células somáticas generalmente provienen de fibroblastos fetales, o de células epiteliales de mama, linfocitos, neuronas y hepatocitos, entre otras (Niemann et al., 2011) but more efficient protocols are now available based on somatic cell nuclear transfer (SCNT). Los ovocitos antes de su enucleación deben estar en metafase II (Do & Robinson, 2014), y posterior a la transferencia nuclear sufren fusión química o electroporación para generar continuidad entre las membranas celulares de la célula donante y el óvulo (Galli et al., 2012). Tras la activación ovocitaria se busca desarrollo *in vitro* del embrión hasta su etapa de blastocisto (5 y 7 días), para su transferencia a la receptora (Tian et al., 2003).

La transferencia nuclear se volvió factible en anfibios desde 1950, pero el primer ensayo en mamíferos se desarrolló en 1980 (Wilmot et al., 2015). Sin embargo, el nacimiento de la oveja Dolly en 1997 ha sido el ejemplo más atractivo de la aplicación de esta técnica, ya que a partir de células epiteliales mamarias adultas reprogramadas se logró un estado de totipotencia, que permitió la inclusión al ovulo enucleado. Esta técnica es una herramienta común para la producción de copias de

animales de alto valor productivo (proteínas, xenotrasplantes, conservación recursos zoogenéticos) (Tian et al., 2003). No obstante, la transferencia nuclear no genera organismos con ADN cien por cien idéntico, ya que el ADN mitocondrial ovocitario, el ARN ribosomal embrionario, y las mutaciones aleatorias derivadas de la electroporación influyen en el nuevo genoma. Adicionalmente, el entorno materno, y la epigenética pueden influir en el desarrollo, y en la eficiencia del proceso (Hill, 2004). Además, el clon resultante puede presentar envejecimiento temprano, trastornos degenerativos y cáncer, derivados de desórdenes epigenéticos, acumulación de macromoléculas dañadas (proteínas y lípidos) y telómeros acortados (Burgstaller & Brem, 2017).

- **Transferencia génica mediada por espermatozoides (SMGT)**

En 1989 se realizó la primera prueba con espermatozoides como vectores naturales en la transmisión de ADN (Laible & Wells, 2006). La técnica inicia con la separación espermática de la fase acuosa seminal, para evitar el contacto con moléculas inhibitoras y DNAsas. Posteriormente, se inserta el material transgénico a través de un plásmido que puede ingresar a través de una disrupción controlada de la membrana mediante a) inyección intracitoplasmática, b) ciclos de congelación y descongelación o c) electroporación (Moreira et al., 2007) such as yeast artificial chromosomes (YAC. Estos espermatozoides modificados son transferidos a través de fecundación *in vitro* a los ovocitos para dar origen a un embrión transgénico que será transferido (Canovas et al., 2010).

Esta técnica ha permitido modificar especies como aves de corral, bovinos, ratones, cerdos y peces, con eficiencias entre el 50 al 80 %, obviando los efectos negativos de la micromanipulación embrionaria (Bihon

Asfaw & Assefa, 2019). No obstante, se presenta poca absorción de ADN por parte de los espermatozoides, resultando en bajas tasas de fertilización (Arias et al., 2015).

- **Transgénesis mediada por células madre pluripotentes**

El uso células madre de embriones (blastómeras y la masa celular interna) desde dos células hasta blastocisto (5-7 días), para la introducción de un transgén mediante microinyección, virus, electroporación o transfección química para posteriormente ser integrado a través de recombinación homóloga es una técnica exitosa de transgénesis (Uzoeto et al., 2019).

Esta recombinación homóloga se genera durante la profase I de la meiosis, momento en donde existe atracción de las secuencias de ADN por su complementariedad, por tanto, el ADN transgénico se implanta igual que el ADN cromosómico, pero en un lugar no aleatorio del genoma (Montoliu, 2002). Posteriormente, se determinan las células madre que adquirieron el transgén, para implantarlas en la masa celular interna del nuevo embrión a transferir. Finalmente, se analiza la descendencia para determinar los animales heterocigotos para el transgén, que deben cruzarse para obtener una progenie homocigota (Redfern & Jean, 2013).

Se han realizado trabajos con células madre espermatozonales (IPS), por su origen germinal que permite autorrenovación y diferenciación constante. A grandes rasgos, la técnica se basa en el trasplante de IPS a las que previamente se les ha insertado un transgén, a los túbulos seminíferos de machos receptores, para posteriormente obtener la capacidad de generar espermatozoides portadores del transgén (Zhao et al., 2021) 1,288 dead-in-shell chicken embryos were collected from four breeder chicken hatcheries in Tai'an, Rizhao, Jining, and Heze, China. Salmonella isolates were successfully recovered from 6.7% of these

embryos (86/1,288. Sin embargo, la técnica presenta desventajas, como la obtención de quimeras con células de los cultivo celulares, que pueden portar genes mutados diferentes y no el gen de la línea germinal (Thomson & McWhir, 2004). Esta técnica ha sido exitosa en ratones, pero requiere varias generaciones para lograrse la homocigosis (Chaible et al., 2013).

- **Recombinación Homóloga (RH) y el gene targeting**

La recombinación homóloga (RH) y el gene targeting buscan la manipulación del genoma, a través de la modificación específica de determinados genes. Brevemente, este proceso inicia con la modificación de células madre de embriones indiferenciados a través de RH mediada por vectores (Melton, 2002). A su vez, estos vectores pueden contener un marcadores de resistencia a antibióticos, que inhiben el crecimiento de los ejemplares no transgénicos (Hermonat & Muzyczka, 1984).

Posteriormente, estas células madre son inyectadas o electroporadas a un embrión buscando el reemplazo de un fragmento de ADN del embrión y las células madre modificadas a través de un intercambio recíproco, ya sea por inserción o reemplazo de material genético (Schiestl & Petes, 1991). Para la inserción se presenta un único intercambio, mediante la implementación del constructo en el locus objetivo y la duplicación de la región homóloga, y para el reemplazo, son necesarios dos intercambios recíprocos o la conversión de genes no recíprocos (Wang & Zhou, 2003).

Esta técnica ha generado animales resistentes o susceptibles a patógenos (Bhan et al., 1999), modelos *knock out* y animales con genes reporteros para el monitorea de la expresión génica *in vivo* o *ex vivo* (Zuo et al., 2017). Sin embargo, entre sus desventajas se encuentra a) una integración aleatoria, por lo que la adhesión de las células madre

modificadas deben evaluarse a través de Southern blot o PCR, y una baja eficiencia en comparación con la inyección pronuclear (Rocha-Martins et al., 2015).

- **Transgénesis mediada por silenciamiento por RNA de interferencia**

El silenciamiento basado en el ácido ribonucleico de interferencia (ARNi) es un sistema natural de función regulatoria en un gran número de organismos, usado para suprimir elementos virales exógenos, que ha sido modificado como técnica transgénica (Kues & Niemann, 2011). Este método usa fragmentos de ARN de doble cadena (ARNdc) (21-25 pares de bases (bp)) que actúan como activadores para inducir la degradación específica de secuencias de ARN homólogas a través del complejo de silenciamiento inducido por ARN (RISC), evitando la codificación de una determinada proteína (Baum & Roberts, 2014). Generalmente, el ARNi es transfectado a embriones tempranos a través de un transgén (Dieckhoff et al., 2007). La implementación de esta técnica en biotecnologías que incluyen silenciamiento génico, la resistencia a patógenos y a algunos virus es exitosa (Ma et al., 2006).

EMPLEO DE VECTORES PARA GENERAR ANIMALES TRANSGÉNICOS

Un vector transgénico busca transferir la información genética entre organismos. Se utiliza para portar el ADN recombinante (el transgén y genes marcadores) a una célula receptora, para obtener una o un grupo de células transgénicas.

- **Transferencia génica mediada por transposones y plásmidos**

En transgénesis, los transposones son vehículos génicos que transportan el gen de interés a través de una transposasa exógena,

mediante un plásmido o una secuencia de ARN mensajero sintético (Ivics et al., 1997). Esta transposasa reconoce una región de repetición invertida terminal dentro del transposón (que alberga el ADN codificante del transgén), que posteriormente es reconocido e integrado en el genoma de la célula diana en un proceso denominado transposición (Jakobsen et al., 2011). Entre las ventajas de los transposones están el tropismo por las regiones eucromáticas del ADN (asociadas a la transcripción), la capacidad de transportar fragmentos de tamaño superior a 10 kilobases (kbs) y la baja capacidad inmunogénica (Niemann et al., 2011).

Por otra parte, los plásmidos son moléculas de ADN circular extracromosómico que transportan ADN con ayuda de elementos estructurales básicos como promotores y señales de terminación transcripcional (Poli A) (Liu, 2013). La integración del transgén es similar a la de los transposones, y se conoce su validez desde 1980 por microinyección pronuclear en embriones murinos. Entre sus ventajas están la capacidad de albergar genes con tamaños menores a 25 kbs sin afectar su estabilidad, y su eficiencia como vector de clonación (Mali, 2013).

- **Vectores virales**

Los virus de la familia *Retroviridae* poseen ARN como material genético, que les posibilita convertir e infectar el genoma de células diana, a través de una retrotranscriptasa que convierte su ARN en ADN, facilitando la inserción de un segmento ADN al azar (Grinevich et al., 2016). En la transgénesis, los mecanismos retrovirales son aplicados principalmente en oocitos y cigotos en estado quimérico, debido a que el transgén no se distribuye de una manera uniforme a través el embrión (Agca et al., 2008). Igual que en otras técnicas, se cruzan individuos portadores para finalmente obtener homocigotos (Ahmad et

al., 2018).

El retrovirus más usado es el virus de leucemia Moloney (roedores), sin embargo, también destacan el virus del sarcoma de Rous (Cáncer en humanos) y el virus de la leucosis aviar (aves de corral) (Rutovitz & Mayer, 2002). No obstante, existen limitantes en esta técnica como el tamaño del vector (8 a 10 kb) que no permite insertar promotores de mayor tamaño, y la preferencia de estos virus por multiplicarse en células en replicación, que pueden bajar eficiencia de la transfección (Ramadass, 2017).

Para resolver algunas limitantes de los retrovirales, se han usado lentivirus, de la misma familia de los *Retroviridae* y con mecanismos de transmisión similar, pero que no requieren células en mitosis, ni un amplio rango de células diana (Mali, 2013). Tanto los retrovirus, como los lentivirus han sido utilizados ampliamente para la generación de roedores transgénicos mediante la infección de líneas germinales masculinas, destacando el papel de los lentivirus en el estudio del Alzheimer (Agca et al., 2008).

APLICACIONES Y USOS DE ANIMALES TRANSGÉNICOS

La transgénesis en animales se ha perfilado a la implantación de genes funcionales, permitiendo la investigación de la regulación génica en procesos celulares y fisiológicos, así como el desarrollo aplicaciones específicas (Figura 2) (Cherenek et al., 2010).

• Animales transgénicos en pro de la salud humana

El uso de animales transgénicos ha cumplido un rol importante en la obtención de conocimiento de patologías infecciosas, genéticas, metabólicas y del desarrollo en humanos (Houdebine, 2002). El ratón se ha consolidado como modelo de estudio para el Alzheimer, estudiando procesos

amiloidogénicos (APP) y la presenilina 1 (PS1) como factor anti-amiloidogénico (Platt et al., 2013). No obstante, para otras enfermedades, por las diferencias funcionales se han considerado los conejos transgénicos (Mazo et al., 2015).

• Animales transgénicos como donantes de órganos para humanos

El trasplante de órganos ha permitido incrementar la expectativa de vida de personas con falla orgánica terminal (Fischer & Schnieke, 2022). La recepción de un órgano para un trasplante depende de factores como el tiempo y la escasez de órganos (Uzoeto et al., 2019), y en busca de alternativas, los xenotrasplantes se consideran actualmente como un recurso promisorio para disminuir estos factores (Hryhorowicz et al., 2017).

A pesar del estudio de modelos como los primates y cerdos, son estos últimos los más prometedores por su cercanía fisiológica y genética con el humano, y por su manejo y reproducción (Jakobsen et al., 2011). Desde 1960 se reportó el primer xenotrasplante de riñón proveniente de un chimpancé a un humano (Bogaerde & White, 1997), y el más reciente es trasplante cardiaco de un porcino a un humano en el año 2021 (Reardon, 2022). Se han reportado avances en el xenotrasplante de precursores neuronales porcinos en primates para el tratamiento de enfermedades neurodegenerativas como el Parkinson y Huntington (Vadori et al., 2015), así como, el avance en el xenotrasplante de islotes pancreáticos porcinos en primates diabéticos (Van Der Windt et al., 2009)

No obstante, los mayores obstáculos de esta técnica son a) el componente inmunológico de la transferencia, b) la necesidad de aumentar el tiempo de supervivencia de los pacientes y c) el riesgo de las enfermedades zoonóticas (Hryhorowicz et al., 2017).

Grandes esfuerzos se han realizados

para generar modificaciones transgénicas en animales donantes, como el bloqueo de estructuras antigénicas de superficie (epítomos 1,3 gal ausentes en humanos) o a través de la modificación para la expresión de proteínas humanas inhibidoras del sistema de complemento (CD46, CD59 y CD55) (Phelps et al., 2003). Lo anterior con el objetivo de reducir los eventos inmunológicos negativos en los pacientes como el rechazo agudo (vascular) hiperagudo y crónico (Bogaerde & White, 1997).

• Transgénesis proyectada en la industria biofarmacéutica

El uso de proteínas exógenas en el marco farmacéutico se remonta a 1920 con el uso de insulina derivada del páncreas del cerdo. Para 1980, las bacterias recombinantes fueron las encargadas de producir insulina humana de manera masiva (Bagle et al., 2013). A pesar de que la producción de proteínas a través de microorganismos es altamente eficiente, muchas de estas no generan de manera correcta cambios postraduccionales (N y O glicosilaciones), que tienen un importante en el funcionamiento proteico (Melo et al., 2007). Esta área de la biomedicina genera ganancias de hasta 3 billones de dólares en Estados Unidos, por lo que el desarrollo que nuevas estrategias para la obtención de estas proteínas de alto valor, como el uso de biorreactores animales es constante (Miller, 2002).

A nivel de biorreactores, se ha buscado que estas proteínas sean secretadas en fluidos de producción constante que no afecten la salud del animal, tales como la orina, plasma seminal, leche, clara de huevo o sangre (Dyck et al., 2003). De hecho, la leche ha sido por muchos años el mejor producto para la extracción de proteínas recombinantes, por su fácil obtención, alta producción, y por ser la glándula mamaria una sintetizadora de proteínas por excelencia. Como resultado, a la

fecha, alrededor de 100 proteínas transgénicas han sido producidas correctamente mediante este tejido (Yu et al., 2013)

Citando algunos ejemplos se destacan la producción de 65 g/l de alfa-1 anti-tripsina en leche de ovejas transgénicas (inactivador de las enzimas proteolíticas para mejorar la elasticidad de los pulmones en humanos) (Ménoret et al., 2017), la antitrombina recombinante humana de origen caprino con una producción de 2,8 g L⁻¹ de leche, y lactoferrina recombinante humana proveniente de leche de conejos con valores de 2,3 g L⁻¹ (Han et al., 2007). Adicionalmente, el uso de promotores órgano-específicos como el promotor de uromodulina ha logrado producido eritropoyetina recombinante humana en orina de ratones (Zbikowska et al., 2002).

• Uso de la transgénesis para el aumento de parámetros productivos en producción animal

El mejoramiento de características en producción animal ha resultado esencial para garantizar la seguridad alimentaria y bienestar humano. La preservación de las características de interés económico como la producción de leche y carne, así como una mejor sanidad animal han sido el enfoque principal de la transgénesis animal, permitiendo reducir el uso de medicamentos y antibióticos, aumentando la oferta de productos de origen animal a través del aumento del rendimiento productivo, generando mayores ganancias económicas y reduciendo su impacto en la salud humana y ambiental (Houdebine, 2005).

Para el caso de la producción cárnica, en porcinos la inserción del gen *hMT-pGH* (promotor de metalotioneína humana) que promueve el gen de la hormona de crecimiento ha incrementado la conversión alimenticia y el rendimiento en canal (Niemann et al., 2003). Por otra parte, la inserción del gen de

factor de crecimiento I, similar a la insulina humana (hIGF-I), ha producido animales con cortes de lomo más magros y con menos grasa (Niemann et al., 2019).

La industria lechera se ha beneficiado con el desarrollo de vacas transgénicas con capacidad de producir copias extras de proteínas lácteas de gran valor como la β - y κ -caseína, aumentando la producción de queso y otros productos (Laible & Wells, 2006). Adicionalmente, se ha logrado producir leche hipoalérgica, compuesta por lactosa baja en B-lactoglobulina y la producción de leche bovina de vacas transgénicas con adición de lactoferrina humana (Van Eenennaam, 2017).

Un gran avance también se ha realizado en el marco de la resistencia a enfermedades en la producción animal, generando un impacto benéfico en la sanidad y bienestar animal. Se han transferido genes que codifican para el complejo mayor de histocompatibilidad, inmunoglobulinas e interferones para generar animales más resistentes a algunos agentes patógenos virales y bacterianos (Niemann et al., 2011) but more efficient protocols are now available based on somatic cell nuclear transfer (SCNT. De manera más precisa, se han integrado proteínas antibacterianas como la lisostafina para su expresión en la glándula mamaria bovina con el objetivo de aumentar la resistencia a la mastitis producida por *Staphylococcus aureus* o la resistencia en pollos de engorde al virus de la influenza aviar a través del uso de fragmentos de RNA insertados en un lentivirus que interfiere con la polimerasa de la influenza aviar (Lyll et al., 2011).

Los ovinos de pelo también han sufrido modificaciones transgénicas para mejorar la producción de lana modificando genes candidatos asociados al aumento de producción de cisteína y colágeno, así como el gen IGF-1 (factor de crecimiento insulínico tipo 1), aumentando hasta en un 9 % la producción de lana en machos (Asaye et al., 2014; Rajoriya et al., 2013).

CONCLUSIONES

En los últimos cincuenta años, el incremento de la transgénesis animal además de sentar bases para técnicas de ingeniería genética ha generado avances en salud humana y animal, así como en producción animal. Esto además de consolidar modelos animales, ha generado gran expectativa al esperar que su aporte compense a una humanidad ávida de soluciones y productos transgénicos seguros que suplan necesidades de alimento y salud, en busca de una mejor calidad de vida. Sin embargo, nuestros esfuerzos deben centrarse en la sofisticación de los procesos técnicos, incremento de la eficiencia, y disminución los costos de producción y tiempo requerido para generar nuevos animales modificados buscando impactar de manera masiva a la población. A su vez, este aumento exponencial debe tener como pieza clave el mantenimiento de la diversidad genética de la especie y el mantenimiento de animales transgénicos con, criterios éticos y responsables en aras de mantener el bienestar humano y animal.

REFERENCIAS

- Acquaah, G. (2004). *Understanding biotechnology: An integrated and cyber-based approach* (2nd ed.). Prentice Hall.
- Agca, C., Fritz, J. J., Walker, L. C., Levey, A. I., Chan, A. W. S., Lah, J. J., & Agca, Y. (2008). Development of transgenic rats producing human β -amyloid precursor protein as a model for Alzheimer's disease: Transgene and endogenous APP genes are regulated tissue-specifically. *BMC Neuroscience*, 9(28), Article 2202. <https://doi.org/10.1186/1471-2202-9-28>
- Ahmad, S., Mahajan, K., Gupta, T., Gulzar, M., & Yadav, V. (2018). Transgenesis in animals: Principles and applications – A review. *International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences*, 7(10), 3068–3077. <https://doi.org/10.20546/ijcmas.2018.710.358>
- Arias, M., Delgado, A., Sánchez, R., & Felmer, R. (2015). Transfección de espermatozoides bovinos para su posterior utilización en transgénesis mediada por espermatozoides (SMGT). *SPERMOVA*, 5(1), 83–86. <https://doi.org/10.18548/aspe/0002.19>
- Asaye, M., Biyazen, H., & Girma, M. (2014). Genetic engineering in animal production: Applications and prospects. *Biotechnology and Biochemistry Research*, 2(2), 12–22. http://www.netjournals.org/z_BBR_14_013.html
- Bagle, T., Kunkulol, R., Baig, M., & More, S. (2013). Transgenic animals and their application in medicine. *International Journal of Medical Research & Health Sciences*, 2(1), 107–116. <https://bit.ly/3eCmVlb>
- Baum, J. A., & Roberts, J. K. (2014). Progress Towards RNAi-Mediated Insect Pest Management. In *Advances in Insect Physiology*, 47, 249–295. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-800197-4.00005-1>
- Bazinet, M., & Braxton, M. (2005). *Transgenic animals*. Worcester Polytechnic Institute.
- Bednarczyk, M., Kozłowska, I., Łakota, P., Szczerba, A., Stadnicka, K., & Kuwana, T. (2018). Generation of transgenic chickens by the non-viral, cell-based method: effectiveness of some elements of this strategy. *Journal of Applied Genetics*, 59(1), 81–89. <https://doi.org/10.1007/s13353-018-0429-6>
- Bhan, A. K., Mizoguchi, E., Smith, N., Mizoguchi, A., Blian, A. K., Mizoguthi, E., Smith, R. N., & Rhan, A. K. (1999). Colitis in transgenic and knockout animals as models of human inflammatory bowel disease. *Immunological Reviews*, 169, 195–207. <https://doi.org/https://doi.org/10.1111/j.1600-065X.1999.tb01316.x>
- Bihon Asfaw, A., & Assefa, A. (2019). Animal transgenesis technology: A review. *Cogent Food and Agriculture*, 5(1), Article 1686802. <https://doi.org/10.1080/23311932.2019.1686802>
- Bogaerde, J., & White, D. (1997). Xenogeneic transplantation. *British Medical Bulletin*, 53(4), 904–920. <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.bmb.a011658>
- Brophy, B., Smolenski, G., Wheeler, T., Wells, D., L'Huillier, P., & Laible, G. (2003). Cloned transgenic cattle produce milk with higher levels of beta-casein and kappa-casein. *Nature Biotechnology*, 21(2), 157–162. <https://doi.org/10.1038/nbt783>
- Brüggemann, M., Osborn, M. J., Ma, B., Hayre, J., Avis, S., Lundstrom, B., & Buelow, R. (2015). Human antibody production in transgenic animals. *Archivum Immunologiae et Therapiae Experimentalis*, 63(2), 101–108. <https://doi.org/10.1007/s00005-014-0322-x>
- Buhler, T., Bruyere, T., Went, D. F., Stranzinger, G., & Burki, K. (1990). Rabbit beta-casein promoter directs secretion of human interleukin-2 into the milk of transgenic rabbits. *Nature*, 8(2), 140–144. <https://doi.org/https://doi.org/10.1038/nbt0290-140>
- Burgstaller, J. P., & Brem, G. (2017). Aging of cloned animals: A mini-review. *Gerontology*, 63(5), 417–425. <https://doi.org/10.1159/000452444>
- Canovas, S., Gutierrez-Adan, A., & Gadea, J. (2010). Effect of exogenous DNA on bovine sperm functionality using the sperm mediated gene transfer (SMGT) technique. *Molecular Reproduction and Development*, 77(8), 687–698. <https://doi.org/10.1002/mrd.21205>
- Cantore, A., Ranzani, M., Bartholomae, C. C., Volpin, M., Valle, P., Della, Sanvito, F., Sergi, L. S., Gallina, P., Benedicenti, F., Bellinger, D., Raymer, R., Merricks, E., Bellintani, F., Martin, S., Doglioni, C., D'Angelo, A., VandenDriessche, T., Chuah, M. K., ... Naldini, L. (2015). Liver-directed lentiviral gene therapy in a dog model of hemophilia B. *Science Translational Medicine*, 7, Article 277ra28. <https://doi.org/10.1126/scitranslmed.aaa1405>

- Carter, M., & Shieh, J. C. (2010). Gene delivery strategies. In M. Carter, & J. Shieh (Eds.), *Guide to research techniques in neuroscience* (Chapter 10; pp. 229–242). Academic Press. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-374849-2.00010-0>
- Carter, M., & Shieh, J. (2015). Gene delivery strategies. In M. Carter, & J. Shieh (Eds.), *Guide to research techniques in neuroscience* (2nd ed., pp. 239–252). Academic Press. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-374849-2.00009-4>
- Chaible, L. M., Kinoshita, D., Finzi Corat, M. A., & Zaidan Dagli, M. L. (2013). Genetically modified animal models. In P. Conn, & B. T. Michael (Eds.), *Animal model for the study of human disease* (2nd ed., pp. 811–831). Academic Press. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-415894-8.00033-6>
- Chereneck, P., Makarevich, A., Pivko, J., & Bulla, J. (2010). Transgenic farm animal production and application. *Slovak Journal of Animal Science*, 43(2), 45–49.
- Crispo, M., Mulet, A. P., Tesson, L., Barrera, N., Cuadro, F., Dos Santos-Neto, P. C., Nguyen, T. H., Cr n guy, A., Brusselle, L., Ane n, I., & Menchaca, A. (2015). Efficient generation of myostatin knock-out sheep using CRISPR/Cas9 technology and microinjection into zygotes. *PLoS ONE*, 10(8), 1–18. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0136690>
- Dieckhoff, B., Karlas, A., Hofmann, A., Kues, W. A., Petersen, B., Pfeifer, A., Niemann, H., Kurth, R., & Denner, J. (2007). Inhibition of porcine endogenous retroviruses (PERVs) in primary porcine cells by RNA interference using lentiviral vectors. *Archives of Virology*, 152(3), 629–634. <https://doi.org/10.1007/s00705-006-0868-y>
- Do, V., & Taylor Robinson, T. (2014). Somatic Cell nuclear transfer in mammals: Reprogramming mechanism and factors affecting success. *Cloning & Transgenesis*, 3(3), 1. <https://doi.org/10.4172/2168-9849.1000129>
- Dunham, R. A., Warr, G. W., Nichols, A., Duncan, P. L., Argue, B., Middleton, D., & Kucuktas, H. (2002). Enhanced bacterial disease resistance of transgenic channel catfish *Ictalurus punctatus* possessing cecropin genes. *Marine Biotechnology*, 4(3), 338–344. <https://doi.org/10.1007/s10126-002-0024-y>
- Dyck, M. K., Lacroix, D., Pothier, F., & Sirard, M. A. (2003). Making recombinant proteins in animals - Different systems, different applications. *Trends in Biotechnology*, 21(9), 394–399. [https://doi.org/10.1016/S0167-7799\(03\)00190-2](https://doi.org/10.1016/S0167-7799(03)00190-2)
- Ebert, K. M., Selgrath, J. P., DiTullio, P., Denman, J., Smith, T. E., Memon, M. A., Schindler, J. E., Monastersky, G. M., Vitale, L. A., & Gordon, K. (1991). Transgenic production of a variant of human tissue-type plasminogen activator in goat milk: Generation of transgenic goats and analysis of expression. *Nature*, 9(9), 835–839. <https://doi.org/10.1038/nbt0991-835>
- Fischer, K., & Schnieke, A. (2022). Xenotransplantation becoming reality. *Transgenic Research*, 31(3), 391–398. <https://doi.org/10.1007/s11248-022-00306-w>
- Fodor, W. L., Williams, B. L., Matis, L. A., Madri, J. A., Rollins, S. A., Knight, J. W., Velandar, W., & Squinto, S. P. (1994). Expression of a functional human complement inhibitor in a transgenic pig as a model for the prevention of xenogeneic hyperacute organ rejection. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 91(23), 11153–11157. <https://doi.org/10.1073/pnas.91.23.11153>
- Galli, C., Lagutina, I., Perota, A., Colleoni, S., Duchi, R., Lucchini, F., & Lazzari, G. (2012). Somatic cell nuclear transfer and transgenesis in large animals: current and future insights. *Reproduction in Domestic Animals*, 47(3), 2–11. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0531.2012.02045.x>
- Gama Sosa, M., De Gasperi, R., & Elder, G. (2010). Animal transgenesis: An overview. *Brain Structural Function*, 1(214), 91–109. <https://doi.org/10.1007/s00429-009-0230-8>
- Golovan, S. P., Meidinger, R. G., Ajakaiye, A., Cottrill, M., Wiederkehr, M. Z., Barney, D. J., Plante, C., Pollard, J. W., Fan, M. Z., Hayes, M. A., Laursen, J., Hjorth, J. P., Hacker, R. R., Phillips, J. P., & Forsberg, C. W. (2001). Pigs expressing salivary phytase produce low-phosphorus manure. *Nature Biotechnology*, 19(8), 741–745. <https://doi.org/10.1038/90788>
- Gordon, J. W., Scangos, G. A., Plotkin, D. J., Barbosa, J. A., & Ruddle, F. H. (1980). Genetic transformation of mouse embryos by microinjection of purified DNA. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 77(12), 7380–7384. <https://doi.org/10.1073/pnas.77.12.7380>
- Gordon, K., Lee, E., Vitale, J. A., Smith, A. E., Westphal, H., & Hennighausen, L. (1987). Production of human tissue plasminogen activator in transgenic mouse milk. *Nature Biotechnology*, 5(11), 1183–1187. <https://doi.org/10.1038/nbt1187-1183>

- Grinevich, V., Knobloch-Bollmann, H. S., Roth, L. C., Althammer, F., Domanskyi, A., Vinnikov, I. A., Eliava, M., Stanifer, M., & Boulant, S. (2016). Somatic transgenesis (viral vectors). In D. Murphy, & H. Gainer (Eds.), *Molecular neuroendocrinology* (2nd ed., pp. 243–274). Wiley-Blackwell. <https://doi.org/https://doi.org/10.1002/9781118760369.ch12>
- Han, Z. S., Li, Q. W., Zhang, Z. Y., Xiao, B., Gao, D. W., Wu, S. Y., Li, J., Zhao, H. W., Jiang, Z. L., & Hu, J. H. (2007). High-level expression of human lactoferrin in the milk of goats by using replication-defective adenoviral vectors. *Protein Expression and Purification*, 53(1), 225–231. <https://doi.org/10.1016/j.pep.2006.11.019>
- Hermonat, P. L., & Muzyczka, N. (1984). Use of adeno-associated virus as a mammalian DNA cloning vector: transduction of neomycin resistance into mammalian tissue culture cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 81(20), 6466–6470. <https://doi.org/10.1073/pnas.81.20.6466>
- Hill, J. R. (2004). Somatic cell nuclear transfer. *Australian Journal of Experimental Agriculture*, 44(11), 1101–1104. <https://doi.org/10.1071/EA03234>
- Houdebine, L. -M. (2002). Animal transgenesis: recent data and perspectives. *Biochimie*, 84(11), 1137–1141. [https://doi.org/10.1016/S0300-9084\(02\)00012-3I](https://doi.org/10.1016/S0300-9084(02)00012-3I)
- Houdebine, L. (2005). Use of Transgenic Animals to Improve Human Health and Animal Production. *Reprod Dom Anim*, 40(4), 269–281. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0531.2005.00596.x>
- Hryhorowicz, M., Zeyland, J., Słomski, R., & Lipiński, D. (2017). Genetically modified pigs as organ donors for xenotransplantation. *Molecular Biotechnology*, 59(9), 435–444. <https://doi.org/10.1007/s12033-017-0024-9>
- Ivics, Z., Hackett, P. B., Plasterk, R. H., & Izsvák, Z. (1997). Molecular reconstruction of Sleeping Beauty, a Tc1-like transposon from fish, and its transposition in human cells. *Cell*, 91(4), 501–510. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(00\)80436-5](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(00)80436-5)
- Jaenisch, R., & Mintz, B. (1974). Simian virus 40 DNA sequences in DNA of healthy adult mice derived from preimplantation blastocysts injected with viral DNA. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 71(4), 1250–1254. <https://doi.org/10.1073/pnas.71.4.1250>
- Jakobsen, J. E., Li, J., Kragh, P. M., Moldt, B., Lin, L., Liu, Y., Schmidt, M., Winther, K. D., Schyth, B. D., Holm, I. E., Vajta, G., Bolund, L., Callesen, H., Jørgensen, A. L., Nielsen, A. L., & Mikkelsen, J. G. (2011). Pig transgenesis by Sleeping Beauty DNA transposition. *Transgenic Research*, 20(3), 533–545. <https://doi.org/10.1007/s11248-010-9438-x>
- Jiang, R. -D., Liu, M. -Q., Chen, Y., Shan, C., Zhou, Y. -W., Shen, X. -R., Li, Q., Zhang, L., Zhu, Y., Si, H. -R., Wang, Q., Min, J., Wang, X., Zhang, W., Li, B., Zhang, H. -J., Baric, R. S., Zhou, P., Yang, X. -L., & Shi, Z. -L. (2020). Pathogenesis of SARS-CoV-2 in transgenic mice expressing human angiotensin-converting enzyme 2. *Cell*, 182(1), 50–58. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2020.05.027>
- Kaneko, T., Moisyadi, S., Suganuma, R., Hohn, B., Yanagimachi, R., & Pelczar, P. (2005). Recombinase-mediated mouse transgenesis by intracytoplasmic sperm injection. *Theriogenology*, 64(8), 1704–1715. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2005.04.003>
- Kim, T. K., & Eberwine, J. H. (2010). Mammalian cell transfection: the present and the future. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 397(8), 3173–3178. <https://doi.org/10.1007/s00216-010-3821-6>
- Kind, A., & Schnieke, A. (2008). Animal pharming, two decades on. *Transgenic Research*, 17(6), 1025–1033. <https://doi.org/10.1007/s11248-008-9206-3>
- Krimpenfort, P., Rademakers, A., Eyestone, W., der Schans, A. Van, van der Broek, S., Kooiman, P., Kootwijk, E., Platenburg, G., Pierper, F., Strijker, R., & de Boer, H. (1991). Generation of transgenic dairy cattle using “in vitro” embryo production. *Nature*, 9(9), 844–848. <https://doi.org/doi:10.1038/nbt0991-844>
- Kues, W. A., & Niemann, H. (2011). Advances in farm animal transgenesis. *Preventive Veterinary Medicine*, 102(2), 146–156. <https://doi.org/10.1016/j.prevetmed.2011.04.009>
- Kwon, M. S., Koo, B. C., Kim, D., Nam, Y. H., Cui, X. S., Kim, N. H., & Kim, T. (2018). Generation of transgenic chickens expressing the human erythropoietin (hEPO) gene in an oviduct-specific manner: Production of transgenic chicken eggs containing human erythropoietin in egg whites. *PLoS ONE*, 13(5), 1–12. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0194721>

- Laible, G., & Wells, D. N. (2006). Transgenic cattle applications: The transition from promise to proof. *Biotechnology and Genetic Engineering Reviews*, 22(1), 125–150. <https://doi.org/10.1080/02648725.2006.10648068>
- Lanigan, T., Kopera, H., & Saunders, T. (2020). Principles of genetic engineering technology. *Genes*, 11(291), 1073–1088. <https://doi.org/10.3109/03639048509055598>
- Liu, C. (2013). Strategies for designing transgenic DNA constructs. In L. Feeman (Ed.), *Lipoproteins and cardiovascular disease. Methods in Molecular Biology* (Vol. 1027, 2nd ed., pp. 183–201). Humana Press. https://doi.org/10.1007/978-1-60327-369-5_8
- Lyll, J., Irvine, R. M., Sherman, A., McKinley, T. J., Núñez, A., Purdie, A., Outtrim, L., Brown, I. H., Rolleston-Smith, G., Sang, H., & Tiley, L. (2011). Suppression of avian influenza transmission in genetically modified chickens. *Science*, 331(6014), 223–226. <https://doi.org/10.1126/science.1198020>
- Ma, Y., Creanga, A., Lum, L., & Beachy, P. A. (2006). Prevalence of off-target effects in *Drosophila* RNA interference screens. *Nature*, 443(7109), 359–363. <https://doi.org/10.1038/nature05179>
- Mali, S. (2013). Delivery systems for gene therapy. *Indian Journal of Human Genetics*, 19(1), 3–8. <https://doi.org/10.4103/0971-6866.112870>
- Manmohan, S., & Niraj, K. (2010). Transgenic animals: Production and application. *International Journal of Pharmaceutical Sciences and Research*, 1(9), 12–22.
- Mazo, T., Pérez, V., Gómez, A., Llamosas, C., Valdez, L., Zaobornyj, T., Nicolosi, L., Rubio, M. C., D'Annunzio, V., & Gelpi, R. J. (2015). Rol de la tioredoxina-1 en el atontamiento cardíaco en ratones transgénicos. *Revista Argentina de Cardiología*, 83(5), 390–395. <https://doi.org/10.7775/rac.v83.i5.6998>
- Melo, E. O., Canavessi, A. M. O., Franco, M. M., & Rumpf, R. (2007). Animal transgenesis: state of the art and applications. *Journal of Applied Genetics*, 48(1), 47–61. <https://doi.org/10.1007/BF03194657>
- Melton, D. W. (2002). Gene-targeting strategies. In J. M. Walker (Ed.), *Transgenesis techniques. Methods in Molecular Biology* (Vol. 180, 2nd ed., pp. 151–173). Springer. <https://doi.org/10.1385/1-59259-178-7:151>
- Ménoret, S., Tesson, L., Remy, S., Usal, C., Ouisse, L.-H., Brusselle, L., Chenouard, V., & Anegon, I. (2017). Advances in transgenic animal models and techniques. *Transgenic Research*, 26(5), 703–708. <https://doi.org/10.1007/s11248-017-0038-x>
- Miller, H. (2002). As biotech turns 20... *Nature Reviews Drug Discovery*, 1, 1007–1008. <https://doi.org/10.1038/nrd965>
- Montoliu, L. (2002). Gene transfer strategies in animal transgenesis. *Cloning and Stem Cells*, 4(1), 39–46. <https://doi.org/10.1089/153623002753632039>
- Moreira, P. N., Pozueta, J., Pérez-Crespo, M., Valdivieso, F., Gutiérrez-Adán, A., & Montoliu, L. (2007). Improving the generation of genomic-type transgenic mice by ICSI. *Transgenic Research*, 16(2), 163–168. <https://doi.org/10.1007/s11248-007-9075-1>
- Niemann, H., Kues, W. A., Petersen, B., & Carnwath, J. W. (2011). Transgenesis. In M. Moo-Young (Ed.), *Comprehensive Biotechnology* (Vol. 4, 2nd ed., pp. 457–467). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-08-088504-9.00299-3>
- Niemann, H., Rath, D., & Wrenzycki, C. (2003). Review article advances in biotechnology: new tools in future pig production for agriculture and biomedicine. *Reproduction in Domestic Animals*, 38(2), 82–89. <https://doi.org/10.1046/j.1439-0531.2003.00409.x>
- Niemann, H., Lucas-Hahn, A., & Petersen, B. (2019). The methodologies and application potential of genetically modified farm animals. In M. Moo-Young (Ed.), *Comprehensive Biotechnology* (Vol. 4, 2nd ed., pp. 466–480). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-444-64046-8.00292-5>
- Phelps, C., Koike, C., Vaught, T., Boone, J., Wells, K., Chen, S. -H., Ball, S., Specht, S., Polejaeva, I., Monahan, J., Jobst, P., Sharma, S., Lamborn, A., Garst, A., Moore, M., Demetris, A., Rudert, W., Bottino, R., Bertera, S., ... Ayaresng, D. (2003). Production of α 1,3-galactosyltransferase-deficient pigs. *Science*, 299(5605), 411–414. <https://doi.org/10.1126/science.107894>

- Platt, T. L., Reeves, V. L., & Murphy, M. P. (2013). Transgenic models of Alzheimer's disease: Better utilization of existing models through viral transgenesis. *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Basis of Disease*, 1832(9), 1437–1448. <https://doi.org/10.1016/j.bbadis.2013.04.017>
- Polites, H. G., Johnson, L. W., & Pinkert, C. A. (2014). DNA microinjection, embryo handling, and germplasm preservation. In C. A. Pinkert (Ed.), *Transgenic animal technology* (3rd ed., pp. 17–70). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-410490-7.00002-5>
- Pusta, D., Sobulu, R., Pasca, I., & Militaru, M. (2010). Animal transgenesis and its applications. *Bulletin of University of Agricultural Sciences and Veterinary Medicine*, 67(1), 249–255.
- Rajoriya, R., Rajoriya, S., & Kumar, N. (2013). Transgenic animals: Prospects for improving livestock productivity. *Journal of Bio Innovation*, 2(5), 240–259.
- Ramadass, P. (2017). *Animal biotechnology: Recent concepts and developments*. (2nd ed.). MJP Publisher.
- Rapp, J. C., Harvey, A. J., Speksnijder, G. L., Hu, W., & Ivarie, R. (2003). Biologically active human interferon α -2b produced in the egg white of transgenic hens. *Transgenic Research*, 12(5), 569–575. <https://doi.org/10.1023/A:1025854217349>
- Reardon, S. (2022). First pig-to-human can scientists learn? *Nature*, 601, 305–310. <https://doi.org/10.12968/prma.2021.31.4.8>
- Redfern, W. S., & Valentin, J.-P. (2013). Transgenic animals. In H. G. Vogel, J. Maas, F. J. Hock, & D. Mayer (Eds.), *Drug discovery and evaluation: Safety and pharmacokinetic Assays* (pp. 595–603). Springer Berlin Heidelberg. https://doi.org/10.1007/978-3-642-25240-2_21
- Richt, J. A., Kasinathan, P., Hamir, A. N., Castilla, J., Sathiyaseelan, T., Vargas, F., Sathiyaseelan, J., Wu, H., Matsushita, H., Koster, J., Kato, S., Ishida, I., Soto, C., Robl, J. M., & Kuroiwa, Y. (2007). Production of cattle lacking prion protein. *Nature Biotechnology*, 25(1), 132–138. <https://doi.org/10.1038/nbt1271>
- Rocha-Martins, M., Cavalheiro, G. R., Matos-Rodrigues, G. E., & Martins, R. A. P. (2015). From gene targeting to genome editing: Transgenic animals applications and beyond. *Anais Da Academia Brasileira de Ciencias*, 87(2), 1323–1348. <https://doi.org/10.1590/0001-3765201520140710>
- Rutovitz, J., & Mayer, S. (2002). Genetically modified and cloned animals. All in a Good Cause? *GeneWatch UK*.
- Schiestl, R. H., & Petes, T. D. (1991). Integration of DNA fragments by illegitimate recombination in *Saccharomyces cerevisiae* (yeast/nonhomologous recombination/restriction enzymes). *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 88(17), 7585–7589. <https://doi.org/10.1073/pnas.88.17.7585>
- Sinzelle, L., Vallin, J., Coen, L., Chesneau, A., Pasquier, D. Du, Pollet, N., Demeneix, B., & Mazabraud, A. (2006). Generation of transgenic *Xenopus laevis* using the Sleeping Beauty transposon system. *Transgenic Research*, 15(6), 751–760. <https://doi.org/10.1007/s11248-006-9014-6>
- Tarkovski, A. (1961). Mouse chimæras developed from fused eggs. *Nature*, 190(4779), 857–860. <https://doi.org/10.1038/190857a0>
- Thomson, A. J., & McWhir, J. (2004). Biomedical and agricultural applications of animal transgenesis. *Molecular Biotechnology*, 27(3), 231–244. <https://doi.org/10.1385/MB:27:3:231>
- Tian, C., Kubota, C., Enright, B., & Yang, X. (2003). Cloning animals by somatic cell nuclear transfer - Biological factors. *Reproductive Biology and Endocrinology*, 1, article 98. <https://doi.org/10.1186/1477-7827-1-98>
- Uzoeto, O., Eruka, N., Malachi, J., Ezema, O., Onele Ebube, D., Okechukwu, M., & Durojaye, O. (2019). The use of transgenic animals in clinical research; the pros and cons. *Pharmacology Online*, 2, 177–189. <https://bit.ly/3LixJ47>
- Vadori, M., Aron Badin, R., Hantraye, P., & Cozzi, E. (2015). Current status of neuronal cell xenotransplantation. *International Journal of Surgery*, 23, 267–272. <https://doi.org/10.1016/j.ijsu.2015.09.052>

- Van Der Windt, D. J., Bottino, R., Casu, A., Campanile, N., Smetanka, C., He, J., Murase, N., Hara, H., Ball, S., Loveland, B. E., Ayares, D., Lakkis, F. G., Cooper, D. K. C., & Trucco, M. (2009). Long-term controlled normoglycemia in diabetic non-human primates after transplantation with hCD46 transgenic porcine islets. *American Journal of Transplantation*, 9(12), 2716–2726. <https://doi.org/10.1111/j.1600-6143.2009.02850.x>
- Van Eenennaam, A. L. (2017). Genetic modification of food animals. *Current Opinion in Biotechnology*, 44, 27–34. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.copbio.2016.10.007>
- Wall, R. J., Pursel, V. G., Shamayt, A., Mcknightt, R. A., Pittiustt, C. W., & Hennighausent, L. (1991). High-level synthesis of a heterologous milk protein in the mammary glands of transgenic swine. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 88, 1696–1700. <https://doi.org/10.1073/pnas.88.5.1696>
- Wang, B., & Zhou, J. (2003). Specific genetic modifications of domestic animals by gene targeting and animal cloning. *Reproductive Biology and Endocrinology*, 1, Article 103. <https://doi.org/https://doi.org/10.1186/1477-7827-1-103>
- Wilmot, I., Bai, Y., & Taylor, J. (2015). Somatic cell nuclear transfer: origins, the present position and future opportunities. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 370, Article 20140366. <https://doi.org/10.1098/rstb.2014.0366>
- Wilmot, 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(6619), 810–813. <https://doi.org/10.1038/385810a0>
- Wongsrikeao, P., Saenz, D., Rinkoski, T., Otoi, T., & Poeschla, E. (2011). Antiviral restriction factor transgenesis in the domestic cat. *Nature Methods*, 8(10), 853–859. <https://doi.org/10.1038/nmeth.1703>
- Wright, G., Carver, A., Cottom, D., Reeves, D., Scott, A., Simons, P., Wilmot, I., Garner, I., & Colman, A. (1991). High level expression of active human alpha-1-antitrypsin in the milk of transgenic sheep. *Bio/Technology (Nature Publishing Company)*, 9(9), 830–834. <https://doi.org/10.1038/nbt0991-830>
- Yu, H., Chen, J., Liu, S., Zhang, A., Xu, X., Wang, X., Lu, P., & Cheng, G. (2013). Large-scale production of functional human lysozyme in transgenic cloned goats. *Journal of Biotechnology*, 168(4), 676–683.
- Zbikowska, H. M., Soukhareva, N., Behnam, R., Chang, R., Drews, R., Lubon, H., Hammond, D., & Soukharev, S. (2002). The use of the uromodulin promoter to target production of recombinant proteins into urine of transgenic animals. *Transgenic Research*, 11(4), 425–435. <https://doi.org/10.1023/A:1016312017024>
- Zhao, X., Ju, Z., Wang, G., Yang, J., Wang, F., Tang, H., Zhao, X., & Sun, S. (2021). Prevalence and antimicrobial resistance of *Salmonella* isolated from dead-in-shell chicken embryos in Shandong, China. *Frontiers in Veterinary Science*, 8, Article 581946. <https://doi.org/10.3389/fvets.2021.581946>
- Zuo, E., Cai, Y. J., Li, K., Wei, Y., Wang, B. A., Sun, Y., Liu, Z., Liu, J., Hu, X., Wei, W., Huo, X., Shi, L., Tang, C., Liang, D., Wang, Y., Nie, Y. H., Zhang, C. C., Yao, X., Wang, X., ... Yang, H. (2017). One-step generation of complete gene knockout mice and monkeys by CRISPR/Cas9-mediated gene editing with multiple sgRNAs. *Cell Research*, 27(7), 933–945. <https://doi.org/10.1038/cr.2017.81>