



ORIGINAL ARTICLE /ARTÍCULO ORIGINAL

DNA TRANSFECTION OF ANIMAL CELLS AS A TOOL USED IN ANIMAL BIOTECHNOLOGY

TRANSFECCIÓN DE ADN A CÉLULAS DE ANIMALES COMO HERRAMIENTAS UTILIZADAS EN BIOTECNOLOGÍA ANIMAL

Juan M. Iglesias Artola¹, Gianfranco Villamonte¹ & H. Mauricio Gonzales Molino^{1,2}

¹Facultad de Ciencias Biológicas – Universidad Ricardo Palma

²Laboratorio de Biotecnología y Fisiología Animal-Universidad Ricardo Palma
Av. Benavides 5450 Santiago de Surco, Lima, Perú
manuel9112@icloud.com

The Biologist (Lima), 13(1), jan-jun: 125-142.

ABSTRACT

Transfection is a process that involves inserting nucleotides into a cell, with the final product being transgenesis. In recent decades different methods have been developed such as biological, physical and chemical processes that have allowed the introduction of nucleotides into cells. In this review, some important aspects of the most used transfection methods in recent years, and their efficiency in the development of the industry, will be addressed. It concludes with an analysis of the ethical debates that have been generated within the field of animal biotechnology.

Keywords: cells mammalian, DNA, transfection, transgénesis.

RESUMEN

La transfección es un proceso que consiste en introducir nucleótidos en una célula, cuyo producto final es la transgénesis. En las últimas décadas se vienen desarrollando diferentes tipos de métodos como: biológicos, físicos y químicos que han permitido realizar esta introducción de nucleótidos hacia las células. En esta revisión se abordarán algunos aspectos importantes de los métodos de transfección más utilizados en los últimos años, y su eficiencia en el desarrollo de la industria. Se concluye con el análisis de los debates éticos que se han ido generando dentro del ámbito de la biotecnología animal.

Palabras claves: ADN, células de mamíferos, transfección, transgénesis.

INTRODUCCIÓN

La transfección ha permitido expresar genes de interés en células eucariotas. Esta capacidad ha posibilitado obtener un mejor entendimiento de la biología celular, la biología molecular y la genética de las células. Al expresar proteínas en células de animales, se ha podido entender aspectos detallados de la síntesis proteica, los

efectos de las mutaciones en su función en las proteínas, las interacciones entre éstas y las interacciones intercelulares. Además, esta tecnología ha llevado al desarrollo de animales transgénicos, a la fecundación *in vitro*, y a la posibilidad de usar la transferencia de genes para tratar desórdenes genéticos (Iannacone 2007).

Los virus fueron por mucho tiempo la forma más conveniente de transferir genes a células mamíferas. Graham & Van der Eb (1973), utilizaron el adenovirus 2 para transformar células de rata, mientras que Cepko *et al.* (1984) desarrollaron un retrovirus murínico para la introducción de secuencias de ADN en células mamíferas. Si bien los virus constituyen un medio eficiente para lograr la transfección *in vitro*, la construcción de los vectores es laboriosa, consume tiempo, y tiene diversas limitaciones para su uso *in vivo*.

La transfección por medio de vectores virales es altamente eficiente, otros métodos han sido desarrollados. Los trabajos realizados por Pagano *et al.* (1967) fueron pioneros en su área al lograr una alta transferencia de genes a

células mamíferas utilizando dietilaminoetil-dextrano (DEAE-D) mezclado con ARN y ADN (McCutchan & Pagano 1968). Después, se demostró que otros métodos también son eficaces: la encapsulación de ADN utilizando liposomas (Fraley *et al.* 1980, Fraley *et al.* 1981), la fusión inducida por polietilenglicol del ADN en los eritrocitos fantasma (Straus & Raskas 1980), la electroporación (Neumann *et al.* 1982), los coprecipitados de fosfato de calcio/ADN (Wigler *et al.* 1979), y los policondrosulfatos/dimetil sulfóxidos (Kawai & Nishizawa 1984). No existe un método indicado para todo tipo celular; sino, la eficiencia de los métodos utilizados varía con respecto a estos y en general, no fueron muy eficientes y presentaban una alta toxicidad celular.

Tabla 1. Genes reporteros comunes.

Gen	Detección
β -galactosidasa (β -gal)	Enzimático y colorimétrico
Cloranfenicol acetil transferasa (CAT)	Enzimático y radioactivo
Luciferasa	Luminiscencia
Proteína verde fluorescente (GFP)	Fluorescencia

En la actualidad existen tres grupos grandes de métodos de transfección que pueden ser utilizados (Kim & Eberwine 2010): *a*) los métodos biológicos, *b*) los métodos químicos y *c*) los métodos físicos.

El objetivo de esta revisión es mostrar un análisis de las principales estrategias experimentales desde su aplicación hasta las implicaciones bioéticas que puede tener la transfección en células de animales.

1. Métodos de transfección

Se han desarrollado diversas técnicas de transfección que cumplen con el propósito de transferir ácidos nucleicos al interior de las células. Existen ciertas características que permiten una transfección exitosa, estas son: alta eficiencia en el transporte del ácido

nucleico a la ubicación celular apropiada (el núcleo para el ADN plasmídico y el citoplasma para el ARN); baja toxicidad celular; mínima interferencia con la fisiología celular normal; uso sencillo y reproducibilidad (Schenborn 2000). Para el caso de la transfección génica utilizada para terapias se deben tomar consideraciones adicionales tales como la vida media y el transporte a un tipo de célula específica. También se debe decidir si se desea una transfección estable o transitoria. En esta sección se discuten los tres principales métodos de transfección: los métodos biológicos, químicos y físicos.

1.1 Transfección Transitoria

La transfección transitoria de genes está sujeta a varios parámetros. El método de transfección, la fisiología celular y el tipo

celular (cultivos en suspensión o adherentes), el método enzimático o colorimétrico utilizado para cuantificar la actividad del gen reportero, la cantidad de ADN y la normalización de la data. El período de expresión del gen en una transfección génica que varía entre 24 a 72 horas y para el éxito del procedimiento son críticas las condiciones celulares, con las células saludables y las que se encuentren en división las más susceptibles a aceptar plásmidos recombinantes. Para determinar la eficiencia y reproducibilidad de la transfección se puede utilizar un segundo gen reportero que exprese un producto génico que pueda ser detectado y medido de manera sencilla. Tal gen reportero no debe estar presente en el genoma del tipo celular o, en el peor de los casos, puede estar presente pero debe ser expresado en bajos niveles. Los genes reporteros más utilizados se presentan en la Tabla 1.

Es importante recalcar que la eficiencia en la expresión del gen reportero disminuye drásticamente con la integridad del plásmido y su habilidad por llegar al núcleo (Zohar *et al.* 2001).

Los métodos de transfección transitoria generalmente dirigen el ADN plasmídico al citoplasma y no está claro qué porcentaje de estas moléculas son lineales o circulares los alcanzan el núcleo celular. Además, los parámetros experimentales deben ser definidos con cuidado para lograr cierto grado de reproducibilidad. Se ha sugerido que entre los diferentes mecanismos, la difusión pasiva de los plásmidos a través del citoplasma y los poros nucleares representa la forma más probable por la cual los genes reporteros pueden migrar al núcleo celular y ser activados transcripcionalmente. Sin embargo, existe evidencia que sugiere otro mecanismo para explicar la transferencia del ADN plasmídico al núcleo celular, basándose en señales de importación del ADN (Vacik *et al.* 1999, Zohar *et al.* 2001). Se piensa que existe una interacción proteína-ADN plasmídico en el

citoplasma y que tales interacciones, con factores de transcripción producen señales de localización nuclear, permitiendo la importación de ADN exógeno al núcleo.

1.2 Métodos Químicos

La eficiencia de la transfección en esta caso depende de factores tales como la proporción ácido nucléico / químico, pH de la solución y las condiciones de la membrana celular, todo esto lleva a que el proceso de transfección tenga una baja eficiencia, especialmente *in vivo*, comparado con los métodos mediados por virus. Sin embargo, estos métodos presentan baja citotoxicidad, no existe mutagénesis, no hay un ADN extra y no posee límites de tamaño para el ácido nucléico. Se debe tomar en cuenta que la eficiencia de la transfección química varía dependiendo del tipo de célula a utilizar (Iannacone 2007)

1.2.1. Co-precipitación con fosfato de calcio.

En este método el calcio se asocia con las cargas negativas del ácido nucléico. La adición de un buffer fosfato resulta en la precipitación del ADN con el calcio y el fosfato, formando pequeñas partículas. Lo que posibilita que el ADN pueda ingresar a las células por fagocitosis (Loyter *et al.* 1982). Para que la transfección sea satisfactoria se debe controlar el tamaño del precipitado; puesto que, se ha correlacionado los precipitados pequeños con una mayor eficiencia de transfección (Jordan *et al.* 1996). Para esto se debe tomar en consideración que el tamaño de las partículas es sensible a la concentración de calcio y ADN, el pH, la temperatura y el modo en el que el buffer salino y la solución de ADN son mezclados durante la precipitación. Para lograr una alta concentración de ADN, se puede incluir un plásmido inerte (ADNp) genómico de alto peso molecular (Strain *et al.* 1985).

1.2.2 DEAE - Dextrano
Dietilaminoetildextrano. DEAE-dextrano, es un reactivo polimérico policatiónico que se une y transfecta los ácidos nucleicos

(McCutchan & Pagano 1968). El complejo DEAE-dextrano/ADN puede ser tomado por la célula por endocitosis o fagocitosis (Luthman *et al.* 1983, Yang Yang 1997). Se ha encontrado que el tratamiento con cloroquina incrementa la expresión del ADN transfectado en algunos tipos celulares, posiblemente al neutralizar el pH de los lisosomas en los cuales el ADN es internalizado (Luthman *et al.* 1983). Es necesario que durante el proceso de transfección la morfología celular sea monitoreada puesto que el DEAE-dextran puede ser altamente tóxico para las células.

1.2.3 Liposomas catiónicos El primer lípido catiónico sintético publicado como un transportador de ácidos nucleicos fue el bromuro de 1,2-dioleiloxipropil-3-trimetilamonio (DOTMA) desarrollado por Felgner *et al.* (1987). Desde entonces se han diseñado diferentes tipos de lípidos catiónicos sintéticos para la transfección, conservando la misma estructura general del DOTMA, con un grupo mono o policationico covalentemente adherido a una porción lipofílica. La región catiónica de la molécula se asocia con las cargas negativas de los ácidos nucleicos. Se ha correlacionado una carga total positiva o neutra del complejo lípido/ADN con una mayor eficiencia de transfección de células *in vitro*. Se piensa que la carga positiva o neutra reduce la repulsión electrostática entre el ácido nucleico y la membrana celular cargada negativamente. Se piensa, que el complejo lípido/ADN ingresa a la célula por endocitosis. Se puede liberar el ácido nucleico de las vesículas endosomales utilizando otros lípidos, tales como dioleilfosfatidiletanolamina (DOPE) en la formulación del liposoma (Farhood *et al.* 1995).

Existen tres parámetros esenciales que necesitan ser optimizados para poder utilizar cualquier liposoma en la transfección (Wong *et al.* 1980, Straubiger & Papahadjopoulos 1983). Cada tipo celular requiere que se

determine una cantidad óptima de ADN en combinación con la concentración del lípido catiónico. Existe una concentración óptima de ADN y lípido para cada tipo de células, con una alta toxicidad en concentraciones elevadas y baja eficiencia en bajas concentraciones. Otro parámetro que requiere la optimización es el intervalo de tiempo de la transfección, dependiendo de los reactivos y las condiciones utilizadas, el intervalo de tiempo puede variar entre 1 a 24 horas. Las incubaciones más largas son por lo general más tóxicas.

1.3 Métodos físicos

Los métodos de transfección físicos se han desarrollado recientemente y utilizan una diversa gama de herramientas físicas para transportar los ácidos nucleicos al interior de las células. Estos métodos incluyen la microinyección directa, el transporte balístico de partículas, la electroporación, y la transfección basada en láseres (Mehier-Humbert & Guy 2005).

1.3.1 Microinyección. En general, el método de micro inyección introduce de manera directa el ácido nucleico al citoplasma ó núcleo (Ikeda *et al.* 1995, Martinou *et al.* 1995). Este método es efectivo en la introducción de los ácidos nucleicos dentro de las células pero requiere de mucha habilidad y bastante tiempo ya que puede ocasionar la muerte celular.

Esta técnica ha sido aplicada exitosamente para transferir genes a células musculares y particularmente a células epiteliales (Davis *et al.* 1993, Sawamura *et al.* 2002). Una limitación de este procedimiento es la falta de control de parámetros como la concentración de ADN plasmídico, la degradación y la eficiencia en la transferencia de genes. Sin embargo para aplicaciones específicas como la transferencia ectópica de genes, este procedimiento tiene ventajas sobre los otros métodos.

1.3.2 Métodos balísticos. El transporte de

partículas por medios balísticos emplea partículas de oro que se conjugan con los ácidos nucleicos (Lo *et al.* 1994, O'Brien & Lummins 2006). Estos conjugados son disparados a alta velocidad dentro de las células receptoras "pistola de genes". Dentro de la célula el ácido nucleico se disocia de las partículas de oro. Este método es sencillo y confiable pero requiere de equipos y causa daños físicos a las muestras.

Se han diseñado diferentes tipos de instrumentos para este método. Los ácidos nucleicos son primero precipitados en esferas de oro y depositas en hojas de Mylar. Las partículas de ADN/oro o ARN/oro son colocadas en el instrumento para después ser aceleradas por una descarga de alto voltaje y lanzadas a las células o tejidos de elección. Los dispositivos comerciales utilizan un pulso de helio a baja presión para acelerar las esferas de oro. Con estos dispositivos, las muestras pueden ser preparadas utilizando tubos recubiertos con partículas de oro.

1.3.3 Electroporación. Es el método físico más empleado; sin embargo, se desconoce el mecanismo exacto, pero se supone que los pulsos eléctricos perturban las membranas celulares, produciendo agujeros por los cuales los ácidos nucleicos pueden ingresar (Inoue & Krumlauf 2001). Debido a que la electroporación es un método sencillo y rápido, es posible transfectar un gran número de células en poco tiempo una vez que se han determinado las condiciones óptimas para la electroporación. Las células son suspendidas en una concentración de $10^6 - 10^7$ células·mL⁻¹ en un buffer salino de electroporación, buffer salino HEPES o medio de cultivo sin suero (las células adherentes necesitan ser tripsinizadas antes de la electroporación). Las células son después transferidas a una cubeta estéril y se añade el ADN a transferir. Para los experimentos en los que se necesita una expresión transitoria, se añade ADN super enrollado a una concentración de 10-40 µg·

mL⁻¹; para una transfección estable se añade ADN lineal con una concentración de 1-20 µg·mL⁻¹. Después de mezclar las células con el ADN para la transfección, son sometidas a uno o más electro-shocks, luego estas células son incubadas en medio selectivo después de un periodo de recuperación.

Los parámetros más críticos a optimizar cualquier tipo celular son la magnitud del voltaje y la duración del pulso de corriente. Para esto, son efectivas las combinaciones de voltajes altos con pulsos de corto tiempo o voltajes bajos con tiempos más largos. Sin embargo, las condiciones óptimas dependen de las características de la célula, conjuntamente con la conductividad del buffer de electroporación y la temperatura. La electroporación puede realizarse a temperatura ambiente o en hielo, pero es necesario determinar empíricamente las condiciones óptimas para cada tipo célula (Chu *et al.* 1987). El voltaje excesivo y/o la duración de los pulsos resulta en la muerte celular. Durante el establecimiento de las condiciones adecuadas de electroporación se debe monitorear el ratio entre muerte celular y eficiencia de transferencia para un tipo celular dado. La transfección óptima debe ocurrir bajo condiciones que causen aproximadamente el 50 % de muerte celular (Schenborn 2000).

1.3.4 Láser. La transfección mediada por láser (también conocida como optoporación o fototransfección) utiliza un pulso de láser para irradiar la membrana celular con la finalidad de formar un poro momentáneo (Shirahata *et al.* 2001, Barrett *et al.* 2006). Cuando el láser induce la formación del poro, los ácidos nucleicos en el medio son trasferidos dentro de la célula debido a la diferencia osmótica entre el medio y el citosol. El método de láser permite observar a la células transfectada y hacer poros en cualquier ubicación de la célula. Este método puede ser aplicado a células pequeñas, debido a que utiliza un láser, sin embargo es necesario contar con un sistema de

microscopía láser.

Además de los métodos mencionados, existen otros métodos físicos como el ultrasonido (sonoporación) y la utilización de un campo magnético (magnetofección) (Kim *et al.* 1996, Scherer *et al.* 2002).

1.4. Transfección Estable

Para la generación de líneas celulares estables el transgen de interés debe ser co-transfectado con un marcador de selección que produzca resistencia a una droga. Para cada ensayo de transfección estable se debe monitorear de manera cuidadosa la integración del transgen en el genoma de la célula blanco. En un experimento de transfección típico se debe permitir a las células recuperarse de la transfección por un periodo de 24 a 72 horas en la ausencia de selección. Esto permite a la célula expresar la cantidad necesaria de la enzima de resistencia para proteger a las células transfectadas establemente contra la droga. Después de 48 o 72 horas de la transfección el medio de cultivo debe ser cambiado y reemplazado con medio nuevo

complementado con la droga. La selección se produce dentro de las primera a las tercera semana posterior a la transfección con cambios frecuentes del medio de cultivo selectivo. Finalmente la integridad y número de copias del gen debe ser determinado por Southern Blot.

El método más utilizado en la investigación clínica para lograr una transfección estable es el de la transfección mediada por virus, también conocida como transducción (Pfeifer & Verma, 2001). Este método es altamente eficiente debido a la naturaleza viral de la integración en el genoma del huésped. Por ejemplo, se ha utilizado el virus de la leucemia murine (MLV) como vector viral para establecer la expresión sostenible de genes de interés en humanos (Roesler *et al.* 2002). El MLV integra su ADN en el genoma del hospedero, el cual es posteriormente expresado. El ADN del MLV integrado se replica con el genoma del hospedero, lo que permite la expresión sostenible del gen de interés (Figura 1).

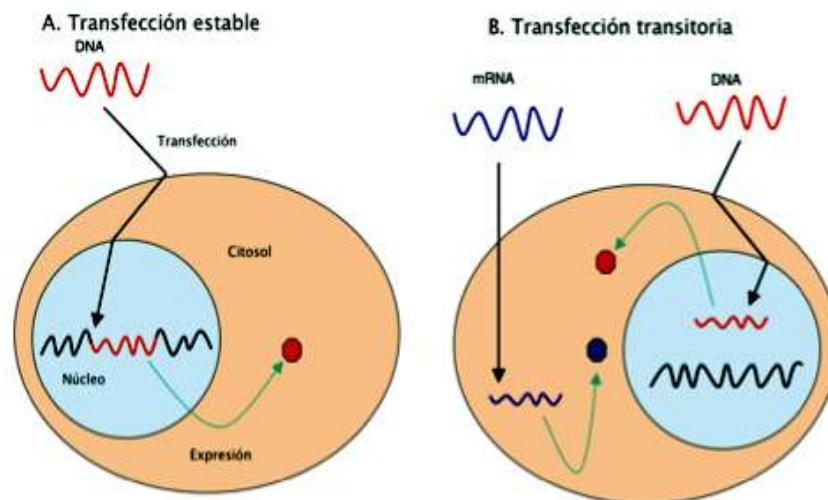


Figura 1. Diagrama esquemático de dos transfecciones diferentes. A. Transfección estable. El ADN foráneo (rojo) es llevado al núcleo al pasar por la membrana celular y nuclear. El ADN es integrado al ADN genómico (negro) y expresado de manera sostenible. B. Transfección transitoria. El ADN foráneo es transportado dentro del núcleo pero no es integrado en el genoma. El mRNA (azul) también es llevado al citosol, en donde es traducido. Los hexágonos representan las proteínas expresadas a partir de los ácidos nucleicos transfectados. Las flechas negras muestran el transporte del ácido nucleico. Tomado de Recillas-Targa (2006).

La citotoxicidad y la inmunogenicidad representan las mayores desventajas de la transfección mediada por virus. La introducción del vector viral puede causar una reacción inflamatoria y una mutación insercional, debido a que ciertos vectores virales se integran de manera azarosa al genoma del hospedero, lo cual puede afectar a genes supresores de tumores, activar oncogenes, o interrumpir genes esenciales (Woods *et al.* 2003). Otra desventaja de este método es que la cápside de un virus tiene espacio limitado para que un gen extraño pueda ser infectivo.

2. Aplicaciones de la Transfección

La transfección es una herramienta para la modificación genética. Gracias a sus múltiples métodos es posible realizar innumerables aplicaciones como:

- ? Estudios genéticos: genes 'knockout' o 'knockdown' para estudiar su expresión fenotípica.
- ? Terapia génica: Cura de enfermedades.
- ? Proteínas recombinantes: Uso de animales como “bio-fábricas”.
- ? Alimentos transgénicos: Modificaciones genéticas principalmente para alimentación.
- ? Biorremediación: Reducción del impacto ambiental de la industria ganadera.
- ? Mascotas transgénicas: Peces brillantes, gatos hipoalérgicos, etc.

A continuación analizaremos cada una de ellas utilizando ejemplos realizados en empresas y universidades.

2.1. Estudios Genéticos

La transfección puede ser útil para el estudio del funcionamiento de genes. Esto se puede realizar por varios medios: introduciendo un gen de otro organismo (transgénesis), mediante un knockout o knockdown que anule la expresión de un gen (Cryan & Mombereau 2004), aumentando la expresión del gen de estudio (Yanni 2004), o alterando la estructura

de la proteína que codifica (Ripps *et al.* 1995).

De esta manera, este procedimiento ha permitido la realización de estudios sobre el funcionamiento de diversos genes humanos, principalmente con fines médicos. Estas investigaciones incluyen el análisis de la influencia genética en trastornos psicológicos y neurodegenerativos, mediante la evaluación del fenotipo producido utilizando mecanismos de transfección (principalmente utilizando modelos murinos). Así vemos que la transfección ha permitido evaluar el impacto de la reducción de la enzima SOD-1 en la neurodegeneración producida en la Esclerosis Lateral Amiotrófica (ELA) (Ripps *et al.* 1995). Asimismo, ha permitido el estudio de la relación de diversos receptores de neurotransmisores como la depresión (Cryan & Mombereau 2004), el autismo, la esquizofrenia, el Alzheimer, la enfermedad de Huntington, entre otros (Bucán & Abel 2002).

La transfección también ha permitido evaluar el impacto de los genes en la regulación enzimática del metabolismo de lípidos, relacionada con enfermedades cardiovasculares como la aterosclerosis (Yanni 2004).

2.2 Terapia Génica

La terapia génica es una importante aplicación de la transfección a la medicina. Muchos de sus usos continúan en experimentación “*in vitro*” o en animales, sin embargo, este campo tiene un gran potencial:

- ♦ Cáncer.
- ♦ Enfermedades congénitas.
- ♦ Curación de heridas, quemaduras y otras afecciones epiteliales.

La terapia génica se puede emplear para curar diversos tipos de cáncer mediante múltiples métodos. Uno de estos métodos es el de “vacunación” anti-tumoral. Este consiste en utilizar la transfección para producir antígenos asociados al crecimiento tumoral. Además, se puede utilizar esta tecnología para inducir la

producción de citoquinas que inhiban la angiogénesis. Asimismo, se puede usar para inducir el metabolismo de protoxinas por las células tumorales, haciendo que los medicamentos contra el cáncer sean de un impacto más directo y controlado (Vile *et al.* 2000).

La terapia génica puede asimismo ser utilizada para suprimir o controlar enfermedades congénitas, o aliviar sus síntomas, evitando a su vez los efectos secundarios que podría producir el uso de fármacos (Spink & Geddes 2004). En el caso de quemaduras, cortes, o afecciones epiteliales provocadas por diversas enfermedades (como el acné o el lupus eritematoso), muchas veces, la curación es lenta y deja muchas cicatrices debido a la ausencia o a la baja producción de factores de crecimiento. La transfección en tejidos epiteliales, probada a la fecha sólo en cultivos celulares y ratones, ha comprobado ser útil tanto para fomentar la regeneración de dichos

tejidos, como para inducir su vascularización y reducir las cicatrices (Branski *et al.* 2006, Strulovici *et al.* 2007).

2.3 Proteínas Recombinantes

Uno de los principales objetivos de la modificación genética de animales es la producción masiva de proteínas. Al buscarse en estos casos la producción, en lugar de la expresión en el animal en sí, la modificación genética en estos casos se enfoca en la leche de diversos mamíferos (ovejas, cabras, vacas, chanchos, entre otros). Esta producción masiva se concentra en proteínas humanas de aplicación biomédica como algunos factores de coagulación, fibrinógeno, colágeno, enzimas y anticuerpos de origen humano; además de en la producción de proteínas de origen viral que podrían servir para inmunizar a las personas ante diversas enfermedades (Durocher *et al.* 2002, Kling 2009) (ver Tabla 2).

Tabla 2. Proteínas producidas en diversos animales transgénicos.

Proteína	Enfermedad/Objetivo	Animal
Activador tisular del Plasminógeno	Trombosis	Cabra, ratón
Anti CD137	Enfermedades autoinmunes	Cabra
Albumina de suero humano	Mantenimiento de volumen sanguíneo	Ratón, vaca
- lacta albúmina	Anti -infección	Vaca
-I antitripsina	Deficiencia lleva enfisema	Oveja
- glucosidasa	Enfermedad de Pompe	Conejo
Antitrombina	Trombosis	Cabra
CFTR	Fibrosis quística	Oveja, ratón
Calcitonina humana	Osteoporesis	Conejo
Colágeno I	Reparación de Tejidos	Vaca
Colágeno II	Artritis reumatoidea	Vaca
Decarboxilasa del ac. Glutámico	Diabetes tipo I	Cabra, ratón
Factor VIII	Hemofilia	Cerdo, Oveja
Fibrinógeno	Curación de heridas	Oveja, vaca
Lactoferrina	Infección antrítica	Vaca
msp-1	Malaria	Ratón
Pro542	VIH	Cabra, ratón

Una de estas proteínas con fines terapéuticos, ATryn (Antitrombina III), producida en cabras transgénicas creadas por la empresa GTC Biotherapeutics, fue diseñada para combatir la trombosis. Esta fue la primera de estas proteínas en ser aprobada para su comercialización en Agosto del 2006 por la Comisión Europea, luego de un reporte positivo de parte de la EMEA (Agency de Medicinas Europea) (Schmidt 2006). Posteriormente, luego de más ensayos, La FDA aceptó su comercialización en EEUU en el 2009 (Fox 2008, Kling 2009).

2.4 Alimentos Transgénicos

La nutrición es una necesidad fisiológica básica para el ser humano (Maslow 1943). Por ello, el desarrollo de mejoras en las propiedades nutricionales de los alimentos es una prioridad para la humanidad. Tradicionalmente estas mejoras se han conseguido mediante la selección artificial, es decir, eligiendo a animales con características deseadas para incrementarlas o mantenerlas mediante su cruce. Sin embargo, esta técnica demora mucho tiempo y no siempre se obtienen todas las características deseadas. En la actualidad es posible realizar estas mejoras mucho más rápido y con total precisión, gracias a la transfección.

Un importante rubro alimenticio en el que se enfoca la transfección es el de la leche. La leche es un alimento muy consumido a nivel mundial. No obstante, mucha gente tiene problemas con su consumo, debido a la intolerancia a la lactosa, la cual se encuentra en 5% aproximadamente en la leche. Además, pese a tener una alta concentración de proteínas, no todas son de alta calidad por lo cual, no todas nutren de la misma forma a quien la consume. Por otro lado, la leche tiene una alta proporción de grasa (3-5% (aprox.)). No obstante, todas esas desventajas se pueden superar mediante la transfección (Yom & Bremel 1993).

Así, por ejemplo, la inhibición de la expresión de la acetil co-A carboxilasa, que se encarga de sintetizar grasa en las glándulas mamarias, puede reducir la concentración de grasa de la leche. Otra modificación importante, sería la de inhibir la producción de α -lactalbúmina, la cual está relacionada con la síntesis de la lactosa, con lo cual se puede obtener leche con una concentración muy reducida o libre de ella. Además, la inhibición de la α -lactoglobulina en la leche de rumiantes puede eliminar las alergias relacionadas a su consumo, y otros ejemplos como el de la expresión de lisozima humana en la leche (proteína con cualidades anti-patogénicas y mejoradora de la flora intestinal) puede mejorar en gran medida la calidad nutricional de la leche (Maga *et al.* 2006).

También se ha utilizado la transfección para mejorar la cantidad de carne en animales. Esta tecnología se ha aplicado principalmente en peces, puesto que los métodos de transfección han sido más eficientes en ellos hasta la fecha. Quizá el caso más conocido sea el del salmón. Este animal ha sido modificado para expresar una mayor concentración de la hormona del crecimiento, lo que permite un crecimiento mucho mayor en poco tiempo (Berkowitz & Kryspin-Sørensen 1994, Ledford 2013) (fig 2).

2.5 Biorremediación

El impacto ambiental de los animales transgénicos suele causar temor a la población (Verhoog 2003). Sin embargo, en la realidad, entre otras cosas, uno de los objetivos de la creación de animales genéticamente modificados es el de mejorar la calidad ambiental. Con este fin, se intenta reducir los productos dañinos para el ambiente producidos en la acuicultura y ganadería, desde los medicamentos utilizados (creando animales resistentes a las enfermedades) hasta los productos del metabolismo animal (Curran & Koszarycz 2004, Niemann & Kues 2007).



Figura 2. Comparación del crecimiento de un salmón silvestre y un salmón transgénico con incremento en la expresión de la Hormona del Crecimiento (Berkowitz & Kryspin-Sørensen, 1994).

Un ejemplo importante de este interés en el ambiente es el de Enviropig™ (cerdo transgénico desarrollado por Golovan *et al.* (2001b)). El objetivo de su creación fue la reducción de la contaminación por fosfatos provocada por la crianza de cerdos. Esta polución es provocada por la degradación deficiente de los fitatos provenientes principalmente de los cereales en animales monogástricos. El Enviropig™ fue creado mediante la inserción de un constructo de los genes *psp* (proteína secretora de la parótida) y *appA* (polifosfatasa ácida o fitasa, proveniente de *Escherichia coli*) que corrigen esta degradación deficiente, reduciendo la emisión de fosfatos provenientes del metabolismo de cerdos (Golovan *et al.* 2001a, Rowland 2002, Niemann & Kues 2007).

2.6 Mascotas transgénicas

La transfección permite la obtención de mascotas con características deseables comercialmente que, sin embargo, no se encuentren en estado natural. Estos han creado un nuevo nicho de mercado con un enorme potencial de crecimiento (Iannacone 2007).

Un ejemplo muy interesante de mascotas transgénicas es el de los peces transgénicos. Inicialmente, Gong y colaboradores en la Universidad de Singapur, modificaron “peces cebra” (*Danio rerio*) para expresar las proteínas fluorescentes GFP (proteína verde fluorescente), YFP (proteína amarillo fluorescente) y RFP (proteína rojo fluorescente) que actúan en asociación con el gen *mylz2*, produciendo diferentes peces de

distintos colores fluorescentes. En 2003, la Universidad de Singapur realizó un trato con Yorktown Technologies, que comenzó a comercializarlos como mascotas bajo el nombre comercial de "GloFish" luego de una evaluación de su posible impacto ambiental y alimenticio llevado a cabo por la FDA, 2003. Además de estos, existen "peces Medaka" (*Oryzias latipes*) fluorescentes, creados por investigadores de la Universidad de Taiwan y comercializados en dicho país (Gong *et al.* 2003; Scotto & Serna 2013) (Figura 3).

Otro caso importante de mascotas genéticamente modificadas es el de los gatos hipoalergénicos, actualmente en desarrollo por la empresa Felix Pets en EEUU. La expresión de la proteína Fel-dI (principal alérgeno, responsable del 90% de los casos de alergia a gatos en humanos) se puede inhibir, silenciando el gen que la produce mediante la inserción de una secuencia llamada *neo-r* en el primer o segundo intrón del gen (Avner *et al.* 2012, Butt *et al.* 2012).



Figura 3. "Glofish": *Danio rerio*, "peces zebra" que expresan proteínas fluorescentes GFP, YFP y RFP que actúan en asociación con el gen *mylz2*. Tomado de Gong *et al.* (2003).

3. Bioética, Opinión Pública y Reglamentación de la Transfección

Como hemos visto, la transfección tiene múltiples aplicaciones con enorme potencial para mejorar la nutrición y la salud a nivel global. Pese a esto, existe un debate continuo de la opinión pública y los legisladores respecto a cuales deberían ser los límites de esta biotecnología, fundamentado tanto en principios bioéticos como en numerosas preocupaciones de diversos tipos, tanto justificadas como injustificadas (Spink & Geddes 2014, Berkowitz & Kryspin-Sørensen 1994, Verhoog 2003, Berkowitz 1993, Ormandy *et al.* 2011).

Existen cuatro principios fundamentales de la bioética: *autonomía* (capacidad de decisión de cada individuo), *beneficencia* (realizar el bien a los demás), *normal eficiencia* (no perjudicar a los demás) y *justicia* (buscar la igualdad de derechos) (Cooley *et al.* 2004, Tsai, 2005).

Siguiendo estos principios, resulta importante considerar los métodos de transfección *per se*, y cómo afectan el bienestar e integridad de los animales. La mayoría de métodos empleados son invasivos porque requieren de acciones como la obtención de muestra seminal, vasectomía o implantación de embriones. Además, la mayoría de métodos son ineficientes (menos de 1 % en mamíferos y entre 10 y 70 % en peces) que conlleva el empleo de gran cantidad de animales, y en muchos casos su muerte. En ese sentido, la transfección al atentar contra la vida animal, atenta contra todos los principios mencionados. Sin embargo, es importante considerar que dichas acciones invasivas no son únicas de la transfección, que se está buscando desarrollar métodos menos invasivos, que se está investigando para mejorar la eficiencia de los métodos, y que esta biotecnología busca mejorar en muchos sentidos la calidad de vida del ser humano; argumentos que en conjunto justifican, al menos en el sentido de la intención, la

transfección dentro de los principios bioéticos (Niemann & Kues 2007, Mephram *et al.* 1998, Christiansen & Sandøe 2000, Lassen *et al.* 2006, Ormandy *et al.* 2011).

En segundo lugar, es relevante aplicar los principios bioéticos al debate sobre la naturalidad en animales transgénicos. En este sentido, podemos analizar el concepto de “*telos*” planteado por Aristóteles. Este concepto implica la esencia y propósito de la existencia de cada ser vivo. En ese sentido, la mayor parte de organismos modificados mediante la transfección estarían en conflicto con su “*telos*” debido a que su esencia se ha modificado para desvirtuar su propósito (Rollin 1998). Sin embargo, pese a que este argumento es en parte cierto, su aplicación práctica debe considerarse inválida, puesto que la crianza tradicional de animales también modifica esta esencia mediante cruces selectivos y que el carácter “natural” de los seres vivos no necesariamente implica que su fenotipo pueda considerarse bueno tanto para el animal como para el ambiente (Verhoog 2003, Ormandy *et al.* 2011).

Otra cuestión importante a considerar, y quizá la más importante para la opinión pública es la de los alimentos transgénicos. En esta cuestión el debate se centra en la seguridad de estos alimentos para el consumo humano y en si se debería permitir que se patenten los alimentos, dejando el control del suministro alimenticio esencialmente en mano de las empresas. Una mirada objetiva a ellos nos permite ver que la única diferencia entre ellos y su versión “normal” es la proteína insertada. En ese sentido, probablemente la mejor solución desde el punto de vista bioético sería informar a los consumidores sobre la proteína foránea que contiene el alimento para evitar riesgos a la salud como potenciales alergias (Berkowitz & Kryspin-Sørensen 1994, Ledford 2013, Jefferson 2006).

Finalmente, es importante considerar las

implicancias bioéticas del posible impacto ambiental producido por los animales transgénicos. En este lado se debe considerar la posibilidad de la alteración del ecosistema debida a la introducción del gen foráneo en una población silvestre. Existe la posibilidad de la reproducción de peces transgénicos e incluso de su cruzamiento con individuos no transgénicos de la misma especie o especies cercanas (Scotto 2012; Oke *et al.* 2013). Sin embargo, esto se podría evitar empleando métodos que eviten la libre reproducción de organismos transgénicos como su contención física o la inducción de poliploidización para hacerlos estériles (Pandian & Koteeswaran 1998, Wong & Van Eenennaam 2008).

Además, es importante considerar la posibilidad de que los animales transgénicos tengan un mayor “fitness” tanto en el caso de que se puedan reproducir como en el de que no. Esto depende de cómo afecte la modificación al animal en el sentido de su resistencia a enfermedades, facilidad de alimentación, etc (Robert *et al.* 2004, Robert *et al.* 2006).

Un caso práctico que sería adecuado revisar es el del salmón transgénico. Este animal desarrollado por investigadores canadienses en 1989, es propiedad actualmente de la empresa AquaBounty, la cual ha pasado muchos años buscando su aprobación en EEUU. En 2012, luego de largos años de espera la FDA publicó un borrador de su posible impacto ambiental, en el cual declaraba que no existían impactos significativos que pudiese causar este animal. Esta ausencia de impactos se explica debido a un “fitness” reducido causado por una menor resistencia de estos animales a enfermedades, a resistentes barreras de contención física creadas por la empresa y a la producción de individuos estériles mediante el cruce de hembras trasgénicas homocigotes con reversión de sexo y hembras no transgénicas. Así, como vemos este salmón cumpliría con los principios de la bioética siempre y cuando

se advierta a la población de su condición transgénica (Smith *et al.* 2010, Ledford 2013, Robert *et al.* 2004).

Sin embargo, como podemos ver en este caso, a veces la ética es superada por los intereses creados. Así vemos que la opinión pública y los políticos en EEUU han sido influenciados por empresas criadoras de salmón no transgénico para evitar la aprobación de este animal. Estas empresas, principalmente establecidas en los estados de Alaska, Washington y Oregón consideran a este salmón una amenaza puesto que crece en menor tiempo y consume menos alimento que los que ellos producen, lo que brindaría a AquaBounty una enorme ventaja competitiva desde el punto de vista económico. Debido a esto, a diferencia de los GloFish (los cuales no afectan a ninguna industria pre-existente), la FDA aún no le da su aprobación a este alimento pese a que cumple con todos los requisitos exigidos y ha superado todos los plazos establecidos (FDA 2003, Robert *et al.* 2004, Maxmen 2012, Ledford 2013).

La transfección es una herramienta biotecnológica de gran potencial, cuya bioética es debatible en el sentido de su aplicación y afectación a la “esencia” de los animales. Sin embargo, cada caso debe ser considerado como distinto y debe ser evaluado con objetividad para evitar la influencia de intereses ajenos a la ética.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Avner, D.B.; Bocklandt, S. & Kehler, J. 2012. Method of genetically altering and producing allergy free cats. US Patent, 20:142,110.
- Barrett, L.E.; Sul, J.; Takano, H.; Van Bockstaele, E.J.; Haydon, P.G. & Eberwine, J.H. 2006. Region-directed phototransfection reveals the functional significance of a dendritically synthesized transcription factor. Nature

- Methods, 3:455-460.
- Berkowitz, D.B. & Kryspin-Sørensen, I. 1994. Transgenic fish: Safe to eat? *Nature Biotechnology*, 12:247-252.
- Berkowitz, D.B. 1993. The food safety of transgenic animals: implications from traditional breeding. *Journal of animal science*, 71:43-46.
- Branski, L.K.; Pereira, C.T.; Herndon, D.N. & Jeschke, M.G. 2006. Gene therapy in wound healing: present status and future directions. *Gene Therapy*, 14:1-10.
- Bucán, M. & Abel, T. 2002. The mouse: genetics meets behaviour. *Nature Reviews Genetics*, 3:114-123.
- Butt, A.; Rashid, D. & Lockey, R.F. 2012. Do hypoallergenic cats and dogs exist? *Annals of Allergy, Asthma & Immunology*, 108:74-76.
- Cepko, C.L.; Roberts, B.E. & Mulligan, R.C. 1984. Construction and applications of a highly transmissible murine retrovirus shuttle vector. *Cell*, 37:1053-1062.
- Christiansen, S.B. & Sandøe, P. 2000. Bioethics: limits to the interference with life. *Animal Reproduction Science*, 60:15-29.
- Chu, G.; Hayakawa, H. & Berg, P. 1987. Electroporation for the efficient transfection of mammalian cells with DNA. *Nucleic Acids Research*, 15:1311-1326.
- Cooley, D.R.; Goreham, G. & Youngs, G.A. 2004. Practical moral codes in the transgenic organism debate. *Journal of Agricultural and Environmental Ethics*, 17:517-544.
- Cryan, J.F. & Mombereau, C. 2004. In search of a depressed mouse: utility of models for studying depression-related behavior in genetically modified mice. *Molecular Psychiatry*, 9:326-357.
- Curran, G.J. & Koszarycz, Y.J. 2004. Animal transgenesis and cloning: Scientific, religious and ethical considerations. *Australian eJournal of Theology*, 3:1-10.
- Davis, H.L.; Demeneix, B.A.; Quantin, B.; Coulombe, J. & Whalen, R.G. 1993. Plasmid DNA is superior to viral vectors for direct gene transfer into adult mouse skeletal muscle. *Human Gene Therapy*, 4:733-740.
- Durocher, Y.; Perret, S. & Kamen, A. 2002. High-level and high-throughput recombinant protein production by transient transfection of suspension growing human 293-ebna1 cells. *Nucleic Acids Research*, 30:9.
- Farhood, H.; Serbina, N. & Huang, L. 1995. The role of dioleoyl phosphatidylethanolamine in cationic liposome mediated gene transfer. *Biochim Biophys Acta*, 1235:289-295.
- FDA. 2003. FDA statement regarding glofish, 9 december. *Website: <http://www.fda.gov/bbs/topics/NEWS/2003/NEW00994>*.
- Felgner, P.L.; Gadek, T.R.; Holm, M.; Roman, R.; Chan, H.W.; Wenz, M.; Northrop, J.P.; Ringold, G.M. & Danielsen, M. 1987. Lipofection: a highly efficient, lipid-mediated dna-transfection procedure. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 84:7413-7417.
- Fox, J.L. 2008. FDA transgenic animal guidance finally surfaces. *Nature Biotechnology*, 26:1205-1207.
- Fraley, R.; Straubinger, R.M.; Rule, G.; Springer, E.L. & Papahadjopoulos, D. 1981. Liposome-mediated delivery of deoxyribonucleic acid to cells: enhanced efficiency of delivery related to lipid composition and incubation conditions. *Biochemistry*, 20:6978-6987.
- Fraley, R.; Subramani, S.; Berg, P. & Papahadjopoulos, D. 1980. Introduction of liposome-encapsulated sv40 DNA into cells. *Journal of Biological Chemistry*, 255:10431-10435.
- Golovan, S.P.; Hayes, M.A.; Phillips, J.P. & Forsberg, C.W. 2001a. Transgenic mice expressing bacterial phytase as a model for phosphorus pollution control. *Nature Biotechnology*, 19:429-433.

- Golovan, S.P.; Meidinger, R.G.; Ajakaiye, A.; Cottrill, M.; Wiederkehr, M.Z.; Barney, D.J.; Plante, C.; Pollard, J.W.; Fan, M.Z. & Hayes, M.A. 2001b. Pigs expressing salivary phytase produce low-phosphorus manure. *Nature Biotechnology*, 19:741-745.
- Gong, Z.; Wan, H.; Tay, T.L.; Wang, H.; Chen, M. & Yan, T. 2003. Development of transgenic fish for ornamental and bioreactor by strong expression of fluorescent proteins in the skeletal muscle. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 308:58-63.
- Graham, F.L. & Van der, E.A.J. 1973. A new technique for the assay of infectivity of human adenovirus 5 DNA. *Virology*, 52:456-467.
- Iannacone, J. 2007. Peces transgênicos ¿riesgos o beneficios?. *The Biologist (Lima)*, 5: 4-6.
- Ikeda, S.R.; Lovinger, D.M.; McCool, B.A. & Lewis, D.L. 1995. Heterologous expression of metabotropic glutamate receptors in adult rat sympathetic neurons: subtype specific coupling to ion channels. *Neuron*, 14:1029-1038.
- Inoue, T. & Krumlauf, R. 2001. An impulse to the brain using in vivo electroporation. *Nature Neuroscience*, 4:1156-1158.
- Jefferson, V. 2006. The ethical dilemma of genetically modified food. *Journal of environmental health*, 69:33-34.
- Jordan, M.; Schallhorn, A. & Wurm, F.M. 1996. Transfecting mammalian cells: optimization of critical parameters affecting calcium-phosphate precipitate formation. *Nucleic Acids Research*, 24:596-560.
- Kawai, S. & Nishizawa, M. 1984. New procedure for DNA transfection with polycation and dimethyl sulfoxide. *Molecular and Cellular Biology*, 4:1172-1174.
- Kim, H.J.; Greenleaf, J.F.; Kinnick, R.R.; Bronk, M.E.; & Bolander, J.T. 1996. Ultrasound-mediated transfection of mammalian cells. *Human Gene Therapy*, 7:1339-1346.
- Kim, T.K. & Eberwine, J.H. 2010. Mammalian cell transfection: the present and the future. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 397:3173-3178.
- Kling, J. 2009. First us approval for a transgenic animal drug. *Nature Biotechnology*, 27:302.
- Lassen, J.; Gjerris, M.; & Sandøe, P. 2006. After Dolly ethical limits to the use of biotechnology on farm animals. *Theriogenology*, 65:992-1004.
- Ledford, H. 2013. Transgenic salmon nears approval. *Nature*, 497:17-18.
- Lo, D.C.; McAllister, A.K. & Katz, L.C. 1994. Neuronal transfection in brain slices using particle-mediated gene transfer. *Neuron*, 13:1263-1268.
- Loyter, A.; Scangos, G.A. & Ruddle, F.H. 1982. Mechanisms of DNA uptake by mammalian cells: fate of exogenously added DNA monitored by the use of fluorescent dyes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 79:422-426.
- Luthman, H. & Magnusson, G. 1983. High efficiency polyoma DNA transfection of chloroquine treated cells. *Nucleic Acids Research*, 11:1295-1308.
- Maga, E.A.; Walker, R.L.; Anderson, G.B. & Murray, J.D. 2006. Consumption of milk from transgenic goat sex pressing human lysozyme in the mammary gland results in the modulation of intestinal microflora. *Transgenic research*, 15:515-519.
- Martinou, I.; Fernandez, P.A.; Missotten, M.; White, E.; Allet, B.; Sadoul, R. & Martinou, J.C. 1995. Viral proteins e1b19k and p35 protect sympathetic neurons from cell death induced by NGF deprivation. *Journal of Cell Biology*, 128:201-208.
- Maslow, A.H. 1943. A theory of human motivation. *Psychological review*, 50: 370-396.

- Maxmen, A. 2012. Politics holds back animal engineers. *Nature*, 490: 318-319.
- McCutchan, J.H. & Pagano, J.S. 1968. Enhancement of the infectivity of simian virus 40 deoxyribonucleic acid with diethylaminoethyl-dextran. *Journal of the National Cancer Institute*, 41:351-357.
- Mehier-Humbert, S.; & Guy, R.H. 2005. Physical methods for gene transfer: improving the kinetics of gene delivery into cells. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 57:733-753.
- Mephram, T.B.; Combes, R.D.; Balls, M.; Barbieri, O.; Blokhuis, H.J.; Costa, P.; Crilly, R.E.; De Cock Buning, T.; Delpire, V.C. & O'Hare, M.J. 1998. The use of transgenic animals in the European Union. *Atla Nottingham*, 26:21-44.
- Neumann, E.; Schaefer-Ridder, M.; Wang, Y. & Hofschneider, P.H. 1982. Gene transfer into mouse lymphoma cells by electroporation in high electric fields. *European Molecular Biology Organization Journal*, 1:841-845.
- Niemann H. & Kues WA. 2007. Transgenic farm animals: an update. *Reproduction, Fertility and Development*, 19:762-770.
- O'Brien, S.C.R. & Lummis, J.A. 2006. Biolistic transfection of neuronal cultures using a hand-held gene gun. *Nature Protocols*, 1:977-981.
- Oke, K.B.; Westley, P.A.H.; Moreau, D.T.R. & Fleming, I.A. 2013. Hybridization between genetically modified Atlantic salmon and wild brown trout reveals novel ecological interactions. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Science*, 280: 20131047.
- Ormandy, E.H; Dale, J. & Griffin, G. 2011. Genetic engineering of animals: ethical issues, including welfare concerns. *The Canadian veterinary journal. La revue veterinaire canadienne*, 52:544-550.
- Pagano, J.S.; Mc Cutchan, J.H.; & Vaheri, A. 1967. Factors influencing the enhancement of the infectivity of poliovirus ribonucleic acid by diethylaminoethyl-dextran. *Journal of Virology*, 1:891-897.
- Pandian, T.J. & Koteeswaran, R. 1998. Ploidy induction and sex control in fish. *Hydrobiologia*, 384:167-243.
- Pfeifer, A. & Verma, I.M. 2001. Gene therapy: promises and problems. *The Annual Review of Genomics and Human Genetics*, 2:177-211.
- Recillas-Targa, F. 2006. Multiple strategies for gene transfer, expression, knockdown, and chromatin influence in mammalian cell lines and transgenic animals. *Molecular Biotechnology*, 34:337-354.
- Ripps, M.E.; Huntley, G.W.; Hof, P.R.; Morrison, J.H. & Gordon, J.W. 1995. Transgenic mice expressing an altered murine superoxide dismutase gene provide an animal model of amyotrophic lateral sclerosis. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 92:689-693.
- Robert, D.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.
- Robert, H.D.; D'Andrade, M.; Uh, M. & Biagi, C.A. 2004. Population effects of growth hormone transgenic coho salmon depend on food availability and genotype by environment interactions. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 101: 9303-9308.
- Roesler, J.; Brenner, S.; Bukovsky, A.A.; Whiting-Theobald, N.; Dull, T.; Kelly, M.; Civin, C.I. & Malech, H.L. 2002. Third-generation, self-inactivating gp91(phox) lentivector corrects the oxidase defect in nod/scid mouse-repopulating peripheral blood-mobilized cd34+ cells from patients with x-linked chronic granulomatous disease. *Blood*, 100:4381-4390.

- Rollin, B.E. 1998. On "telos" and genetic engineering. pp. 156-171. In Holland, A. & Andrew Johnson, A. (ed.), Animal Biotechnology and Ethics, Springer US.
- Rowland, I.R.; 2002. Genetically modified foods, science, consumers and the media. Proceedings of the Nutrition Society, 61:25-29.
- Sawamura, D.; Akiyama, M. & Shimizu, H. 2002. Direct injection of naked DNA and cytokine transgene expression: implications for keratinocyte gene therapy. Clinical and Experimental Dermatology, 27:480-484.
- Schenborn, E.T. 2000. Transfection technologies. In: Tymms, M.J. (ed.). Transcription Factor Protocols. volumen 130 of *Methods in Molecular Biology*TM. pp. 91-102. Human Press.
- Scherer, F.; Anton, M.; Schillinger, U.; Henke, J.; Bergemann, C.; Kruger, A.; Gansbacher, B. & Plank, C. 2002. Magnetofection: enhancing and targeting gene delivery by magnetic force in vitro and in vivo. Gene Therapy, 9:102-109.
- Schmidt, C. 2006. Belated approval of first recombinant protein from animal. Nature Biotechnology, 24:877-877.
- Scotto, C. 2012. Reproducción e hibridación de peces transgénicos fluorescentes en cautiverio: un alcance prospectivo. Scientia Agropecuaria, 3:89-93.
- Scotto, C. & Serna, F. 2013. Primera identificación molecular del transgen de la proteína fluorescente roja (RFP) en peces cebra (*Danio rerio*) transgénicos ornamentales introducidos en el Perú. Scientia Agropecuaria, 4:257-264.
- Shirahata, Y.; Ohkohchi, N.; Itagak, H. & Satomi, S. 2001. New technique for gene transfection using laser irradiation. Journal of Investigative Medicine, 49:184-190.
- Smith, M.D.; Asche, A.G.; Guttormsen, F. & Wiener, J.B. 2010. Genetically modified salmon and full impact assessment. Science, 330:1052-1053.
- Spink, J. & Geddes, D. 2004. Therapy progress and prospects: Bringing gene therapy into medical practice: the evolution of international ethics and the regulatory environment. Gene therapy, 11:1611-1616.
- Strain, A.J.; Wallace, W.A. & Wyllie, A.H. 1985. Enhancement of DNA-mediated gene transfer by high-mr carrier DNA in synchronized CV-1 cells. Biochemical Journal, 225:529-533.
- Straubinger, R.M. & Papahadjopoulos, D. 1983. Liposomes as carriers for intracellular delivery of nucleic acids. Methods in Enzymology, 101:512-527.
- Straus, S.E. & Raskas, H.J. 1980. Transfection of KB cells by polyethylene glycol-induced fusion with erythrocyte ghosts containing adenovirus type 2 DNA. Journal of General Virology, 48:241-245.
- Strulovici, Y.; Leopold, P.L.; O'Connor, T.P.; Pergolizzi, R.G. & Crystal, R.G. 2007. Human embryonic stem cells and gene therapy. Molecular Therapy, 15:850-866.
- Tsai, D.F.C. 2005. The bioethical principles and Confucius' moral philosophy. Journal of Medical Ethics, 31: 159-163.
- Vacik, J.; Dean, B.S.; Zimmer, W.E. & Dean, D. 1999. Cell specific nuclear import of plasmid DNA. Gene therapy, 6:1006-1014.
- Verhoog, H. 2003. Naturalness and the genetic modification of animals. Trends in Biotechnology, 21:294-297.
- Vile, R.G.; Russell, S.J. & Lemoine, N.R. 2000. Cancer gene therapy: hard lessons and new courses. Gene therapy, 7:2-8, 01
- Wigler, M.; Sweet, R.; Sim, G.K.; Wold, B.; Pellicer, A.; Lacy, E.; Maniatis, T.; Silverstein, S. & Axel, R. 1979. Transformation of mammalian cells with genes from procaryotes and eucaryotes. Cell, 16:777-785.

- Wong, A.C. & Van Eenennaam, A.L. 2008. Transgenic approaches for the reproductive containment of genetically engineered fish. *Aquaculture*, 275:1-12.
- Wong, T.K.; Nicolau, C. & Hofschneider, P.H. 1980. Appearance of beta-lactamase activity in animal cells upon liposome-mediated gene transfer. *Gene*, 10:87-94.
- Woods, N.B.; Muessig, A.; Schmidt, M.; Flygare, J.; Olsson, K.; Salmon, P.; Trono D.; Von Kalle, C. & Karlsson, S. 2003. Lentiviral vector transduction of nod/scid repopulating cells results in multiple vector integrations per transduced cell: risk of insertional mutagenesis. *Blood*, 101:1284-1289.
- Yang, Y.W. & Yang, J.C. 1997. Studies of dea-dextran-mediated gene transfer. *Biotechnology Applied Biochemistry*, 25:47-51.
- Yanni, A.E. 2004. The laboratory rabbit: an animal model of atherosclerosis research. *Laboratory animals*, 38:246-256.
- Yom, H.C. & Bremel, R.D. 1993. Genetic engineering of milk composition: modification of milk components in lactating transgenic animals. *The American journal of clinical nutrition*, 58:299-306.
- Zohar, M.; Mesika, A. & Reich, Z. 2001. Analysis of genetic control elements in eukaryotes: transcriptional activity or nuclear hitchhiking? *Bioessays*, 23:1176-1179.

Received September 19, 2014.
Accepted May 25, 2015.