

PEIXOS TRANSGÈNICS

ROSA MARÍA CEINOS I JOSEP ROTLLANT

Instituto de Investigaciones Marinas, Consell Superior d'Investigacions Científiques, Vigo

Adreça per a la correspondència: Josep Rotllant. Departamento de Acuicultura y Biotecnología, Instituto de Investigaciones Marinas (IIM-CSIC).
C. d'Eduardo Cabello, 6. 36208 Vigo. Adreça electrònica: rotllant@iim.csic.es.

RESUM

La generació d'organismes modificats genèticament (OMG) ha representat un avanç tecnològic molt important en totes les àrees de recerca biològica. Així, la producció d'animals transgènics ha estat una eina molt valuosa per a l'establiment d'organismes model en recerca biomèdica, la producció massiva de macromolècules biològicament actives i el desenvolupament de cultius d'aliments, entre d'altres. Malgrat que tradicionalment els mamífers han estat els vertebrats més emprats per a la generació d'animals transgènics, els peixos constitueixen una alternativa excel·lent. Comparats amb els mamífers, els peixos presenten tot un conjunt de característiques, tant evolutives com fisiològiques, i també una sèrie d'interessos comercials i tecnològics, que estan fent d'aquests organismes els animals amb més potencial en els diferents camps d'aplicació de la tecnologia de manipulació genètica.

En aquesta revisió, a més de presentar els darrers avenços tecnològics disponibles per a la generació de peixos transgènics, es repassen les diferents aplicacions de la transferència gènica en peixos, i també els beneficis i els possibles riscos derivats d'aquest ús.

Paraules clau: peix, transgènesi, vector, tècniques de transferència gènica, aqüicultura, biofàbrica, riscos, salut humana, ecosistemes naturals.

TRANSGENIC FISH

SUMMARY

The generation of genetically modified organisms (GMOs) has provided an important technological advance to many areas of biological research. The production of these GMOs has been a valuable tool for the establishment of model organisms for biomedical research and the commercial production of biologically active macromolecules and food,

amongst others. Traditionally, mammals have been used as the model organisms however in recent years the production of transgenic fish has provided an excellent alternative. Compared with mammals, fish presents some ideal physiological characteristics and evolutionary features, which together with recent technological advances and commercial interests, make fish an ideal candidate for genetic manipulation. This paper provides a brief summary of the most recent relevant data in this field.

Key words: fish, transgenesis, vector, gene transfer technology, aquaculture, biofactory, risks, human health, natural ecosystems.

INTRODUCCIÓ

Pocs avanços tecnològics en ciències biològiques han obert tantes qüestions i possibilitats com les que ha obert l'aplicació de les tècniques de transgènesi. La capacitat de canviar selectivament la composició genètica d'un organisme multicel·lular té implicació en totes les àrees de recerca biològica. La producció d'animals transgènics ha representat una eina important per poder entendre la funció i regulació gènica durant el desenvolupament embrionari de moltes espècies, per a la producció massiva de productes gènics d'interès divers i per a la millora o la producció de noves varietats d'organismes amb unes determinades característiques desitjades. Els primers experiments d'aplicació de tècniques de transferència gènica en animals es van iniciar els anys vuitanta, amb la creació del primer animal transgènic, un ratolí (Gordon *et al.*, 1980). A partir d'aquest primer model, s'han aconseguit generar altres animals transgènics com rates, porcs, vaques, ovelles, cabres, conills i peixos, entre d'altres.

Hi ha tres raons que fan dels peixos uns excel·lents candidats per crear organismes transgènics o organismes modificats genèticament (OMG). La primera és que els peixos són el grup de vertebrats més nombrós i amb més diversitat, i per tant constitueixen un sistema molt valuós per a l'estudi *in vivo* de diferents processos biològics en

vertebrats. La segona raó és que els processos clàssics de selecció genètica en peixos per optimitzar i millorar diferents factors d'interès en aqüicultura, com per exemple el creixement, són processos molt lents. En contraposició, l'aplicació de la transgènesi en peixos té el potencial de millorar i optimitzar aquests diferents factors genètics en tan sols una generació. I finalment, la tercera raó són les característiques fisiològiques mateixes dels peixos: són animals molt prolífics, la fecundació és externa i els embrions són fàcilment manejables, cosa que fa que l'aplicació de tècniques de manipulació genètica sigui molt més senzilla de fer que en vertebrats terrestres. Addicionalment, en aquests darrers anys s'han desenvolupat tot un conjunt d'eines biotecnològiques que ens faciliten enormement la generació de peixos modificats genèticament.

Els primers experiments de transgènesi en peixos es van iniciar a mitjan dècada dels vuitanta (Zhu *et al.*, 1985). D'ençà d'aquells primers experiments, la creació i utilització de peixos transgènics ha augmentat significativament tant pel que fa a la recerca bàsica com aplicada, i han passat a ser en alguns casos organismes model d'ampli ús en investigació.

En aquesta revisió es presenten els darrers avenços tecnològics disponibles per a la generació de peixos transgènics, i també els beneficis, aplicacions i dubtes que representen.

GENERACIÓ DE PEIXOS TRANSGÈNICS

Igual que en altres espècies, en els peixos la modificació genètica inclou principalment dos tipus d'experiments: la sobreexpressió gènica i la inhibició gènica. En el primer cas s'introdueix una informació genètica addicional de manera estable al genoma de l'animal. Aquesta nova informació o DNA forà pot ser de la mateixa espècie que l'organisme receptor o d'altres espècies. En el segon cas s'elimina de manera específica i estable una informació genètica del genoma de l'animal.

La modificació genètica presenta tres components indissociables i necessaris: el primer, un gen d'interès del qual s'espera que la modificació l'acompanyi un efecte fenotípic en l'individu; el segon el constitueix l'organisme diana, sobre el qual es farà la modificació, i el tercer, el vector i les tècniques de transferència. Entenem com a vector el vehicle que transporta el material genètic i que en permet la introducció i integració en l'organisme diana en el cas d'experiments de sobreexpressió gènica. També s'anomenen *vectors* els vehicles que transporten les eines necessàries per a l'alteració d'una zona específica del genoma de l'animal en el cas d'experiments d'inhibició gènica. I s'anomenen *tècniques d'expressió gènica* els sistemes utilitzats per a la introducció del vector d'expressió gènica a l'interior de la cèl·lula.

DISSENY DE VECTORS D'EXPRESSIÓ TRANSGÈNICA

Els vectors, com hem mencionat anteriorment, són els sistemes de construcció gènica que s'utilitzen en el procés d'integració d'un gen exogen en el genoma de l'organisme diana. El disseny de vectors

gènics és molt variat, i dependrà bàsicament del tipus de gen que cal introduir i de la finalitat d'aquesta integració. En termes generals aquests vectors es divideixen en dos grans grups, els anomenats *vectors vírics* i el *no vírics*.

Per a la generació de peixos transgènics els sistemes d'expressió més emprats han estat els vectors no vírics, i en destaquen els vectors plasmídics com els d'ús més habitual. Entre aquests cal destacar els següents:

Sistema transposó-transposasa

Els transposons són seqüències de DNA que es poden moure lliurement dins el genoma d'un organisme. Aquests fragments de DNA es mouen gràcies a un mecanisme de tallar i enganxar. Les eines d'integració dels elements de DNA transposable consisteixen en un element que codifica una transposasa que facilita l'escissió i reinserció de DNA a partir d'interaccions amb elements terminals *cis* del transposó i les seqüències en el lloc d'integració. Així, basant-se en aquestes característiques, els transposons tenen molta utilitat per a la generació de transgènesi i mutagènesi insercional. El sistema necessita un plasmidi amb el gen de la transposasa, el qual s'utilitzarà per a la síntesi *in vitro* de mRNA de transposasa i un plasmidi amb el gen que cal inserir envoltat per dues repeticions terminals invertides (*tir*) del transposó. Cada una de les *tir* presenta diferents llocs d'interacció amb la transposasa. L'mRNA de la transposasa i el plasmidi amb l'*insert* escollit es coinjecten a embrions en un estadi d'una a dues cèl·lules. La transposasa tallarà enzimàticament les regions *tir* del plasmidi i a continuació integrarà les regions *tir* més l'*insert* que volem en els nous llocs del genoma. Posteriorment, en aca-

bar-se la transposasa, la integració de l'*insert* escollit entre les seqüències *tir* serà estable.

En peixos els sistemes de transposició més usats són el TOL2 (Kawakami, 2007) i l'Sleeping Beauty SB (Ivics *et al.*, 1997). Dels diferents sistemes usats actualment per generar peixos transgènics, aquest és el que presenta el grau d'eficiència més alt, amb un 50 %.

Sistema meganucleasa I-SceI

El sistema meganucleasa I-SceI és un altre tipus de tecnologia recentment desenvolupada per generar transgènesi en peixos. Es basa en la utilització d'un enzim meganucleasa, la I-SceI, que talla la seqüència de DNA en llocs específics (Monteilhet *et al.*, 1999).

Semblant al sistema transposó-transposasa, el sistema meganucleasa I-SceI necessita un plasmidi amb el gen de la meganucleasa I-SceI, el qual s'utilitzarà per a la síntesi *in vitro* de mRNA de meganucleasa I-SceI i un plasmidi amb el gen que cal inserir flanquejat per dues seqüències específiques de reconeixement per a la meganucleasa I-SceI. L'mRNA de la meganucleasa I-SceI i el plasmidi amb l'*insert* escollit es coinjecten a embrions en un estadi d'una a dues cèl·lules.

El mecanisme de funcionament d'aquesta nova tècnica de transgènesi encara no és del tot clar. Una hipòtesi és que la unió continuada de la meganucleasa I-SceI a les seqüències específiques de reconeixement que hi ha per a aquest enzim en els extrems de l'*insert* escollit impedeix la formació de concatàmers o la degradació de monòmers lineals, els quals normalment inhibeixen la integració del DNA forà (Thermes *et al.*, 2002; Ogino *et al.*, 2006). El grau d'eficiència d'integració del DNA forà

en el genoma diana de diferents espècies de peixos amb aquest sistema és aproximadament del 30 % (Thermes *et al.*, 2002).

TÈCNiques DE TRANSFERÈNCIA GÈNICA EN PEIXOS

Les tècniques de transferència gènica són els sistemes utilitzats per a la introducció dels vectors d'expressió gènica a l'interior de la cèl·lula. Els mètodes més usats en peixos són la microinjecció d'embrions i l'electroporació i lipofecció de gàmetes i testicles.

Microinjecció d'embrions

La microinjecció va ser la primera tècnica de transferència gènica utilitzada en peixos (Zhu *et al.*, 1985) i actualment encara continua sent el mètode més emprat en la generació de peixos transgènics. La microinjecció és un simple procés mecànic en el qual una agulla molt fina penetra la membrana cel·lular per alliberar el seu contingut. Aquest procés es fa utilitzant un microscopi òptic i mitjançant un micromanipulador. En peixos, la *microinjecció* de vectors d'expressió gènica per a l'obtenció d'animals transgènics es fa a l'espai perivitellí d'embrions fertilitzats d'una a dues cèl·lules (Westerfiled *et al.*, 2007). La tècnica de microinjecció és una tècnica laboriosa i lenta i pot produir importants mortalitats als embrions injectats, i per això ha calgut el desenvolupament de tècniques alternatives com l'electroporació (Powers *et al.*, 1990) i la lipofecció (Chen *et al.*, 1990), encara que aquestes tècniques en peixos s'han usat majoritàriament per a l'expressió transitòria de gens exògens i no per generar animals transgènics estables. Una aplicació alternativa interessant de les tècniques

d'electroporació i lipofecció en peixos ha estat la transferència gènica en gàmetes i testicles (Lu *et al.*, 2002), en què s'intenta minimitzar la manipulació d'embrions i incrementar la producció del nombre d'animals transgènics.

Transferència gènica en gàmetes (*sperm-mediated gene transfer*, SMT) i testicles (*testis-mediated gene transfer*, TMGT)

Aquestes tècniques de transferència es basen en la introducció del DNA transgènic als espermatozoides, els quals seran usats posteriorment per fertilitzar artificialment els òvuls. D'aquesta manera, s'obtenen embrions que són portadors del DNA forà inicialment introduït als espermatozoides. La introducció de la construcció d'expressió als espermatozoides es fa mitjançant l'aplicació de dues tècniques, que són l'electroporació o electroporabilització, la qual utilitza l'aplicació d'un camp elèctric extern per incrementar la permeabilització de la membrana cel·lular, i la lipofecció o encapsulació del DNA transgènic en una membrana fosfolipídica que es fusionarà amb la membrana cel·lular.

El gran avantatge d'aquests mètodes sobre el mètode de microinjecció és que no cal manipular els embrions, i la independència pel que fa a l'equipament de cost econòmic elevat, com la utilització dels microscopis i dels micromanipuladors necessaris en la microinjecció. Aquestes tècniques s'han aplicat amb èxit en la generació de transgènesi en espècies de peixos d'interès en aqüicultura com el sard daurat (*Sparus sarba*) (Lu *et al.*, 2002).

INHIBICIÓ GÈNICA ESPECÍFICA EN PEIXOS

La generació d'OMG mitjançant la inhibició gènica específica és una eina molt útil per a l'estudi de la funció gènica, la caracterització de malalties i la producció d'organismes d'alt interès econòmic. Fins fa relativament poc temps, la generació d'OMG mitjançant la inhibició gènica específica s'havia aconseguit per tècniques de recombinació homòloga en cèl·lules mare embrionàries o clonatge mitjançant transferència nuclear, i només s'havia pogut dur a terme en un nombre limitat d'espècies en què l'obtenció de cèl·lules mare embrionàries i l'ús de determinades tècniques de clonatge ja estaven disponibles.

Recentment, gràcies al desenvolupament de noves tecnologies, com el disseny d'oligonucleòtids *morpholino antisentit*, l'ús de dits de zinc-nucleases (ZFN) i la caracterització i disseny de RNA d'interferència, s'ha aconseguit la generació d'organismes amb deleccions gèniques específiques en espècies en què no hi havia aïllades cèl·lules mare embrionàries i en què no estaven disponibles determinades tècniques de clonatge. Aquest és el cas de diferents espècies de peixos.

Tècniques d'inhibició transitòria o reversible (genominvament)

Oligonucleòtids morpholino antisentit (MOS). L'ús de *morpholinos* és un mecanisme d'inhibició posttranscripcional de gens específics (Heasman, 2002). Els *morpholino phosphorodiamidate oligonucleotides antisentit*, coneguts com a *morpholinos*, són molècules sintètiques resultants del redisseny de molècules de RNA natural, en les quals s'ha substituït la ribosa per una *morpholina*. La seva longitud sol ser de 21-25 nucleò-

tids. Els *morpholinos* inhibeixen l'expressió dels gens diana unint-se a l'RNA missatger (mRNA) complementari. La formació del complex *morpholino*-mRNA inhibeix la traducció a proteïna (Summerton, 1990) o la reacció de maduració de la molècula de mRNA mateixa, també anomenada *reacció de tall i unió* (Draper *et al.*, 2001). La inhibició específica d'un procés o l'altre dependrà exclusivament del disseny de l'oligonucleòtid. A diferència de l'ús de RNA d'interferència, els *morpholinos* no degraden la molècula de mRNA, sinó que en bloquegen estèricament el processament. En peixos, són àmpliament utilitzats per inhibir transitòriament l'expressió d'un gen determinat (Bill *et al.*, 2009).

RNA d'interferència. La ribointerferència o RNA d'interferència és un altre mecanisme d'inhibició posttranscripcional (Hamilton *et al.*, 1999). Aquesta inhibició específica és portada a terme per molècules de RNA que, sent complementàries a un determinat RNA missatger (mRNA), condueixen a la degradació o alteració del seu processament. Els RNA d'interferència poden ser principalment de dos tipus diferents, siRNA i miRNA (Ghildiyal *et al.*, 2009). Els siRNA (*small interfering RNA*) són molècules de RNA de cadena doble (dsRNA) de 20-21 nucleòtids que s'originen a partir d'un RNA més llarg. L'enzim responsable de la formació de molècules de siRNA a partir d'un dsRNA més gran és l'enzim Dicer. Dicer és un enzim citoplasmàtic de la família RNAasa III, que processa el dsRNA en fragments de RNA de doble cadena amb extrems 5' fosfat i dos nucleòtids lliures amb un extrem hidroxil (-OH) en 3'. Els siRNA inhibeixen l'expressió dels gens diana tallant RNA missatger (mRNA) complementari, per mitjà de la interacció de la cadena antisentit del siRNA amb el complex RISC (*RNA-induced silencing complex*). Els dos trossos de

l'mRNA són degradats posteriorment, i això finalment es tradueix en la inhibició de l'expressió del gen diana. Addicionalment els siRNA també poden provocar la modificació conformacional del DNA.

Els miRNA (*microRNA*) són molècules de RNA de cadena única (ssRNA) d'una longitud de 21-25 nucleòtids. Els miRNA d'animals no presenten una complementarietat exacta amb la regió 3' UTR, i generalment inhibeixen la traducció de l'mRNA diana. El sistema de gènesi és similar al dels siRNA, en què intervien l'enzim Dicer i el complex RISC. Addicionalment cal comentar que hi ha un tercer grup de RNA d'interferència, els anomenats *piRNA* (*Piwi-interacting RNA*) (Seto *et al.*, 2007). Igual que els microRNA, són molècules de RNA de cadena única (ssRNA), i se sintetitzen a partir de precursors de cadena única mitjançant un procés diferent de l'usat per als miRNA i els siRNA. S'han identificat desenes de milers de piRNA, i avui dia se sap que la seva interacció amb unes proteïnes anomenades *Piwi* té un paper clau en el desenvolupament de les cèl·lules germinals (Klattenhoff, *et al.*, 2008).

Tècniques d'inhibició permanent o irreversible (genoanul·lació)

Dits de zinc-nucleases (zinc-finger nucleases, ZFN). Els dits de zinc-nucleases són enzims de restricció artificials creats mitjançant la unió d'una proteïna de dit de zinc, que són proteïnes que uneixen DNA amb una proteïna nucleasa, que tenen la capacitat de tallar el DNA. El resultat és una proteïna artificial que té la capacitat d'unir-se específicament a una seqüència de DNA i tallar-la. El principal avantatge d'aquest mètode és la possibilitat d'introduir delecions gèniques a la línia germinal, fet que es tradueix en la creació d'animals genoa-

nullats per a un gen específic (Rémy *et al.*, 2009). L'etapa limitant de l'ús de dits de zinc-nucleases és el disseny de dominis de dits de zinc específics d'unió a seqüències concretes de DNA del gen diana. Actualment hi ha disponibles dues plataformes per dissenyar dits de zinc específics per a una determinada seqüència: una plataforma privada creada per Sangamo Biosciences (<http://www.compozrzn.com>), i una plataforma pública, i per tant d'accés obert, creada pel Zinc Finger Consortium (<http://addgene.org/zfc>, <http://www.zincfingers.org/software.tools.htm>). El sistema funciona de la manera següent: injectem l'mRNA de la ZFN específica a l'embrió de peix en un estadi de desenvolupament d'una o dues cèl·lules, l'mRNA es traduirà a proteïna i aquesta s'unirà al DNA del gen diana i hi provocarà un tall. La inducció d'aquest tall a la doble cadena de DNA activarà el sistema de reparació cel·lular, que repararà aquest tall d'una manera imprecisa, de manera que introduirà mutacions en el gen diana o seleccionat. D'aquesta manera obtindrem peixos mosaic per a una determinada mutació en un gen específic (Ekker, 2008).

APLICABILITAT DE LA TRANSFERÈNCIA GÈNICA EN PEIXOS

La utilització de peixos transgènics té un ampli ventall d'aplicacions, entre les quals cal destacar la seva importància en el camp de la investigació bàsica, concretament en disciplines com la biologia del desenvolupament, en què els organismes model, com el peix zebra (*Danio rerio*) (Westerfield *et al.*, 2007) o el medaka o peix d'arrosar japonès (*Oryzias latipes*) (Wittbrodt *et al.*, 2002) tenen un paper rellevant. Els processos de transferència d'eines biotecnològiques han

permès que els peixos transgènics s'utilitzin com a biofàctories per a la síntesi de substàncies d'aplicació farmacèutica, o en aqüicultura, per modificar o introduir diferents característiques en una determinada espècie amb la finalitat d'optimitzar-ne el cultiu intensiu. Així, malgrat que la producció de peixos transgènics no és un procés complicat, la seva transferència a escala industrial planteja nombroses incògnites. La majoria són degudes principalment al desconeixement que tenim de la possible interacció entre aquest tipus d'animals, el medi natural i la salut humana.

Investigació

La transgènesi és una de les eines biotecnològiques més utilitzades per a la caracterització funcional d'un gen. Modulant l'expressió gènica mitjançant tècniques de sobreexpressió o inhibició es pot caracteritzar la funció, la regulació, l'estructura gènica i la implicació d'un gen en determinats processos fisiològics. Dels diferents organismes model utilitzats en investigació bàsica, un dels més prometedors i com més va més utilitzat és el peix zebra (*Danio rerio*) (Westerfield *et al.*, 2007).

El peix zebra és un excel·lent organisme model en l'estudi del desenvolupament embrionari dels vertebrats, en estudis genètics i en fisiologia. Actualment està substituint altres organismes model de vertebrats, com els ratolins i les rates, a causa del rebuig social que comporta usar-los en experimentació. Avui dia hi ha una base de dades disponible amb informació genètica, genòmica i del desenvolupament del peix zebra anomenada ZFIN (Zebrafish Information Network). Recentment, a Espanya s'ha creat una plataforma tecnològica per a la difusió de l'ús d'aquesta espècie com a organisme model anomenada DARENET

(www.darenet.es). L'estudi del desenvolupament del peix zebra proporciona diversos avantatges enfront d'altres organismes model. Tot i que el temps de generació del peix zebra és comparable al del ratolí, els embrions de peix zebra es desenvolupen ràpidament, i passen d'ous a larves en menys de tres dies. Addicionalment, els embrions són grans, robustos i transparents i es desenvolupen externament a la mare, característiques que en faciliten la manipulació experimental i l'observació. Un dels grans avantatges d'aquest organisme és la seva alta homologia genètica amb altres espècies de vertebrats com l'espècie humana, cosa que n'ha propiciat l'ús com a model per a l'estudi de malalties humanes d'origen genètic. Cal destacar també les grans possibilitats que ofereix aquest model per a l'aplicació de noves tecnologies «òmiques» com la genòmica, la proteòmica o la metabolòmica.

Biofactories

La síntesi química de proteïnes amb activitat biològica per part de la indústria farmacèutica és una activitat costosa i amb limitacions tecnològiques importants a l'hora d'obtenir grans quantitats. Una alternativa viable és l'ús d'animals, per la producció controlada. Així, generalment la síntesi d'aquestes macromolècules es fa en determinat teixits de l'animal hoste, que finalment allibera el producte en determinats líquids biològics com la llet, la sang o el líquid seminal. Aquest sistema facilita la recollida del producte sintetitzat (Ebert *et al.*, 1991; Paleyanda *et al.*, 1997; Cott *et al.*, 2001). Malgrat que aquest sistema funciona molt bé en la majoria de casos, planteja algunes limitacions o problemes. La majoria de líquids biològics contenen enzims lítics que poden hidrolitzar les proteïnes heterò-

logues de nova producció, tret que siguin altament resistents a la degradació. Addicionalment, els animals utilitzats són normalment grans mamífers, com vaques, ovelles o cabres, que requereixen grans instal·lacions i que, per tant, tenen un cost molt elevat de manteniment. També cal tenir en compte que algunes malalties priòniques i víriques són transferibles des d'espècies de mamífers no humans a l'espècie humana i que, per tant, pot ser possible que la producció d'una proteïna recombinant en mamífers pugui actuar com a vector de transmissió d'aquest tipus de malalties.

Per tant, l'ús de peixos transgènics per a la producció d'aquest tipus de macromolècules amb interès terapèutic o industrial és una bona alternativa. Actualment, la utilització de peixos transgènics com a biofactories està en fase experimental. Els treballs que s'han fet fins ara han estat experiments a petita escala per assajar la viabilitat de certes aplicacions. Així, s'ha descrit la producció del factor VII de coagulació humana (hFVII) en el peix zebra, el peix gat i la tilàpia (Hwang *et al.*, 2004). Aquesta proteïna s'usa per al tractament de l'hemofília. Una altra proteïna en estudi per produir-la mitjançant peixos transgènics és la insulina humana. S'ha descrit la generació de tilàpies transgèniques que produeixen insulina humana en els seus corpuscles de Brockman per al tractament de diabetis en mamífers (Alexander *et al.*, 2006).

Aqüicultura

En l'àmbit de l'aqüicultura, les aportacions que ofereix la transgènesi estan relacionades amb la millora de diferents caràcters d'interès econòmic i productiu, objectius que no varien dels buscats mitjançant la millora genètica tradicional. La

majoria de treballs en aquest camp s'han centrat a millorar les taxes de creixement de diferents espècies, majoritàriament de salmònids. Això s'ha aconseguit mitjançant la integració de còpies addicionals del gen que codifica l'hormona de creixement o GH. Així, els primers peixos transgènics per a l'hormona del creixement van ser generats mitjançant la utilització de construccions gèniques constituïdes per promotors vírics i el gen de l'hormona de creixement procedent de mamífers. Els resultats obtinguts en aquests primers experiments no van ser gaire prometedors (Zang *et al.*, 1990), i no va ser fins més tard, amb la introducció de seqüències pròpies de peixos, quan es va observar que els peixos transgènics per a l'hormona del creixement presentaven taxes de creixement de dues a onze vegades superiors a les registrades en els seus homòlegs no transgènics (Du *et al.*, 1992; Devlin *et al.*, 1994). Però a més dels salmònids, també s'han generat peixos transgènics per a l'hormona del creixement en altres espècies. Així, s'han creat tilàpies (*Orochromis niloticus*) transgèniques per a aquesta hormona que creixen tres vegades més que els seus homòlegs respectius no transgènics (Rahman *et al.*, 1998), o el moll japonès (*Misgurnus mizolepis*), en què s'ha observat que els animals transgènics creixien vora cinc vegades més (Kwon-Nam *et al.*, 2001).

Altres esforços s'han centrat a millorar l'eficiència de conversió energètica, la resistència a malalties o bé a suportar condicions ambiental adverses com les baixes temperatures.

Com és ben sabut, tota activitat industrial destinada al cultiu intensiu d'animals ha de fer front a malalties i a condicions ambientals adverses que poden posar en perill la producció. Per tant, per a la indústria piscícola és tan important optimitzar el creixement com assegurar la supervivència

dels animals cultivats. En aquest camp, hem de fer ressaltar el desenvolupament de vacunes de DNA. Encara que el fet de vacunar un individu no constitueix un procés de transgènia, sí que ho és el procés de síntesi de la vacuna. Les vacunes de DNA víric són plasmidis bacterians constituïts bàsicament per un promotor víric i el gen d'interès. Aquests plasmidis sintetitzats en bacteris són purificats i injectats intramuscularment en els peixos per activar la producció específica d'una proteïna (gen d'interès) *in vivo* i induir posteriorment la producció específica d'anticossos per part de l'animal. Un exemple d'aquesta aplicació és la immunització del salmó de l'atlàntic (*Salmo salar*) contra el virus causant de la necrosi hematopoètica infecciosa (IHN) (Traxlet *et al.*, 1999). Exemples directes de l'aplicació de transgènesi a la millora de la resistència a patògens bacterians són la sobreexpressió de certes proteïnes antibacterianes d'ampli espectre com el lisozim i les cecropines (Hew *et al.*, 2001; Sarmasik *et al.*, 2002). En el primer cas, es van crear salmons transgènics que sobreexpressaven el lisozim de truita (Hew *et al.*, 2001). Sorprenentment, avui dia els resultats d'aquests experiments encara no han estat publicats. Tanmateix, s'ha demostrat que peixos zebra (*Danio rerio*) que sobreexpressaven aquest mateix gen sí que presentaven més resistència enfront a diferents malalties bacterianes (Yazawa *et al.*, 2006). El segon exemple és el de les cecropines. Les cecropines són pèptids que tenen activitat bactericida enfront un gran nombre de bacteris (Hultmark *et al.*, 1980; Lee *et al.*, 1989). Així, es van generar peixos gat (*Ictalurus punctatus*) transgènics mitjançant la introducció de la cecropina del cuc de seda, i es va demostrar que aquests peixos tenien més resistència enfront de diferents malalties bacterianes (Dunham *et al.*, 2002).

Com ha estat mencionat anteriorment, una altra aplicació de la transferència gènica d'interès per a l'aqüicultura ha estat la de generar individus que puguin suportar condicions ambientals adverses com les baixes temperatures, amb l'objectiu d'incrementar geogràficament la seves àrees de cultiu, com en el cas del salmó i de la carpa vermella. Així, s'han creat animals transgènics que sobreexpressen proteïnes anticongelants (Hew *et al.*, 1992; Wang *et al.*, 1995). Les proteïnes anticongelants o AFP són glicoproteïnes presents en el plasma de diferents espècies de peixos capaços de viure a temperatures per sota dels 0 °C. Aquestes proteïnes s'uneixen als cristalls de gel i n'impedeixen el creixement en els líquids de l'animal (Davies i Sykes, 1997). Els resultats d'aquestes experiències han estat la generació d'animals de diferents espècies (salmó i carpa vermella) tolerants a aigües més fredes.

Finalment, cal mencionar la millora de l'eficiència de conversió energètica com una altra àrea de gran importància en l'aplicació de la transferència gènica d'interès per a l'aqüicultura. En aquest camp, els avenços s'han centrat en la introducció de canvis en el metabolisme de determinades substàncies per poder millorar-ne la capacitat d'assimilació per part de l'organisme. Així, s'ha introduït el gen del transportador de glucosa-1 humana juntament amb el gen de l'hexocinasa de tipus 2 de rata en la truita, i s'ha observat que aquesta introducció es traduïa en una millora en la utilització de carbohidrats per part de l'animal (Krasnow *et al.*, 1999). Un altre exemple és la creació de peixos zebra transgènics per a l'enzim D6-dessaturasa, un enzim de la ruta de biosíntesi de l'àcid eicosapentanoic (EPA) i l'àcid docosahexanoic (DHA), àcids grassos molt beneficiosos per a la salut humana. Els resultat d'aquests experiments van permetre la cre-

ació d'animals amb una capacitat de síntesi d'EPA i DHA significativament més elevada que la dels seus homòlegs no transgènics (Alimuddin *et al.*, 2007).

Com ha quedat palès, la utilització de tècniques de modificació genètica encara és incipient en alguns camps de possible aplicació d'aquesta tecnologia, com és el cas de la producció massiva de macromolècules biològicament actives o el desenvolupament del cultiu d'aliments. Això és degut principalment a dues raons: la primera és la falta d'informació gènica en moltes espècies, i la segona, i possiblement la més determinant, el desconeixement generalitzat de la possible interacció entre aquest tipus d'animals, el medi natural i la salut humana.

Tot i això, ja hi ha al mercat peixos transgènics. L'any 2002 l'empresa Taikong va començar a comercialitzar a la Xina un petit peix ornamental transgènic amb una estranya coloració groga i verdosa amb propietats fluorescents. El peix va ser batejat amb el nom comercial de TK-1. Actualment, l'empresa Yorktown Technologies comercialitza l'anomenat *GloFish*, un peix zebra transgènic que conté diferents variants d'una proteïna fluorescent, i que s'ha convertit en el primer organisme modificat genèticament (OMG) que ha estat comercialitzat als Estats Units com a mascota.

Un altre exemple, és l'anomenat *salmó AquAdvantage*, un salmó transgènic per a l'hormona del creixement dissenyat per l'empresa nord-americana AquaBounty Technologies. La comercialització del salmó AquAdvantage està en procés d'aprovació per part de la FDA i s'espera la resolució al començament de l'any 2010.

RISCOS DERIVATS DE L'ÚS DE PEIXOS TRANSGÈNICS

Com ha estat mencionat anteriorment, tots els treballs de transgènia en peixos han generat grans expectatives i interès, però paral·lelament han generat recel i desconfiança sobre les possibles conseqüències del seu ús. Això inclouria efectes sobre el medi natural, efectes en el consumidor i problemes ètics relacionats amb el seu ús.

Peixos transgènics i seguretat mediambiental

El principal risc mediambiental derivat de l'ús de peixos transgènics és la possibilitat d'escapament dels animals transgènics dels seus llocs de cria i les conseqüències corresponents en la disseminació del transgèn, és a dir, el seu pas incontrolat a altres individus i, per tant, a la biodiversitat ictiològica.

Aquestes i altres consideracions han fet necessari el desenvolupament d'estratègies per avaluar els riscos potencials que comporta l'ús de peixos transgènics en el medi natural. Per això s'han proposat una sèrie de paràmetres que cal tenir en compte, com són la capacitat de supervivència, de reproducció i d'adaptació d'una espècie transgènica en un ecosistema natural. En la figura 1 es mostra un quadre que esquematitza aquest tipus d'estratègia d'avaluació proposada per Devlin *et al.* (2006).

A més de les consideracions generals plantejades en l'esquema anterior, l'avaluació correcta d'aquests possibles riscos ecològics requereix dur a terme estudis empírics per a cada espècie seleccionada, cada tipus de gen manipulat i cada sistema de cultiu intensiu escollit. Així, els estudis amb animals transgènics per a l'hormona del creixement, concretament en salmó i

carpa (Hu *et al.*, 2007), han demostrat que en ecosistemes naturals rics en nutrients els peixos transgènics per a l'hormona del creixement constitueixen una clara amenaça per als organismes salvatges de la mateixa espècie o espècies similars, principalment a causa de la seva capacitat major per competir per l'aliment. Però, quan aquests animals es troben en ecosistemes pobres en nutrients, passen a ser els organismes salvatges els dominants i els transgènics els que passen a tenir una taxa de supervivència menor, bàsicament a causa de la incapacitat d'adaptació dels organismes transgènics a aquest tipus de condicions (Devlin *et al.*, 1999; Fu *et al.*, 2007). Així mateix, quan s'analitzava la capacitat natatòria dels animals, característica que determina la seva capacitat de trobar aliment, de reproduir-se i de fugir de possibles depredadors, i que, per tant, garanteix la capacitat de supervivència i de reproducció de l'animal, s'observava que els salmons adults i juvenils transgènics per a l'hormona del creixement presentaven una disminució significativa de la capacitat natatòria respecte als organismes salvatges (Farell *et al.*, 1997; Lee *et al.*, 2003).

Tanmateix, aquests i altres estudis que consideren altres variables fenotípiques han estat fets en petits sistemes experimentals, espais artificials externs que intenten simular el medi natural però que difícilment inclouen tots els factors i interaccions que es donen a la natura.

Per tant, és clar que els organismes genèticament modificats poden comportar riscos per al medi ambient i que és justificable la necessitat d'una avaluació objectiva completa.

Peixos transgènics i salut humana

Un dels principals objectius de l'aplicació de la transgènesi és la millora en l'obtenció de productes alimentaris. L'any 1994 va arribar al mercat dels EUA el primer producte modificat genèticament (un tomàquet). De llavors ençà n'hi ha hagut molts més (soja, blat de moro i patates, entre d'altres), i menjar aliments modificats genèticament ha esdevingut una cosa bastant normal, encara que molta gent no n'és conscient. L'Organització de les Nacions Unides per l'Agricultura i l'Alimentació (FAO), l'Organització Mundial de la Salut (OMS) i l'Organització per a la Cooperació i el Desenvolupament Econòmic (OCDE) han constatat que els aliments obtinguts

mitjançant eines biotecnològiques són igual de saludables que els mateixos aliments obtinguts mitjançant tècniques tradicionals (OECD Symposium, 1992; Berkowitz i Sorensen, 1994).

Encara que actualment no està aprovat l'ús de peixos transgènics com a aliment apte per al consum humà, hi ha algunes qüestions importants per tal d'avaluar-ne la seguretat. Així, la innocuïtat del DNA forà introduït, el producte d'aquest DNA i la seguretat que aquest DNA forà no s'integri en l'organisme que s'alimenta del producte transgènic són algunes de les consideracions que s'han d'analitzar. Quan mengem estem ingerint DNA d'espècies animals o vegetals, el qual és hidrolitzat per nucleases durant la digestió; per tant,

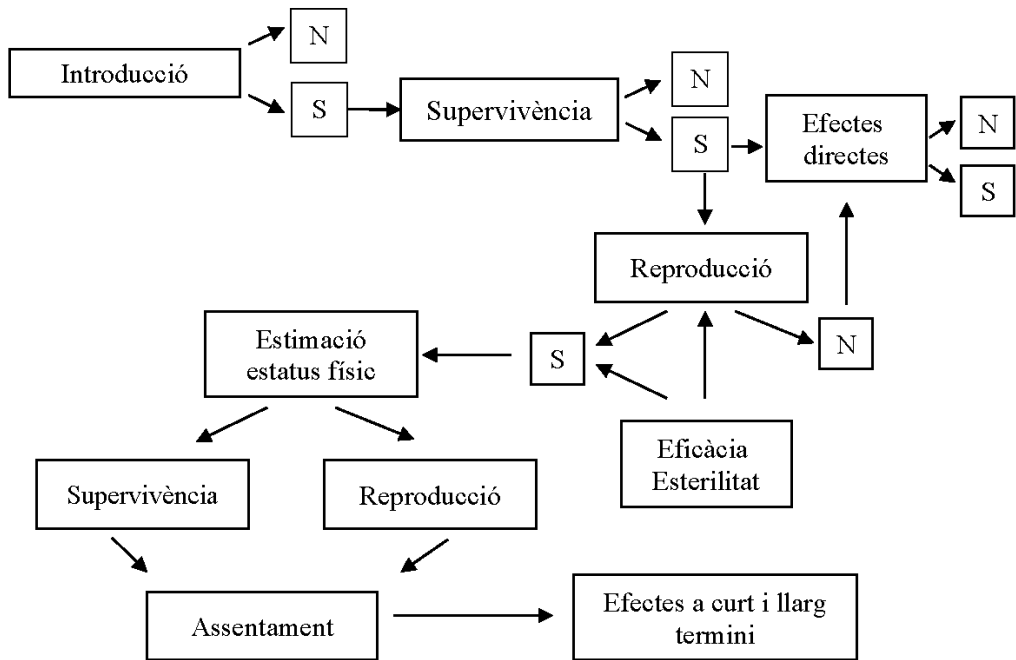


FIGURA 1. Esquema general simplificat dels principals paràmetres que cal tenir en compte per a una avaluació de possibles riscos originats per l'escapament de peixos transgènics en un ecosistema natural. Els punts d'intersecció avaluen la conseqüència o probabilitat que una acció tingui lloc: S (l'acció es produeix), N (l'acció no es produeix). Adaptat de Devlin *et al.*, 2006.

el DNA forà present en els aliments transgènics sofreix el mateix procés. Una altra qüestió seria si el DNA forà fos de tipus infeccios, amb capacitat de replicar-se i afectar l'organisme hoste o altres organismes. Actualment, la majoria dels DNA forans emprats en processos de generació de transgènesi no tenen segments infecciosos. Quan es té en compte la seguretat del producte que s'origina en expressar-se el DNA forà inserit, s'apliquen els mateixos principis que per al consum de qualsevol tipus de proteïna, sempre que s'ingereixi per via oral. Però a més, la proteïna que expressa l'animal transgènic no ha d'afectar el seu estat de salut. Potser seria a escala al·lèrgica on podria sorgir un possible problema amb la proteïna obtinguda per transgènesi. En el cas de peixos transgènics per a l'hormona del creixement (GH), hi ha un estudi fet en primats no humans en què els van injectar hormona obtinguda a partir de tilàpies (*Oreochromis mossambicus*) transgèniques. Després de l'anàlisi d'un ampli rang de paràmetres fisiològics, bioquímics i de conducta, no es van detectar anomalies de cap tipus (Guillen *et al.*, 1999). Aquests mateixos autors van fer un segon estudi, però en aquest cas amb vint i dues persones voluntàries, que es van alimentar durant cinc dies amb tilàpies transgèniques. Cap paràmetre clínic no es va veure afectat en finalitzar l'experiment. Una altra possibilitat que cal tenir en compte a l'hora de valorar la seguretat d'un aliment d'origen transgènic és la capacitat mateixa de l'inserit de DNA forà d'activar algun gen de l'organisme hoste que codifiqui alguna toxina. Tanmateix, aquesta possibilitat és ínfima.

Cal dir que dins la Unió Europea no es poden comercialitzar organismes modificats genèticament sense que hagin rebut prèviament una autorització que es concedeix després que s'hagi fet una avaluació

científica dels riscos potencials per a la salut o el medi ambient.

AGRAÏMENTS

Volia agrair la col·laboració del doctor Lluís Tort en la revisió d'aquest manuscrit.

BIBLIOGRAFIA

- ALEXANDER, E. L. R.; DOOLEY, K. C.; POHAJDAK, B.; XU, B. Y.; WRIGHT, J. R. (2006). «Things we have learned from tilapia islet xenotransplantation». *Gen. Comp. Endocrinol.*, 148: 125-131.
- ALIMUDDIN; YOSHIZAKI, G.; VISWANATH, K.; SHUICHI, S.; TOSHIO, T. (2007). «Expression of Masu salmon delta 5-desaturase-like gene elevated EPA and DHA biosynthesis in Zebrafish». *Mar. Biotechnol.*, 9: 92-100.
- BERKOWITZ, D. B.; KRYPIN-SORENSEN, I. (1994). «Transgenic fish: Safe to eat?». *Bio/Technology*, 12: 247-252.
- BILL, B. R.; PETZOLD, A. M.; CLARK, K. J.; SCHIMMEN-TI, L. A.; EKKER, S. C. (2009). «A primer for morpholino use in zebrafish». *Zebrafish*, 6 (1): 69-77.
- COTT, K. E. van; LUBON, H.; GWAZDAUSKAS, F. C.; KNIGHT, J.; DROHAN, W. N.; VELANDER, W. H. (2001). «Recombinant human protein C expression in the milk of transgenic pigs and the effect on endogenous milk immunoglobulin and transferring levels». *Transgenic Res.*, 10: 43-51.
- CHEN, T. T.; POWERS, D. A. (1990). «Transgenic fish». *Trends in Biotechnology*, 8: 209-214.
- DAVIES, P. L.; SYKES B. D. (1997). «Antifreeze proteins». *Curr. Opin. Structural Biol.*, 7: 828-834.
- DEVLIN, R. H.; JOHNSSON, J. I.; SMAILUS, D. E.; BIAGI, C. A.; JÖNSSON, E.; BJÖRNSSON, B. T. (1999). «Increased ability to compete for food by growth hormone-transgenic coho salmon *Oncorhynchus kisutch* (Walbaum)». *Aquac. Res.*, 30: 479-482.
- DEVLIN, R. H.; SUNDSTRÖM, L. F.; MUIR, W. M. (2006). «Interface of biotechnology and ecology for environmental risk assessments of transgenic fish». *Trends in Biotechnology*, 24: 89-97.
- DEVLIN, R. H.; YESAKI, T. Y.; BIAGI, C. A.; DONALDSON, E. M.; SWANSON, P.; CHAN, W. K. (1994). «Extraordinary salmon growth». *Nature*, 371: 209-210.
- DRAPER, B. W.; MORCOS, P. A.; KIMMEL, C. B. (2001). «Inhibition of zebrafish fgf8 pre-mRNA splic-

- ing with morpholino oligos: A quantifiable method for gene knockdown». *Genesis*, 30b (3): 154-156.
- DU, S. J.; GONG, Z. Y.; FLETCHER, G. L.; SHEARS, M. A.; KING, M. J.; IDLER, D. R.; HEW, C. L. (1992). «Growth enhancement in transgenic Atlantic salmon by the use of an 'all fish' chimeric growth hormone gen construct». *Biotechnology (NY)*, 10: 176-181.
- DUNHAM, R. A.; WARR, G.; NICHOLS, A.; DUNCAN, P. L.; ANGUE, B.; MIDDLETON, D.; LIU, Z. (2002). «Enhanced bacterial disease resistance of transgenic channel catfish, *Ictalurus punctatus*, possessing cecropin genes». *Mar. Biotechnol.*, 4: 338-344.
- EBERT, K. M.; SELGRATH, J. P.; DiTULLIO, P.; DENMAN, J.; SMITH, T. E.; MEMON, M. A.; SCHINDLER, J. E.; MONASTERSKY, G. M.; VITALE, J. A.; GORDON, K. (1991). «Transgenic production of human tissue-type plasminogen activator in goat milk: generation of transgenic goat and analysis of expression». *Biotechnology*, 9: 835-838.
- EKKER, S. C. (2008). «Zinc finger-based knockout punches for zebrafish genes». *Zebrafish*, 5 (2): 121-123.
- FARRELL, A. P.; BENNETT, W.; DEVLIN, R. H. (1997). «Growth-enhanced transgenic salmon can be inferior swimmers». *Can. J. Zool.*, 75: 335-337.
- FU, C.; LI, D.; HU, W.; WANG, Y.; ZHU, Z. (2007). «Growth and energy budget of F2 'all-fish' growth hormone gene transgenic common carp». *J. Fish Biol.*, 70: 347-361.
- GHILDIAL, M.; ZAMORE, P. D. (2009). «Small silencing RNAs: an expanding universe». *Nat. Rev. Genet.*, 10 (2): 94-108.
- GORDON, J. W.; SCANGOS, G. A.; PLOTKIN, D. J.; BARBOSA, J. A.; RIDDLE F. H. (1980). «Genetic transformation of mouse embryos by microinjection of purified DNA». *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 77 (12): 7380-7384.
- GUILLÉN, I.; BERLANGA, J.; VALENZUELA, C. M.; MORALES, A.; TOLEDO, J.; ESTRADA, M. P.; PUENTES, P.; HAYES, O.; FUENTE, J. de la (1999). «Safety evaluation of transgenic tilapia with accelerated growth». *Mar. Biotechnol.*, 1: 2-14.
- HAMILTON, A.; BAULCOMBE, D. (1999). «A species of small antisense RNA in posttranscriptional gene silencing in plants». *Science*, 286 (5441): 950-952.
- HEASMAN, J. (2002). «Morpholino oligos: making sense of antisense?». *Dev. Biol.*, 243 (2): 209-214.
- HEW, C. L.; FLETCHER, G. L. (2001). «The role of aquatic biotechnology in aquaculture». *Aquaculture*, 197: 191-204.
- HEW, C.; POON, R.; XIONG, F.; GAUTHIER, S.; SHEARS, M.; KING, M.; DAVIES, P.; FLETCHER, G. (1999). «Liver-specific and seasonal expression on transgenic Atlantic salmon harbouring the winter flounder antifreeze protein gene». *Transgenic Research*, 8: 405-414.
- HU, W.; WANG, Y.; ZHU, Z. Y. (2007). «Progress in the evaluation of transgenic fish for possible ecological risk and its containment strategies». *Sci. China Ser C-Life Sci.*, 50: 573-579.
- HULTMARK, D.; STEIONER, H.; RASMUSAN, T.; BOMAN, H. G. (1980). «Insect immunity purification and properties of three inducible bactericidal proteins from haemolymph of immunized pupal of *Hylophora cecropia*». *Eur. J. Biochem.*, 106: 7-16.
- HWANG, G.; MÜLLER, F.; RAHMAN, M. A.; WILLIAMS, D. W.; MURDOCK, P. J.; PASI, K. J.; GOLDSPINK, G.; FARAHMAND, H.; MACLEAN, N. (2004). «Fish as bioreactors: transgene expression of human coagulation factor VII in fish embryos». *Mar. Biotechnol. (NY)*, 6 (5): 485-492.
- 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.
- KAWAKAMI, K. (2007). «Tol2: a versatile gene transfer vector in vertebrates». *Genome Biology*, 8 (supl. 1): S7.
- KLATTENHOFF, C.; THEURKAUF, W. (2008). «Biogenesis and germline functions of piRNAs». *Development*, 135 (1): 3-9.
- KRASNOV, A.; PITKÄNEN, T.; MÖLSÄ, H. (1999). «Gene transfer for targeted modification of salmonid fish metabolism». *Genetic Analysis: Biomolecular Engineering*, 15: 115-119.
- KWON NAM, Y.; KOO NOH, J.; SUN CHO, Y.; JONG CHO, H.; CHO K. N.; GEUN KIM, C.; SOO KIM, D. (2001). «Dramatically accelerated growth and extraordinary gigantism of transgenic mud loach *Misgurnus mizolepis*». *Transgenic Research*, 10: 353-362.
- LEE, C. G.; DEVLIN, R. H.; FARRELL, A. P. (2003). «Swimming performance, oxygen consumption and excess post-exercise oxygen consumption in adult transgenic and ocean-ranched coho salmon». *J. Fish Biol.*, 62: 753-766.
- LEE, J. Y.; BOMAN, A.; SUN, C. X.; ANDERSSON, M.; JÖRNVALL, H.; MUTT, V.; BOMAN, H. G. (1989). «Antibacterial peptides from pig intestine: Isolation of a mammalian cecropin». *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, 86: 9159-9162.
- LU, J. K.; FU, B. H.; WU, J. L.; CHEN, T. T. (2002). «Production of transgenic silver sea bream (*Sparus sarba*) by different gene transfer methods». *Mar. Biotechnol.*, 4: 328-337.

- MONTEILHET, C.; PERRIN, A.; THIERRY, A.; COLLEAUX, L.; DUJON, B. (1990). «Purification and characterization of the in vitro activity of I-Sce I, a novel and highly specific endonuclease encoded by a group 1 intron». *Nucl. Acids Res.*, 18 (6): 1407-1413.
- OGINO, H.; MCCONNELL, W. B.; GRAINGER, R. M. (2006). «Highly efficient transgenesis in *Xenopus tropicalis* using I-SceI meganuclease». *Mechanisms of Development*, 123: 103-113.
- ORGANIZATION FOR ECONOMIC COOPERATION AND DEVELOPMENT (1992). *The proceedings of the OECD Symposium on Aquatic Biotechnology and Food Safety*. Paris.
- PALEYANDA, R. K.; VELANDER, W. H.; LEE, T. K.; SCANDELLA, D. H.; GWAZDAUSKAS, F. C.; KNIGHT, J. W.; HOYER, L. W.; DROHAN, W. N.; LUBON, H. (1997). «Transgenic pigs produce functional human factor VIII in milk». *Nat. Biotechnol.*, 15: 971-975.
- POWERS, D. A.; COLE, T.; CREECH, K.; CHEN, T. T.; LIN, C. M.; KIGHT, K.; DUNHAM, R. (1992). «Electroporation: a method for transferring genes into the gametes of zebrafish, *Brachydanio rerio*, channel catfish, *Ictalurus punctatus*, and common carp, *Cyprinus carpio*». *Mol. Mar. Biol. Biotechnol.*, 1: 301-309.
- RAHMAN, M. A.; MAK, R.; AYAD, H.; SMITH, A.; MACLEAN, N. (1998). «Expression of a novel piscine growth hormone gene results in growth enhancement in transgenic tilapia *Orochromis niloticus* (L.) following heat-shock-induced triploidy». *Mar. Biotechnol.*, 1: 533-544.
- RÉMY, S.; TESSON, L.; MÉNORET, S.; USAL, C.; SCHARENBERG, A. M.; ANEGON, I. (2009). «Zinc-finger nucleases: a powerful tool for genetic engineering of animals». *Transgenic Res.*, 19 (3): 363-371.
- SARMASIK, A.; WARR, G.; CHEN, T. T. (2002). «Production of transgenic medaka with increased resistance to bacterial pathogens». *Mar. Biotechnol.*, 4: 310-322.
- SETO, A. G.; KINGSTON, R. E.; LAU, N. C. (2007). «The coming of age for Piwi proteins». *Molecular Cell*, 26 (5): 603-609.
- SUMMERTON, J. (1999). «Morpholino antisense oligomers: the case for an RNase-H independent structural type». *Biochimica et Biophysica Acta*, 1489: 141-158.
- THERMES, V.; GRABHER, C.; RISTORATORE, F.; BOURRAT, F.; CHOULIKA, A.; WITTBRODT, J.; JOLY, J. S. (2002). «I-SceI meganuclease mediates highly efficient transgenesis in fish». *Mechanisms of Development*, 118 (1-2): 91-98.
- TRAXLER, G. S.; ANDERSON, E.; LAPATRA, S. E.; RICHARD, J.; SHEWMAKER, B.; KURATH, G. (1999). «Naked DNA vaccination of Atlantic salmon, *Salmon salar* against IHN». *Dis. Aquat. Org.*, 38: 183-190.
- WANG, R.; ZHANG, P.; GONG, Z.; HEW, C. L. (1995). «Expression of the antifreeze protein gene in transgenic goldfish (*Carassius auratus*) and its implication in cold adaptation». *Mol. Mar. Biol. Biotechnol.*, 4: 20-26.
- WESTERFIELD, M. (2007). *The Zebrafish Book: A guide for the laboratory use of Zebrafish (Danio rerio)*, 5a ed. Eugene: Univ. of Oregon Press.
- WITTBRODT, J.; SHIMA, A.; SCHARTL, M. (2002). «Medaka, a model organism from the far East». *Nat. Rev. Genet.*, 3: 53-64.
- YAZAWA, R.; HIRONO, I.; AOKI, T. (2006). «Transgenic zebrafish expressing chicken lysozyme show resistance against bacterial diseases». *Transgenic Res.*, 15: 385-391.
- ZHANG, P. J.; HAYAT, M.; JOYCE, C.; GONZALEZ-VILLASEÑOR, L. I.; LIN, C. M.; DUNHAM, R. A.; CHEN, T. T.; POWERS, D. A. (1990). «Gene transfer, expresión and inheritance of pRSV-rainbow trout-GH cDNA in the common carp, *Cyprinus Carpio* (Linnaeus)». *Mol. Reprod. Dev.*, 25: 3-13.
- ZHU, Z.; LI, G.; HE, L.; CHEN, S. (1985). «Novel gene transfer into the fertilized eggs of goldfish (*Carassius auratus* 1758)». *Journal of Applied Ichthyology*, 1: 31-33.