VII CONGRESO LATINOAMERICANO DE BUIATRIA
XX JORNADAS URUGUAYAS DE BUIATRIA
Paysandú, R.O.U., 17-20 de junio de 1992

BIOTECNOLOGIA ANIMAL: PRODUCCION DE FARMACOS PROTEICOS PARA HUMANOS EN LA LECHE DE RUMIANTES TRANSGENICOS

Mushtaq A. Memon*

Karl M. Ebert*

RESUMEN

Ha habido un deseo por parte de la sociedad de disponer de alimentos a bajo costo. Los animales productores de alimento humano han estado sometidos a cambios constantes que van de su domesticación a la biotecnología. Los avances biotecnológicos que han mejorado la producción de carne vacuna, ovina y porcina en los países desarollados pueden ser de poco valor para la producción caprina en los países en desarrollo. La aplicación exitosa de esta tecnología depende del reconocimiento de las condiciones climáticas especiales, las diferencias raciales y la posibilidad de contar con personal entrenado laboratorio y recursos económicos.

Nuestro informe recientemente publicado (Ebert el al., 1991) demuestra la producción de la primera cabra transgénica que produce en su leche una proteína heteróloga enzimáticamente activa y sirve como prototipo para la producción comercial a gran escala de fármacos proteicos para humanos en un animal lechero.

A. INTRODUCCION.

Ha habido una necesidad y un deseo por parte de la sociedad de tener a disposición alimento a bajo costo. Los animales que producen la mayor parte del alimento necesario para el ser humano han estado sometidos a constante cambio. La domesticación de estos animales fue el primer intento de asegurar la disponibilidad de alimentos cuando se necesitara. Este período se continuó con los cruzamientos y con la inseminación artificial para producir animales con características deseables. El propósito principal de estos programas fue minimizar el costo por unidad de producto - carne, leche, lana, etc. Los bovinos, especialmente el ganado lechero, fueron los que más se beneficiaron con este programa de

* Phd Profesor Asociado y Jefe de Teriogenología. Washington State University EEUU

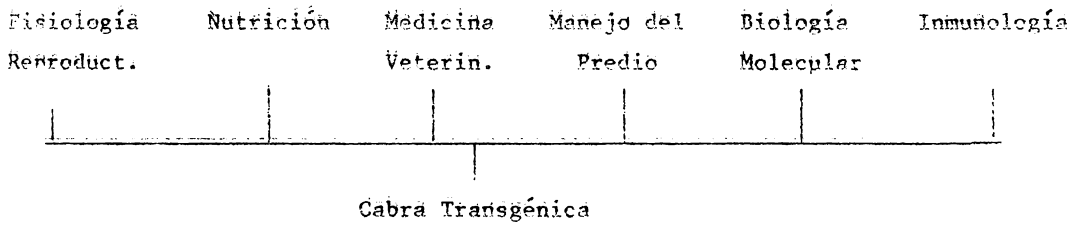
mejoramiento.

Durante la década del 60 y del 70 surgieron otras tecnologías reproductivas y fueron aplicadas a nuestras especies domésticas: conservación de semen; transferencia de embriones; partición de embriones y conservación de estos. Estos avances técnicos ofrecieron claros beneficios a la sociedad. Por ejemplo el número de vacas lecheras en EE.UU. decreció a la mitad pero la producción de leche por vaca casi fue duplicada entre 1955 y 1980 (Voelker, 1981; Niedermier et al., 1983). Ahora con el advenimiento de la biología molecular aplicada, es posible transferir características deseables en una o dos generaciones de animales. Esto puede ser hecho directamente alterando la creación de animales a nivel de genes individuales (Ebert y Selgrath, 1991). La manipulación génica a través de la inserción directa de un gene extraño en el genoma existente del animal es la principal técnica utilizada por los ingenieros genéticos.

B. AUMENTO DE LA EFICIENCIA EN PRODUCCION ANIMAL.

Tradicionalmente, los individuos implicados en producción animal han trabajado independientemente para aumentar la eficiencia de los sistemas de producción. Por ejemplo, los fisiólogos en reproducción, los nutricionistas, las genetistas y los veterinarios han trabajado en diferentes aspectos pero dirigidos a la misma meta del aumento de la producción.

La metodología corriente (biotecnología) requiere más cohesión, o trabajo de equipo, a través de la participación activa de individuos de varias ciencias. Los roles de estos miembros del equipo son variados pero esenciales para montar un programa exitoso para hacer animales transgénicos. Como se aprecia en el diagrama siguiente, hay por lo menos 6 disciplinas asociadas con un programa transgénico.



El genetista se ha sofisticado más y se ha trasformado en un biólogo molecular. El fisiólogo reproductivo con la ayuda del nutricionista y el que maneja el establecimiento, diagraman e inician el trabajo a nivel animal: por ej. sincronización del ciclo estral, reproducción y manejo animal. Los aspectos sanitarios son manejados por el veterinario, que es iniciado en esta "nueva" tecnología. El importante rol del biólogo molecular en este equipo es identificar los genes apropiados y modificarlos para su reintroducción por microinyección.

El segundo paso es monitorear la aparición de este animal genéticamente manipulado. Un huésped de problemas desconocidos podría esperarse en términos de objetivo y expresión génica y posibles características no esperadas resultantes de los productos de fusión génica en los animales transgénicos. En esta etapa el biólogo molecular es requerido para modificar el gene apropiado.

C. PRODUCCION DE LA CABRA TRANSGENICA

En la Universidad de Tufts, hemos estado ocupados en la producción de cabras transgénicas desde 1987. El propósito principal de este proyecto es producir fármacos en la leche de cabras transgénicas. Un plasminógeno activador de tejidos (tPA), una proteína clave empleada para disolver los mortales coágulos sanguíneos en el ataque al corazón en humanos, se expende actualmente en EEUU

a 2.200 dólares la dosis. Nuestra esperanza es que las cabras puedan ser alteradas para producir fármacos para humanos en su leche y reducir así, sustancialmente, el costo de producción.

El proyecto es llevado a cabo en el nordeste de EEUU. La estación de apareamiento en esta zona comienza en setiembre y termina en enero. Pocas cabras "ciclan" naturalmente durante otra época del año. Las dos principales razas utilizadas en este proyecto son la Alpina y la Saanen.

1. Monitoreo y Selección de las cabras.

La compra de las cabras en establecimientos de cría en los estados de Nueva Inglaterra comienza por una encuesta telefónica. La conversación incluye series de preguntas para determinar que las cabras no tienen en su historia clínica problemas sanitarios o reproductivos, por ej. hermafroditismo, infertilidad, abortos, etc. El paratécnico del proyecto, junto con el veterinario visitan el establecimiento y examinan clínicamente a las cabras para descartar problemas sanitarios (por ej. ectima contagioso, linfadenitis caseosa, etc.). Se toman muestras de sangre para realizar test serológicos para encefalitis-artritis caprina (CAE), fiebre Q, enfermedad de Johne y Brucella melitensis. Este monitoreo pre adquisión puede varias dependiendo de la prevalencia de una enfermedad particular en cualquiera de esas zonas. Las cabras compradas son mantenidas en cuarentena durante 3 semanas donde son monitoreadas para descartar cualquier problema sanitario potencial antes de ser introducidas en el hato.

2. Sincronización de celo. Superovulación. Apareamiento y recuperación de embriones.

La sincronización del ciclo estral de la donante y de la recipiente se cumple colocando un implante de norgestomet (Ceva Lab., Overland Park, Ks, USA) subcutáneamente en la oreja, el cual es dejado durante 14 a 21 días. Las donantes son superovuladas con PMSG (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA) o FSH-P (Schering Pharmaceutica), Kenilworth, NJ, USA), y son servidas a corral con el macho (Selgrath et al., 1990; Pendleton et al., 1986).

Las donantes son privadas decomida (durante 36 horas) y de agua (24 horas) antes de ser intervenidas. Por el momento, es necesaria la cirugía para la recuperación de los embriones. Como agentes preanestésicos se usan: Diazepam (Steries Laboratories, Phoenix, AZ, USA) y Ketamine (Ketaset, Aveco Co., Fort Dodge, IA, USA), y la anestesia es mantenida con halotano (Halocarbon Laboratories, N. Augusta, SC, USA) en oxígeno. Se realiza una incisión por la línea media, exteriorizándose el tracto reproductivo de cada cabra. Se inserta luego una cánula por el orificio oviductal a través de la fimbria, infundiéndose 15 a 20 ml de solución salina de fosfato bufferada (PBS, Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA). Los lavados oviductales son recogidos en caja de Petri estériles y examinados inmediatamente bajo un microscopio esteoscópico en busca de embriones. Los embriones son colocados en un portaobjetos con una depresión para su examen usando el microscopio de contraste de interferencia de Nomarski (160x). Se determina que ocurrió la fertilización si son visibles los pronúcleos femenino y masculino o si ha ocurrido el clivaje de la célula del embrión (Selgrath et al., 1990).

3. Microinyección y transferencia embrionaria.

A partir de la visualización de los pronúcleos, se inyecta el masculino con 2 pl de 1 ug/ml de solución de DNA que contiene un fragmento de 4.9 kb de DNA, usando las técnicas standard de microinyección (Ebert et al., 1988; Rexroad et al., 1989). Luego de la inyección los embriones se colocan en Hams F-12 con un 10% de suero fetal bovino en una atmósfera de aire húmedo con 5% de CO_2 hasta la transferencia (1/2 a 2 horas).

Luego del lavado oviductal se examinan los ovarios y se registra el número de cuerpos lúteos (CL) morfológicamente aparentes. Las recipientes son anestesiadas exteriorizándose los tractos reproductivos en la forma que fue descrita para las donantes. Se examinan los ovarios, registrándose también la presencia, número y apariencia morfológica de los cuerpos lúteos. Los embriones son transferidos con la menor cantidad de líquido posible al oviducto ipsilateral al CL, usando un tubo capilar esterilizado de 50 ul que se inserta en el lumen del oviducto a través de la fimbria.

4. Detección de la preñez.

En las receptoras de los embriones transferidos, se detecta la preñez empleándose un sistema de ultrasonido (US) de tiempo real lineal con un transductor de 5 MHZ (Technicare, Denver, CO, USA). Se quita el pelo en una pequeña área (5 x 12 cm) de las regiones inguinales derecha e izquierda adyacentes a la ubre. Se realizan scaneos transabdominales en la cabra en pie colocando el transductor en contacto con la piel. Este se cumple mediante un gel de trasmisión (ECHO Ultrasound, Lewiston, PA, USA). Durante el primer año del proyecto, la primera ecografía fue realizada entre los días 30-34 de gestación y luego repetida a intervalos semanales hasta el día 57 (Tabla 1).

Tabla 1. Eficiencia de la ecografía para la determinación de preñez en cabras.

Día de Gestación	N	Correctamente identificada como: Preñada	(%)	No Preñada	(%)
30-34	3	0/1	(0)	2/2	(100)
40-44	31	13/14	(93)	18/18	(100)
45-49	6	4/4	(100)	2/2	(100)
50-57	4	2/2	(100)	2/2	(100)
TOTALES	44	19/21	(91)	24/24	(100)

Basado en los resultados de la ecografía (Memon et al., 1990) hemos adoptado un programa de realizarlas a los 40, 50 y 110 días de gestación, respectivamente. Durante cada examen, se intenta saber si la cabra está preñada y el número de fetos presentes. La viabilidad fetal se establece sobre la base de un corazón latiendo en cada feto.

5. Inducción del parto.

Las cabras recipientes preñadas son inducidas al parto con Prostaglandina F2alfa (PGF2 alfa, Lutalyse, Upjohn Co., Kalamazoo, MI, USA). Esta ha demostrado ser el agente de elección para la inducción del parto en cabras (Ott et al., 1980). Es adminsitrada a la cabra (20 mg IM) en el día 145 0 146 de gestación. Los cabritos nacen el día 147. Este esquema de inducción de parto ha sido exitoso sin problemas mayores de distocia, retención de membranas fetales o infertilidad postparto.

6. Resumen de los resultados.

Nuestro informe recientemente publicado (Ebert et al., 1991) demuestra la producción de la primera cabra transgénica que está produciendo en su leche una proteina heteróloga, enzimáticamente activa, y sirve como prototipo para la producción comercial a gran escala de fármacos proteicos para humanos en animales lecheros.

Treinta hembras recipientes recibieron 165 embriones de una o dos células y otras 6 recibieron 38 de una sola célula que fueron cultivados 72 horas in vitro (desarrollados a mórula) y transferidos a los úteros. Trece recipientes con transferencia oviductal (43%) quedaron preñadas y parieron 22 cabritos (13%). Cinco de las seis recipientes que recibieron embriones de una célula cultivados hasta la etapa de mórula tuvieron 7 crías (18%). Fueron identificadas dos cabras transgénicas y representan un 1% de eficiencia en el desarrollo de cabras transgénicas a partir de los embriones microinyectados.

La hembra transgénica fue servida y tuvo dos crías no transgénicas. El análisis de su leche, en busca de LAtPA humana, realizado mediante ELISA indicó que la hembra transgénica produjo LAtPA a una concentración de 3 ug/ml. La producción de LAtPA fue constante a lo largo del período normal de lactancia. Es de destacar que la proteina fue enzimáticamente activa en un ensayo para medir su acción fibrolítica.

SUMMARY

ANIMAL BIOTECHNOLOGY: PRODUCTION OF HUMAN PHARMACEUTICAL PROTEINS IN MILK OF THE TRANSGENIC RUMINANTS. The has been a desire by society for availability of food at low cost. Food producing animals have been under constant change from animal domestication to biotechnology. The biotechnological approaches which have improved the beef, pork and lamb production in developed countries may not be applicable to the goat production in developing countries. Successful application of this technology would depend upon recognition of the unique climatic conditons, breed differences and availability of trained personnel, laboratory and financial resources.

Our recently published repoprt (Ebert et al., 1991) demostrates the production of the first transgenic goat that is producing an enzimatically active heterologous protein in milk and serves as a prototype for large scale commercial production of human pharmaceutical proteins in a dairy animal.

BIBLIOGRAFIA

EBERT, K.M.; LOW, M.J.; OVERSTROM, E.W.; BUONOMO, F.C.; BAILE, C.A.; ROBERTS, T.M.; LEE, A.; MANDEL, G. and GOODMAN, R.H. A Moloney HLV-rat somatotropin fusión gene produces biologically active somatotropin in a transgenic pig. Mol. Endocrinol. 2:277-283, 1988.

_____; and SELGRATH, J.P. Changes in domestic livestock through genetic engineering. In: Banbury Symposium Publication. Applications of Basic Research in Mammalian Development. Eds., R.A. Pedersen, A. McLaren and N. First. Col. Spring Harbor Press. In Press. 1991.

_____; _____; DITULLIO, P.; DENMAN, J.; SMITH, T.E.; MEMON, M.A.; SCHINDLER, J.E.; MONASTERSKY, G.M.; VITALE, J.A. and GORDON, K. Transgonic production of a variant of human tissue-type plasminogen activator in goat milk. 1: Generation of transgenic goats and analyses expression. Biotecnology (In Press).

MEMON, M.A.; MONASTERSKY, G.M.; SMITH; T.H.; SELGRATH, J.P. and EBERT, K.M. Determination of pregnancy in dairy goats using transabdominal real-time ultrasonography. Poster, Society for Theriogenology, Ann. Meeting, Toronto, Canada. 1990.

NIEDERMEIER, R.P.; CROWLEY, J.W. and MEYER, E.C. United States dairying: Changes and challenges. J. Anim. Sci. (suppl.) 57:44. 1983.

OOT. R.S.; NELSON, D.R.; MEMON, M.A:; LOCK, T.F. and HIXON, J.E. Dexamethasone and Prostaglandin F. for induction of parturition in goats. Proc. 9th Intl. Cong. Anim. Reprod. & A.I., p. 492. 1980.

PENDLETON, R.J.; YOUNG, C.R.; RORIE, 'R.W.; MEMON, M.A: and GODKE, R.A. The use of norgestomet implant for the synchronization and superovulation of dairy goats. Theriogenology 25:180 (Abstract). 1986.

REXROAD, C.E.; HAMMER, R.E.; BOLT, D.J.; MAYO, K.E.; FROHMAN, L.A. and PALMITER, R.D. Production of transfenic sheep with growth-regulating genes. Mol. Reprod. Dev. 1:164. 1989.

SELGRATH, J.P.; MEMON, M.A.; SMITH, T.E. and EBERT, K.M. Collection and transfer of microinjectable embryos from diary goats. Theriogenology. 34:1195-1205. 1990.

VOELKER, D.E. Dairy herd improvement associations. J. Dairy Sci. 64:1269. 1981.