

LA TRANSGÈNESI EN ELS ANIMALS DE PRODUCCIÓ I EL SEU EFECTE SOBRE L'ALIMENTACIÓ I LA SALUT

MARIA TERESA PARAMIO I DOLORS IZQUIERDO

Departament de Ciència Animal i dels Aliments, Universitat Autònoma de Barcelona

Adreça per a la correspondència: Maria Teresa Paramio Nieto. Departament de Ciència Animal i dels Aliments, Universitat Autònoma de Barcelona, Edifici 5. 08193 Cerdanyola del Vallès. Tel.: 935 811 456. Adreça electrònica: *teresa.paramio@uab.cat*.

RESUM

Amb l'ús de la transgènesi, la ramaderia ha canviat i ha augmentat els seus objectius productius. A la producció de carn, llet i ous per al consum alimentari ara s'afegeix la producció de proteïnes d'interès terapèutic i comercial, obtingudes en la llet, la clara de l'ou i el sèrum dels animals. Les metodologies utilitzades per produir remugants, conills, porcs i ocells transgènics són encara poc eficients i econòmicament costoses. Les principals metodologies són: *a)* microinjecció del transgèn en el pronucli del zigot, *b)* utilització dels espermatozoides com a vectors del transgèn, *c)* utilització de virus, especialment de lentivirus, com a portadors del nou gen i *c)* transferència nuclear. Els principals objectius buscats amb la transgènesi són produir: *a)* animals més productius, *b)* aliments d'origen animals més saludables, *c)* animals menys contaminants i *d)* animals usats com a biofàctories perquè produeixin proteïnes d'interès terapèutic. Fins avui dia no s'ha permès la comercialització de cap producte de la ramaderia transgènica. La falta d'una normativa clara sobre la regulació i comercialització d'aquests productes més una opinió pública escèptica a aquestes metodologies ha produït una baixada important en l'activitat d'aquesta investigació.

Paraules clau: ramaderia, transgènica, biofàctoria, nous aliments.

TRANSGENIC LIVESTOCK AND ITS EFFECT ON ANIMAL FOOD PRODUCTION AND HUMAN HEALTH

SUMMARY

Transgenic allows increasing and changing the conventional roles of farm animals. To the meat, the milk and the eggs is added the production of biopharmaceutical goods ob-

tained in milk, egg white and serum. The first transgenic sheep, goat, pig and rabbit were described at 1985. Nowadays, the methodologies used are inefficiently and costly. These are: *a)* pronuclear microinjection, *b)* sperm mediated DNA transfer, *c)* DNA transfer using viral vectors and *d)* transgenic somatic nuclear transfer. The main objectives search by transgenic livestock are: *a)* improve animal production, *b)* novel foods with additional benefits for human health, *c)* reduction of farm animal contamination, *d)* farm animals as bioreactors of pharmacological proteins. At present, marketing of transgenic animal products has not been allowed. As regulatory guidelines are not completely developed and because of the weak acceptance of transgenic products by population, these researches subjects has been reduced.

Key words: livestock, transgenic, biopharmaceutical, novel foods.

INTRODUCCIÓ

Des de l'inici de la domesticació dels animals, els humans han estat modificant contínuament els seus genotips per adaptar-los a les necessitats humanes. Fins als anys vuitanta del segle passat, la selecció genètica dels animals d'interès ramader tenia per objectiu incrementar i optimitzar la seva capacitat per produir principalment llet, carn i ous, i secundàriament, llana, pell, pèl, energia i adob. Els avanços de la genètica molecular i de la biotecnologia de la reproducció han permès que les espècies ramaderes, a més dels seus productes tradicionals, puguin ser utilitzats per produir proteïnes d'interès terapèutic i industrial. Així, del terme *farmining*, entès com l'activitat tradicional ramadera, s'ha passat a *pharmining*, que indica la utilització dels animals com a biofàctories per produir proteïnes terapèutiques d'alt interès comercial per mitjà de la llet, el sèrum, la clara d'ou i d'altres teixits i productes. La investigació sobre organismes transgènics s'inicia al començament dels anys setanta amb el desenvolupament de les tecnologies del DNA recombinant. La possibilitat de seleccionar, copiar i alterar gens d'interès identificat i poder transferir-los a altres animals, plantes o qualsevol altre organisme viu, va obrir una enorme perspectiva per a

modificacions genètiques dels organismes vius fins aquest moment desconegudes. En la ramaderia, la transgènesi també ha permès obrir horitzons totalment nous.

Actualment, les principals línies d'investigació sobre transgènesi en els animals productius són:

a) Incrementar la productivitat dels animals mitjançant extraccions de l'hormona del creixement (GH, IGF, etc.) i produir animals amb velocitats de creixement més grans, índexs millors de conversió dels aliments i menys greix a la canal.

b) Modificar les propietats nutritives dels aliments d'origen animal: per exemple, canviar la composició dels àcids grassos en la carn de porc, canviar la composició d'aminoàcids de certes proteïnes animals, l'enriquiment de la llet amb ferro i vitamines, etc.

c) Produir aliments funcionals: llet sense lactosa, llets maternitzades amb proteïnes humanes, llet amb propietats antimicrobianes, etc.

d) Produir animals resistent a malalties: principalment vaques d'alta producció lletera resistent a la mastitis i remugants que no puguin expressar el prió de la BSE o malaltia de les «vaques boges».

e) Animals que permetin una producció menys contaminant: porcs que excretin menys fòsfor en la seva femta.

f) Utilitzar als animals com a productors d'òrgans per a trasplantaments humans, xenotrasplantaments; en aquesta línia d'investigació el porc és l'animal model, ja que la seva fisiologia i els seus òrgans tenen moltes similituds amb els òrgans humans.

g) La utilització d'animals com a biofàctories de proteïnes d'interès farmacològic. L'expressió d'aquestes proteïnes es produeix sobretot en la llet de remugants i conills, en la clara de l'ou i en el sèrum. Aquesta línia d'investigació és la que actualment està més desenvolupada, entre d'altres coses, a causa de l'alt valor econòmic que presenten aquestes proteïnes terapèutiques en el mercat en relació amb el valor dels aliments.

Els primers conills, porcs i ovelles transgènics es van aconseguir el 1985 utilitzant la microinjecció de gens en el zigot (Hammer *et al.*, 1985). A partir d'aquesta data s'han produït animals transgènics com a models de malalties humanes (ratolins i porcs, principalment) i animals amb resistència a malalties letals o molt incidents en la ramaderia. D'altres animals transgènics, especialment cabres, ovelles, gallines, conills, vaques i porcs, s'han utilitzat per produir proteïnes d'interès terapèutic. A mesura que aquestes investigacions es van desenvolupant es trobaran nous objectius en aquests animals. Actualment els organismes reguladors nord-americans i europeus, la FDA (Food and Drug Administration) i l'EMA (European Medicines Agency) no han permès la comercialització de cap producte procedent d'animals transgènics. Aquest fet posa en risc la continuïtat d'aquestes línies de treball després de més de vint anys d'investigació (Miller, 2008).

METODOLOGIES PER A LA PRODUCCIÓ D'ANIMALS TRANSGÈNICS

Un animal és considerat transgènic quan una còpia d'un o diversos gens exògens, sintetitzats al laboratori, és introduït en el genoma de l'animal d'una manera estable; a més, s'ha de poder transmetre a la descendència. El gen forà (anomenat *transgèn*) generalment està format per dues parts: una part que és pròpiament el gen, i que és la que té la capacitat de produir la proteïna, i l'altra part formada per diverses seqüències genètiques reguladores que milloren o protegeixen l'expressió del gen. La proteïna codificada pel transgèn es denomina *proteïna recombinant* perquè és el resultat de la recombinació entre el gen seleccionat i els seus elements de control.

El primer pas per produir un animal transgènic és seleccionar un gen que ens interessi i determinar on (llet, sèrum, cèl·lules epitelials, etc.) i quan (durant la lactació, abans de la pubertat, etc.) s'expressarà el gen.

Les metodologies utilitzades per produir remugants, conills, porcs i ocells transgènics són diverses, econòmicament costoses i encara poc eficients en comparació de la producció de plantes transgèniques, animals de laboratori o peixos transgènics. Les metodologies utilitzades són les que esmentem tot seguit.

Microinjecció del gen al pronucli del zigot

La microinjecció consisteix a injectar en un dels pronuclis de l'òvul fecundat (zigot) moltes còpies del transgèn seleccionat, mitjançant un micromanipulador. Si el transgèn és incorporat amb èxit en el genoma del zigot, totes les cèl·lules de l'animal tin-

dran incorporat el nou gen. Aproximadament unes cinc mil còpies del gen, contingudes en 1-2 picolitres de medi, són injectades en un dels dos pronuclis, generalment en el format per l'espermatozoide. Aquesta tècnica és laboriosa i poc eficient a causa de l'alt nombre de zigots microinjectats que no podran seguir el seu desenvolupament embrionari per l'efecte advers de la injecció. D'altra banda, el DNA forà és altament mutagènic i letal per a molts embrions, de manera que solament el 10-20 % dels zigots microinjectats integren el nou gen en el seu genoma. En la pràctica, amb molta freqüència el transgèn no és incorporat en totes les cèl·lules embrionàries produïdes a partir del zigot i s'obtenen animals mosaic. A més, molts dels transgènics produïts per microinjecció no incorporen el transgèn a les seves cèl·lules germinals i, per tant, no el poden transmetre a la seva descendència. Així, en animals experimentals, com el ratolí, solament l'1-5 % dels zigots microinjectats produiran un ratolí transgènic. Aquesta xifra d'èxit és molt menor en animals domèstics com vaques, ovelles, porcs i cabres, en què no s'acostuma a arribar ni a l'1 %. La dificultat d'obtenir un nombre elevat de zigots en aquestes espècies de taxa d'ovulació més baixa, la sensibilitat més alta dels zigots a la microinjecció, les baixes taxes de desenvolupament embrionari dels zigots microinjectats en les femelles receptores i la freqüència menor d'integració del gen forà, fan d'aquesta tècnica d'obtenció de transgènics una metodologia molt costosa econòmicament i molt poc eficient científicament.

A pesar de totes aquestes dificultats, la microinjecció ha estat utilitzada de manera reeixida en cabres i ovelles per produir proteïnes d'interès farmacèutic. Així, el primer producte biofarmacèutic presentat a l'EMEA perquè l'aproessin va ser

l'ATryn, una forma recombinant de l'antitrombina humana, produïda en la llet de cabra (Zhou *et al.*, 2005) utilitzant la microinjecció. En animals de laboratori, com els ratolins, aquesta metodologia és la que més s'utilitza.

Utilització de virus com a vectors del nou gen

Aquesta metodologia es basa en la capacitat que tenen els virus d'incorporar el seu material genètic a la cèl·lula infectada. Aquesta metodologia va ser la primera que es va utilitzar per aconseguir la transgènesi. L'avantatge que presenta és l'alta integració del transgèn tant en les cèl·lules germinals com en el zigot o en les cèl·lules de l'embrió, a més del trauma mínim que es produeix en les seves membranes i estructures. En gallines, en què l'embrió, que es troba present en l'ou fecundat, conté més de cinquanta mil cèl·lules, normalment la introducció del transgèn en l'embrió es fa mitjançant infecció amb virus. Fins ara s'han utilitzat dos tipus de virus, els retrovirus i els lentivirus. Actualment, els lentivirus són els més utilitzats i eficients en la producció d'animals transgènics pel fet que són capaços d'incorporar el transgèn a més varietat de cèl·lules i en cèl·lules en diferents estadis del cicle cel·lular. En porcs, el percentatge d'animals transgènics obtinguts en relació amb els embrions infectats és del 13 al 31 % amb un 90 % dels animals transgènics que expressen un alt nivell de proteïna (Whitelaw *et al.*, 2004). En bovins, els lentivirus han produït vaques transgèniques mitjançant infecció de l'òvul però no mitjançant la infecció de l'embrió (Hofmann *et al.*, 2004). Utilitzant aquests virus s'han obtingut pollastres, porcs, conills, ovelles, vaques i cabres transgèniques; no obstant això, hi ha espècies, com els micos,

en què no s'han pogut produir. Una de les grans limitacions que presenta aquesta metodologia és que els virus solament poden transferir gens de mida petita (fins a 10 kb) per les limitacions físiques de la càpsula vírica. Un altre desavantatge important és el llarg i complicat procés que representa afegir el gen a la dotació genètica del virus i l'empaquetament posterior en la càpsula vírica (revisat per Robl *et al.*, 2007).

Utilització dels espermatozoides com a transmissors del nou gen

El 1971 es va comprovar que l'espermatozoide tenia capacitat per incorporar nou DNA i integrar-lo al genoma de l'òvul (Brackett *et al.*, 1971). Posteriorment, el 1989 unes investigadores italianes van demostrar que els espermatozoides eren capaços d'incorporar nou material genètic en el seu nucli i que inseminant amb aquests espermatozoides un òvul es podien aconseguir animals transgènics d'una manera fàcil i eficient. La investigació documentava que simplement afegint el material genètic a una solució d'espermatozoides, eren capaços d'integrar-lo al seu nucli i transferir-lo al zigot i, d'aquesta manera, s'aconseguia un ratolí transgènic (Lavitrano *et al.*, 1989). Nombrosos laboratoris van intentar repetir aquesta metodologia tan prometedora i barata, però la baixa repetibilitat dels resultats va desanimar els investigadors a seguir en aquesta línia de recerca. En els darrers anys s'ha tornat a obrir aquesta investigació i s'ha aconseguit un 80 % de porcs transgènics amb gran estabilitat del transgèn (Lavitrano *et al.*, 2002). Per millorar l'eficàcia d'aquest mètode s'han introduït tècniques d'electroporació i liposomes per millorar la incorporació del DNA a l'espermatozoide (Smith i Spadafora, 2005) i la utilització d'anticossos

monoclonals que reconeixen la superfície de l'espermatozoide (Chang *et al.*, 2002). També l'ús de l'ICSI (*intracytoplasmic sperm injection*) ha millorat els resultats d'obtenció de porcs transgènics (Perry *et al.*, 1999) en permetre seleccionar l'espermatozoide transgènic per injectar-lo directament a l'òocit. En remugants, els resultats amb aquesta metodologia han estat més escassos (Shemesh *et al.*, 2000), i s'ha aconseguit descendència transgènica, però amb mosaicisme (revisat per Wall, 2002).

Transferència nuclear de cèl·lules somàtiques

El naixement de l'ovella Dolly, el primer animal clònic produït mitjançant transferència nuclear d'una cèl·lula somàtica (Wilmut *et al.*, 1997), va donar pas a una nova tecnologia per produir animals transgènics. En comparació de la microinjecció, aquesta tècnica té com a avantatge la utilització d'un nombre menor d'animals experimentals i, com a conseqüència, la reducció significativa del cost de la investigació. La metodologia de la transferència nuclear té dues etapes: *a*) introduir el transgèn en el nucli de la cèl·lula somàtica i identificar correctament la cèl·lula transgènica i *b*) introduir la cèl·lula somàtica, i ja transgènica, dins del citoplast de l'òvul enucleat i fusionar i activar ambdues cèl·lules fins a produir un embrió transferible a una femella receptora. Aquesta segona etapa és específicament la metodologia del clonatge. Més concretament, per a la producció de les cèl·lules transgèniques, les cèl·lules somàtiques utilitzades preferentment en la producció d'animals transgènics són els fibroblasts. Els fibroblasts són cèl·lules fàcils de cultivar *in vitro* i es troben presents en molts teixits, des d'on és fàcil aïllar-les. Els fibroblasts poden ser obtinguts

de teixits d'animals vius i de teixits de fetus. El ritme de reproducció dels fibroblasts és molt ràpid i se'n poden aconseguir milions en poc temps. De totes maneres, amb cadascuna de les divisions, les cèl·lules van envellint i perden capacitat per poder ser clonades. També, la vida *in vitro* de les cèl·lules depèn de l'edat de l'animal donant. Així, els fibroblasts fetals són els que permeten més divisions cel·lulars. Per exemple, cultivant durant quaranta-vuit hores teixit d'un fetus boví (2 a 4 cm) es poden obtenir cinquanta milions de cèl·lules en cultiu, fet que amplia les possibilitats que n'hi hagi de modificades genèticament, que un nombre adequat tinguin incorporat correctament el transgèn i que es trobin prou robustes per poder ser transferides al citoplast i produir embrions viables. Hi ha diferents mètodes per incorporar el transgèn a la cèl·lula; aquest procés s'anomena *transfecció*. Una de les tècniques per fer-la és mitjançant l'electroporació, que consisteix a produir descàrregues elèctriques a la cèl·lula de manera que es produeixin porus en la membrana perquè penetri el transgèn. De cinc milions de cèl·lules, solament incorporen el transgèn aproximadament 500 (revisat per Keefer, 2007). Per a la selecció d'aquestes cèl·lules, el transgèn incorpora una construcció marcador que permet seleccionar les cèl·lules transgèniques i cultivar-les durant diversos dies per poder identificar el transgèn per PCR i poder augmentar el nombre de cèl·lules transgèniques en els diversos passos dels cultius cel·lulars. Durant aquests cultius les cèl·lules van envellint i finalment cal seleccionar les que semblin més viables.

La transferència de nuclis

En aquesta tecnologia el primer pas és l'enucleació de l'òvul, és a dir, l'extracció

de tot el seu material genètic. Aquest procés es fa aspirant amb una micropipeta tot el nucli i el corpuscle polar de l'òvul tenint cura de deixar intacta la major part del citoplasma. Aquesta nova cèl·lula enucleada és denominada *citoplast*. Una vegada preparat el citoplast, el fibroblast transgènica és introduït entre la zona pellúcida i la membrana plasmàtica del citoplast. La fusió d'ambdues cèl·lules es fa per electrofusió o descàrregues elèctriques. Aquestes descàrregues modifiquen les càrregues elèctriques d'ambdues membranes plasmàtiques i provoquen l'aparició d'una sèrie de porus per on es produeix la fusió dels citoplasmes, i això dona com a resultat una única cèl·lula amb un sol nucli. El pas següent és el procés d'activació cel·lular, que consisteix a activar la nova cèl·lula fusionada perquè iniciï les divisions cel·lulars i es desenvolupi un embrió. Aquesta activació normalment es fa químicament utilitzant compostos que estimulen l'entrada massiva de calci a la cèl·lula i compostos que inhibeixen els enzims presents al citoplast encarregats de mantenir l'òvul sense dividir abans de ser estimulat per l'espermatozoide. Després de la fusió i l'activació, el nou embrió es manté en medis de cultiu embrionari *in vitro* fins a arribar a la fase de mòrula o blastocist, moment en el qual és transferit a una femella receptora perquè mantingui la gestació fins al naixement. Aquest mètode assegura que l'embrió és transgènica, ja que el nucli introduït provenia d'una cèl·lula transgènica.

L'eficàcia d'aquestes tecnologies ha estat millorada gràcies a les investigacions en gens diana (*gene targeting*) (Kuroiwa *et al.*, 2004) i la tecnologia transcromosòmica (Kuroiwa *et al.*, 2002). Els gens diana es basen en el procés de recombinació homòloga; consisteix a col·locar en el transgèn seqüències de gens endògens que els permetin reconèixer el lloc específic del

cromosoma on s'ha d'integrar el transgèn, de manera que s'eviti que s'integri a l'atzar, amb les conseqüències negatives que comporta això. La tecnologia transcromosòmica consisteix a transferir microcromosomes en lloc de gens. Els microcromosomes són grans trossos de DNA que contenen tots els elements d'un cromosoma, incloent-hi telòmers, centròmers i múltiples llocs de replicació del DNA. Els microcromosomes no s'integren en el DNA de l'amfitrió, sinó que afegeixen un nou cromosoma a la seva dotació genètica. A més, els microcromosomes duen més quantitat de DNA, ja que no necessiten ser integrats en cap cromosoma endogen. Normalment la quantitat que es pot integrar en un cromosoma és de 10.000 a 30.000 nucleòtids, i els microcromosomes poden tenir deu milions o més bases de DNA. Conseqüentment, aquesta tecnologia permet transferir gens de gran longitud o molts gens alhora. Actualment ja s'han produït vedelles transgèniques per produir immunoglobulina humana, que s'han obtingut mitjançant microcromosomes artificials, també denominats *HAC (human artificial chromosome)*, i utilitzant la tècnica de transferència nuclear amb fibroblasts (Kuroiwa *et al.*, 2002).

OBJECTIUS DE LA TRANSGÈNESI EN ELS ANIMALS RAMADERS

La transgènesi és una línia d'investigació tan potent que no solament afectarà la producció animal convencional, sinó que permetrà als animals tenir utilitats noves i diferents. Actualment les línies d'investigació més importants que es desenvolupen sobre els animals d'interès productiu són els que enumerem tot seguit.

Millores en la salut animal

Amb la genètica quantitativa s'ha pogut millorar poc la resistència dels animals a certes malalties. Amb l'enginyeria genètica s'han obert noves estratègies per poder millorar la salut dels animals. La millora de la salut dels animals implica, entre d'altres coses, més benestar per als animals, una reducció important de la medicació que necessiten ara, un increment en la productivitat i una millora en els paràmetres reproductius, a més de produir aliments de millor qualitat i més sans. Una de les estratègies per millorar la resistència a les malalties és fer animals transgènics que expressin en el seu organisme els anticossos necessaris per lluitar contra la malaltia seleccionada. S'han produït construccions per expressar anticossos en conills, porcs i ovelles; no obstant això, els anticossos formats eren d'una grandària aberrant i d'una capacitat molt feble d'afinitat amb l'antigen. Una altra línia d'estudi per millorar la salut animal és fer femelles transgèniques que expressin en la llet els anticossos que volem, de manera que el nounat s'immunitzi durant la lactació (revisat per Laible, 2009). Pel seu impacte social, una important línia d'investigació ha estat eradicar dels animals transmissors el prió que produïa la BSE (encefalitis bovina espongiforme) o malaltia de les «vaques boges». En ovelles, cabres i vaques els animals portadors de l'al·lel PrP són els animals que pateixen i transmeten aquesta malaltia. L'estratègia contra aquesta malaltia ha estat produir animals transgènics amb un transgèn desactivador del PrP. Els animals en els quals la transgènia els ha desactivat un gen endogen es coneixen amb el nom d'*animals genoanul·lats*. Fins al moment, s'han obtingut vaques (Kuroiwa *et al.*, 2004), ovelles (Denning *et al.*, 2001) i cabres (Yu *et al.*, 2009) genoanul·lades en homozigosi.

Una de les grans infeccions que afecten el boví d'alta producció lletera són les mastitis. Aquesta infecció de la glàndula mamària comporta grans pèrdues econòmiques a les explotacions lleteres. Freqüentment la mastitis és provocada per *Staphylococcus aureus*, un patògen difícil de controlar amb els antibiòtics actuals. Per aturar aquest problema s'han produït vacques transgèniques que expressen en la llet l'enzim lisostafina (Wall *et al.*, 2005). La lisostafina és un antimicrobià molt eficaç que provoca la ruptura de la paret cel·lular del bacteri. Segons els nivells d'expressió de l'enzim, el grau de protecció contra la mastitis serà major.

Producció de nous aliments més saludables

La composició química i nutritiva dels aliments pot ser modificada significativament per la transgènesi. Mitjançant l'enginyeria genètica els aliments poden augmentar el nombre de compostos nutritius que tenen, com per exemple en el cas de l'arròs daurat, o arròs al qual s'ha afegit provitamina A en la seva composició. També es poden eliminar o reduir nutrients que poden ser perillosos per a algunes persones, com és el cas de la lactosa de la llet de vaca. Un grup d'investigadors de la Universitat de Davis, a Califòrnia, ja ha aconseguit una cabra que expressa en la llet la proteïna lisozim (Maga *et al.*, 2006). El lisozim és un antimicrobià natural de la llet dels mamífers. La llet humana conté molta més quantitat d'aquesta proteïna que les llets de vaca i cabra. L'enriquiment de la llet de vaca o de cabra amb lisozim humà milloraria la qualitat nutritiva i donaria a la llet propietats antimicrobianes i antiinflamatòries. També s'està estudiant d'afegir a la llet dels remugants la proteïna

humana lactoferrina, de manera que s'incrementin les propietats nutritives de la llet i es millori la protecció intestinal.

Un altre problema que s'està estudiant fa referència a les intoleràncies a certs sucres. Moltes persones al món són intolerants a la llet de vaca a causa de la lactosa. Aquesta intolerància és deguda a la manca de lactasa, l'enzim que hidrolitza la lactosa en glucosa i galactosa. La lactosa és un sucre i no una proteïna, per la qual cosa no té un gen que la codifiqui específicament. Per eliminar la lactosa de la llet s'estan utilitzant diverses estratègies. Una és canviar els enzims que produeixen la lactosa en el cicle dels sucres perquè el producte final sigui la glucosa i la galactosa. D'altres estudis intenten produir en la llet la lactasa que hidrolitza la lactosa per aconseguir que aquest sucre s'hidrolitzi prèviament a la ingestió. Una de les primeres estratègies que es va seguir va ser la d'inhibir la producció d'aquest sucre, però no va tenir èxit. Una altra línia d'estudi va ser intentar expressar enzims que hidrolitzin la lactosa en la llet mateixa, i una altra via ha estat inhibir la producció de lactoalbúmina, una proteïna imprescindible per formar la lactosa en la glàndula mamària (Whitelaw, 1999).

La transgènesi permetrà modificacions en la llet que produiran un canvi important en les seves característiques nutritives. Així, si s'aconsegueix que la glàndula mamària de la vaca produeixi proteïnes làctiques provinents del genoma de les dones es podria obtenir una llet de vaca completament maternitzada.

Potser, l'animal que ha superat tots els assajos productius i està a l'espera de la comercialització és el porc, al qual s'ha afegit el gen *FAD2*, que codifica l'enzim A12 àcid gras-dessaturasa provinent dels espinacs. Aquests porcs transgènics expressen aquest enzim en els seus adipòcits, i incre-

menten en un 20 % la quantitat d'àcid lino-leic en el seu greix (Saeki *et al.*, 2004). També s'han produït porcs amb capacitat per produir àcids grassos ω -3 (Lai *et al.*, 2006). En ambdós tipus de transgènics, l'objectiu era produir carn amb menys greix saturat i, conseqüentment, amb menys risc de produir malalties cardiovasculars. Actualment en les revistes científiques es discuteix perquè no es poden comercialitzar (Kang i Leaf, 2007).

Augment de la productivitat animal

Uns dels primers objectius dels treballs amb transgènics van ser incrementar la velocitat de creixement, el pes i la composició de la canal dels animals. Des que el 1982 la revista *Nature* publicà per primera vegada la fotografia d'un ratolí transgènic amb una grandària considerablement major que els seus congèneres perquè tenia moltes còpies de l'hormona del creixement (Palmiter *et al.*, 1982), molts investigadors van iniciar aquesta línia de treball per produir una ramaderia d'animals més grans. No obstant això, els resultats van ser frustrants, ja que els animals nascuts presentaven tantes aberracions que eren inviàbles. En els darrers anys, utilitzant l'hormona de creixement humana s'han aconseguit porcs i vaques amb més creixement i menys greix a la canal; no obstant això, els resultats són encara poc consistents (Draghia-Akli *et al.*, 1999).

Millorar la sostenibilitat de la ramaderia

Un dels grans problemes de la ramaderia intensiva de porcí és la contaminació que produeix la seva femta, anomenada *puri*, en el sòl. Una manera de reduir aquesta contaminació ha estat produir un

porc transgènic amb el gen de la fitasa obtingut d'un bacteri. El porc expressa la fitasa en les glàndules salivals i es produeix una millora en la digestibilitat dels fitats de la dieta, amb la qual cosa es redueix el 75 % la quantitat de fosfats produïts en la femta dels porcs (Golovan *et al.*, 2001).

Producció de proteïnes d'interès farmacèutic

Potser un dels grans canvis que ha produït la transgènesi és la possibilitat de produir proteïnes d'interès terapèutic utilitzant animals amb una alta producció de llet, d'ous o carn. Els animals domèstics sempre han estat una font de medicaments humans, i han produït anticossos i antídots en el seu sèrum. Altres proteïnes farmacològiques s'obtenien de teixits animals, com per exemple la insulina i l'hormona del creixement, obtingudes del porc. Aquests medicaments obtinguts de teixits animals poden presentar problemes de contaminació amb proteïnes animals no desitjades (Houdebine, 2000). L'enginyeria genètica permet obtenir proteïnes humanes en teixits animals amb una alta taxa de síntesi proteica, com és la glàndula mamària, l'oviducte de la gallina o la sang. A més, certs compostos com els anticossos policlonals no podrien ser obtinguts d'altra manera. Les proteïnes recombinants procedents de gens humans també presentarien menys risc d'allèrgia en relació amb les obtingudes de teixits animals. Actualment la majoria de proteïnes recombinants humanes són produïdes per bacteris, llevats i cultius cel·lulars. L'avantatge d'utilitzar els animals com a biofàctories és la seva capacitat per produir proteïnes estables i actives en comparació de les proteïnes recombinants procedents de bacteris, llevats, cèl·lules de mamífer i plantes. A més, els animals

TAULA 1. *Bioproductes elaborats per empreses europees i nord-americanes*

Sistema	Empresa o grup, país	Pàgina web	Productes o models	Estat
Cabres	GTC Biotherapeutics, EUA	www.transgenics.com	Antitrombina III (ATryn) Anticossos monoclonals Vacuna de la malària	L'ATryn és aprovada a la UE i es troba en proves clíniques als EUA. En els altres productes és preclínic
	Pharmathene, EUA/Canadà	www.pharmathene.com	Butilcolinesterasa	Recerca
Ovelles	Hematech, EUA	www.hematech.com	Anticossos policlonals	Recerca
	GTC Biotherapeutics, EUA	www.transgenics.com	Albúmina sèrica humana	Recerca
Porcs	Revivacor, EUA	www.revivacor.com	Xenotrasplantaments (implants de cartílag) Anticossos policlonals	Recerca
	Progenetics	www.progtx.com	Factor IX	Recerca
	Foulum Research Center, Dinamarca	www.agrsci.org/ny_navigation/forskning/centre/forskningcenter_foulum	Model d'Alzheimer	Recerca
	Universitat Estatal de Carolina del Nord (R. M. Petters), EUA	www.ncse.edu	Model de retinitis pigmentosa	Recerca
Conills	Universitat de Missouri (R. Prather), EUA	www.missouri.edu	Xenotrasplantaments	Recerca
	Pharming, Països Baixos	www.pharming.com	Inhibidor de C1	Assajos clínics de fase II
	BioProtein Technologies, França	www.bioprotein.com	Proteïnes recombinants	Recerca
Pollastres	Therapeutic Human Proteins, EUA	www.polyclonals.com	Anticossos humans policlonals	Recerca
	Avigenics, EUA	www.avigenics.com	Interferó	Assajos clínics
	Origin Therapeutics, EUA	www.origentheapeutics.com	Proteïnes recombinants	Recerca
	Viragen, EUA	www.viragen.com	Interferó α i anticossos de cadena simple	Recerca
	Vivalis, França	www.vivalis.com	Proteïnes recombinants amb un sistema basat en cèl·lules	Recerca

produïrien quantitats molt més grans de proteïnes, i això faria que el sistema fos més rendible econòmicament (Cott *et al.*, 2004). Ja s'han obtingut quantitats acceptables de proteïnes recombinants en ovelles, cabres i vaques, amb una alta activitat biològica. En la clara d'ou, els resultats obtinguts d'expressió i activitat de la proteïna recombinant han estat menys importants que en la llet, encara que es van millorant.

Actualment, cap de les proteïnes recombinants produïdes per animals ha estat comercialitzada, encara que des de 2006 l'antitrombina ATryn (anticoagulant) està aprovada per l'EMEA (Agència Europea del Medicament). Una altra proteïna recombinant produïda en la llet de cabra i que està en procés d'aprovació és Protexia, una proteïna amb activitat butiril-colinesterasa que és utilitzada contra els agents tòxics del sistema nerviós. Un dels problemes que preveuen les agències reguladores per a l'aprovació d'aquests medicaments és la seva possible immunogenètat alterada. Encara que les proteïnes provenen de gens humans, les modificacions posttraduccionals possibles produïdes en l'organisme de l'animal en poden haver modificat l'allerogeneïtat, a més d'haver alterat la capacitat de persistència o la vida útil de la proteïna. En el quadre de la pàgina anterior s'observen les empreses europees i americanes que produeixen bioproductes —quadre elaborat per Keefer *et al.* (2007), *Council for Agriculture Science and Technology*, 35.

No hi ha productes procedents d'animals transgènics que hagin estat comercialitzats, ni proteïnes farmacèutiques, ni aliments enriquits, ni animals més productius. Un dels principals motius d'aquesta falta de comercialització és que la legislació reguladora de nous fàrmacs i aliments no ha decidit definitivament quins tipus de regulacions haurien de superar aquests productes obtinguts mitjançant enginyeria

genètica (Keefer, 2004). En aquest moment avança amb més rapidesa la ciència que les noves regles produïdes pels organismes reguladors, i, per tant, no s'atreveixen a comercialitzar-los solament utilitzant les proves que es fan als aliments o fàrmacs convencionals. A més, l'opinió pública dels països desenvolupats, escèptica amb aquestes metodologies, impedeix una política més activa sobre aquesta investigació. Ja fa vint anys que es va produir la primera proteïna recombinant en ovelles i encara no s'ha donat una resposta concloent a la petició de comercialització. Aquesta situació tan poc definida, tant legalment com políticament, ha resultat en una disminució important en les inversions en aquestes línies de treball, malgrat el gran potencial que tenen (Miller, 2008).

BIBLIOGRAFIA

- BRACKETT, B. G.; BARANSKA, W.; SAWICKI, W.; KOPROWSKI, H. (1971). «Uptake of heterologous genome by mammalian spermatozoa and its transfer to ova through fertilization». *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, 68: 353-357.
- CHANG, K.; QIAN, J.; JIANG, M.; LIU, Y. H.; WU, M. C.; CHEN, C. D.; LAI, C. K.; LO, H. L.; HSIAO, C. T.; BROWN, L.; BOLEN, J.; HUANG, H. I.; HO, P. Y.; SHIH, P. Y.; YAO, C.-W.; LIN, W. J.; CHEN, C. H.; WU, F. Y.; LIN, Y. J.; XU, J.; WANG, K. (2002). «Effective generation of transgenic pigs and mice by linker based sperm-mediated gene transfer». *BMC Biotechnology*, 2: 5.
- DENNING, C.; BURL, S.; AINSLIE, A.; BRACKEN, J.; DINNYES, A.; FLETCHER, J.; KING, T.; RITCHIE, M.; RITCHIE, W. A.; ROLLO, M.; SOUSA, P. de; TRAVERS, A.; WILMUT, I.; CLARK, A. J. (2001). «Deletion of the α -(1,3)galactosyl transferase (GGTA1) gene and the prion protein (PrP) gene in sheep». *Nat. Biotech.*, 19: 559-562.
- DRAGHIA-AKLI, R.; FIOROTTO, M. L.; HILL, L. A.; MALONE, P. B.; DEEVER, D. R.; SCHWARTZ, R. J. (1999). «Myogenic expression of an injectable protease-resistant growth hormone-releasing hormone augments long-term growth in pigs». *Nat. Biotech.*, 17: 1179-1183.

- GOLOVAN, S. P.; MEIDINGER, R. G.; AJAKIYE, 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». *Nat. Biotech.*, 19: 741-745.
- HAMMER, R. E.; PURSEL, V. G.; REXROAD, C. E.; WALL, R. J.; BOLT, D. J.; EBERT, K. M.; PALMITER, R. D.; BRINSTER, R. L. (1985). «Production of transgenic rabbits, sheep and pigs by microinjection». *Nature*, 315: 680-683.
- HOFMANN, A.; ZAKHARTCHENKO, V.; WEPPERT, M.; SEBALD, H.; WENIGERKIND, H.; BREM, G.; WOLF, E.; PFEIFER, A. (2004). «Generation of transgenic cattle by lentiviral gene transfer into oocytes». *Biol. Reprod.*, 71: 405-409.
- HOUEBINE, L. M. (2000). «Transgenic animal bioreactors». *Transgenic Res.*, 9: 305-320.
- KANG, J. X.; LEAF, A. (2007). «Why the omega-3 piggy should go to market». *Nat. Biotech.*, 25: 505-506.
- KEEFER, C. (2007) «The role of the transgenic livestock in the treatment of the human disease». *Council for Agricultural Science and Technology (CAST)*, 35: 12.
- KEEFER, C. L. (2004). «Production of bioproducts through the use of transgenic animal models». *Anim. Reprod. Sci.*, 82: 5-12.
- KUROIWA, Y.; KASINATHAN, P.; CHOI, Y. J.; NAEEM, R.; TOMIZUKA, K.; SULLIVAN, E. J.; KNOTT, J. G.; DUTEAU, A.; GOLDSBY, R. A.; OSBORNE, B. A.; ISHIDA, I.; ROBL, J. M. (2002). «Cloned transchromosomal calves producing human immunoglobulin». *Nat. Biotech.*, 20: 889-894.
- KUROIWA, Y.; KASINATHAN, P.; MATSUSHITA, H.; SATHIYASELAN, J.; SULLIVAN, E. J.; KAKITANI, M.; TOMIZUKA, K.; ISHIDA, I.; ROBL, J. M. (2004). «Sequential targeting of the genes encoding immunoglobulin- μ and prion protein in cattle». *Nat. Genet.*, 36: 775-780.
- LAI, L.; KANG, J. X.; LI, R.; WANG, J.; WITT, W. T.; YONG, H. Y.; HAO, Y.; WAX, D. M.; MURPHY, C. N.; RIEKE, A.; SAMUEL, M.; LINVILLE, M. L.; KORTE, S. W.; EVANS, R. W.; STARZL, T. E.; PRATHER, R. S.; DAI, Y. (2006). «Generation of cloned transgenic pigs rich in omega-3 fatty acids». *Nat. Biotech.*, 24: 435-436.
- LAIBLE, G. (2009). «Enhancing livestock through genetic engineering—recent advances and future prospects». *Comp. Immunol. Microbiol. Infect. Dis.*, 32: 123-137.
- LAVITRANO, M.; BACCI, M. L.; FORNI, M.; LAZZERESCHI, D.; DI STEFANO, C.; FIORETTI, D.; GIANCOTTI, P.; MARF, G.; PUCCI, L.; RENZI, L.; WANG, H.; STOPPACCIARO, A.; STASSI, G.; SARGIACOMO, M.; SINIBALDI, P.; TURCHI, V.; GIOVANNONI, R.; CASA, G. della; SEREN, E.; ROSSI, G. (2002). «Efficient production by sperm-mediated gene transfer of human decay accelerating factor (hDAF) transgenic pigs for xenotransplantation». *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, 99: 14230-14235.
- LAVITRANO, M.; CAMAIONI, A.; FAZIO, V. M.; DOLCI, S.; FARACE, M. G.; SPADAFORA, C. (1989). «Sperm cells as vectors for introducing foreign DNA into eggs: Genetic transformation of mice». *Cell*, 57: 717-723.
- MAGA, E. A.; SHOEMAKER, C. F.; ROWE, J. D.; BONDURANT, R. H.; ANDERSON, G. B.; MURRAY, J. D. (2006). «Production and processing of milk from transgenic goats expressing human lysozyme in the mammary gland». *J. Dairy Sci.*, 89: 518-524.
- MILLER, H. I. (2008). «FDA on transgenic animals—dog's breakfast?». *Nat. Biotech.*, 26: 159-160.
- PALMITER, R. D.; BRINSTER, R. L.; HAMMER, R. E.; TRUMBauer, M. E.; ROSENFIELD, M. G.; BIRNBERG, N. C.; EVANS, R. M. (1982). «Dramatic growth of mice that develop from eggs microinjected with metallothionein-growth hormone fusion genes». *Nature*, 300: 611-615.
- PERRY, A. C.; NBSF, F.; WAKAYAMA, T.; KISHIKAWA, H.; KASAI, T.; OKABE, M.; TOYODA, Y.; YANAGIMACHI, R. (1999). «Mammalian transgenesis by intracytoplasmic sperm injection». *Science*, 284: 1180-1183.
- ROBL, J. M.; WANG, Z.; KASINATHAN, P.; KUROIWA, Y. (2007). «Transgenic animal production and animal biotechnology». *Theriogenology*, 67: 127-133.
- SAEKI, K.; MATSUMOTO, K.; KINOSHITA, M.; SUZUKI, I.; TASAKA, Y.; KANO, K.; TAGUCHI, Y.; MIKAMI, K.; HIRABAYASHI, M.; KASHIWAZAKI, N.; HOSOI, Y.; MURATA, N.; IRITANI, A. (2004). «Functional expression of a δ -12 fatty acid desaturase gene from spinach in transgenic pigs». *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, 101: 6361-6366.
- SHEMESH, M.; GUREVICH, M.; HAREL-MARKOWITZ, E.; BENVENISTI, L.; SHORE, L. S.; STRAM, Y. (2000). «Gene integration into bovine sperm genome and its expression in transgenic offspring». *Mol. Reprod. Dev.*, 56: 306-308.
- SMITH, K.; SPADAFORA, C. (2005). «Sperm-mediated gene transfer: Applications and implications». *BioEssays*, 27: 551-562.
- WALL, R. J. (2002). «New gene transfer methods». *Theriogenology*, 57: 189-201.
- WALL, R. J.; POWELL, A. M.; PAAPE, M. J.; KERR, D. E.; BANNERMAN, D. D.; PURSEL, V. G.; WELLS, K. D.;

- TALBOT, N.; HAWK, H. W. (2005). «Genetically enhanced cows resist intramammary *Staphylococcus aureus* infection». *Nat. Biotech.*, 23: 445-451.
- WHITELAW, B. (1999). «Toward designer milk». *Nat. Biotech.*, 17: 135-136.
- WHITELAW, C. B. A.; RADCLIFFE, P. A.; RITCHIE, W. A.; CARLISLE, A.; ELLARD, F. M.; PENA, R. N.; ROWE, J.; CLARK, A. J.; KING, T. J.; MITROPHANOUS, K. A. (2004). «Efficient generation of transgenic pigs using equine infectious anaemia virus (EIAV) derived vector». *FEBS Letters*, 571: 233-236.
- WILMUT, I.; SCHNIEKE, A. E.; MCWHIR, J.; KIND, A. J.; CAMPBELL, K. H. (1997). «Viable offspring derived from fetal and adult mammalian cells». *Nature*, 385: 810-813.
- YU, G.; CHEN, J.; XU, Y.; ZHU, C.; YU, H.; LIU, S.; SHA, H.; CHEN, J.; XU, X.; WU, Y.; ZHANG, A.; MA, J.; CHENG, G. (2009). «Generation of goats lacking prion protein». *Molecular Reproduction and Development*, 76: 3.
- ZHOU, Q.; KYAZIKE, J.; ECHELARD, Y.; MEADE, H. M.; HIGGINS, E.; COLE, E. S.; EDMUNDS, T. (2005). «Effect of genetic background on glycosylation heterogeneity in human antithrombin produced in the mammary gland of transgenic goats». *Journal of Biotechnology*, 117: 57-72.