

Animales transgénicos: usos y limitaciones en la medicina del siglo XXI

Transgenic animals: uses and limitations in the 21st century medicine

Dr. Brian M. Cavagnari^a

RESUMEN

Uno de los avances biotecnológicos más importantes de las últimas décadas fue el desarrollo de los animales transgénicos. En este artículo se analiza por qué los animales transgénicos son excelentes modelos para estudiar la función y regulación de los genes y para buscar nuevas estrategias terapéuticas para las enfermedades humanas. Se discute su uso como biorreactores para producir productos farmacológicos para el tratamiento de enfermedades y la posibilidad de generar cerdos transgénicos como fuente alternativa a la donación de órganos.

Palabras clave: animales transgénicos, animales knockout, animales genoprivos.

SUMMARY

One of the most important advances in biotechnology during the last decades was the development of transgenic animals. In this article, I discuss why transgenic animals are excellent models to analyze gene function and regulation, and to look for new therapeutic strategies for human diseases. Moreover, their use as bio-reactors to produce pharmaceutical products for the treatment of human diseases, and the possibility of generating transgenic pigs as an alternative source of organ donors for humans is also discussed.

Key words: transgenic animals, knockout animals.

que se conoce en el ambiente médico sobre las técnicas surgidas de la biología molecular, actualmente de amplio uso en investigación y en la práctica médica.¹ Sin duda, de los muchos avances que se obtuvieron en los últimos años, uno de los más promisorios en la investigación biomédica fue el desarrollo de animales transgénicos y de animales *knockout* (genoprivos).

El propósito de este artículo es comentar los actuales usos de estos modelos experimentales y su utilidad biomédica en el presente y a futuro.

ANIMALES TRANSGÉNICOS

Se considera transgénico todo organismo vivo manipulado genéticamente mediante la inserción de un gen que no forma parte de su genoma original. Son muchas las áreas en las cuales los animales transgénicos han aportado enormes beneficios, tal el caso del sector pecuario, pero en este artículo sólo desarrollaremos aquellas de relevancia biomédica.

Animales transgénicos como modelo de enfermedades humanas: la enfermedad como expresión incorrecta de genes

Las características particulares de cada tejido dependen de las proteínas que sus células expresan. Se desprende de esto que las enfermedades de base genética son el resultado de la expresión incorrecta de los genes específicos que codifican para tales proteínas.

Pero al hablar de "expresión incorrecta" no nos referimos solamente a la expresión de proteínas de función anómala, sino también a la expresión de la proteína adecuada en el lugar

INTRODUCCIÓN

Hace ya mucho tiempo que la enfermedad humana se considera como el producto de la interacción entre un componente genético predisponente y un medio ambiente desencadenante. La importancia de la genética del individuo en el desarrollo de una enfermedad ha hecho que cada vez se utilice más la genética molecular en la actividad clínica cotidiana (se realizan diagnósticos por técnicas moleculares, se utiliza la terapia génica como tratamiento alternativo de algunas enfermedades, etc.). Sin embargo, a pesar de estar transitando la segunda década del siglo XXI, es llamativo lo poco

a. Servicio de
Pediatria. Hospital
Materno Infantil
de Tigre "Dr.
Florencio Escardó".
Docencia e
Investigación.
Secretaría de
Política Sanitaria y
Desarrollo Humano.
Municipalidad de
Tigre.

Correspondencia:
Dr. Brian M. Cavagnari:
bcavagna@gmail.com

Conflicto de intereses:
Ninguno que declarar.

Recibido: 1-2-10
Aceptado: 11-5-10

equivocado (falla en la expresión histo específica), a la expresión de la proteína adecuada a destiempo (falla en la expresión cronoespecífica) y a la expresión de la proteína adecuada en cantidades anormalmente altas o bajas.²

Estas aberraciones son el resultado de mutaciones en cualquier región del gen, sea ésta una región codificante del mismo o no. Para comprender su alcance, debemos repasar algunas características del gen eucariota y del flujo de información genética (Figura 1).

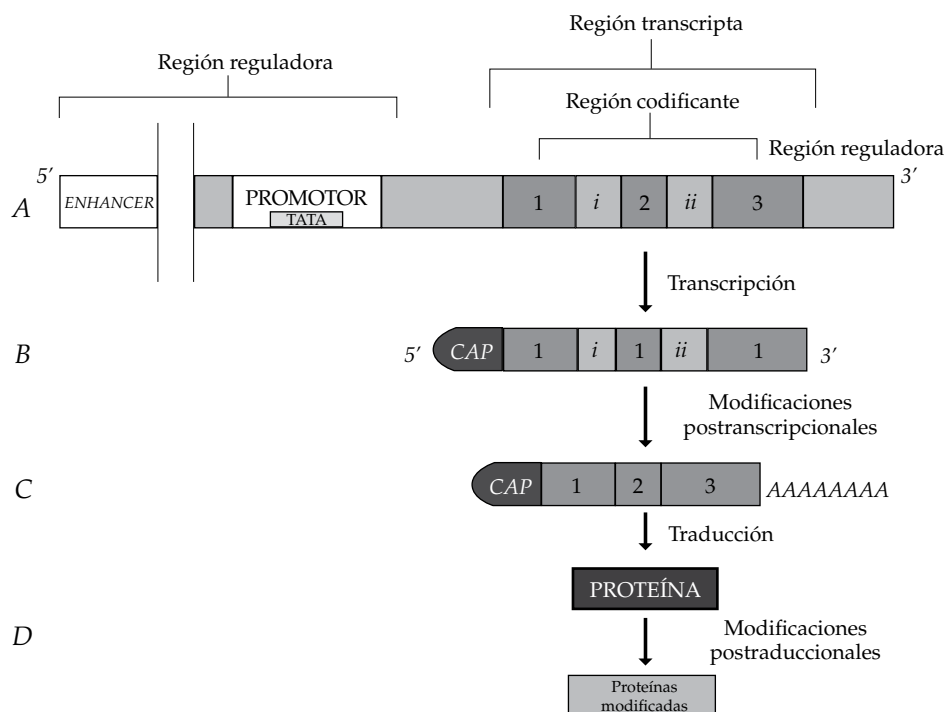
El concepto de gen es más funcional que es-

tructural, ya que un gen no sólo incluye a la región que codificará finalmente los aminoácidos de la futura proteína (región codificante), sino que incluye a una región no codificante o región reguladora (región promotora, señales de procesamiento y de terminación, entre otras).

Las regiones no codificantes tienen las secuencias de ADN que le confieren al gen la expresión cronoespecífica e histo específica de la proteína que se sintetizará a partir de la región codificante del gen.

El promotor del gen es una secuencia de ADN

FIGURA 1. Flujo de información genética



El ADN es un polímero de nucleótidos (base nitrogenada unida a una desoxirribosa fosfato). La unión de los nucleótidos se da entre el carbono en posición 3' de la desoxirribosa de un nucleótido y el carbono en posición 5' de la desoxirribosa del nucleótido adyacente. Esto hace que los enlaces fosfodiéster dentro de la cadena de nucleótidos posean direccionalidad. Para señalar una posición dentro del gen, se dice "hacia 5'" (hacia la izquierda de la figura) o "hacia 3'" (hacia la derecha de la figura).

A: Simplificación de la estructura de un gen eucariota. La región codificante posee exones (numerados del 1 al 3) e intrones (i y ii). En la región reguladora se destacan el promotor y el *enhancer* o resaltador. El promotor posee un motivo TATA que es reconocido por una serie de proteínas que forman el complejo de transcripción basal, el cual inicia la transcripción del gen. El resaltador puede estar en otro sitio (hacia 5' o hacia 3') y en otra orientación. A él se unen factores que determinan la velocidad de la transcripción.

B: Simplificación de la estructura de un transcrito primario. En este ARN se incluyen tanto los exones como los intrones, quienes poseen las secuencias necesarias para un correcto corte y empalme. Cabe destacar que la adición del cap es un proceso cotranscripcional, aunque se lo considere como una modificación postranscripcional.

C: Simplificación de la estructura de un ARNm maduro. Se observan las tres principales modificaciones postranscripcionales: el corte y empalme, que elimina los intrones dejando unidos a los exones, la adición del cap a 5' (mencionada en B) y la poliadenilación a 3'. Este ARNm maduro será finalmente traducido a una proteína.

D: Modificaciones postraduccionales. Son un conjunto de cambios químicos (glucosilación, fosforilación, metilación, acilación, acetilación, hidroxilación, carboxilación, ubiquitinación, etc.) en algunos aminoácidos constituyentes de las proteínas que pueden determinar, entre otras cosas, la actividad, recambio, localización, plegamiento y degradación proteica, así como la interacción con otras proteínas.

que define el sitio de iniciación de la transcripción del ADN a ARN mensajero (ARNm). Se encuentra hacia el extremo 5' y posee, aunque no siempre, un "motivo TATA" (secuencia de ADN en la región promotora) que será reconocido por un complejo proteico que finalmente acoplará a la ARN polimerasa II. Estas moléculas de ADN-proteínas forman el complejo de transcripción basal, y son los propios factores de transcripción los que se encargan de que la expresión génica sea histo específica.³

Otras estructuras que forman parte de la región regulatoria del gen son los denominados *enhancers* o resaltadores, que son secuencias de ADN que actúan a distancia del sitio de iniciación de la transcripción. La interacción de estos resaltadores con sus factores de transcripción provoca cambios en la velocidad de la transcripción. De esta forma no sólo se regula la expresión o no de un determinado gen (todo o nada), sino también su velocidad de transcripción y, en consecuencia, la mayor o menor cantidad de proteína sintetizada.

Hacia 3' de la región codificante, los genes poseen regiones que determinan la terminación de la copia del ARN y también señales que indican que este transcrito será modificado mediante la adición de una "cola" de nucleótidos de adenina (poliA), que le otorgarán mayor estabilidad al ARNm.²

Ya en su región codificante, la gran mayoría de los genes tiene exones (secuencias de nucleótidos que estarán presentes en el ARNm maduro) que están interrumpidos por intrones (segmentos en la región codificante del gen que no estarán presentes en el ARNm maduro).

La región codificante del gen se transcribe inicialmente a un transcrito primario (ARN con intrones y exones) que debe sufrir varias transformaciones para formar un ARNm maduro. Una de ellas consiste en la eliminación de los intrones mediante un proceso de corte y empalme (*splicing*) que deje unidos a los exones. Los intrones poseen secuencias de ADN específicas localizadas en sus márgenes 5' y 3', las uniones de empalme, necesarias para un corte y empalme adecuado. De hecho, muchas enfermedades se producen por mutaciones en las uniones de empalme. Otras modificaciones que sufre el transcrito primario son la adición de una cola de poliA en su extremo 3' y el agregado en su extremo 5' de un capuchón o *cap* (nucleótido metilado). Finalmente obtenemos un ARNm maduro, el cual se transporta al citosol celular para ser decodificado en los ribosomas y generar así una proteína, en el proceso denominado traducción.

Vemos así que la información necesaria para regular la expresión proteica en todos los tejidos, está en el ADN de los genes que conforman los cromosomas humanos. Son los genes los que tienen las secuencias que regulan la expresión de estas proteínas, los que determinan su adecuada función, su expresión en el lugar y tiempo correctos, y su cantidad.²

Recordando entonces las distintas aberraciones que se incluyen en el término "expresión incorrecta" de las proteínas y que finalmente llevarán al desarrollo de una enfermedad, podemos comprender a qué nivel génico se produce cada una de ellas: las mutaciones en las regiones codificantes del gen dan como resultado la formación de proteínas no funcionales o con su función alterada. Las mutaciones en las regiones reguladoras del gen (resaltadores y promotor), alteran el control transcripcional adecuado del gen en cuestión, dando como resultado modificaciones en la cantidad de proteína sintetizada (exceso o defecto), así como alteraciones de la histo especificidad y cronoespecificidad.²

Ante este panorama, resulta obvio que para tener un buen conocimiento de la enfermedad es necesario comprender la estructura y función de genes específicos y también la manera en que es controlada su expresión, tanto en el estado de salud como en el de enfermedad. El estudio de esta fisiología molecular ha entrado en una nueva fase de revelación experimental con el advenimiento de la transgénesis,⁴ ya que estas enfermedades pueden ser simuladas con animales *knockout* (animales genoprivos, en donde la expresión de uno o más genes se ha hecho inoperativa).

Los ratones *knockout* son ampliamente utilizados para generar modelos de enfermedad humana debido a su relativo bajo costo y a su corto período de gestación,⁵ pero debido a las diferencias fisiológicas entre ratones y seres humanos, se desarrollan día a día animales transgénicos filogenéticamente más cercanos al ser humano.

Al día de hoy, esta tecnología ha permitido crear una enorme cantidad de "enfermedades simuladas". Existen modelos de tumores del sistema nervioso central,⁶ de enfermedad de Parkinson,⁷ de espondiloartropatías,⁸ de esquizofrenia,⁹ de esclerosis múltiple¹⁰ y de síndrome metabólico,¹¹ entre muchas otras.

El usar animales de granja transgénicos no sólo aporta una ventaja filogenética evidente sino que nos permite tener períodos de observación más prolongados para estudiar el desarrollo de las enfermedades humanas. Con esta premisa, se

han generado cerdos transgénicos como modelo de retinitis pigmentosa¹² y de enfermedad de Alzheimer,¹³ así como ovejas transgénicas como modelo de fibrosis quística.¹⁴

Los animales transgénicos no sólo permiten estudiar la progresión natural de varias enfermedades, sino también evaluar nuevas estrategias terapéuticas para muchas enfermedades humanas, de una forma imposible de realizar en seres humanos.⁵

Hoy por hoy, la generación de animales transgénicos es esencial para el estudio *in vivo* de la función y la regulación de los genes durante el desarrollo, la organogénesis y el envejecimiento, así como para el estudio del normal estado de salud y el desarrollo de la enfermedad.

Animales transgénicos como biorreactores

Un buen sistema de producción de proteínas recombinantes debe poder elaborar grandes cantidades de ellas, asegurar que sean biológicamente activas e idénticas a las endógenas y tener un costo razonable.¹⁵

A pesar del menor costo que acarrea producir biomoléculas en microorganismos como bacterias y levaduras, estos organismos no realizan varias de las modificaciones postraduccionales que son requeridas para la correcta función *in vivo* de las proteínas de interés. Por este motivo, es de suma importancia poder producir altas concentraciones de estas proteínas en animales de granja (filogenéticamente más cercanos al ser humano) que funcionen como biorreactores.¹⁶

Estas proteínas de alto interés biomédico pueden ser producidas en varios fluidos biológicos, como sangre, orina, líquido seminal, saliva y leche, en función del promotor que se coloque en la construcción.¹⁷ A modo de ejemplo, se ha podido obtener eritropoyetina humana recombinante¹⁸ y alfa-1-antitripsina humana,¹⁹ en orina de ratón, mediante el promotor de la uromodulina.

No obstante, debido a la gran cantidad de volumen que se puede obtener y a la facilidad de la recolección, el vehículo de elección para la expresión de proteínas de valor biomédico en animales transgénicos es la leche. La glándula mamaria puede expresar más de 2 g de proteína recombinante por litro de leche.²⁰

Como existen proteínas que sólo se expresan en la leche (como la caseína, la lactoglobulina y la proteína ácida del suero),²¹ si se introduce por recombinación homóloga el gen de una proteína de interés bajo el promotor de una de estas proteínas, se obtendrá la expresión de la

proteína recombinante deseada en la leche del animal transgénico.

Actualmente, varias proteínas biológicamente activas se han producido con animales de granja transgénicos como biorreactores. Dentro de las más destacadas, cabe mencionar al activador tisular del plasminógeno,²² utilizado en pacientes con trombosis y producido en la leche de cabras transgénicas.

En la leche de ovejas transgénicas se obtuvo la expresión de alfa-antitripsina (tratamiento del enfisema pulmonar y de la fibrosis quística)²³ y de los factores de coagulación VIII y IX (tratamiento de la hemofilia A y B, respectivamente).^{24,25}

La leche de conejos transgénicos se está utilizando para la producción de calcitonina²⁶ (tratamiento de la osteoporosis y la hipercalcemia).

Por su parte, en la leche de vacas transgénicas se están sintetizando anticuerpos policlonales humanos²⁷ y lactoferrina humana,²⁰ entre otras proteínas de alto valor biomédico.

En la Argentina se obtiene actualmente un alto nivel de expresión de hormona de crecimiento humana (hasta 5 g/l) en la leche de vacas transgénicas.²⁸

Para comprender el alcance de esta tecnología, basta señalar que, según se calcula, sólo 2 animales transgénicos cubrirían la necesidad de factor IX de toda la humanidad²⁹ y sólo 16 vacas transgénicas podrían satisfacer el requerimiento mundial de hormona de crecimiento humana.³⁰

La compleja tarea de generar un animal de granja transgénico, los costos de su desarrollo y los minuciosos controles a los que deben ser sometidos los productos obtenidos por esta vía, hacen que todavía no se vea reflejado en el mercado todo el potencial de esta tecnología, pero cada vez se avanza más rápidamente para alcanzar este objetivo y ya se vislumbran los primeros resultados. Tanto Europa como EE.UU. han aprobado la venta en sus mercados de la primera antitrombina alfa humana obtenida en la leche de cabras transgénicas.

Animales transgénicos para xenotrasplantes

Actualmente, la necesidad de órganos humanos para trasplantes no es cubierta por las donaciones, por lo que una fuente alternativa de órganos podría reducir la distancia entre la oferta y la demanda. Por esta razón se trabaja en optimizar la donación de órganos de animales hacia seres humanos (xenotrasplantes).

Se sabe que el cerdo es el animal que reúne las mejores características para ser donante de órganos a seres humanos: sus órganos tienen tamaño,

anatomía y fisiología similares a los del ser humano, los cerdos son una especie prolífica y de rápido crecimiento, su mantenimiento es de bajo costo y existen técnicas de transgénesis establecidas, capaces de modificar la inmunogenicidad de los órganos porcinos.¹⁶

Uno de los principales obstáculos inmunológicos que surge frente a los xenotrasplantes es el rechazo hiperagudo que se produce ante la presencia del disacárido galactosa 1-3 galactosa de la superficie celular de varios mamíferos (como el cerdo) que no se encuentra presente en los seres humanos.³¹ Otro inconveniente es el rechazo vascular agudo.³²

Se han desarrollado animales transgénicos tendientes a evitar la respuesta inmunitaria que activa la cascada del complemento responsable de estos rechazos hiperagudo y agudo. Uno de los principales enfoques fue generar cerdos transgénicos que expresen algunas proteínas humanas que inhiben la cascada del complemento, como hCD59,³³ hCD46³⁴ y hDAF.³⁵

Otro enfoque para evitar el rechazo hiperagudo que deviene de la reacción inmunológica frente al epítipo galactosa 1-3 galactosa, fue desarrollar cerdos genoprivos (*knockout*) en los cuales se eliminó el gen de la enzima 1-3-galactosiltransferasa, lo que permite la generación de animales que no expresen el epítipo responsable del rechazo hiperagudo³⁶ y que, por lo tanto, son candidatos para el xenotrasplante. Al día de hoy, se han creado varios cerdos transgénicos como fuente de órganos para xenotrasplantes.^{37,38}

Animales transgénicos como productores de leche modificada

Otro claro ejemplo de los alcances de la transgénesis es la modificación de algunos constituyentes de la leche.

Un gran porcentaje de la población mundial, especialmente la de origen asiático, presenta algún grado de déficit en la actividad de la enzima lactasa (encargada de la degradación del principal azúcar de la leche: la lactosa). En el mercado existen fórmulas comerciales de leche deslactosada, pero actualmente se trabaja en el desarrollo de animales transgénicos que lleven una copia del gen que codifica para la enzima lactasa, de forma tal de obtener, directamente del animal, una leche libre de lactosa apta para el consumo humano.³⁹

También se trabaja en el desarrollo de animales genoprivos (*knockout*) para el gen de la lactoglobulina, para obtener leche destinada a consumidores alérgicos.^{40,41}

Por otra parte, se ha logrado producir lactoferrina humana en la leche de vacas transgénicas.²⁰ La lactoferrina humana no sólo tiene propiedades antibacterianas, antifúngicas y antivirales, sino que también posee efectos tróficos sobre el intestino. El propósito de producir leche vacuna con lactoferrina humana es el de mejorar la defensa inmunológica de los niños alimentados con leche de vaca.

De esta forma, vemos cómo la transgénesis se utiliza para lograr leches para consumo humano que puedan suplir deficiencias enzimáticas de la población, que sean aptas para el consumo de personas alérgicas y, también, para mejorar la calidad de la leche vacuna para aquellos niños que no pueden ser amamantados por sus madres.

CONCLUSIÓN

En la actualidad, tanto los procesos fisiológicos como muchas enfermedades humanas, están siendo analizados desde un punto de vista cada vez más "molecular".

La biología molecular aplicada a la medicina trae esperanza para el tratamiento de muchas enfermedades que podrían llegar a ser corregidas gracias a la biotecnología.

Parte importante e innegable de estos avances científicos, que ya forman parte de nuestra vida cotidiana, son los animales transgénicos, que día a día ayudan a comprender la fisiopatología de las enfermedades humanas al mostrar cuáles son los genes que se inducen o reprimen y cuáles las proteínas que se activan o inactivan. Existen organismos genéticamente modificados que son instrumentos para el ensayo de nuevas terapéuticas (fármacos, inhibidores enzimáticos, anticuerpos monoclonales, inhibidores de ARN y terapia génica entre otras);^{42,51} asimismo, animales que pueden ser potenciales donantes de órganos y que son diseñados estratégicamente para producir en sus fluidos (principalmente en la leche) proteínas humanas que son clave para el tratamiento de muchas enfermedades.

En plena época de avances biotecnológicos, se torna casi imprescindible que el médico generalista conozca las herramientas que ayudan a entender una nueva forma de ver la patología y que brindan enormes posibilidades de estudio y de desarrollo terapéutico. Tales herramientas ya no forman parte de la medicina del futuro, sino de la del presente.

Agradecimientos

El autor agradece al Dr. Diego J. Rodríguez Gil (Universidad de Yale, Facultad de Medicina, New

Haven, CT, EE.UU.) por la lectura crítica del manuscrito y por sus oportunas sugerencias. ■

BIBLIOGRAFÍA

- Leslie L, Rappo P, Abelson H, Jenkins RR, et al. Final Report of the FOPE II Pediatric Generalists of the Future Workgroup. *Pediatrics* 2000;106(5):1199-223.
- Sinclair J. ADN, ARN y proteínas. En: Cox T, Sinclair J. *Biología molecular en medicina*. Madrid: Ed. Médica Panamericana; 1998: Págs. 25-41.
- Solomon WB. Control transcripcional de la expresión génica humana. En: Cox T, Sinclair J. *Biología molecular en medicina*. Madrid: Ed. Médica Panamericana; 1998: Págs. 63-81.
- Cox, TM. *Biología molecular y el futuro de la medicina*. En: Cox T, Sinclair J. *Biología molecular en medicina*. Madrid: Ed. Médica Panamericana; 1998: Págs. 334-45.
- Gama Sosa MA, De Gasperi R, Elder G. Animal transgenesis: an overview. *Brain Struct Funct* 2010;214(2-3):91-109.
- Momota H, Holland EC. Mouse models of CNS embryonal tumors. *Brain Tumor Pathol* 2009;26(2):43-50.
- Harvey BK, Wang Y, Hoffer BJ. Transgenic rodent models of Parkinson's disease. *Acta Neurochir Suppl* 2008;101: 89-92.
- Milia AF, Ibba-Manneschi L, Manetti M, Benelli G, et al. HLA-B27 transgenic rat: an animal model mimicking gut and joint involvement in human spondyloarthritides. *Ann NY Acad Sci* 2009;1173:570-4.
- Desbonnet L, Waddington JL, Tuathaigh CM. Mice mutant for genes associated with schizophrenia: common phenotype or distinct endophenotypes? *Behav Brain Res* 2009;204(2):258-73.
- Holmoy T, Harbo H, Vartdal F, Spurkland A. Genetic and molecular approaches to the immunopathogenesis of multiple sclerosis: an update. *Curr Mol Med* 2009;9(5):591-611.
- Aleixandre de Artiñano A, Miguel Castro M. Experimental rat models to study the metabolic syndrome. *Br J Nutr* 2009;102(9):1246-53.
- Li ZY, Wong F, Chang JH, Possin DE, et al. Rhodopsin transgenic pigs as a model for human retinitis pigmentosa. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1998;39:808-19.
- Kragh PM, Nielsen AL, Li J, Du Y, et al. Hemizygous minipigs produced by random gene insertion and handmade cloning express the Alzheimer's disease-causing dominant mutation APPsw. *Transgenic Res* 2009;18:545-58.
- Harris A. Towards an ovine model of cystic fibrosis. *Hum Mol Genet* 1997;6:2191-4.
- Piedrahita J. Los animales transgénicos y su potencial en el desarrollo de la biotecnología animal. *Revista Corpoica* 1996;1:29-33.
- Melo EO, Canavessi AMO, Franco MM, Rumpf R. Animal transgenesis: state of the art and applications. *J Appl Genet* 2007;48(1):47-61.
- Dyck MK, Lacroix D, Pothier F, Sirard MA. Making recombinant proteins in animals-different systems, different applications. *Trends Biotechnol* 2003;21:394-9.
- Zbikowska HM, Soukhareva N, Behnam R, Chang R, et al. The use of the uromodulin promoter to target production of recombinant proteins into urine of transgenic animals. *Transgenic Res* 2002;11:425-35.
- Zbikowska HM, Soukhareva N, Behnam R, Lubon H, et al. Uromodulin promoter directs high-level expression of biologically active human alpha-1-antitrypsin into mouse urine. *Biochem J* 2002;365:7-11.
- Van Berkel PH, Welling MM, Geerts M, van Veen HA, et al. Large scale production of recombinant human lactoferrin in the milk of transgenic cows. *Nat Biotechnol* 2002;20: 484-7.
- Wilmot I, Archibald AL, McClenaghan M, Simmons FP, et al. Modification of milk composition. *Reprod and Fertil* 1991;43:265-75.
- Ebert KM, DiTullio P, Barry CA, Schindler JE, et al. Induction of human tissue plasminogen activator in the mammary gland of transgenic goats. *Biotechnology (NY)* 1994;12: 699-702.
- Wright G, Carver A, Cottom D, Reeves D, et al. High level expression of active human alpha-1-antitrypsin in the milk of transgenic sheep. *Biotechnology (NY)* 1991;9:830-4.
- Niemann H, Halter R, Carnwath JW, Herrmann D, et al. Expression of human blood clotting factor VIII in the mammary gland of transgenic sheep. *Transgenic Res* 1999;8: 237-47.
- Schnieke AE, Kind AJ, Ritchie WA, Mycock K, et al. Human factor IX transgenic sheep produced by transfer of nuclei from transfected fetal fibroblasts. *Science* 1997;278:2130-3.
- McKee C, Gibson A, Dalrymple M, Emslie L, et al. Production of biologically active salmon calcitonin in the milk of transgenic rabbits. *Nat Biotechnol* 1998;16:647-51.
- Kuroiwa Y, Kasinathan P, Matsushita H, Sathiyaselan J, et al. Sequential targeting of the genes encoding immunoglobulin-mu and prion protein in cattle. *Nat Genet* 2004;36 (7):775-80.
- Salamone D, Barañao L, Santos C, Bussmann L, et al. High level expression of bioactive recombinant human growth hormone in the milk of a cloned transgenic cow. *J Biotechnol* 2006;124(2):469-72.
- Rudolph NS. Biopharmaceutical production in transgenic livestock. *Trends Biotechnol* 1999;17:367-74.
- Redwan RM. Animal-derived pharmaceutical proteins. *J. Immunoassay Immunochem* 2009;30:262-90.
- Gallili U, Marcher B, Buehler H, Shohet S. Human natural anti-alpha-galactosyl IgG. II. The specific recognition of alpha (1-3)-linked galactose residues. *J Exp Med* 1985;162(2):573-82.
- Auchincloss H, Sachs DH. Xenogeneic transplantation. *Annu Rev Immunol* 1998;16:433-70.
- Fodor WL, Williams BL, Matis LA, Madri JA, et al. Expression of a functional human complement inhibitor in a transgenic pig as a model for the prevention of xenogeneic hyperacute organ rejection. *Proc Natl Acad Sci USA* 1994;91:11153-7.
- Diamond LE, Quinn CM, Martin MJ, Lawson J, et al. A human CD46 transgenic pig model system for the study of discordant xenotransplantation. *Transplantation* 2001;71:132-42.
- Zaidi A, Schmoeckel M, Bhatti F, Waterworth P, et al. Life-supporting pig-to-primate renal xenotransplantation using genetically modified donors. *Transplantation* 1998;65: 1584-90.
- Phelps CJ, Koike C, Vaught TD, Boone J, et al. Production of alpha 1,3-galactosyltransferase-deficient pigs. *Science* 2003;299:411-4.
- Sprangers B, Waer M, Billiau AD. Xenotransplantation: where are we in 2008? *Kidney Int* 2008;74:14-21.
- Ekser B, Rigotti P, Gridelli B, Cooper DK. Xenotransplantation of solid organs in the pig-to-primate model. *Transpl Immunol* 2009;21:87-92.
- Jost B, Vilotte JL, Duluc I, Rodeau JL, et al. Production of low-lactose milk by ectopic expression of intestinal lactase in the mouse mammary gland. *Nat Biotechnol* 1999;17:160-4.
- Avila Castañón L, Hidalgo Castro EM, del Río Navarro BE, Sierra Monge JJ. Cow-milk's protein allergy. *Rev Aler Mex* 2005;52(5):206-12.
- Selbert S, Bentley DJ, Melton DW, Rannie D, et al. Efficient

- BLG-Cre mediated gene deletion in the mammary gland. *Transgenic Res* 1998;7(5):387-96.
42. Remy S, Tesson L, Usal C, Menoret S, et al. New lines of GFP transgenic rats relevant for regenerative medicine and gene therapy. *Transgenic Res*. 2010. [Acceso: 26 de abril de 2010]. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20094912>.
 43. Hua Y, Vickers TA, Okunola HL, Bennett CF, et al. Antisense masking of an hnRNP A1/A2 intronic splicing silencer corrects SMN2 splicing in transgenic mice. *Am J Hum Genet* 2008;82(4):834-48.
 44. Wang L, Grisotti G, Roos R. Mutant SOD1 knockdown in all cell types ameliorates disease in G85R SOD1 mice with a limited additional effect over knockdown restricted to motor neurons. *J Neurochem* 2010;113(1):166-74.
 45. Schwegler C, Dorn-Beineke A, Nittka S, Stocking C, et al. Monoclonal anti-idiotypic antibody 6G6.C4 fused to GM-CSF is capable of breaking tolerance to carcinoembryonic antigen (CEA) in CEA-transgenic mice. *Cancer Res* 2005;65(5):1925-33.
 46. Aitken J, Loomes K, Scott D, Reddy S, et al. Tetracycline treatment retards the onset and slows the progression of diabetes in human amylin/islet amyloid polypeptide transgenic mice. *Diabetes* 2010;59(1):161-71.
 47. Leypoldt F, Choe C, Gelderblom M, von Leitner E, et al. Dimethylarginine dimethylaminohydrolase-1 transgenic mice are not protected from ischemic stroke. *PLoS One* 2009;4(10):e7337.
 48. Imbimbo B, Hutter-Paier B, Villetti G, Facchinetti F, et al. CHF5074, a novel gamma-secretase modulator, attenuates brain beta-amyloid pathology and learning deficit in a mouse model of Alzheimer's disease. *Br J Pharmacol* 2009;156(6):982-93.
 49. Roopenian D, Christianson G, Sproule T. Human FcRn transgenic mice for pharmacokinetic evaluation of therapeutic antibodies. *Methods Mol Biol* 2010;602:93-104.
 50. Erbel C, Chen L, Bea F, Wangler S, et al. Inhibition of IL-17A attenuates atherosclerotic lesion development in apoE-deficient mice. *J Immunol* 2009;183(12):8167-75.
 51. Leroy K, Ando K, Héraud C, Yilmaz Z, et al. Lithium treatment arrests the development of neurofibrillary tangles in mutant tau transgenic mice with advanced neurofibrillary pathology. *J Alzheimers Dis* 2010;19(2):705-19.