

UNIVERSIDAD DE LA REPÚBLICA

FACULTAD DE VETERINARIA

¿POR QUÉ PRODUCIR PECES TRANSGÉNICOS? BENEFICIOS Y RIESGOS

Por

Bach. María Cristina MANZI INZUA

TESIS DE GRADO presentada como uno de
los requisitos para obtener el título de
Doctor en Ciencias Veterinarias
Orientación: H, I, C, T de los alimentos de
origen animal

MODALIDAD: Revisión monográfica

**MONTEVIDEO
URUGUAY
2016**

PÁGINA DE APROBACIÓN:

Tesis de grado aprobada por:

Presidente de mesa:

.....
Dr. Alejo Menchaca

Segundo miembro (tutor):

.....
Ing. Agr. Raúl Ponzoni

Tercer miembro:

.....
Dra. Silvia Llambí

Fecha:

.....

Autor:

.....
Bach. María Cristina Manzi

AGRADECIMIENTOS

En primer lugar, a mi tutor, Ing. Agr. Raúl Ponzoni, quien ha inculcado en mí, un sentido de responsabilidad y rigor académico. No tengo más que agradecimiento, por su esfuerzo, dedicación, paciencia y motivación, sin él, no habría sido capaz de llevar a cabo esta revisión.

A mi co-tutor, Dr. Fernando Macedo, y al Dr. Alejo Menchaca, quien tan amablemente acepto participar en este proyecto, aportando su valioso conocimiento en este tema tan particular.

A las funcionarias de la biblioteca de Facultad de Veterinaria, por su buena disposición y colaboración.

A todos aquellos que me acompañaron en este largo viaje, mi familia, mis compañeros y amigos.

Y por último, el más importante de todos, agradecer a mis padres, Héctor y María Luisa, porque ellos han sentado en mí el deseo de superación, sin ustedes, nada de esto habría sido posible.

¡ A todos, muchas gracias !

TABLA DE CONTENIDO:

	Página
PÁGINA DE APROBACIÓN.....	2
AGRADECIMIENTOS.....	3
LISTA DE TABLAS Y FIGURAS.....	6
1. RESUMEN.....	7
2. SUMMARY.....	8
3. OBJETIVOS.....	9
4. ESTADO MUNDIAL DE LA PESCA Y ACUICULTURA.....	10
4.1. Crecimiento de la acuicultura.....	10
5. INGENIERIA GENETICA Y ORGANISMOS GENÉTICAMENTE MODIFICADO (OGM).....	12
5.1. Consideraciones generales.....	12
5.2. Definición de OGM.....	13
6. ANTECEDENTES.....	13
7. ETAPAS DE LA TRANSFERENCIA GÉNICA EN PECES.....	16
7.1. Construcción del ADN.....	17
7.2. Introducción del ADN foráneo.....	18
7.3. Integración del ADN.....	20
7.4. Promotores y expresión del ADN.....	20
7.5. Transmisión a la descendencia.....	22
7.6 Limitaciones técnicas e inconvenientes de la transgénesis.....	22
8. ¿POR QUÉ PENSAR EN PECES TRANSGÉNICOS?.....	23
9. PECES COMO MODELO.....	24
10. BENEFICIOS Y APLICACIONES DE LOS PECES TRANSGÉNICOS.....	25
10.1. Manipulación de transgénesis en rasgos a parte de crecimiento.....	25
10.1.1. Tolerancia al frío y resistencia a la congelación.....	25
10.1.2. Resistencia a enfermedades.....	27
10.1.3. Modificaciones del metabolismo.....	28
10.1.4. Esterilidad.....	29
10.1.5. Biofábricas.....	31
10.1.6. Biosensores.....	31
10.1.7. Biocontroles.....	33
10.1.8 .Xenotransplantes.....	34
10.1.9. Oncopeces.....	34

10.1.10. Peces ornamentales.....	36
10.2. Manipulación de transgénesis en rasgos crecimiento.....	38
10.2.1. Índice de crecimiento-Hormona del crecimiento.....	39
10.2.2. Construcción del “Súper Salmón”	40
10.2.3. Transgenes GH de interés comercial.....	41
10.2.4. Importancia de las especies comerciales GM.....	45
11. EJEMPLOS DE TRANSGÉNESIS EN OTRAS ESPECIES.....	46
11.1. Transgénesis en porcinos.....	46
11.2. Transgénesis en ovinos.....	47
11.3. Transgénesis en caprinos.....	49
11.4. Transgénesis en bovinos.....	50
12. OBJECIONES Y RIESGOS ASOCIADOS A PECES TRANSGÉNICOS.....	51
12.1. Objeciones a los peces transgénicos.....	52
13. EVALUACIÓN Y GESTION DE RIESGOS EN PECES TRANSGÉNICOS.....	54
13.1. Análisis de riesgos.....	54
13.2. Riesgo ambiental.....	55
13.2.1. Método de recopilación de datos de aptitud en transgénicos.....	56
13.2.2 .Manejo de riesgo ambiental.....	56
13.3 Riesgo para la salud humana.....	57
14. EDICIÓN DE GENOMA.....	58
15. DISCUSIÓN.....	63
16. CONCLUSIONES.....	66
17. BIBLIOGRAFIA.....	67

LISTA DE TABLAS Y FIGURAS

	Página
Figura 1: Producción mundial de la pesca de captura y la acuicultura.....	12
Figura 2: Ratones transgénicos para la hormona del crecimiento.....	14
Figura 3: Pez cebra transgénico de marca registrada (<i>Danio rerio</i>) que expresa una Proteína fluorescente.....	15
Figura 4: Salmón AquaAdvantage comparado con su contra parte.....	16
Figura 5: Esquema de la metodología tradicional para la generación de un pez transgénico.....	17
Figura 6: Microinyección de ADN en huevos de salmón.....	19
Figura 7: Observación en vivo de la expresión de lo transgenes.....	24
Figura 8: Medakas transgénicos tratados con proteína verde fluorescente.....	33
Figura 9: Desarrollo de pez cebra y Desarrollo de embrión humano.....	35
Figura 10: Expresión de la proteína verde fluorescente.....	36
Figura 11: Introducción de genes fluorescentes en peces Medaka o TK1.....	37
Figura 12: Comparación de Peces Tetra.....	37
Figura 13: Sushi GloFish.....	38
Figura 14: La hormona del crecimiento transgénico tilapia del Nilo.....	43
Figura 15: Diagrama de producción de salmón transgénico.....	44
Figura 16: Corderos transgénicos uruguayos nacidos en la Fundación IRAUy.....	49
Figura 17: Corderos con genoma editado, con aumento de su masa muscular.....	60
Figura 18: Perros Beagle con genoma editado, “hipermusculosos”	61
Tabla 1: Algunos peces transgénicos en desarrollo.....	25

1. RESUMEN

En sus comienzos la Acuicultura dio grandes esperanzas para la solución de los problemas de pobreza de las naciones del Tercer Mundo. Se pensó en la generación de nuevos empleos, de divisas por la exportación de productos de la pesca, y en el suministro de proteínas de bajo costo. Para satisfacer la demanda y aliviar la presión sobre la pesca natural, la acuicultura creció rápidamente. Sin embargo, las tendencias indican que el porcentaje de poblaciones de peces sobreexplotadas irá en aumento, y el porcentaje de poblaciones subexplotadas continuará decreciendo. Esta realidad, ha generado una gran preocupación acerca de no poder mantener la estabilidad actual de las capturas mundiales. Con el advenimiento de la ingeniería genética, se ha logrado modificar genéticamente organismos vivos, lo que permite producir organismos “nuevos” que lleven funciones “programadas”, que faciliten los procesos de producción industrial, y la incorporación de nuevas características productivas haciéndolos más eficientes y competitivos. En la actualidad, los organismos genéticamente modificados (OGM) o transgénicos, están siendo aplicados en la acuicultura con diferentes finalidades. A nivel productivo, se busca obtener peces genéticamente modificados con ciclos productivos más cortos, logrando aumentar las tasas de crecimiento y mejorando las tasas de conversión de los alimentos. Esta característica, ha sido desarrollada en especies de interés comercial, como la Tilapia del Nilo, Carpa común y el Salmón del Atlántico. Otras características de interés que se busca mejorar en los peces a través de modificación genética, son: la resistencia a enfermedades, resistencia al frío y a la congelación, y modificaciones en el metabolismo. Nuevas investigaciones están dirigidas a crear peces transgénicos como biosensores y biocontroles para estudios ambientales, aplicaciones en medicina humana para el estudio del cáncer (oncopeces), y xenotrasplantes, y en la industria farmacéutica como biofábricas. En la actualidad, peces ornamentales transgénicos que expresan fluorescencia se encuentran en los mercados, y en el 2015, la FDA (*Food and Drug Administration*) autorizó la venta del salmón AquAdvantage genéticamente modificado, convirtiéndolo en el primer OGM de origen animal, aprobado para consumo humano. Se podría decir, que la transgénesis en los peces tiene múltiples aplicaciones, muchas de las cuales resultan ventajosas para los sistemas productivos. Sin embargo, los peligros que la tecnología transgénica aplicada en peces pueda acarrear, deben ser considerados. Existe el temor de que si los peces transgénicos escaparan al medio natural, podrían provocar un fuerte impacto sobre las especies silvestres, y sobre el ecosistema. Varias objeciones frente a los peces transgénicos han sido planteadas, por lo que, para poder desarrollar una biotecnología segura, es necesario elaborar un buen plan de evaluación de riesgos que se acompañe de una metodología adecuada para disminuir o eliminar los mismos. En este trabajo, se busca plantear una idea general de las posibles aplicaciones de la transgénesis en los peces, intentar exponer cuales son los beneficios y riesgos que pueden presentar, y cuáles son las medidas propuestas para minimizar los peligros que los mismos puedan representar.

2. SUMMARY

In its early stages of development, Aquaculture generated great expectations about solving the problems of poverty in Third World countries. It was thought that it would generate new jobs, foreign exchange from the export of fishery products, and provide a low-cost protein. To meet demand and relieve pressure on natural fisheries, aquaculture grew rapidly. However, trends indicate that the percentage of stocks over-exploited will increase, and the percentage of sub-exploited populations will continue to decline. This reality has generated great concern about not being able to maintain the current level of world catches. Genetic engineering has succeeded in genetically modifying living organisms. It can produce "new" organisms with functions "programmed" to facilitate the process of industrial production, and the incorporation of new productive features, making them more efficient and competitive. Currently, genetically modified organisms (GMOs) or transgenic, are being used in aquaculture for different purposes. At the production level, the aim is to obtain genetically modified fish with shorter production cycles, achieving increased growth rates and improving feed conversion rates. Some of these features have been developed in species of commercial interest, such as the Nile tilapia, common carp and Atlantic salmon. Other features of interest in fish improvement programs through genetic modification are: disease resistance, resistance to cold and freezing, and changes in metabolism. New research is aimed at creating transgenic fish as biosensors and biocontrol for environmental studies, applications in human medicine for the study of cancer (oncopeces), and xenotransplants, and in the pharmaceutical industry, as bio-factories. There are transgenic ornamental fish in the market that express fluorescence, and in 2015, the FDA (*Food and Drug Administration*) approved the sale of genetically modified salmon, AquAdvantage, making it the first GMO animal approved for human consumption. Transgenesis in fish has multiple applications, many of which are advantageous for production systems. However, the possible risks associated with the use of transgenic technology may bring about must be considered. There are fears that if transgenic fish escaped into the wild they could have a strong negative impact on wild species, and the ecosystem. Hence, several objections to the creation of transgenic fish have been raised. To develop a safe biotechnology, it is necessary to have a good risk assessment plan, accompanied by an appropriate methodology to reduce or eliminate risks. In this thesis, we review the possible applications of transgenesis in fish, we try to identify the benefits and risks that may result, and suggest measures to minimize the dangers that they can represent.

3. OBJETIVOS

- Efectuar una puesta al día acerca de por qué producir peces transgénicos.
- Discutir los posibles beneficios y riesgos que pueden acarrear.
- Discutir el posible papel de los peces transgénicos en el contexto de la situación actual de la pesca y la acuicultura.

4. ESTADO MUNDIAL DE LA PESCA Y ACUICULTURA

Según las nuevas perspectivas proyectadas por la FAO (*Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura*), se espera que la población mundial aumente en un número de 2 mil millones de personas, alcanzando los 9,6 mil millones para el año 2050, lo que implica un enorme desafío que supone alimentar a nuestro planeta y al mismo tiempo conservar sus recursos naturales para las futuras generaciones (La agricultura mundial en la perspectiva del año 2050, FAO, 2009).

En la actualidad, el pescado sigue siendo uno de los productos más comercializados en todo el mundo, su producción mundial ha aumentado constantemente en las últimas cinco décadas (figura 1) y sigue creciendo a un ritmo mayor que la población mundial, a una tasa media anual del 3,6 por ciento, superando la tasa de crecimiento de la población mundial del 1,6 por ciento (FAO, SOFIA, 2014).

Por otro lado, la proteína de pescado puede representar un componente nutricional esencial en determinados países con una mayor densidad poblacional, donde el aporte proteico total puede ser escaso. En el 2010, el pescado representó el 16,7 por ciento del aporte de proteínas animal de la población mundial, y el 6,7 por ciento del total de proteína consumida (FAO, SOFIA, 2012).

Las tendencias indican que la pesca de captura continuará en aumento, registrando un máximo histórico de 93,7 millones de toneladas en 2011, siendo la segunda más alta en la historia (93,8 millones de toneladas en 1996). En el año 2012, la producción mundial alcanzó 90,4 millones de toneladas, correspondientes a peces comestibles y algas marinas (FAO, SOFIA, 2014).

Por otra parte, la pesca mundial marina, ha presentado un constante aumento a lo largo de los años. La producción registrada para el 2011 fue de 82,6 millones de toneladas, y 79,7 millones de toneladas en el 2012. La proporción de poblaciones evaluadas de peces marinos capturados dentro de los niveles sostenibles desde el punto de vista biológico, disminuyó de 90 por ciento en 1974 a 71,2 por ciento en 2011, año en el que según las estadísticas, el 28,8 por ciento de las poblaciones de peces fueron capturados en un nivel insuficiente desde el punto de vista biológico, resultando sobreexplotadas (FAO, SOFIA, 2014). La población explotada a un nivel biológico insostenible, refiere a aquellas especies con abundancia inferior necesaria para producir el rendimiento máximo sostenible.

Las diez especies más producidas, representaron alrededor del 24 por ciento de la pesca de captura marina mundial en 2011, y la mayoría de sus poblaciones están plenamente explotadas, no es posible aumentar su producción, y algunas son objeto de sobrepesca. La pesca ilegal, no declarada y no reglamentada, sigue siendo uno de las principales amenazas para los ecosistemas (FAO, SOFIA, 2014).

4.1 Crecimiento de la acuicultura

El pescado y productos de la pesca representan una fuente muy valiosa de

proteínas y nutrientes esenciales. Por lo que, para satisfacer la demanda y aliviar la presión sobre la pesca natural, la acuicultura creció rápidamente como una alternativa (Naylor y col., 2000).

La acuicultura se puede definir, como el cultivo de organismos acuáticos que incluye peces, moluscos, crustáceos y plantas acuáticas. El cultivo implica algún tipo de intervención en el proceso de crianza para mejorar la producción, tales como siembra regular, alimentación controlada y protección de predadores (FAO: Pesca y acuicultura, <http://www.fao.org/fishery/aquaculture/es>).

La producción en acuicultura continúa en aumento, aunque a un menor ritmo. Para el año 2012, estableció otro máximo histórico de producción de 90,4 millones de toneladas, y proporciona en la actualidad casi la mitad del pescado destinado a la alimentación humana (FAO, SOFIA, 2014). Se prevé, que este valor aumente en un 62 por ciento para el año 2030, debido a las altas demandas mundiales (FAO: Fish to 2030).

La producción acuícola de peces comestibles, se amplió de 32,4 millones de toneladas en 2000, a 66 millones de toneladas en el 2012 (FAO, SOFIA, 2012).

En este ámbito, es de importancia destacar, que la población mundial nunca ha consumido tanto pescado, ni ha dependido tanto del sector pesquero para su nutrición como hoy en día. El consumo per-cápita sigue aumentando, y las demandas a nivel mundial son cada vez mayores, por lo que la acuicultura desempeña un papel crucial a la hora de hacer frente a esos desafíos. Para hacerlo en forma sostenible, debe dejar de depender de los peces enteros cultivados, y practicar nuevos métodos de cultivo (FAO: Fish to 2030).

Existe una gran preocupación acerca de no poder mantener la estabilidad actual de las capturas mundiales. Las tendencias indican que el porcentaje de poblaciones sobreexplotadas irá en aumento, y el porcentaje de poblaciones subexplotadas continuará decreciendo (FAO, SOFIA, 2014).

Para evitar la pesca excesiva en los ecosistemas, podría ser necesario mantener la abundancia de algunas poblaciones por encima del nivel de rendimiento máximo sostenible. La pesca excesiva no solo provoca consecuencias ecológicas, sino que también disminuye la producción, trayendo grandes problemas sociales y económicos.

Debido a la expansión mundial, la demanda de pescado y sus productos continuará aumentando, independientemente de que el consumo per-cápita se mantenga estable o no, lo que obligará a utilizar mejor los recursos actuales, y buscar métodos alternativos para su producción sostenible en el tiempo (FAO: Fish to 2030).

Estas proyecciones indican que tanto la acuicultura como la pesca de captura se encuentran en un punto de colapso, y refleja la necesidad de establecer las medidas necesarias para mejorar el sector. El reto, no solo consiste en producir, sino también en hacerlo de modo sostenible desde el punto de vista ambiental, buscando nuevas alternativas que garanticen la estabilidad de los ecosistemas y la seguridad desde el punto de vista nutricional y alimenticio (FAO, SOFIA, 2014).

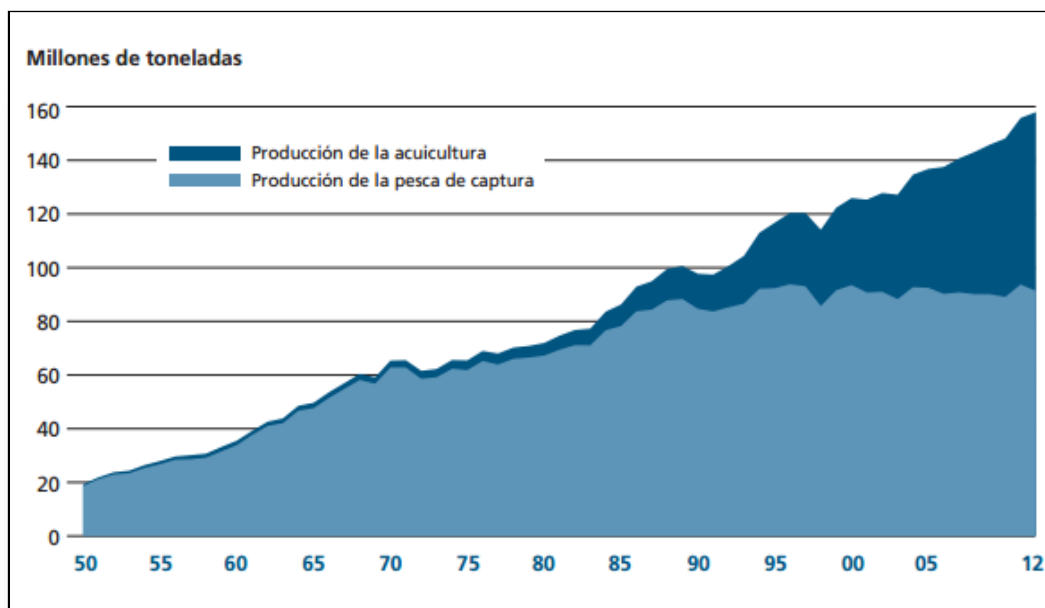


Figura 1: Producción mundial de la pesca de captura y la acuicultura. Fuente: (FAO, SOFIA, 2014).

5. INGENIERÍA GENÉTICA Y ORGANISMOS GENÉTICAMENTE MODIFICADOS

5.1 Consideraciones generales

Desde su inicio el hombre ha seleccionado plantas y domesticado animales mediante el apareamiento selectivo de individuos, con el fin de transferir los caracteres deseados. La principal limitante de este proceso radica en la incompatibilidad sexual observada cuando los organismos son muy divergentes genéticamente, lo que impide la transferencia de genes entre especies. La ingeniería genética permite romper esta barrera, posibilitando la incorporación de genes desde otras especies que de otra forma sería imposible con los métodos de mejoramiento tradicional. Podemos definir ingeniería genética, como la manipulación científica de organismos a nivel celular, que permite producir organismos alterados o “nuevos” que lleven funciones “programadas”, que faciliten procesos de producción industrial (Pérez y Nichito, 1993). De esta forma, los organismos genéticamente modificados son organismos vivos, manipulados genéticamente mediante la inserción de un gen que habitualmente no formaba parte de su repertorio genético. La finalidad de esto es proporcionar a la planta o animal nuevas características productivas y hacerlos más eficientes y competitivos (Clark, 2002).

La cría selectiva es un método probado y aceptado en animales de granja, pero tiene como desventaja, que presenta una escala de tiempo larga, puede transmitir rasgos no deseados debido a la mezcla de genomas de los padres, y la transferencia de genes de una especie a otra se evita debido a barreras biológicas interespecíficas. La transgénesis sin embargo, permite la introducción de un gen, y el aumento o supresión de un rasgo seleccionado mediante transferencia de copias de un gen específico proveniente de un individuo de la misma especie o de una especie diferente, permitiendo modificar las características hereditarias de un animal

mediante técnicas de ingeniería genética. Esto podría ayudar a reducir la probabilidad de efectos genéticos negativos imprevistos de la cría selectiva, y centrar los esfuerzos en la obtención de mayores niveles de producción para la agricultura y acuicultura.

5.2 Definición de organismos transgénicos o genéticamente modificados

Qué entendemos por Transgénico? La palabra transgénico fue utilizada por primera vez por Gordon y Ruddle (1981), para designar a un organismo genéticamente transformado mediante micro-inyección de ácido desoxirribonucleico (ADN).

En la actualidad el significado ha evolucionado, con los avances de la propia técnica, y Beardmore (1997) sugiere otra alternativa para definir a los transgénicos: “células y organismos que contienen secuencias integradas de ADN clonado (transgén) transferido mediante técnicas de ingeniería genética”.

El Protocolo de Cartagena sobre Seguridad de la Biotecnología del Convenio de 1992 sobre Diversidad Biológica, se refiere a los Organismos Genéticamente Modificados (OGM,) como un organismo modificado. Esto significa que son todos aquellos organismos vivos que poseen una combinación genética nueva, insertada e incorporada mediante una técnica in vitro de ingeniería genética. Por tanto, es la técnica, en lugar de la fuente de ADN del donante, que define a un OGM.

Técnicamente, los OGM o transgénicos, son aquellos individuos cuya construcción genética ha sido alterada por la inserción de pequeños fragmentos de ADN, provenientes de una cepa de su misma especie, de una especie diferente o pudiendo también ser sintética (Pérez y Nirchito, 1993).

En la creación de individuos transgénicos ocurre introducción de material genético exógeno (ADN) en un genoma del anfitrión, resultando en su mantenimiento estable, transmisión y expresión (Nguyen y Ponzoni, 2008). Es necesario, que el ADN que se introduce en un genoma se mantenga estable de forma hereditaria y afecte a todas las células en los organismos multicelulares. Generalmente, en animales, el ADN extraño se introduce en cigotos y los embriones que hayan integrado el ADN en su genoma previamente a la primera división, producirán un organismo transgénico. De este modo, en algunos, el transgén pasará a la línea germinal y así a las siguientes generaciones a través de los gametos.

6. ANTECEDENTES

La primera microinyección de material genético se informó en 1966, pero tardó 15 años para que Gordon y colaboradores reportaran en 1980, el primer ratón transgénico, inyectando ADN en uno de los pronúcleos de un cigoto de ratón (Gordon y col., 1980). Al año siguiente Gordon y Ruddle (1981), demostraron la integración y transmisión estable a través de la línea germinal de genes inyectados en pronúcleos de cigotos de ratón obtenidos por fecundación in vitro. El paso siguiente consistió en probar que también era posible obtener ratones transgénicos que incorporaran en su genoma un gen de otra especie. Así, Palmiter y colaboradores (1982), lograron mediante esta técnica introducir un ADN constructo

(del inglés, “construct”), que consiste en una secuencia de promotor de la metalotioneína de ratón, empalmada a una hormona del crecimiento de la rata (secuencia de codificación), en los pronúcleos de ovocitos de ratón recién fertilizados. Se observó que estos ratones genéticamente modificados aumentaron de una a tres veces su tasa de crecimiento (Figura 2) (Palmiter y col., 1982).

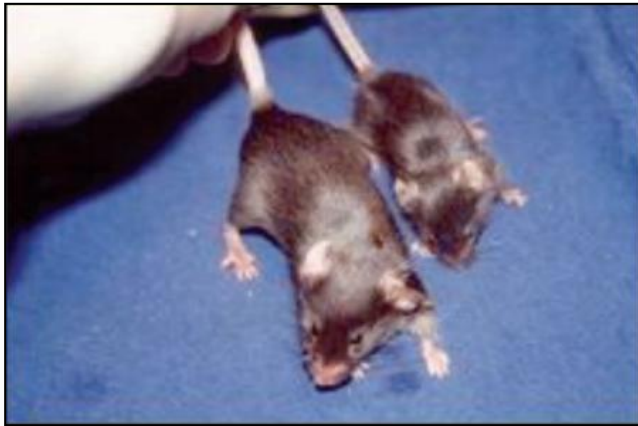


Figura 2: ratones transgénicos para la hormona del crecimiento. El ratón de la izquierda es transgénico, al portar el gen de la hormona del crecimiento de la rata, mientras que el de la derecha no lo es y pertenece a la misma camada. Fuente: (Bolívar, 2007. http://www.ibt.unam.mx/computo/pdfs/FUNDAMENTOS_2007.pdf).

En 1983, se creó la primera variedad transgénica de tabaco. Fue desarrollada por Michael W. Bevan, Richard B. Flavell y Mary-Dell Chilton mediante la creación de un gen quimérico que combinaba un gen de resistencia a un antibiótico con el plásmido T1 de la bacteria *Agrobacterium*. El tabaco fue infectado por la bacteria modificada con este plásmido, teniendo como resultado la inserción del gen quimérico en la planta. Mediante técnicas de cultivo de tejidos se seleccionó una célula de tabaco conteniendo el gen y a partir de esta, se desarrolló en una nueva planta (Bevan y col., 1983).

Desde entonces, la manipulación genética en vegetales suma más de 40 variedades de cultivos transgénicos (*Agbioworld: Cultivos y Alimentos Genéticamente Modificados*. <http://www.agbioworld.org/biotech-info/articles/spanish/resumen.html>).

La incorporación de la transgénesis en los peces fue posterior y estuvo motivada por el deseo de producir en acuicultura líneas de alta productividad.

El primer éxito en la Microinyección de secuencias de genes clonados en los huevos de peces se logró al mismo tiempo y de forma independiente por Maclean y Talwar (1984), con los huevos de trucha arco iris (*Oncorhynchus mykiss*), y por Zhu y colaboradores (1985), con los huevos de peces de colores (*Carassius auratus*). Esto fue seguido por la introducción con éxito del gen de la hormona del crecimiento (GH) humana en el genoma de la locha (*Misgurnus anguillicaudatus*), con la obtención de peces transgénicos que crecieron 3 a 4,6 veces más rápido que el control dentro de los primeros 135 días (Zhu y col., 1986).

Una expresión satisfactoria de transgénesis ha sido lograda por Fletcher y colaboradores (1988), con el gen anticongelante del lenguado (*Pseudopleurodecid americidus*) introducido en el salmón del Atlántico. En 1992, Du y colaboradores, publican la primera demostración de la mejora del crecimiento del salmón del Atlántico transgénico utilizando un constructo quimérico derivado enteramente de peces.

Desde estos primeros trabajos, la investigación en el marco de peces transgénicos se ha incrementado e involucran muchas especies de peces y una amplia gama de fenotipos, incluyendo la mejora en el crecimiento, resistencia a enfermedades y la tolerancia al frío.

Las recientes aplicaciones de la tecnología transgénica se relacionan con el desarrollo de nuevas variedades de peces ornamentales como el medaka transgénico (*Latipes Oryzias*) con un color verde fluorescente (Chou y col., 2001). El pez medaka fluorescente se comercializa actualmente por la empresa taiwanesa Taikong (www.azoo.com.tw).

En el 2004, un pez cebra transgénico que expresa fluorescencia aparece por primera vez en los mercados públicos, vendidos por una empresa de EEUU (*GloFish*, www.glofish.com) (Figura 3). El GloFish es un pez cebra transgénico de marca registrada (*Danio rerio*), que expresa una proteína fluorescente de una anémona de mar bajo el control transcripcional de un promotor específico de músculo (Gong y col., 2003).



Figura 3: pez cebra transgénico de marca registrada (*Danio rerio*), que expresa una proteína fluorescente. Disponible en: <https://www.glofish.com/meet-glofish/glofish-gallery/>.

La era de los “alimentos transgénicos” para el consumo humano directo, comenzó el 18 de mayo de 1994, cuando la FDA autorizó la comercialización del primer alimento transgénico, el tomate “FlavrSavr”, obtenido por la empresa *Calgene*, con maduración retardada. El tomate Flavr Savr fue desarrollado a través del uso de ARN antisentido para regular la expresión de la enzima poligalacturonasa (PG) en la

maduración de la fruta del tomate (Matthew y col., 1994). Las semillas para el cultivo de alimentos genéticamente modificados son desarrolladas, producidas y comercializadas por diferentes empresas multinacionales, entre ellas se destacan *Monsanto, Dupont, Novartis, y Aventis*. Hasta el momento los vegetales transgénicos más importantes para la industria alimentaria son, la soja resistente al herbicida Glifosato y el maíz Bt.

En el marco de los peces transgénicos, el 19 de noviembre del 2015 la FDA aprobó el salmón AquaAdvantage para su venta en el mercado, transformándolo en el primer animal transgénico aprobado, con destino al consumo humano.

AquaAdvantage ha sido manipulado genéticamente para crecer más rápidamente que su contra parte salmón no genéticamente modificado (Figura 4). Lo hace ya que contiene un constructo de ADN que se compone del gen de la hormona de crecimiento de salmón Chinook bajo el control de un promotor del abadejo del océano (FDA, 2015).



Figura 4: salmón transgénico y otro normal, ambos de 18 meses. Fuente: *AquaBounty Technologies*: <https://aquabounty.com> .

7. ETAPAS DE LA TRANSFERENCIA GÉNICA EN PECES

En la última década se han desarrollado técnicas que han permitido aislar, manipular, e introducir en determinados organismos secuencias génicas para mejorar algunas de sus características. La aplicación de la tecnología de transferencia génica en peces puede mejorar algunos rasgos, tales como el crecimiento, la resistencia a enfermedades, y la adaptación a condiciones ambientales no apropiadas.

Los primeros experimentos en los que se intentó aplicar la transferencia génica en embriones de pez se realizaron a mitad de los años 80 (Chourrout y col., 1986; Maclean y col., 1987a; Fletcher y col., 1988). La producción de millones de copias de un determinado fragmento de ADN, ha sido posible gracias a dos descubrimientos independientes. Primero, el hallazgo de un grupo de enzimas que cortan el ADN en secuencias concretas de la molécula, llamadas endonucleasas de restricción (Wilson y col., 2012). El segundo, el descubrimiento de plásmidos, que son un excelente

medio de transporte para genes, puesto que empleando una variedad de endonucleasas, polimerasas y ligasas, los plásmidos pueden ser cortados, llevados a una forma lineal unidos con otras secuencias de ADN y regresados en su forma circular (Díaz, 2006). Estos nuevos plásmidos pueden multiplicarse en cultivos bacterianos, y de esta forma la secuencia de ADN aislada de un determinado organismo puede ser mantenida y amplificada independientemente.

La creación de un organismo transgénico implica diferentes etapas: la construcción del ADN que vamos a introducir, la introducción exitosa de los nuevos genes, su integración, expresión en el nuevo huésped, su posterior transmisión a la descendencia y el establecimiento de una línea transgénica (figura 5) (Pérez y Nirchio, 1993). A continuación se trata en detalle cada una de estas etapas.

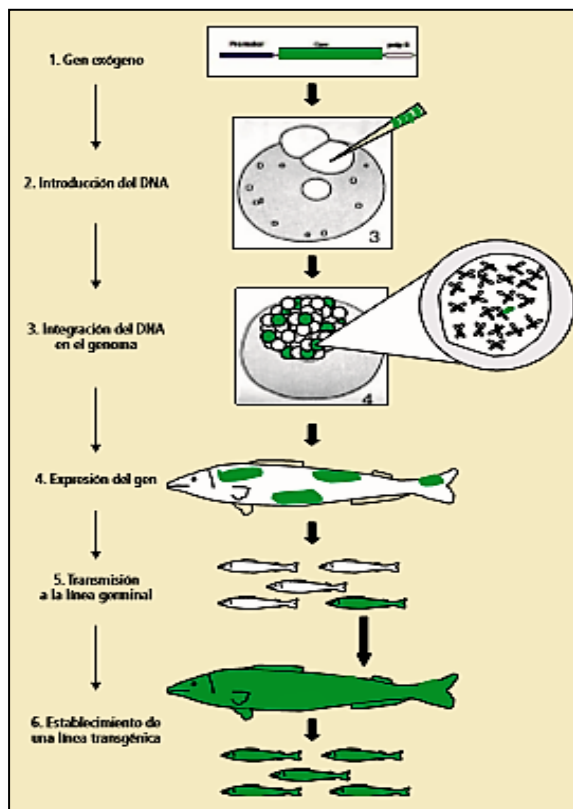


Figura 5: Esquema de la metodología tradicional para la generación de un pez transgénico. Fuente: (Portela y Huerta, 2007).

7.1 Construcción del ADN

La obtención de las construcciones, diseño y fabricación de moléculas recombinantes de ADN, son el paso inicial en la creación de OGM. El ADN que vamos a introducir debe poseer la secuencia codificante completa del gen que deseamos expresar, junto con todas las secuencias reguladoras que aseguren su expresión exitosa. La secuencia reguladora más importante es la promotora, la cual va a determinar cuándo y en que tejido se activará un determinado gen (Benavides y Guénet, 2003). El gran logro ha sido unir la región reguladora normal de un gen, con la secuencia codificante de otro, unión que recibe el nombre de "empalme génico".

En 1982, Palmiter y colaboradores, introdujeron en el ADN de cigotos de ratones un gen que codifica la hormona del crecimiento, la cual se sintetiza solo en la glándula pituitaria, unido a un promotor de una proteína (metalotoina) que normalmente se sintetiza en forma continua en el hígado. Estos ratones transgénicos mostraron un notable aumento en la tasa de crecimiento, como consecuencia de la producción de la hormona de crecimiento en grandes cantidades en el hígado (Palmiter y col., 1982).

En los comienzos de la transgénesis solo se emplearon secuencias de virus de aves o mamíferos, ante la falta de secuencias de expresión de origen piscícola. En el caso de que el pez vaya a tener una aplicación biotecnológica, es deseable que todas estas secuencias provengan también de un pez, y que se eliminen todas las secuencias bacterianas que han sido necesarias para su construcción. Uno de los promotores más utilizados es el de la actina beta de carpa (Liu y col., 1990). Posteriormente, este promotor se aisló en otras especies de peces (Takagi y col., 1994; Higashijima y col., 1997; Hamada, 1998), y ha sido utilizado cada vez más en sustitución de ciertos promotores virales. Otros promotores de origen piscícola utilizados para la generación de OGM son los de las proteínas anticongelantes de *Macrozoarces americanus* (Fletcher y col., 1988) y los de las metalotioneinas de trucha arcoíris (Inoue y col., 1992).

Otro elemento esencial en la construcción del ADN, son los genes marcadores, útiles para identificar y medir el éxito de la transferencia de genes y sus vectores, ya que permiten determinar si un fragmento de ADN se ha introducido con éxito en la célula animal (FAO y OMS, 2007). Los genes de cloranfenicol acetiltransferasa, betagalactosidasa y luciferasa bacterianas pertenecen a este grupo de genes.

En la literatura se menciona que los genes utilizados en peces transgénicos se pueden dividir en diferentes grupos (Sin F, 1997). Por un lado están los llamados genes informáticos, utilizados como marcadores; un segundo grupo, genes de mejoramiento de funciones que se diseñan para aumentar o añadir nuevas funciones en los OGM (genes codificantes); y un tercer grupo de genes, los cuales tienen regiones regulatorias, y que codifican para proteínas con propiedades y características de los peces (promotor).

7.2 Introducción del ADN foráneo

La introducción exitosa de genes nuevos comprende tres procesos: integración, expresión y transmisión.

Una vez seleccionado y construido el gen recombinante que se desea incorporar, el siguiente paso es introducirlo en el genoma del organismo blanco.

La microinyección es el método más común que se emplea en peces desde 1985, en la que se transfiere el ADN a los huevos individuales o a los embriones recién fertilizados (Figura 6). Esta inyección debe hacerse en una etapa temprana, cuando el embrión consta de 1 a 2 células. El inconveniente que se presenta en esta etapa inicial del desarrollo, es que el núcleo de las células embrionarias de los peces no es visible, por lo que resulta imposible inyectar la solución de ADN directamente en el núcleo, lo que aumentaría la eficacia del proceso (Dunham, 2004). El equipo que se

utiliza para inyectar el ADN, consiste en un microscopio de disección estereoscópica y dos micromanipuladores, uno con aguja microscópica de cristal y el otro con una micro-pipeta para sujetar el huevo fertilizado. La microinyección resulta en la integración aleatoria y tardía de múltiples copias del transgén en los cromosomas, mientras que otros se degradan. Esto hace que el pez fundador tenga un alto grado de mosaicismo y que la expresión del transgén sea impredecible (Benavides y Guénet, 2003).

Se han ensayado otros métodos que permiten la transferencia de ADN a muchos embriones a la vez (Dunham, 2004). En esta línea, se ha ensayado la electroporación, que utiliza pulsos eléctricos cortos para permeabilizar la membrana celular. Tanto en la membrana del corión como en la membrana del huevo se producen poros que permiten la entrada del ADN. Esta técnica se ha utilizado con huevos de diferentes especies de peces como medaka, pez cebra y carpa común (Powers y col., 1992; Buono y Linser 1991; Hostetler y col., 2003).

En algunos casos se ha electroporado el espermatozoides que luego ha sido utilizado para la fecundación, o bien se ha inoculado el espermatozoides con el ADN para que lo transporte en el momento de la fecundación. Se han realizado ensayos electroporando el espermatozoides en diferentes especies como carpa común, pez gato africano, tilapia o salmón chinook, pero se ha visto que los niveles de integración y expresión del transgén eran mucho más bajos que los alcanzados mediante microinyección (Dunham, 2004).

También se ha evaluado el empleo de otros métodos masivos, como el bombardeo de micropartículas recubiertas de ADN en huevos fecundados (Zelenin y col., 1991; Kinoshita y col., 2003), la perforación múltiple de membranas por microproyectiles o interacción de cargas entre membranas ADN/lípidos (lipofección) y el uso de retrovirus (Dunham, 2004). Más recientemente se han empleado elementos transponibles de pez para la introducción del ADN, y se han logrado muy buenos resultados de integración y expresión de pez cebra (Davidson y col., 2003).

En la actualidad la microinyección sigue siendo el método más ampliamente utilizado.

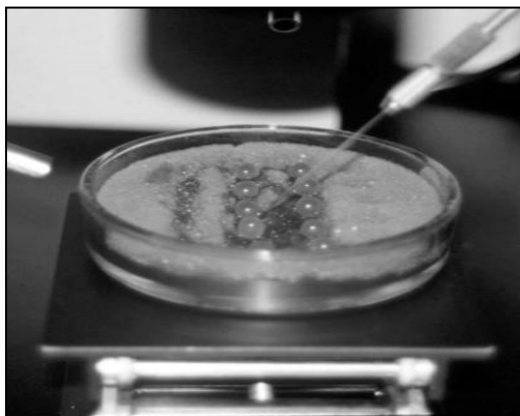


Figura 6: Microinyección de ADN en huevos de salmón. Fuente: (Dunham, 2004).

7.3 Integración del ADN

Por integración se entiende la incorporación de una o más copias del nuevo gen en un locus cromosómico. Una vez que el ADN es introducido en el embrión debe dirigirse al núcleo y posteriormente integrarse en el genoma del huésped.

Independientemente de que método se utiliza para introducir el ADN, la integración al genoma huésped se produce en una etapa del desarrollo embrionario más avanzada, en la cual se ralentiza la división celular, no hay tanta replicación, y la degradación del ADN exógeno se vuelve más aparente. Esto da lugar a la existencia de mosaicismo en la generación parental, por lo que no todas las células del organismo contienen el transgén (Dunham, 2004).

El número de copias que se integran pueden ser muy pocas o muchas y pueden integrarse a diferentes lugares únicos o múltiples de los cromosomas del OGM. También existe mosaicismo en células de la línea germinal, lo que dará una disminución en la transmisión del transgén a la descendencia. La integración retardada también causa mosaicismo (Hackett, 1993).

Algunos investigadores creen que las bajas tasas de integración y mosaicismo obstaculizan la investigación sobre peces transgénicos y el desarrollo de líneas comerciales potencialmente valiosas de peces transgénicos. La base de este pensamiento es que la mayoría de los DNA introducidos mediante microinyección u otros procedimientos de transferencia, se pierden durante los primeros 10 días después del parto en embriones de acogida. Un millón de copias del gen se introducen en cada embrión y sólo alrededor del 0,0001 por ciento de las construcciones logran establecer su residencia permanente en el genoma de los peces (Dunham, 2004).

Con el fin de mejorar los porcentajes de integración, se han utilizado enzimas responsables de la inserción de los elementos de ADN, altamente móviles, conocidos como genes saltarines o transposones. Estos transposones, cortan un segmento de ADN y lo pegan en otro cromosoma, o en otro sitio del mismo cromosoma. Se ha utilizado la meganucleasa I-SceI, y en Medaka se ha conseguido elevar los porcentajes de transgénesis hasta un 30 por ciento (Thermes y col., 2002). Varios grupos de investigación han demostrado la posibilidad de construcciones retrovirales o vectores basados en transposones para aumentar la eficiencia de integración del transgén (Hackett y Alvarez, 2000). Sin embargo, el uso de secuencias virales puede aumentar los riesgos asociados a la transgénesis.

7.4 Promotores y expresión del ADN introducido

El término expresión se refiere a la actividad del transgén manifestada como ácido ribonucleico (ARN) mensajero y proteínas.

Una expresión satisfactoria de transgénesis en peces ha sido lograda por Fletcher y colaboradores (1988), con el gen anticongelante del lenguado (*Pseudopleurodecid americanus*) introducido en el salmón del Atlántico; por Stuart y colaboradores (1988), con el gen bacteriano CAT introducido en bagres de canal, y por Zhang y colaboradores (1988), introduciendo el gen de la trucha arco iris en carpas.

Lo interesante de todos estos casos y en otros en los cuales las construcciones génicas han sido probadas en cultivos de tejidos de peces, es que los genes son expresados únicamente al estar bajo el control de promotores derivados de peces o de virus. Esto es consecuencia de la integración tardía del ADN exógeno en el genoma, con la cual el patrón de expresión del gen introducido también presenta mosaicismo (no todas las células del organismo están expresando transgén) (Dunham, 2007).

En técnicas como la microinyección citoplásmica, se introducen muchas moléculas de ADN para aumentar su eficiencia, lo que resulta en la inserción de múltiples copias. Esto afecta la expresión del transgén, ya que la maquinaria celular puede acabar inactivando este ADN extraño mediante metilación o formación de heterocromatina. Para solucionar estos problemas se ha ensayado el uso de secuencias que puedan “aislar” al gen exógeno de la formación de cromatina inactiva a su alrededor (Caldovic y Hackett, 1995).

Otro aspecto importante en la obtención de un pez transgénico es el desarrollo de sistemas que permitan un mejor control de la expresión génica. El gen recombinante (transgén) necesita ser fusionado a una secuencia promotora, que regula o permite la expresión del ADN recombinante. Si el gen se introdujese sin un promotor, es muy poco probable que se integre cerca de un promotor endógeno (ya en el genoma del huésped) que permita la expresión (Dunham, 2004). El uso de promotores artificiales puede permitir eludir algunos de los mecanismos de regulación naturales que pueden inhibir y regular la expresión. Los promotores más comúnmente evaluados en los primeros estudios de peces transgénicos eran de origen viral y de mamíferos. Los promotores virales no suponen ningún riesgo biológico o de seguridad alimentaria conocida. Sin embargo, menos investigación se lleva a cabo hoy con promotores virales debido a la mala percepción pública de la palabra virus, lo que probablemente haría la futura comercialización de peces transgénicos extremadamente difícil (Peréz y Nirchio, 1993).

La experiencia en peces con promotores de origen homólogo como la metalotioneína no ha resultado satisfactoria, pues una de sus limitaciones es la naturaleza de los inductores (metales pesados) que pueden causar efectos colaterales en el animal. En cuanto al uso de sistemas heterólogos, cabe destacar el sistema de regulación por tetraciclinas, que ha sido útil para controlar la expresión en ratones transgénicos (Furth y col., 1994; Kistner y col., 1996).

Puesto que el ADN viral no es deseable, el futuro depende del aislamiento de genes y regiones reguladoras derivadas de peces. En la actualidad unos pocos genes han sido aislados, como es el caso de genes que codifican proteínas tales como transferrinas, inmunoglobulinas, actina, hormona del crecimiento, metalotioneínas, entre otras, pero su número y variedad va en aumento.

Para muchas aplicaciones de los peces transgénicos también es deseable el control especial del transgén, de manera que éste sólo se exprese en determinado órgano o tejido. Esto es posible usando promotores específicos de tejidos para dirigir la expresión del gen exógeno. En peces ya se dispone de algunos de estos promotores que permiten una expresión específica en el corazón (Shentu y col., 2003), hígado (Her y col., 2003), glándula pineal (Gothilf y col., 2002), entre otros.

Estos promotores no sólo permiten restringir la expresión del transgén a un tipo celular determinado, sino que también pueden permitir que éste se exprese en las mismas condiciones fisiológicas en las que lo hace el gen original del que proviene el promotor (Duham, 2004).

7.5 Transmisión a la descendencia

El último paso en la generación de un animal transgénico es conseguir la presencia del gen exógeno en las células de la línea germinal, para asegurar que el transgén pase a la siguiente generación.

Peces transgénicos F1 (descendencia del apareamiento inicial de dos organismos) producidos a través de cualquier técnica de transferencia presentan mosaicismos, por lo que la transmisión a la siguiente generación será baja (Dunham, 2004). Sin embargo, muchos de estos peces pueden transmitir el ADN integrado de forma estable a su progenie pero en bajas proporciones. El porcentaje de transmisión es aun más bajo en peces con ciclos vitales largos (Fletcher y col., 1988). Estudios de reproducción con pez cebra, indicaron que aunque los peces transgénicos fundadores (obtenidos a partir de un embrión al cual se le inyectó ADN) eran con frecuencia mosaicos de la línea germinal, los individuos transgénicos de generaciones posteriores fueron totalmente homocigotos (todas las células poseen el transgén) para el transgén marcador (Stuart y col., 1990; Shears y col., 1991).

El animal que obtenemos a partir de un embrión inyectado con ADN se llama “fundador”, y los peces transgénicos que descienden del mismo fundador, conforman una misma línea transgénica, estableciendo así la línea germinal (Benavides y Guénet, 2003).

Posteriormente, a partir de la técnica de reacción en cadena de la polimerasa (PCR), se detectan las secuencias de ADN que se han insertado en el genoma huésped (Benavides y Guénet, 2003).

7.6 Limitaciones técnicas e inconvenientes de la transgénesis en peces

Cuando se intenta crear un OGM se presentan varios inconvenientes, ya sea en el momento de la entrega del transgén, en su integración genómica, expresión o en su transmisión. Por ejemplo, los cambios en la integración genómica de los transgenes en los cromosomas de acogida siguen siendo bastante bajos, los huevos de algunas especies de peces no son adecuados para la microinyección, requiriendo de métodos alternativos. Se observa también, baja frecuencia en la transmisión de la línea germinal a la progenie, ya que la mayoría de los fundadores transgénicos presentan mosaicismos, causado por la integración retrasada de los transgenes (Benavides y Guénet, 2003; Dunham, 2004).

En cuanto a la expresión y transmisión del transgén, los problemas más comunes radican en que la expresión del transgén no está bajo estricto control por falta de vectores inducibles; los niveles de expresión no son uniformes entre los individuos, incluso dentro de una misma línea; la expresión del transgén se silenció con frecuencia en las células de la línea germinal; y la herencia de los transgenes en las generaciones posteriores no siempre es estable (Duham, 2004).

Todas estas limitaciones en la creación de un OGM deben ser estudiadas para obtener nuevas alternativas para la creación futura de peces transgénicos con fines tecnológicos.

8. ¿POR QUÉ PENSAR EN PECES TRANSGÉNICOS?

Partiendo de la base que el desarrollo de la acuicultura es de interés, la disponibilidad de líneas domesticadas y genéticamente mejoradas para características de producción pasa a ser un requisito esencial. De poco valdría invertir en mejoras ambientales (sanidad, nutrición, calidad de agua) si no se cuenta con animales capaces de utilizar eficientemente los insumos.

Cuando existe variación genética aditiva en un rasgo, siempre habrá respuesta a la selección si se aplican métodos eficientes. En la literatura existen varias estimaciones de la respuesta a la selección en la tasa de crecimiento en experimentos y programas de mejoramiento a gran escala (Ponzoni y col., 2012). Las siguientes estimaciones constituyen ilustrativos ejemplos (expresando la ganancia genética en porcentaje, por generación de selección): salmón coho (Pacífico), 10.1; trucha arco iris, 13.0; salmón del Atlántico, de 10.6 a 14.2; bagre del Canal, 12.0 a 20.0, y para tilapia del Nilo, 17.0 (Gjedrem y Baranski, 2009). Un promedio de estas estimaciones es de aproximadamente 15 por ciento de ganancia genética por generación para la tasa de crecimiento. Esto significa que es posible duplicar la tasa de crecimiento en menos de siete generaciones. Esto es una ganancia genética mayor de la que se suele obtener en animales terrestres, y se puede conseguir gracias a que de modo general los animales acuáticos tienen mayor variación genética en la tasa de crecimiento, mayor fecundidad, así como un menor intervalo de generaciones. En consecuencia, es posible aplicar una intensidad de selección mucho mayor y conseguir una ganancia genética anual mayor gracias a la rápida reposición generacional.

Los beneficios de la mejora genética en la tasa de crecimiento derivan en parte de la reducción de los costos fijos y a que decrece la necesidad de energía para el mantenimiento durante todo el ciclo vital. A menudo también se puede observar una respuesta correlacionada en la mejora de la tasa de conversión del alimento (Thodesen y col., 2001).

En el programa de cría noruego, que hoy abastece de huevos genéticamente mejorados de salmón del Atlántico y trucha arco iris a más del 70 por ciento de la industria de la piscicultura, la relación costo / beneficio ha sido estimada en 1/15. Estimaciones similares se han obtenido para programas de cría de animales de granja terrestres. La relación, sin embargo, depende en gran medida del tamaño del sector de la producción total que se beneficia del programa de mejoramiento genético, y podría ser mayor (Ponzoni y col., 2007, 2008).

Científicos de WorldFish han demostrado que la inversión en programas de mejoramiento genético de la tilapia y la carpa a nivel nacional puede dar lugar a cocientes beneficio / costo muy favorables, del orden de 8 a 60, dependiendo de las circunstancias específicas, y a veces incluso mayor (Ponzoni y col., 2007, 2008).

A pesar del éxito de los antes citados programas de mejora genética basados en un enfoque clásico, los peces transgénicos podrían proporcionar beneficios adicionales. Los programas de mejora genética clásicos llevan tiempo y trabajo, y la esperanza siempre ha sido que la transgénesis resultase en más rápidas ganancias con menos esfuerzo. También, debe reconocerse que hay rasgos difíciles de mejorar con el enfoque clásico. En tales instancias la transgénesis podría ofrecer una alternativa para satisfacer la demanda de peces y mariscos de forma más eficiente y sostenible.

9. PECES COMO MODELO

Dentro de los vertebrados los peces presentan características ventajosas que los hacen aptos para su manipulación genética (Powers, 1989). Entre ellas se destacan, sus ciclos cortos, su alta fecundidad con desoves de miles de huevos y por tanto mayor número de individuos transgénicos producidos. Sus huevos son de gran tamaño y a menudo transparentes, lo que permite hacer el seguimiento del desarrollo embrionario (Bolivar, 2007).

Otra ventaja importante, es que los peces presentan fertilización e incubación externa, lo que evita problemas de fertilización *in vitro* y reimplantación, y la fertilización se puede retrasar por un periodo de tiempo considerable después de la colecta de los huevos. Además, no solo es posible su cultivo en condiciones de laboratorio, dado su pequeño tamaño y tiempo generacional corto, como es el caso del pez cebra (*Brachydanio rerio*) y pez medaka (*Oryzias latipes*), sino que también se pueden utilizar los mismos embriones en diferentes etapas para obtener un valor dinámico de expresión, y observar *in vivo* la expresión de los transgenes (Figura 7).

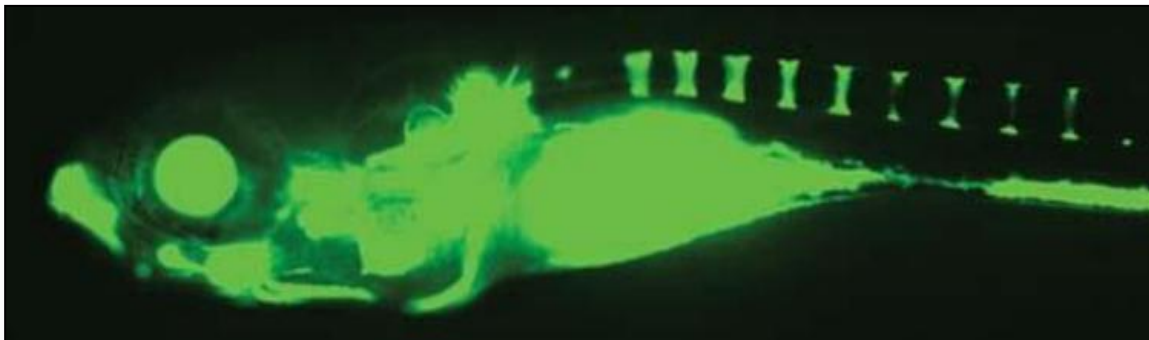


Figura 7: observación *in vivo* de la expresión de los transgenes. Fuente: (Mendoza, 2015).

Se ha demostrado que los peces tienen además frecuencias de integración iguales o mayores a las registradas para ratones (10 a 70 por ciento), y que tienen una excelente respuesta frente a la manipulación genética que los capacita para soportar los efectos de los cambios genómicos (Bolivar, 2007).

En la actualidad las especies seleccionadas para el estudio de peces transgénicos son unas pocas decenas (Tabla 1). Los criterios para su selección se basan en su fácil manejo, o por su valor comercial, como la carpa, salmón y tilapia.

Tabla 1: algunos peces transgénicos en desarrollo

Especies	Gen introducido*	Efectos deseados	País
Salmon del atlántico	PAC	Tolerancia al frío	EE.UU,
	PAC, HC de salmón	Mayor crecimiento	Canadá
Salmon coho	PAC, HC de salmón real	Aumento 10 a 30 veces su crecimiento (en 1 año)	Canadá
Truca arcoíris	PAC, HC de salmón	Mayor crecimiento y eficiencia en alimentación	EE.UU, Canadá
Tilapia	PAC, HC de salmón	Mayor crecimiento y eficiencia en alimentación	Canadá, R. Unido
Tilapia	Gen productor de insulina de tilapia modificado	Producción de insulina humana para diabéticos	Canadá
Locha de fango	HC de locha de fango + Genes promotores de Locha de fango y ratón	Mayor crecimiento y eficiencia en la alimentación.	China, Republica De Corea

PAC: gen de proteína anticongelante de peces del ártico HC: gen de hormona del crecimiento

Fuente: tabla de referencia disponible en:

<http://www.argenbio.org/adc/uploads/pdf/Biotecnologia%20y%20acuicultura.pdf>

10. BENEFICIOS Y APLICACIONES DE LOS PECES TRANSGÉNICOS

En la acuicultura, los peces modificados por ingeniería genética representan una opción muy importante para la producción de organismos que promuevan un mayor desarrollo en esta industria, en un ambiente de mayor respeto a la naturaleza y de manera más sostenible. Las técnicas de la ingeniería genética pueden ser empleadas para mejorar la tasa de crecimiento, incremento de las tasas de supervivencia incrementando la resistencia a enfermedades, control de la reproducción, maduración y esterilidad, resistencia a bajas temperaturas y a la congelación, que les permitan adaptarse a diferentes condiciones ambientales, mejoramiento a la conversión de alimentos y cambios en el metabolismo.

10.1 Manipulación de transgénicos en rasgos aparte del crecimiento

10.1.1 Tolerancia al frío y resistencia a la congelación

La idea de un sistema de “anticongelante” se describe en peces marinos que habitan en la costa del norte de Labrador cuyos fluidos corporales tenían el mismo punto de congelación del agua de mar (-1.7 a -2 grados Celsius) en lugar de agua dulce (0 grados Celsius) (Fletcher y col., 1992).

Especies como el salmón, se congelan y mueren a temperaturas por debajo de -0,7 grados Celsius, por lo que su cultivo es muy limitado en épocas de invierno (Fletcher y col., 1992).

La tolerancia al frío refiere a la capacidad de los peces como la tilapia y la carpa para sobrevivir a temperaturas que van de 2 grados a 10 grados Celsius.

La idea es utilizar genes anticongelantes de peces de regiones polares, lo que permitirá que peces transgénicos que expresen estos genes toleren bajas temperaturas.

La modificación de la proteína anticongelante podría mejorar la tolerancia al frío mediante la alteración de la membrana celular (Wu y col., 1998), varios intentos de transferencia de genes se han llevado a cabo en peces de colores (Wang y col., 1995).

Muchos teleósteos marinos que habitan en aguas polares con temperaturas de hasta -1.9 grados producen proteínas que les permiten evitar la congelación.

Existen cuatro de estas proteínas: AFP (proteínas anticongelantes) tipo I, II, III, IV, así como una glicoproteína anticongelante (Davies y col., 1989 a). Estas proteínas actúan uniéndose a cristales de hielo que se forman en los peces e inhiben su crecimiento, disminuyendo la temperatura de congelación del organismo.

La glicoproteína anticongelante se encuentra en el bacalao antártico (*Dissastichus mawsoni*); la proteína tipo I fue aislada en solla roja (*Pleuronectes americanus*), la tipo II de cuervo marino (*Hemirhamphus americanus*) y la tipo III del abadejo del océano (*Macrozoarces americanus*).

Los genes que codifican estas proteínas se expresan en el hígado y muestran variación de expresión estacional (Fletcher y col., 1992). También se ha observado expresión en piel, branquias y otros tejidos (Fletcher y col., 2001; Zhong y Fan, 2002; Haraing y col., 2003).

La proteína tipo III del abadejo del océano ha sido introducida en el pez rojo (*Carassius Auratus*). Aunque los niveles de expresión eran 1000 veces menos que en el abadejo, se reportó un aumento a la tolerancia al frío (Wang y col., 1995).

El salmón del Atlántico también se ha diseñado para expresar los genes de la proteína anticongelante (Fletcher y col., 1992; Hew y col., 1995). Se introdujo en el salmón Atlántico el gen de una AFP de tipo I del pez plano (*Pseudopleuronectes americanus*), bajo control de su propio promotor. Se demostró que el transgénico se integro al genoma pez, y se transmitía a la siguiente generación (Fletcher y col., 1988). Sin embargo, estos animales no eran resistentes a la congelación. Esto puede deberse a dos cosas, la primera, es que el salmón Atlántico carece de endopeptidasas que son necesarias para procesar los precursores de AFP y obtener así la proteína madura activa. La segunda, podría deberse a que la expresión del gen en el transgénico es baja como para conferirle resistencia al frío. Esto último es debido a que el salmón transgénico solo cuenta con una copia de los genes AFP, mientras que en el pez plano los genes AFP están en múltiples copias (Hew y col., 1998).

Esta es la segunda de las principales aplicaciones de la transgénesis en peces, la cual podría disminuir las pérdidas de una variedad de especies de peces ocasionadas durante la temporada de invierno. Se encuentra aún en fase experimental, y existe el temor sobre un posible aumento de la aptitud y potencial invasivo que los peces resistentes al frío y a la congelación puedan crear (Ponzoni y Nguyen, 2008).

10.1.2 Resistencia a enfermedades

Una limitante importante en la acuicultura industrial es el brote de diversas enfermedades. Esto es debido a que los peces son cultivados en altas densidades y bajo un alto grado de estrés, lo que los hace susceptibles a padecer diferentes infecciones, causadas por una gran variedad de agentes patógenos como bacterias, virus, hongos y parásitos.

A modo de ejemplo, podemos citar a la industria del bagre de canal, la cual sufre enormes pérdidas económicas de más de 10 millones de dólares en los EE.UU debido a enfermedades. Los antibióticos pueden ayudar, pero solo unos pocos han sido aprobados para su uso en acuicultura (Sarmasik y col., 2002).

Es por esta razón, que se ha propuesto como alternativa utilizar la transferencia genética para producir peces transgénicos con mayor resistencia a enfermedades. Se ha buscado alcanzar dos metas diferentes, lograr la resistencia a patógenos virales específicos, y por otro lado aumentar la resistencia a infecciones bacterianas (Dunham, 2004). Dado que los peces tienen un sistema inmune poco desarrollado, una estrategia sería potenciar el mecanismo de defensa no específico de la inmunidad natural, utilizando mediadores como la lisozima y la transferrina.

Las lisozimas son una de las proteínas antimicrobianas mejor caracterizada, son hidrolasas que rompen ciertos tipos de enlaces presentes en las paredes de las células bacterianas. Las lisozimas se encuentran en muchos tejidos de vertebrados superiores y pertenecen al sistema inmune innato.

Un intento pionero fue demostrado por Hew y colaboradores (1995) en el salmón Atlántico, al cual se le introdujo el gen de la lisozima de la trucha arcoíris. La lisozima de la trucha arcoíris es un potente agente contra bacterias gran +, y el gen que la codifica bajo control del promotor AFP del *menticirrhus americanus* se utilizó para generar el salmón transgénico (Hew y col., 1995). No se conoce hasta el momento si esta estrategia fue efectiva para aumentar la resistencia a las infecciones bacterianas.

También se ha generado pez cebra que contiene el gen de la lisozima de pollo (lisozima de clara de huevo), bajo el control de un promotor de la queratina de hirame (*paralichthys olivaceus*). En la F2 de esta línea transgénica la expresión del gen era fuerte en tejidos epiteliales, hígado y branquias. Entre un 60 y 65 por ciento de los peces cebra transgénicos sobrevivieron a infecciones, mientras que el 100 por ciento de los controles no transgénicos murió. Esto demostró que la estrategia proporciona un aumento en la resistencia a enfermedades de origen bacteriano en esa especie (Yazawa y col., 2006).

Otro mecanismo para potenciar la mejora de la resistencia a enfermedades en organismos acuáticos transgénicos, podría ser la utilización de péptidos antimicrobianos. Los primeros identificados fueron las cecropinas en la polilla de seda (*Hyalophora cecropa*) (Dunham y col., 2002).

Las cecropinas son pequeños péptidos catiónicos de insectos que presentan actividad bactericida. Las mismas también se han identificado en una gran variedad

de vertebrados e invertebrados, y especies como el cerdo las sintetizan, lo que indicaría que no son tóxicas para organismos eucariotas. Características estructurales de las cecropinas les permite incorporarse fácilmente en la membrana celular de bacterias, hongos y parásitos, formando poros en la membrana que conducen la muerte del patógeno (Bechinger, 1997).

Estos péptidos antimicrobianos también son capaces de inhibir la replicación viral, alterando en forma directa su envoltura, y provocando desintegración de sus cápsidas. Estos péptidos fueron más efectivos en virus envueltos que en los virus no envueltos, y pueden actuar en diferentes etapas de la infección viral para inhibir su replicación (Chiou y col., 2002).

Tres mecanismos se han propuesto para explicar la inhibición de la replicación viral por parte de los péptidos antimicrobianos: 1) producen inactivación directa de las partículas virales al actuar sobre las bicapas de lípidos de la envoltura viral (Daher y col., 1986); 2) Inhiben la penetración del virus en la membrana celular del huésped (Srinivas y col., 1990; Baghian y col., 1997), y 3) Inhiben la replicación viral en células infectadas por la supresión de la expresión de gen viral (Wachinger y col., 1998).

La inserción del péptido cecropina B aumento la resistencia a enfermedades bacterianas de dos a cuatro veces en el bagre de canal (Dunham y col., 2002). No se registró efecto pleiotropico (cuando la inserción de un gen afecta a más de un rasgo), sobre el crecimiento, y el transgén se transmitió a la siguiente generación. Los bagres transgénicos y los bagres no transgénicos se desafiaron en estanques con *Edwardsiella ictaluri* (enterobacteria). Ambos genotipos presentaron mortalidad elevada, pero la sobrevivencia de los transgénicos fue el doble frente al control no transgénico. Se obtuvieron resultados similares para transgénicos cecropinas en Medaka (Sarmasik y col., 2002).

En la actualidad, la aplicación de la transgénesis para mejorar la resistencia a enfermedades se encuentra en vías de investigación. Si tiene éxito, los avances en esta área pueden provocar la reducción de pérdidas de producción y un menor uso de antibióticos para el control de enfermedades (Nguyen y Ponzoni, 2008.).

10.1.3 Modificaciones en el metabolismo

Se ha sugerido, que la modificación del metabolismo digestivo de los peces podría permitirles aprovechar de manera más eficaz la utilización de los carbohidratos (CH).

Los peces en comparación con los animales terrestres de granja, tienen una baja capacidad para utilizar los CH. Se cree que esta dificultad en los peces, puede estar relacionada con problemas en el transporte de la glucosa a través de la membrana plasmática.

Algunos peces como los salmónidos son carnívoros y son alimentados con productos derivados del pescado. Esto significa un problema no solo desde el punto de vista económico, sino que también afecta al ecosistema marino y terrestre. La sobrepesca de determinadas especies utilizadas para alimentar a los salmones, como el capelán y la anguila de arena de mar, ha causado un daño significativo en el ecosistema de aves marinas (Holmes, 1996). Una posible solución frente a este

problema, podría ser la modificación metabólica de los peces de cultivo para que puedan utilizar los carbohidratos (CH) de plantas.

Con este fin, se realizó una investigación en Finlandia que demostró que a salmónidos a los que se les transfirió genes de transportador de glucosa tipo 1 humano y la hexoquinasa tipo 2 de rata con un promotor CMV (*Cytomegalovirus*), les permite usar piensos de origen vegetal con mayor facilidad (Krasnov y col., 1999).

En cuanto al aumento de la utilización de los CH en los peces, se les transfirió a dos especies de salmónidos los mismos transgenes. Pero desafortunadamente no se obtuvo evidencia directa que compruebe la funcionalidad de los genes en el metabolismo de los CH, debido a un alto mosaicismo, lo que impidió una correcta interpretación de los resultados (Krasnov y col., 1999).

Otra aplicación de interés en la modificación del metabolismo de los peces es la mejora en el metabolismo del fósforo. El gen de la fitasa aislado *del Aspergillus niger*, se transfirió a Medaka, y se comprobó que el Medaka transgénico produce la enzima recombinante activa. Estos Medakas, presentaron una mayor tasa de sobrevivencia frente a los controles no transgénicos (hasta seis veces) al consumir fitato como única fuente de fósforo (Hostetler y col., 2005).

Otros experimentos intentan modificar la composición de ácidos grasos en los peces. Ácidos grasos como el eicosapentanoico (EPA) y el ácido docosahexanoico (DHA) presentes en los peces, traen beneficios importantes a los humanos que consumen pescado. El problema radica en la inclusión de aceite vegetal en la dieta de los peces en cultivo, lo que provoca una disminución en la calidad de estos ácidos grasos en la carne del pescado (Bell y col., 2002).

El éxito en estas investigaciones podría acarrear grandes beneficios, permitiendo reducir la explotación de determinadas especies utilizadas como alimento para peces de cultivo, disminuyendo así el impacto sobre los ecosistemas.

10.1.4 Esterilidad

Aunque el uso de peces transgénicos en acuicultura tiene el potencial de aumentar la disponibilidad de alimentos y disminuir los costos de producción, existe el temor sobre la posibilidad de escape de los individuos transgénicos y la contaminación de las poblaciones silvestres por un posible cruzamiento. Por esta razón, la obtención de peces estériles podría ser el medio ideal para la contención de los peces transgénicos en los sistemas de producción.

Otra ventaja de la generación de peces transgénicos estériles, es que permitiría que el metabolismo del pez no invierta recursos en el crecimiento gonadal, favoreciendo el crecimiento somático y el desarrollo de músculo comestible.

La manera más eficaz de lograr esterilidad en peces, es apuntar a genes que codifican para hormonas sexuales, como la gonadotropina y la hormona liberadora de gonadotropinas (GnRH) (Maclean y col., 2002).

Como la técnica de "Knockout" (eliminar) no estaba disponible en peces, las investigaciones intentaron durante muchos años, reducir la expresión génica por orientación del producto de ARNm de un gen. Aunque se han aplicado diferentes métodos para producir transgénicos estériles a través de manipulación cromosómica, la esterilidad no se logró en el 100 por ciento del tiempo, y el pez a menudo presenta retraso en el crecimiento (Dunham, 2004).

Recientemente se reportó el uso de un método para inhibir la expresión transgénica del gen que codifica para la GnRH, hormona importante en el desarrollo gonadal y reproductivo (Hu y col., 2006). El primer reporte en esta tecnología se produjo en ratones hipogonadales (Mason y col., 1986), donde una delección en el gen GnRH disminuía los niveles de gonadotropina, obteniendo de esta forma ratones estériles. Si se reemplazara el gen GnRH por una copia no funcional, se podría obtener peces estériles.

En cuanto a la técnica antisentido, la misma consiste en producir ARN que sea complementario del ARN de un gen específico. De esta forma se produce la hibridación entre estas dos moléculas, y el ARN no traduce a proteína. Esta técnica, tiene por objeto, impedir la transcripción del mensaje interfiriendo a nivel del ARNm. Esto se consigue utilizando un principio biológico general que permite que en el ADN, siempre por razones de enlaces químicos, el nucleótido Timina se une al nucleótido Adenina, mientras que el nucleótido Citosina se une al nucleótido Guanina. De modo que si se conoce la secuencia de nucleótidos de un determinado gen, se puede fabricar su contraparte complementaria, que al entrar al núcleo de la célula, automáticamente se va a unir a la secuencia respectiva del ARNm, y de esta forma la transcripción se detiene. Cada gen tiene muchos nucleótidos, pero no es necesario fabricar la contrapartida total del gen. Basta solo una pequeña porción del oligonucleótido que se va a unir a una pequeña porción del ARNm, para bloquearlo y que no pueda transmitir el mensaje. De allí que a este oligonucleótido, que tiene la secuencia de nucleótidos complementaria, se le llame "antisentido", ya que la operación normal, es la que tiene sentido.

La primera construcción antisentido se realizó en trucha arcoíris. La construcción contenía ADNc antisentido de la GnRH III de salmón Atlántico, con un promotor del propio gen de la GnRH. Se logró la integración, transmisión a la descendencia y presencia del ARN antisentido en el cerebro. Desafortunadamente, los niveles de GnRH no se vieron afectados y los peces no eran estériles (Uzbekova y col., 2000).

Esto puede ser debido a dos circunstancias, en primer lugar, la técnica antisentido presenta varios inconvenientes: para llegar a bloquear un determinado ARNm con un oligonucleótido debe lograrse que este último se introduzca al núcleo de la célula, lo cual no es fácil. Por otra parte, es necesario que el mismo, alcance el compartimiento relevante dentro de la célula donde se pueda unir a su respectivo ARNm. Con las metodologías actuales, sucede que una gran proporción del oligonucleótido es atrapado en un compartimiento intracelular llamado endosoma, donde queda no disponible para unirse al ARNm. En este sentido se están investigando varias aproximaciones, ya sea para engañar al endosoma o acelerar su liberación cuando éste capta al oligonucleótido (Gura, 1995). En segundo lugar, los peces tienen tres formas de GnRH codificadas por tres genes diferentes. Conocer

con profundidad cual es la función de cada una, podría ser útil para investigaciones futuras.

En este ámbito, un grupo de investigadores chinos utilizó una construcción antisentido para el gen GnRH III de la carpa, bajo un promotor de actina beta de carpa. La introducción en esta especie determinó que el 30 por ciento de la población en estudio no desarrolló gónadas (Hu y col., 2006).

La principal ventaja de la técnica de antisentido, es que es posible invertir la esterilidad inyectando hormonas. Estos peces podrían reproducirse y su progenie seguiría siendo estéril.

En la actualidad, la generación de peces transgénicos estériles sigue siendo una posibilidad futura, aunque ya se han hecho importantes avances en trucha arcoíris (Nguyen y Ponzoni, 2008).

10.1.5 Aplicaciones en industria farmacéutica: Biofábricas

Se entiende como biofábricas, la utilización de animales transgénicos para la síntesis de proteínas recombinantes de alto valor con aplicaciones terapéuticas. Se busca la creación de peces transgénicos que produzcan proteínas para uso clínico en humanos.

Los peces resultan especialmente atractivos para estos procedimientos, por presentar un rápido crecimiento, tiempo de generación rápido y económico, y porque la transgénesis resulta más fácil en peces en comparación con los animales de granja. Otra característica importante en los peces, es la de poder producir todas las modificaciones traduccionales para obtener proteínas activas. Algunos autores han demostrado que el músculo de pez cebra puede usarse como bioreactor (Gong y col., 2003).

Se ha logrado producir a partir de tilapia el factor VII de coagulación humana, y su posterior purificación a partir de embriones o el suero del pez. La construcción de esta tilapia se realizó con un promotor de la vitelogenina de tilapia con la conducción de un ADN que codifica el factor VII de coagulación humana (Hwang y col., 2004).

El factor VII de coagulación se utiliza después de trasplantes de hígado (la vitelogenina se sintetiza en hígado), y en tratamientos de lesiones.

Otros experimentos se realizaron por Pohajdak y colaboradores (2004), que diseñaron una tilapia para que produzca insulina humana.

Aunque no se han logrado resultados significativos en esta área, la utilización de peces transgénicos para producir proteínas de interés terapéutico o industrial ampliaría considerablemente las aplicaciones en la acuicultura.

10.1.6 Toxicología ambiental: biosensores

Los peces transgénicos pueden servir como sistemas de detección de contaminantes en el agua. Existen líneas de pez cebra (*Danio rerio*) que contienen un gen indicador, normalmente el de la proteína verde fluorescente (GFP), o la

luciferasa de luciérnaga, cuya expresión está bajo el control de un elemento inducible por algún contaminante del agua (Maclean, 1998; Legler y col., 2000; Carvan y col., 2001; Mattingly y col., 2001; Kusik y col., 2008). Así, se han utilizado promotores de choque térmico, promotores que responden a metales pesados, o a hidrocarburos aromáticos. De esta forma, el pez cebra transgénico emite luz únicamente cuando se encuentra en un medio con altos índices de contaminación. Tras la incorporación de estos compuestos y posterior acumulación en los tejidos del pez, éstos son capaces de activar los promotores dando lugar a la expresión del gen indicador.

Estudios adicionales han logrado hacer medaka transgénica que expresa la proteína verde fluorescente (GFP) (Figura 8) en presencia de estrógenos y otros contaminantes endocrinos (Zeng y col., 2005).

La proteína verde fluorescente (GFP), es una proteína que presenta fluorescencia de color verde brillante. Aunque muchos otros organismos marinos tienen similares proteínas, la GFP se refiere tradicionalmente a la primera proteína aislada de la medusa *Aequorea victoria*.

El uso de peces como biosensores, también puede llevarse a cabo a través de la inserción de un transgén que se activa por determinados compuestos, lo que resulta en la producción de señales detectables tales como estrógenos ambientales (Gong y col., 2003). En algunas cepas de *Danio rerio*, un transgén produce proteína verde fluorescente de una manera dependiente de la dosis en respuesta al cadmio (Blechinger y col., 2002) y a neurotoxinas (Zhang y Gong, 2013).

También hay informes de investigaciones en medaka, que utilizan vectores basados en bacteriófagos mutagénicos para detectar mutaciones causadas por contaminantes acuáticos (Winn, 2001). Estos peces contienen un gen que actúa como diana mutacional. Este gen se transfiere posteriormente a un sistema bacteriano especializado para cuantificar las mutaciones.

Estos peces genéticamente modificados, utilizados como indicadores, pueden ser introducidos en cámaras de confinamiento porosas en la naturaleza o pueden ser liberados al agua dulce, y actuar como detectores de contaminantes específicos, por ejemplo, río abajo de las fábricas, fábricas de papel y tratamiento de aguas residuales.

Aunque la investigación sobre buenas prácticas agrarias en estos peces ha demostrado que tendrían un mínimo impacto sobre los ecosistemas, se deben tener ciertas precauciones antes de desplegar tales peces libremente en la naturaleza, en particular si no son nativos. Mantener los peces contenidos en el medio ambiente natural, o transferir agua de ensayo al laboratorio, puede ser un enfoque razonable a tener en cuenta.

Ng y colaboradores (2011), analizan algunas ventajas del uso de peces transgénicos como biomonitores: en primer lugar, los animales utilizados no tienen que ser sacrificados y el mismo animal puede usarse para controlar continuamente; en segundo lugar, la respuesta de un animal puede reflejar la influencia in vivo de un compuesto, su bioacumulación, biotransformación, así como informar sobre

cualquier contaminante que desencadene el transgén. Y finalmente destaca, que las respuestas frente a estos compuestos son rápidas, ya que actúan a nivel de genes y pueden desencadenar una respuesta antes que sus efectos se observen a nivel de una población.

El uso de peces transgénicos en toxicología ambiental esta aún poco explotada, sin embargo, dada la existencia de un alto número de enfermedades humanas que se relacionan con contaminantes acuáticos, cabe pensar que en un futuro inmediato se destinaran más recursos es este campo.



Figura 8: Medakas transgénicos tratados con GFP (proteína verde fluorescente). Disponible en: <http://quimica-urjc-biologia.wikispaces.com/premio+nobel+2008>.

10.1.7 Biocontroles

Varias formas de control están siendo consideradas para lograr erradicar las especies invasoras en cuerpos de agua. Este es un problema frecuente en muchos ecosistemas de agua dulce, por ejemplo, la carpa común y pez mosquito son plagas comunes en Australia.

Hay muchas técnicas genéticas, pero no modificaciones genéticas en proceso de estudio, con el objetivo de intentar erradicar las poblaciones invasoras de forma que no sea destructivo para la biota nativa.

Técnicas similares se podrían aplicar utilizando la modificación genética a través del uso de un gen inducible de mortalidad, o un gen de esterilidad inducible.

Las especies transgénicas podrían utilizar enfoques que implican la alteración de la proporción sexual en los peces nativos, introduciendo cepas transgénicas estériles en los cuerpos de agua donde se encuentran dichas especies invasoras (Davis y col., 1999). Para que este enfoque tenga éxito, es necesario que los peces transgénicos introducidos sean capaces de competir con los peces nativos fértiles, por esta razón se busca adicionarles otros rasgos que les permitan expresar un aumento en su aptitud. Estos efectos han sido bien modelados y teóricamente, un

"gen troyano" tal tiene la capacidad para conducir extinciones de poblaciones, incluso con sólo una única pequeña introducción de la cepa genéticamente modificada (Muir y Howard, 1999). Se predijo que, un transgén introducido en una población natural por un pequeño número de peces transgénicos, se extienda como resultado de la ventaja de acoplamiento mejorada, pero la reducción de la viabilidad de la descendencia causará eventual extinción local de ambas poblaciones. Sin embargo, estos riesgos deben ser evaluados con cada nuevo animal transgénico antes de su liberación.

Algunos ensayos similares están siendo realizados en la naturaleza usando mosquitos (*Anopheles spp*) genéticamente modificado, para intentar reducir sus poblaciones que llevan y transmiten enfermedades a los seres humanos (Morris, 2011).

Es probable, que el resultado de estos experimentos tenga fuertes efectos sobre la conveniencia o no de utilizar técnicas similares aplicadas a los peces.

10.1.8 Xenotransplantes

Se han obtenido importantes avances en esta área para el tratamiento de la diabetes tipo I en humanos utilizando a la tilapia (*Oreochromis niloticus*) como modelo. Se han construido tilapias transgénicas que expresan una insulina "humanizada" en sus corpúsculos de Brockmann, para su posterior trasplante. Este transgén no parece tener efectos negativos sobre la supervivencia de los peces transgénicos en condiciones de laboratorio, y la producción de insulina humana continúa durante por lo menos 8 años (Hrytsenko y col., 2011).

La ventaja que presenta la tilapia frente a otros animales es que no se requiere de procedimientos complejos para el asilamiento de sus corpúsculos. Además son más resistentes a la hipoxia que los de mamíferos, lo que permite que sean trasplantados encapsulados disminuyendo la posibilidad de rechazo por parte del sistema inmunitario del receptor.

Se realizó un experimento en el que se trasplantó islotes de tilapia transgénica a ratones diabéticos, y estos mantuvieron niveles normales de glucosa (Wright y Pohajdak, 2001; Pohajdak y col., 2004; Alexander y col., 2006).

A pesar de los buenos resultados obtenidos en esta especie, cabe destacar que esta aplicación de los peces transgénicos se encuentra en fase de investigación y desarrollo.

10.1.9 Oncopeces: pez cebra transgénico como modelo para estudiar el cáncer

La biología del pez cebra y la gran similitud de su genoma y el del ser humano (Figura 9), lo señalan como apto para el estudio de enfermedades humanas como el cáncer.

El embrión del pez cebra no llega a medir 1 mm y el adulto mide entre 3 y 4 cm, lo que representa una gran ventaja al permitir trabajar con un gran número de animales en poco espacio. Otras ventajas de estos peces es que las hembras desovan más

de 200 embriones por semana, los mismos se desarrollan fuera de la hembra, son transparentes y su organogénesis ocurre en 24 horas. Su rápida organogénesis y angiogénesis, permite introducir ADN o ARN en embriones antes de la primera división, consiguiendo que las células del embrión fabriquen la proteína correspondiente (Fuentes y col., 2012).

A partir de la secuenciación completa de su genoma y el estudio de los patrones de expresión, se ha logrado determinar la gran semejanza genética y fisiológica entre el pez cebra y el humano en procesos fundamentales como el cáncer.

Los tumores del pez cebra son similares histopatológicamente al del humano, conservan la mayoría de los genes implicados en este proceso y se encuentran alterados de manera similar (Fuentes y col., 2012).

La transparencia del embrión permite observar en vivo la función de determinada diana, mediante la introducción de la proteína verde fluorescente (GFP) en líneas transgénicas que expresen tales moléculas. Esta técnica permite identificar células, órganos e incluso tumores.

Un ejemplo, es la observación en un pez cebra de la expansión de la leucemia, mediante la expresión de un oncogén fusionado al gen GFP (Figura 10). Se logró de esta forma identificar compuestos químicos que puedan permitir regular la proliferación descontrolada de estas células (Fuentes y col., 2012).

Otra característica del pez cebra, es que sus tumores no producen metástasis. Sin embargo, se observó que al trasplantar células tumorales humanas en estos peces, si metatizaban. Lo que se busca a través de esta investigación, es encontrar compuestos químicos que permitan inhibir o disminuir la metástasis de las células tumorales.



Figura 9: A) Desarrollo de pez cebra; B) Desarrollo de embrión humano; C) Embriones dentro del corión y recién eclosionados. Fuente: (Cayuela y col., 2012).

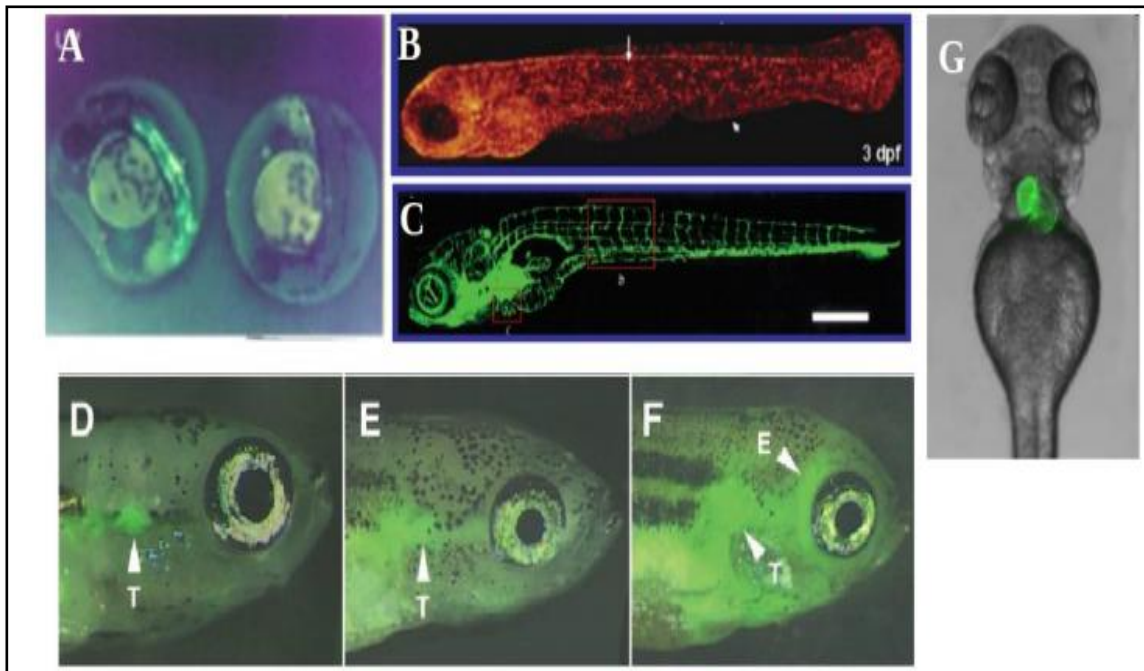


Figura 10: A) Embriones tras las transgénesis. Mosaico de GFP; B) y C) Larvas transgénicas expresando RFP en células epiteliales; D) Timo de pez transgénico sobre expresando un oncogén fusionado a GFP en linfocitos; E) y F) Desarrollo expansión de la leucemia. Fuente: (Cayuel y col., 2012).

10.1.10 Peces ornamentales

A partir del año 2002 se comercializan peces transgénicos que poseen una proteína fluorescente en su genoma, los denominados “peces brillantes”.

La Universidad Nacional de Taiwán creó un pez que emitía coloraciones amarilla verdosa fluorescente en la oscuridad. Se trata del pez Medaka (*Orizas latipes*) de agua dulce, que no posee coloración en su estado natural, al cual se le añadieron genes de Medusa (*Aequorea victoria*) (Figura 11). Tomaron la GFP (proteína verde fluorescente) y la implantaron en embriones de Medaka. Su nombre comercial es TK-1 y se comercializa actualmente por la empresa taiwanesa *Taikong* (www.azoo.com.tw).

A este le siguió el pez cebra (*Brachidanio rerio*) TK-2, el cual emite una coloración rojo brillante. Se le introdujo una proteína rojo fluorescente (RPF) aislada de genes del Coral marino (*Anemonia majano*). Peces cebra que pueden brillar en más de una coloración, también se han producido (Wan y col., 2002). En el 2004 este pez cebra transgénico que expresa fluorescencia aparece por primera vez en los mercados públicos, vendidos por una empresa de EEUU (*GloFish*).

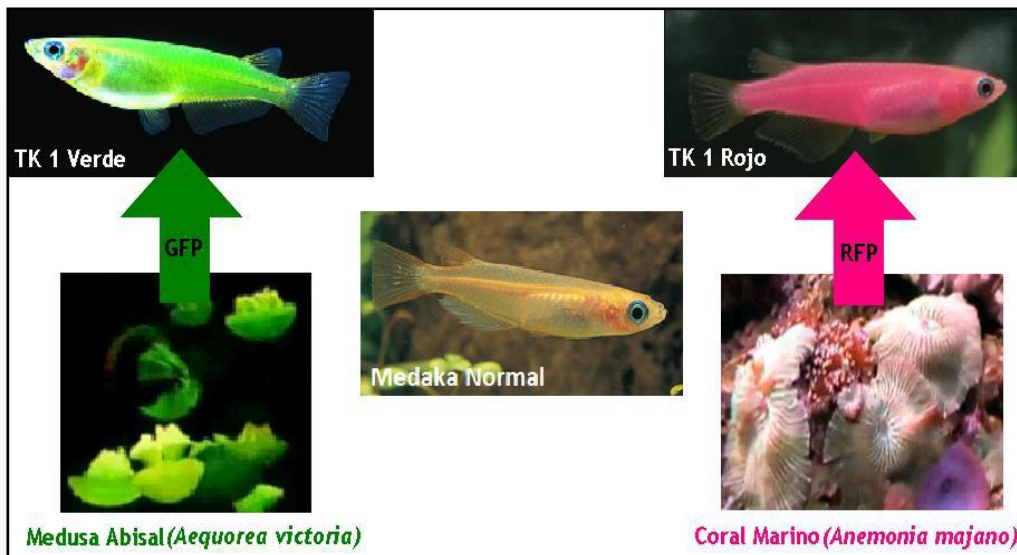


Figura 11: Introducción de genes fluorescentes en peces Medaka o TK1. Fuente: (Taiwán Review, 2006).

Existen otras especies reportadas, a finales del año 2008 la Universidad Nacional de Singapur obtuvo el primer pez ornamental amazónico llamado Tetra blanco o gris, vulgarmente conocido como “Monjita” (*Gymnocorymbus ternetzi*) (Figura 12). Se le introdujo al pez tetra, una construcción génica con la RFP y un promotor específico del musculo del pez cebrá. El color rojo vivo, se observó en los peces fundadores bajo la luz del día, lo que demuestra la viabilidad de usar promotores de pez cebrá para producir peces ornamentales fluorescentes en otras especies a través de transgénesis (Pan y col., 2008). Actualmente los peces tetra están siendo comercializados por la empresa *GloFish* (<https://www.glofish.com>).



Figura 12: Comparación de Peces Tetra. (A) Tetra gris no transgénico. (B) Tetra blanco no transgénico. (C) Tetra blanco transgénico con RFP. Fuente: (Pan y col., 2008).

Existe el temor de que estas proteínas afecten el comportamiento de los peces genéticamente modificados, y los efectos negativos que puedan tener sobre el medio ambiente.

En base a esto, se realizó un estudio en laboratorio con peces cebra transgénicos fluorescentes frente a sus contrapartes no transgénicos. Se observó, que el *Brachidanio rerio* transgénico no sufrió mayor depredación y que eran dos a tres veces más vulnerables que los controles (Hill y col., 2011).

Se ha publicado que las proteínas fluorescentes usadas comúnmente en peces transgénicos han sido utilizadas sin efectos tóxicos aparentes, que las mismas no aparentan compartir una homología con alérgenos conocidos, concluyendo que no hay ninguna base científica para creer que la expresión de la proteína fluorescente en los peces transgénicos representaría un riesgo toxicológico, ya sea el medio ambiente o a los consumidores, si los peces entraran en el ecosistema (Andrew Cubitt, 1995).

Aunque estos peces han sido creados con fines ornamentales, se ha sugerido el uso de peces fluorescentes para modificar la apariencia de alimentos como el sushi con tecnología similar. El GloFish es una marca registrada de organismos genéticamente modificados, como pez cebra fluorescente vendido por *Yorktown Technologies*. Aunque no fue desarrollado originalmente para su uso en sushi, es uno de los primeros animales genéticamente modificados que están disponibles públicamente (Figura 13).



Figura 13: sushi GloFish de la empresa norteamericana *Yorktown Technologie*. Disponible en: <http://www.glowingsushi.com/>.

10.2 Manipulación de transgénicos en rasgo crecimiento

Los productos de origen acuático, tanto de la pesca convencional como de la acuicultura, constituyen una fuente importante de alimentos y recursos económicos para la sociedad. La evolución de la actividad pesquera en el siglo pasado mostro un aumento sostenido en la captura de peces a partir de la década de 1950, de aproximadamente 6 por ciento por año, con un aumento de 18 millones de toneladas (FAO, SOFIA, 2014).

En los últimos años, la acuicultura ha mostrado un aumento constante, y el número de ejemplares que se encuentran en sobreexplotación continúa en aumento (FAO, SOFIA, 2014).

Esta situación ha generado preocupación a nivel mundial en cuanto a la posibilidad real de que las poblaciones sobreexplotadas logren recuperar su nivel original. Entre los diferentes problemas que enfrenta la acuicultura, se destacan la limitación del área física para su desarrollo, la contaminación y el impacto de sus derivados y desechos en el medio ambiente.

Es por esta razón, que la biotecnología, constituye la oportunidad para lograr un aumento en la producción por unidad de área y la posibilidad de producir una industria alimentaria más eficaz.

Como se ha señalado anteriormente, la biotecnología es la manipulación a través de técnicas de ingeniería genética de los microorganismos, plantas y animales para la fabricación de productos comercialmente beneficiosos para el hombre (Pérez y Nirchio, 1993).

La biotecnología incide en diferentes áreas como producción de alimentos, degradación de desechos industriales, minerales y medicina.

Las técnicas utilizadas, han permitido, desde mediados de la década de 1970, aislar y manipular genes específicos y con ello el desarrollo de microorganismos transgénicos que fabrican proteínas de origen eucariota con utilidad terapéutica, como vacunas, enzimas y hormonas.

10.2.1 Índice de crecimiento-Hormona del crecimiento (GH)

Uno de los principales intereses de la acuicultura, es obtener el máximo de biomasa en el menor tiempo y con el menor costo posible. Es por esta razón, que el desarrollo de peces transgénicos se ha dirigido principalmente, a aumentar las tasas de crecimiento y mejorar las tasas de conversión de los alimentos, con el fin de disminuir los ciclos de producción. Con el fin de alcanzar tales objetivos a lo largo del tiempo, se han realizado en diversas especies de peces de interés comercial, construcciones utilizando la hormona del crecimiento.

La hormona del crecimiento, pertenece a una familia de proteínas con similitud estructural y algunas funciones comunes. Es un polipéptido que se expresa en la glándula pituitaria, y se une a receptores específicos de células, e induce la síntesis y secreción de factores de crecimiento similares a la insulina: factor de crecimiento insulínico tipo 1 y tipo 2 (IGF-1 e IGF-II), lo que resulta en la producción del crecimiento somático a través de la mejora del apetito, tasa de eficiencia de alimentación y el crecimiento (Guillén y col., 1998).

Es un gran desafío obtener el máximo crecimiento sin causar efectos nocivos para el organismo (Guillén y col., 1998), ya que el exceso de GH puede causar problemas, tales como: acromegalia y agrandamiento de la cabeza (Rahman y col., 2001).

Luego del éxito obtenido por Palmiter y sus colaboradores (1982), en ratones transgénicos que crecían más del doble de su tamaño al introducirles un ADN constructo con GH de rata, se generó una gran expectativa para su posible aplicación en peces. Sin embargo, varios de los genes derivados de mamíferos no tuvieron el efecto deseado para aumentar la tasa de crecimiento en los peces.

El mecanismo por el cual ocurre este incremento del crecimiento no está del todo claro, pero podría deberse a una mayor tasa de conversión de alimentos o a un mayor consumo de alimentos, aunque estudios han indicado que los transgénicos para GH son metabólicamente más eficaces que los no transgénicos (Krasnov y col., 1999; Rahman y col., 2001; McKenzie y col., 2003).

Existe un aumento en la síntesis de proteínas y movimiento de lípidos, lo que afecta no solo el crecimiento sino que también al metabolismo, composición corporal, morfología del cuerpo y edad de maduración sexual (Hallerman y col., 2007). Debido a una mayor avidez por el alimento, se ha observado una mayor actividad y agresividad, y un menor temor a exponerse a los depredadores (Sundstron y col., 2004). Es importante destacar que el fenotipo final, se verá inevitablemente influido por el ambiente en el cual vive el animal.

El éxito en la creación de peces transgénicos con crecimiento mejorado, es difícil de demostrar, ya que solo puede determinarse a partir de experimentos a gran escala, con un gran número de peces transgénicos, y por lo general luego de obtener varias generaciones para eliminar el efecto del mosaicismo en el pez fundador.

Wu y colaboradores (2003), realizaron una construcción con GH de peces que se introdujo con éxito en la carpa común, lo que resultó en una mayor tasa de crecimiento y una mayor conversión de los alimentos, en comparación con los controles no transgénicos.

Sin embargo, uno de los casos más representativos es la serie de experimentos que condujeron a la creación de los peces transgénicos conocidos como “súper salmones”, llamados así, por la velocidad de crecimiento y el tamaño que alcanzaron a corto plazo.

10.2.2 Construcción del “súper salmón”

La creación de estos salmones de rápido crecimiento, surge en los intentos de resolver los problemas a los que se enfrenta la industria de la acuicultura, sobre todo en épocas de invierno. En una gran parte de la costa este de Canadá, el agua se congela o alcanza temperaturas muy por debajo de los -1,8 grados Celsius, lo que conlleva a una disminución del área para cultivar salmones, ya que estas temperaturas son letales para los mismos (Fletcher y col., 1992).

En este proceso de detección de genes “anticongelantes”, se descubrió que éstos tenían un gran potencial para contrarrestar determinados factores que afectaban el crecimiento (Fletcher y col., 1992). A partir de este descubrimiento, con el gen “anticongelante” del abadejo del océano, se construyó un gen recombinante ligando la región promotora de este gen anticongelante y el gen estructural que codifica para la GH del salmón Atlántico.

Los genes de GH se expresan en la glándula pituitaria bajo el control del SNC (sistema nervioso central), de tal forma, que para que se expresen en varios tejidos es necesario modificar los elementos de su expresión. Esta es la función del acoplamiento de la región estructural del gen GH con las regiones reguladoras de los genes que codifican para la proteína anticongelante de abadejo, ya que permite que la GH se exprese continuamente en diferentes tejidos del salmón, durante todo el año (Bolívar, 2007).

Luego de la construcción del ADN, se introdujo el material genético en huevos fertilizados de salmón Atlántico por micro-inyección. Después de cruzar peces transgénicos con silvestres se obtuvieron salmones que expresan la GH y que crecen entre dos a seis veces más rápido que los salmones no transgénicos (Bolívar, 2007).

La transferencia del gen “anticongelante” se ha ensayado en un gran número de especies. En los primeros experimentos en peces, se usaron genes de GH de mamíferos y promotores de origen viral. Posteriormente, se han usado construcciones de ADN con secuencias de origen piscícola. Las respuestas han sido variadas, desde animales que no mostraron aumento en su crecimiento respecto a su contraparte no transgénico, hasta aquellos que mostraron un crecimiento de más de veinte veces, aunque lo más frecuente ha sido obtener al menos una duplicación del crecimiento.

También se ha demostrado, que la utilización de genes y zonas reguladoras homologas (mismo origen), ofrece mejores resultados que al utilizar transgenes de origen muy distantes (Liu y col., 1990).

La respuesta a una misma construcción de ADN también puede variar entre especies, y se ha visto que en los salmónidos se obtienen mejores resultados. Se ha sugerido que esto puede deberse a las disminuciones estacionales de crecimiento que estos presentan, mientras que otros peces crecen a lo largo de todo el año de manera similar (Delvin, 1997).

El patrimonio genético es otro factor que influye en la respuesta de los animales al transgén de GH. Se realizó un experimento con dos cepas de truchas arcoíris transgénicas, una silvestre y otra doméstica. Las truchas salvajes que de manera natural tienen una menor tasa de crecimiento, mostraron un mayor crecimiento que las truchas domésticas. Sin embargo, en las cepas domésticas que presentan mayores tasas de crecimiento, la acción del transgén no causó un crecimiento adicional (Delvin y col., 2001).

10.2.3 Transgenes GH de interés comercial

Carpa común (*Cyprinus carpio*)

La carpa común es una de las especies más cultivadas en la acuicultura mundial (FAO, 2003), su producción cultivada fue cercana al 14 por ciento del total de la producción global de acuicultura de agua dulce en 2002 (3 millones toneladas). La producción aumentó en una tasa promedio global de 9,5 por ciento/año entre 1985 y 2002. En la década pasada (1993-2002) ésta ha aumentado a 10,4 por ciento/año, y

a lo largo de los años su producción ha ido en aumento (FAO: Programa de información de especies acuáticas:

http://www.fao.org/fishery/culturedspecies/Cyprinus_carpio/es#tcNA00EA).

Los datos estadísticos indican que la producción de carpa común puede haber llegado cerca de su límite. Sin embargo, permanecerá como una especie importante en aquellas áreas donde ha sido producida tradicionalmente.

Los avances más destacados en esta especie con transgén GH fue logrado mediante la transferencia de una construcción genómica “all fish” que contiene una carpa herbívora (*Ctenopharyngodon idella*), gen de GH impulsado por un promotor 3-actina de los huevos de carpa común (Wang y col., 2001). La mayoría de estos transgénicos alcanzaron en menor tiempo su tamaño comercial, además, la conversión de los alimentos era de 1,10, lo que implica una mejora significativa sobre los controles no transgénicos (1,31). La madurez sexual de las carpas transgénicas fue posterior a las de los peces no transgénicos.

Tilapia del Nilo (*Oreochromis niloticus*)

La tilapia del Nilo se introdujo a los países en desarrollo y se cultivó a nivel de subsistencia con el fin de satisfacer los requerimientos locales de ingesta de proteínas. Al mejorar las técnicas de producción y el control de sabor del producto, la tilapia ingresó a los principales mercados de pescado de estos países. Un componente importante de la creciente industria de tilapia es la proliferación de presentaciones del producto.

La Tilapia (incluyendo todas las especies) constituye el segundo grupo más importante de peces cultivados, tras las especies de carpa. El incremento en la producción global de tilapia ascendió de 1,5 millones de toneladas en 2003 a 2,5 millones de toneladas en 2010. Está previsto que la producción mundial de tilapia casi se duplique, de 4,3 millones de toneladas a 7,3 millones anuales entre 2010 y 2030 (FAO: Programa de información de especies acuáticas:

http://www.fao.org/fishery/culturedspecies/Oreochromis_niloticus/es).

Se han realizado una variedad de experimentos para construir tilapias GH transgénicos.

Un grupo de científicos logro crear tilapias transgénicas derivadas de una línea híbrido interespecífico: *O. hornorum* x *O. aureus*, utilizando una GH de tilapia cuya expresión es impulsada por un promotor de citomegalovirus. Las líneas transgénicas obtenidas, exhibieron una mejora en el crecimiento entre 60-80 por ciento en nueve meses, la variación se debió a las diferentes condiciones de cultivo en las que se encontraban (Martinez y col., 1996, 1999; Hernandez y col., 1997).

Pruebas a gran escala se llevaron a cabo en líneas de tilapia transgénica. La primera, contenía el gen de la GH de salmón Chinook, bajo el control del promotor del gen de la proteína “anticongelante” de *Menticirrhus americanus*. Al final del experimento los peces transgénicos mostraron un aumento de peso de más del doble respecto a los no transgénicos (figura 14), y una mayor eficiencia en la conversión de alimentos (Maclean y Laight, 2000; Rahman y col., 2001). En la

segunda, se utilizó una faneca (*macrozoarces americanus*), el promotor de la proteína anticongelante, empalmado a un salmón Chinook con secuencias de GH. Los resultados obtenidos, sugirieron que esta línea de tilapia transgénica utiliza en forma más eficiente las proteínas, materia seca y energía, que su contraparte no transgénica (Rahman y col., 2001).

En términos generales, las tilapias transgénicas demostraron una mayor tasa de crecimiento, mayor eficiencia en la conversión de alimentos, y una mayor capacidad para osmoregular frente a sus controles no transgénicos (Guillen y col., 1999), lo cual puede proporcionarles una ventaja en la adaptación en el agua de mar.

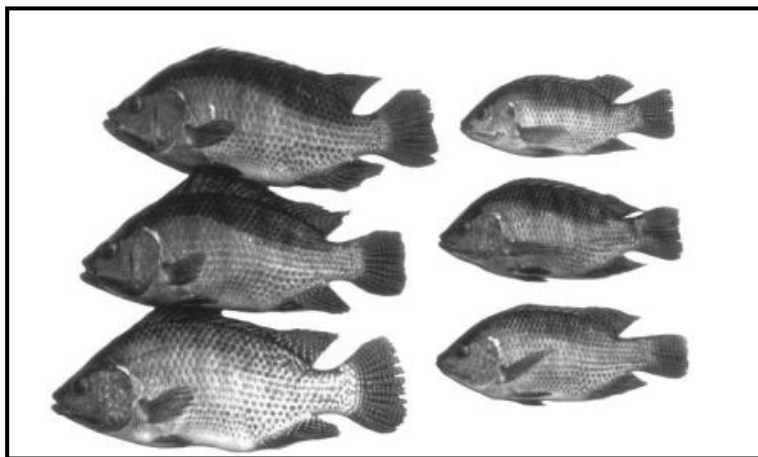


Figura 14: La hormona del crecimiento transgénico tilapia del Nilo, que ilustra una mejora de dos a cuatro veces el peso corporal en comparación con los controles no transgénicos. Fuente: (Dunham, 2004).

Salmón del Atlántico (*Salmo salar*)

La producción mundial actual de salmón del Atlántico cultivado excede a 1 millón de toneladas. En la actualidad, representa más del 90 por ciento del mercado de salmón cultivado y más del 50 por ciento del mercado global total de salmón.

El cultivo de salmón del Atlántico ha sido un asunto largamente polémico y su efecto sobre el ambiente y las pesquerías silvestres (particularmente pesquerías de salmónidos) es cuestionado por muchos individuos y organizaciones. La mayor preocupación radica: en el impacto ambiental global y asuntos de desarrollo sostenible, dado que la producción de salmón depende, para la producción de dietas, de los suministros de harina y aceite de pescados capturados por las pesquerías industriales. También se han expresado preocupaciones en relación con el bienestar de los peces cultivados (FAO: Programa de información de especies acuáticas:

http://www.fao.org/fishery/culturedspecies/Salmo_salar/es#tcNA0050).

En los experimentos realizados en salmón del Atlántico, el constructo utilizado al igual que en tilapia del Nilo, consiste en Chinook ADNc de GH de salmón, fusionado a una proteína anticongelante de faneca oceánica como promotor (figura 15) (Hew y

col., 1995). Estos salmones transgénicos, presentaron un aumento de dos a tres veces en su tasa de crecimiento y una mayor conversión de los alimentos frente a sus pares no transgénicos. Se examinó el comportamiento de los mismos frente a los alimentos, constituyentes del cuerpo y metabolismo del oxígeno. Se concluyó que los salmones transgénicos GH, exhiben una capacidad similar para utilizar los alimentos frente a los controles. No se encontró variación en los coeficientes de digestibilidad de la materia seca, proteína bruta y energía (Cook y col., 2000a), y mostraron mayor eficiencia metabólica frente al oxígeno (consumen 42 por ciento menos). Se observó, un mayor apetito, mayor consumo diario de alimentos (dos a tres veces), gastan más tiempo recolectando alimentos, y sus pliegues intestinales son de mayor tamaño en comparación con los salmones no transgénicos de tamaño corporal similar.

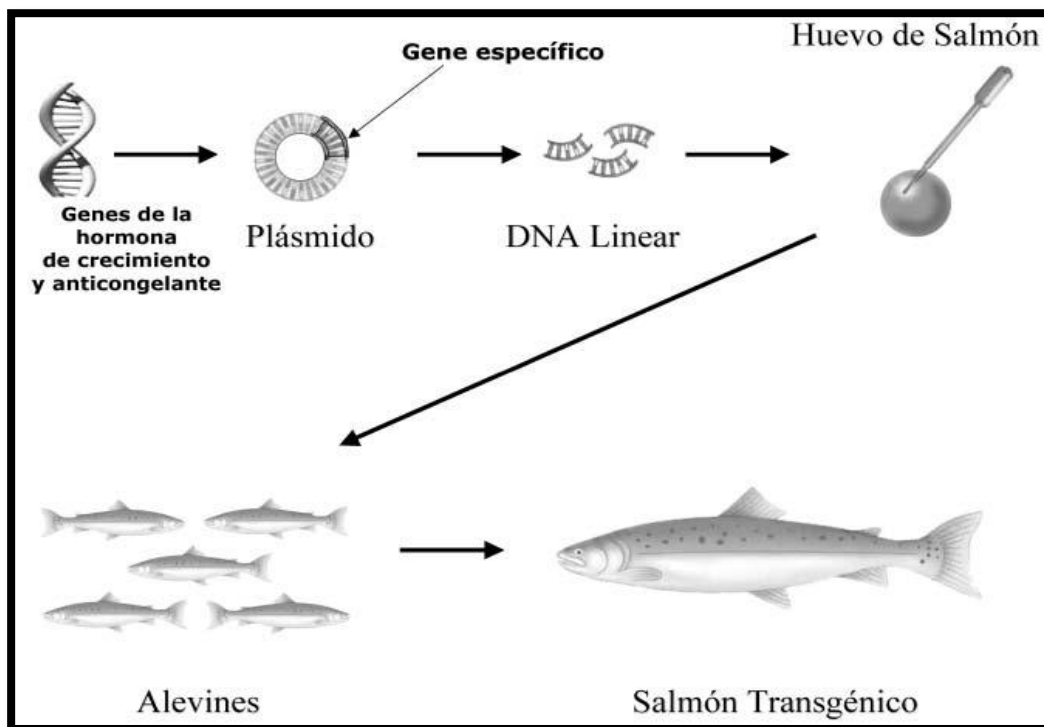


Figura 15: diagrama de producción de salmón transgénico. Fuente: (Gracia, 2007).

AquAdvantage Salmón

El salmón creado por la empresa *AquaBounty Tecnologías* el cual fue autorizado para su salida al mercado por la FDA en el año 2015, exhibe un crecimiento potenciado de dos a tres veces la tasa de crecimiento inicial, en relación a salmones no transgénicos. El AquAdvantage salmón ha sido manipulado genéticamente para llegar a un marcador importante de crecimiento en la acuicultura más rápidamente que su contraparte de salmón del Atlántico no genéticamente modificado. Lo hace, ya que contiene un constructo de ADN que se compone de la hormona de crecimiento de genes de salmón Chinook bajo el control de un promotor de abadejo del océano (FDA: evaluación del salmón diseñado genéticamente).

Estos animales genéticamente modificados, son regulados solamente por la FDA. Esto es así, porque los animales genéticamente modificados se engloban en el

concepto de “animal drugs” o drogas animales, ya que la construcción de ADN recombinante se considera un elemento no alimenticio, que pretende afectar o modificar la estructura de un animal de modo similar a una droga (Varela, 2015).

La FDA determinó que este salmón no es diferente, ni en apariencia ni en sabor frente al convencional, pero puede ser diferente para los productores, ya que se estima que podrá reducir los costos de producción de manera significativa (FDA: evaluación del salmón diseñado genéticamente).

Un desafío importante para la compañía, fue alejar el temor de que si este salmón escapase al océano y se apareara con sus pares silvestres, podría afectar a las poblaciones mundiales de salmónes. Para evitar este problema, la compañía decidió solicitar la aprobación solo para peces estériles, de cría en cautiverio.

Después de una exhaustiva y rigurosa investigación científica, la FDA ha llegado a la conclusión de que AquAdvantage salmón es tan seguro para comer como cualquier salmón del Atlántico no genéticamente modificado, y también que presenta las mismas propiedades nutritivas (FDA: evaluación del salmón diseñado genéticamente). Los datos demostraron que los genes insertados se mantuvieron estables a lo largo de varias generaciones de peces, que los alimentos derivados del salmón transgénico son seguros para ser consumidos por los seres humanos y animales, y que la técnica utilizada de ingeniería genética es segura para el salmón.

La FDA evaluó el impacto ambiental que este pueda acarrear, y se encontró que su aprobación no tendría un impacto significativo en el medio ambiente. Esto se debe a las múltiples medidas de contención que presentó la compañía, que utilizará su base en tierra, en instalaciones en Panamá y Canadá, lo cual hace que sea muy poco probable que los salmónes pudieran escapar y establecerse en la naturaleza. Además de las importantes medidas de contención en las instalaciones en tierra para evitar el escape de estos peces transgénicos, existe una importante barrera biológica: todos estos salmónes son hembras estériles.

10.2.4 Importancia de las especies comerciales GM

El principal factor que influye en el desarrollo de los salmónes transgénicos u otras especies de importancia comercial, es que la demanda mundial para la producción de proteínas ha aumentado significativamente en las últimas décadas, y la proteína de pescado a menudo comprende una parte importante de la dieta diaria en muchos países.

A diferencia de otras fuentes de proteínas (por ejemplo, carne de bovino, cerdo, aves de corral), el pescado, especialmente peces de agua fría, proporcionan una fuente de proteína que es baja en grasas saturadas y alto contenido de los ácidos grasos omega-3, ácido eicosapentaenoico y ácido docosahexaenoico, nutrientes que se han asociado con un mejor estado de salud.

A medida que la demanda mundial de pescado aumenta, muchas de las pesquerías del mundo han llegado a niveles superiores de pesca, alcanzando los niveles máximos sostenibles. Cuando la cría de una pesquería de stock cae por debajo de un nivel sostenible, la población de peces en esa zona empieza a desaparecer.

Para satisfacer la creciente demanda de proteína de pescado a la luz de la disminución de las poblaciones y la disminución en la captura de peces silvestres, la utilización de la acuicultura comercial se ha ampliado considerablemente en los últimos años.

La demanda de salmón de piscifactoría ha seguido una tendencia similar a la de otras especies de peces, en constante aumento año tras año con nuevos mercados abiertos. La acuicultura es la fuente de aproximadamente el 69 por ciento de la producción de salmón en todo el mundo (FAO, SOFIA, 2012).

Cifras recientes de FAO, reflejan que poblaciones marinas de especies importantes se encuentran en un punto de colapso. Actualmente, poco más del 70 por ciento de los peces se está explotando dentro de los niveles sostenibles. De ese porcentaje, las especies plenamente explotadas, aquellas que están cerca de su máxima producción sostenible representan más del 60 por ciento, mientras que las infra-explotadas suponen un 10 por ciento.

A través de un modelo realizado por la FAO, el informe Fish to 2030 (El pescado hasta 2030), que simuló resultados de las interacciones entre países y regiones para realizar proyecciones hasta 2030, se predijo, que para el año 2030, el 62 por ciento del pescado procederá de la acuicultura, con un crecimiento más rápido de especies como tilapia, carpa y bagre. Está previsto que la producción mundial de tilapia casi se duplique, desde 4,3 millones de toneladas a 7,3 millones anuales entre 2010 y 2030 (FAO: Fish to 2030).

Estos análisis hacen pensar en un sistema mundial que sufre excesiva presión, disminución de la biodiversidad y peligro inminente de los recursos pesqueros. Y es por esta razón, que es necesario buscar otros métodos más sostenibles a largo plazo, lo cual nos lleva a creer que la modificación genética en peces de interés comercial, sería una alternativa frente a la acuicultura y la pesca convencional.

11. EJEMPLOS DE TRANSGÉNESIS EN OTRAS ESPECIES

11.1 Porcinos

Xenotransplantes

En la actualidad, se han creado cerdos transgénicos con la finalidad de proporcionar órganos para los pacientes que requieren un trasplante.

En casos normales, el sistema inmune humano rechazaría el órgano porque reconoce a las células del órgano animal como extrañas y las destruye. Sin embargo, a través de la modificación genética, es posible insertar genes que sinteticen glicoproteínas idénticas a las humanas, y que de ese modo sean reconocidas como propias por el sistema inmune del receptor.

El primer paso que se ha dado en esta área, es la obtención de cerdos transgénicos capaces de expresar el complejo principal de histocompatibilidad (MHC) humano, eludiendo así el rechazo hiperagudo.

El primer cerdo transgénico (Astrid) se obtuvo en 1991, fue desarrollado por científicos ingleses de la compañía *Imutran*, inyectando ADN humano en un embrión de cerdo. Su genoma contiene el gen de una función del sistema inmunológico humano: factor acelerador del decaimiento (DAF). La idea es que en el trasplante, los órganos del cerdo no sean rechazados por el sistema inmune humano (Brown, 2002).

Desde entonces, casi media docena de empresas biotecnológicas han obtenido cerdos transgénicos capaces de expresar los inhibidores del complemento, lo que significa la desaparición del rechazo hiperagudo cuando sus órganos son xenotrasplantados. La reciente generación de cerdos transgénicos en los que se eliminó el gen 1-3 galactosiltransferasa y que permitiría la producción de animales que carecen del epítipo responsable del rechazo hiperagudo, es una clara demostración del poder de esta tecnología (Phelps y col., 2003).

A pesar de los avances obtenidos, quedan por resolverse numerosas interrogantes, destacando la posibilidad de que se transmitan al hombre infecciones virales de origen animal, no descritas previamente.

11.2 Ovinos

Al dirigirse la expresión de secuencias que codifican proteínas no lácteas a la glándula mamaria de animales de granja transgénicos, el órgano podría servir como un "biorreactor" para la producción de proteínas farmacológicamente activas a gran escala. En ovejas se han realizado diferentes ensayos para la producir alfa 1-antitripsina y el factor IV de la coagulación en la glándula mamaria.

Producción de alfa 1-antitripsina

La deficiencia de alfa-1 antitripsina es un trastorno genético hereditario que puede ocasionar una enfermedad obstructiva crónica, fundamentalmente enfisema. El déficit de alfa-1 se caracteriza por unos niveles en la sangre muy bajos o inexistentes de una proteína llamada alfa-1 antitripsina (AAT), que es producida por el hígado. La función principal de la AAT es proteger el tejido pulmonar de la inflamación ocasionada por las infecciones y los irritantes inhalados. Los pacientes con enfisema pulmonar hereditario necesitan de grandes dosis de la enzima alfa-1-antitripsina para suplir su deficiencia en el plasma.

Por esta razón, se han obtenido por diversos procedimientos, ovejas transgénicas portadoras del gene humano que codifica para esta enzima, unida al promotor del gene de la β -lactoglobulina, a fin de que el transgén se exprese exclusivamente en las células de la glándula mamaria.

Un experimento realizado por Ian Wilmut y colaboradores (1991) utilizando el ADN de dicho gen híbrido, obtuvieron resultados diferentes en las crías obtenidas. Una de ellas que presentaba un mayor número de copias del transgén integrados en su genoma, llegó a producir cantidades elevadas de alfa-1 (63 mg/ml) durante la primera semana, para posteriormente estabilizarse en 35 mg/ml.

Producción de factor IX de coagulación

También se han obtenido ovejas transgénicas portadoras del gene humano que codifica para el factor IX de coagulación de la sangre (anti-hemofílico) (Schnieke y col., 1997). El mismo, sólo se puede obtener a partir de la sangre donada, y la amenaza frente a enfermedades de transmisión sanguínea está creando una situación dramática para los hemofílicos. La obtención de animales transgénicos capaces de producir este agente sería una solución casi definitiva.

La glándula mamaria es una auténtica factoría en cuanto a producción de proteínas se refiere; la idea, es poder transformarla de tal modo que una fracción de estas proteínas sean agentes de interés terapéutico, que pueden recogerse y aislarse de la leche mediante un proceso sencillo.

El ganado ovino ha sido y es la especie de elección para los experimentos realizados en este campo. Se trata de animales capaces de producir proteínas en gran cantidad de forma natural, y además con una gran ventaja sobre el ganado vacuno, por la gestación más corta, es posible conocer los resultados de la experimentación en la mitad de tiempo.

Hasta ahora ya se han conseguido dos ovejas capaces de producir factor IX de coagulación en la leche en una concentración 1/250 veces menor que la de la sangre humana. Primero mediante la técnica de microinyección en el pronúcleo del cigoto del correspondiente gene humano (ADN), unido también a un promotor génico de origen ovino, y más tarde mediante el uso de la técnica de clonación por transferencia de núcleos de fibroblastos fetales genéticamente modificados para portar y expresar el citado transgén (Schnieke y col., 1997).

Ovejas fluorescentes

En el año 2012, en Uruguay, científicos del Instituto de Reproducción Animal Uruguaya (IRAUy) y el Instituto Pasteur, con el apoyo del especialista Ignacio Anegón, han creado ovejas fluorescentes

Para este experimento los investigadores utilizaron el gen responsable de producir la proteína GFP que se encuentra en la medusa *Aequorea Victoria*, y lo incorporaron en una oveja receptora (IRAUy, 2012). Cuando ese gen se introduce en el embrión del cordero, el cordero expresa esa proteína, dando como resultado corderos cuyos tejidos frente a una luz ultravioleta, adoptan un color verde fluorescente.

Los nueve corderos transgénicos uruguayos nacieron en octubre de 2012 en la Fundación IRAUy, donde se desarrollan sin problemas y no se distinguen de sus pares no transgénicos (Figura 16). Ocho de los nueve corderos (88,9 por ciento) del grupo transgénico, mostraron una fuerte expresión de la GFP, evidente en los ojos, mucosas, y tejidos de queratina (Crispo y col., 2015a).

Estos corderos fueron los primeros ovinos transgénicos de Latinoamérica, y el avance fue publicado en la revista de mayor prestigio en el campo de la transgénesis *Transgenic Research* (Crispo y col., 2015b).

El objetivo de este experimento, era probar una técnica novedosa para introducir un gen extranjero en el ADN de los animales, de tal forma que el éxito del procedimiento fuera fácilmente constatable, en este caso a simple vista mirando los animales en la oscuridad. "Es una técnica muy eficiente porque todos los corderos que nacieron son positivos. Ya funcionando, se puede manejar otro gen de mayor interés, para producir una proteína específica" (Menchaca, 2013).

Las investigaciones en este campo apuntan a la posibilidad de tomar el gen responsable de la producción de una proteína faltante en algunas patologías humanas (por ejemplo la insulina en los diabéticos), incorporarlo al genoma de un embrión de una oveja, que al nacer produciría esa sustancia en la leche. Eso permitiría aislar esa proteína para elaborar medicamentos, de forma más sencilla que en la actualidad.



Figura 16: Corderos transgénicos uruguayos nacidos en la Fundación IRAUy. Fuente: (IRAUy, 2013).

11.3 Caprinos

Bioreactores

Las cabras también pueden constituirse en buenos bioreactores de proteínas humanas, puesto que producen cuatro litros de leche por día y sus periodos de gestación y de desarrollo son cortos (cinco y ocho meses, respectivamente).

Tras varios experimentos, se logro producir el anticoagulante antitrombina (AT) humano, en la leche de cabras transgénicas. La producción de AT en la glándula mamaria de estas cabras transgénicas proporciono un nivel alto ($> 1 \text{ g / L}$) en la expresión de esta proteína terapéutica. En un ensayo de comparación estructural y funcional de ambos compuestos (el producido por la cabra transgénica y el AT humano), se pudo constatar, que eran estructuralmente idénticos, y que la actividad específica de la AT producida por la cabra era igual al derivado de plasma AT, en un ensayo de inhibición in vitro de la trombina humana. Sin embargo, tenía cuatro veces mayor afinidad por la heparina (Edmunds y col.1998).

A partir del año 2009, EEUU autoriza el primer medicamento para uso humano, obtenido de la leche de cabras transgénicas (*Biociencia, 2009*). Posteriormente la Agencia Europea de Medicamentos (*European Medical Agency*), que junto con la FDA de los EEUU son los dos grandes referentes mundiales en materia de regulación de medicamentos, también autorizó la comercialización de este producto para los países europeos. Ambas autorizaciones marcaron un hito en la historia del uso de la transgénesis animal para la producción de biofármacos. Más recientemente se ha aprobado el segundo producto farmacológico generado en animales transgénicos, en este caso en conejos, y hay una larga lista de productos en proceso de registro y evaluación que seguramente serán aprobados en los próximos años. Este primer fármaco, producido en cabras, bautizado como Atryn® por su fabricante (*GTC Biotherapeutics Inc's*), es un antitrombótico que beneficiará a los pacientes con una enfermedad denominada deficiencia hereditaria de antitrombina, en la que su organismo es incapaz de fabricar una proteína sanguínea (la antitrombina) que previene la formación de coágulos.

Este medicamento fue obtenido a partir de cabras genéticamente modificadas, a las cuales se les añadió un gen humano que codifica la acción de la proteína anticoagulante antitrombina (AT), proteína que ayuda a prevenir la coagulación sanguínea y que normalmente se extrae del plasma (Echelard y col., 2005). Los científicos de esta compañía copiaron el gen AT y lo agregaron a un fragmento de ADN de las cabras, el impulsor de la beta caseína, garantizando así que el efecto de este gen sólo aparezca en la leche.

11.4 Bovinos

Bioreactores

La aplicación de tecnologías transgénicas en ganado lechero se ha restringido en gran medida a la producción de productos farmacéuticos en la glándula mamaria. Una aplicación más amplia de la transgénesis en la producción de ganado lechero requerirá la identificación de rasgos de destino que sean susceptibles para la modificación transgénica y económicamente importante para la industria láctea (Zuelke, 1998).

En 1991, tres grupos de investigación de Holanda obtuvieron vacas transgénicas portadoras del gen humano de la lactoferrina, que es sintetizada en la glándula mamaria del animal. En este caso el promotor génico empleado para dirigir la expresión del transgén en la glándula mamaria, fue el del gen que codifica para la alfa-S1-caseína bovina. En este experimento se obtuvo una hembra y un macho transgénico, de los cuales el macho dio positivo para la presencia del gen humano en todos los tejidos analizados (placenta, oreja y sangre), estimándose que era portador de varias copias (cinco a diez) del gen humano (Bolivar, 2007).

En la actualidad, se puede lograr la expresión del gene que codifica para la lactasa, para tener leche libre de lactosa para las personas que tiene intolerancia a ésta. La lactasa descompone a la lactosa de tal modo que es posible que ésta pueda ser absorbida.

Leche “maternizada”

Científicos del Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria (INTA), y de la Universidad Nacional de San Martín (UNSAM) crean en Argentina el primer bovino doble transgénico en el mundo que produce "leche maternizada". Estos investigadores lograron insertar los dos genes humanos que dirigen la síntesis de la lisozima y la lactoferrina en un solo sitio del genoma bovino, de modo que se expresaran únicamente en la glándula mamaria (INTA, 2012).

Un año después de su nacimiento, se realizó la inducción artificial de la lactancia y se logró obtener leche. Una vez analizada, se confirmó la presencia de las dos proteínas de origen humano: lisozima y lactoferrina, convirtiéndola en la única vaca del mundo capaz de segregar dos proteínas humanas en su leche (INTA, 2012).

Cabe destacar que la leche producida por esta vaca transgénica no está hasta el momento aprobada para su consumo.

12. OBJECIONES Y RIESGOS ASOCIADOS A PECES TRANSGÉNICOS

Los peligros que la tecnología transgénica aplicada en peces pueda acarrear, deben ser considerados en relación con las prácticas aceptadas actualmente, es decir, la domesticación, y los programas de mejoramiento genético convencionales.

Sin embargo, hay una diferencia importante entre el producto de la cría selectiva y la transgénesis. Mientras que la cría selectiva se basa en la herencia poligénica, por lo que el resultado obtenido es el efecto acumulativo de muchos genes, cada uno con un pequeño efecto (Lynch y Walsh, 1998), la transgénesis, implica a un gen con un efecto importante. Una importante consecuencia de esta diferencia, radica en los posibles efectos pleiotrópicos de los genes implicados. La pleiotropía, es el fenómeno por el cual un gen, es responsable de efectos fenotípicos en más de una característica de un individuo. Un fenotipo es cualquier característica o rasgo observable de un organismo, como su morfología, su peso a cierta edad, propiedades bioquímicas, o comportamiento.

El efecto pleiotrópico en los OGM es la observación de cambios imprevistos de varias características, cuando se esperaba que solo una característica debiera haber cambiado. Esto trae como consecuencia, la dificultad de predecir el comportamiento de los peces transgénicos, respecto a sus pares no transgénicos.

Una metodología desarrollada por Muir y sus colaboradores (2001), incluye la recopilación de rasgos de adaptación o rusticidad (del inglés, “fitness”) de los individuos transgénicos y sus congéneres no transgénicos, seguida de la inclusión de estos datos en un modelo matemático que predice el destino del transgén sobre múltiples generaciones. Sin embargo, todavía se está muy lejos de poder tener una información completa para la evaluación y el manejo de la bioseguridad de los peces transgénicos, debido a falta de conocimiento científico sobre los rasgos de los organismos modificados, la ecología de los ambientes naturales en los que podrían penetrar estos organismos y la interacción entre los dos (Kapuscinski, 2005; Delvin y col., 2006).

12.1 Objeciones a los peces transgénicos

- **El procedimiento utilizado para producir el pez transgénico es antinatural**

Si bien es cierto que el procedimiento utilizado para la construcción de OGM no es natural en el sentido que la inserción de material de ADN que se lleva a cabo no tendría lugar sin la intervención humana, cabe destacar que no existe una marcada división entre lo natural y lo antinatural en los métodos de cría.

La selección y la polinización cruzada utilizada para generar los cultivos existentes no son verdaderamente naturales, y desde luego que el uso de la ovulación múltiple, y la transferencia de embriones tan ampliamente utilizada en la actualidad en el ganado de cría, están lejos de ser naturales. Las píldoras anticonceptivas y la fertilización in vitro en nuestra propia especie, están también muy lejos de ser métodos naturales, sin embargo estas prácticas son generalmente aceptadas.

Por lo tanto, el argumento de que la manipulación del genoma es indeseable porque es antinatural, no es en sí conveniente.

- **Los genes usados podrían conferir propiedades indeseables**

Este es un riesgo real, ya que los peces transgénicos podrían producir proteínas nuevas o modificadas que podrían ser tóxicas para los seres humanos. Debido a los posibles efectos de “posición” (influencia e intensidad que tiene un transgén sobre otros genes, dependiendo de su posición en el genoma) de un transgén, las líneas transgénicas producidas para consumo humano deben ser sometidas a pruebas continuas para asegurar que no exista intolerancia humana a las proteínas producidas (Ponzoni y Nguyen, 2008).

Por otro lado, los genes utilizados hasta la fecha en peces transgénicos, no han mostrado inconvenientes respecto a la seguridad alimentaria. Incluso las hormonas sintetizadas por los genes que codifican la hormona de crecimiento son considerados seguros para su consumo, ya que son polipéptidos y por tanto se digieren en el intestino.

- **Las nuevas proteínas podrían provocar intolerancia inmunológica**

Algunos ensayos realizados en humanos y primates no humanos, que consumieron peces transgénicos han sido reportados por Guillen y colaboradores (1999), sin ningún hallazgo de efectos adversos. Una proteína producida por un transgén, no es diferente al sistema inmune de cualquier otra proteína.

- **Los peces transgénicos podrían escapar y cruzarse con parientes silvestres**

El escape o la introducción de peces transgénicos en comunidades naturales es una preocupación ecológica importante (Tiedje y col, 1989; Kapuscinski y Hallerman, 1990, 1991; Hallerman y Kapuscinski, 1992).

Una de las principales cuestiones ambientales se centra en la posible liberación al ambiente de los peces genéticamente modificados, ya que si los mismos no son contenidos de manera adecuada, podrían escapar y cruzarse con especies silvestres, lo que puede llevar a un impacto ecológico indeseable.

La propagación de los peces transgénicos puede ejercer un impacto perjudicial en la biodiversidad local, ya que presentan una mayor capacidad predatoria o competitiva, pueden mezclarse con especies afines y perturbar así la diversidad genética. El impacto producido sobre la biodiversidad si los peces transgénicos se escaparan y apareasen con especies nativas, es difícil de predecir. Los peces genéticamente modificados construidos con genes que producen GH, llegan a crecer cuatro veces más que sus contrapartes no transgénicos, consumen más alimento y presentan mayor agresividad y habilidad para obtener su alimento. Por lo tanto, es posible que el escape de estos peces al medio ambiente, amenacen la supervivencia de las especies silvestres.

Sin embargo, los científicos afirman que estos organismos estarán muy domesticados, tendrán poca adaptación en el medio silvestre, y por lo tanto, no competirán con éxito con las especies nativas. Existe evidencia que sugiere que los peces transgénicos son menos aptos que los silvestres, por lo que el daño puede ser no tan grande como se espera. Sin embargo, hay una falta de evidencia experimental sobre lo que puede suceder en casos individuales (Ponzoni y Nguyen, 2008).

Experiencias pasadas, han demostrado que la introducción de grandes especies predatoras en nuevos ecosistemas pueden originar desastres ecológicos. En los años 60, por ejemplo, se introdujo la perca del Nilo en el lago Victoria en África y en solo una década las poblaciones locales de más de cuatrocientas especies diferentes de pequeños peces, descendieron del 80 por ciento al 2 por cientos del total del stock piscícola. Igualmente, la liberación de un salmón o carpa modificada para tener mayor crecimiento en un medio ambiente natural, podría desplazar una gran cantidad de especies nativas de peces.

Por lo tanto, deben aplicarse medidas de bioseguridad adecuadas para la gestión de los posibles riesgos, evaluación, manejo y gestión de los mismos (Dunham, 1999; Muir y Howard, 2002).

Varios métodos han sido desarrollados para reducir los riesgos de la exposición de los peces transgénicos en la naturaleza. Estos implican, contención física y geográfica, esterilidad inducida, y la limitación de la expresión del transgén una vez en la naturaleza.

El confinamiento biológico implica el control genético, por ejemplo, mediante la producción de crías de un solo sexo (Devlin y Donaldson, 1992) o por la triploidía inducida (presencia de una dotación cromosómica de $3n$ cromosomas, frente a los $2n$ normales de las células diploide) lo que provoca esterilidad en muchos peces. El logro de 100 por ciento de esterilidad mediante la inducción de triploidía ha demostrado ser difícil (Devlin y col., 2010).

No existen en la actualidad ninguna técnica disponible que pueda garantizar un 100 por ciento de esterilización, y aunque los peces fueran estériles, aun competirían por el alimento y el hábitat de las poblaciones naturales, existiendo riesgo potencial de que desplacen a las poblaciones silvestres si estos escarparan al medio ambiente.

- **Bienestar de los peces transgénicos**

La salud de los peces transgénicos puede verse comprometida. Estudios han indicado que el índice de excesivo crecimiento sobre todo en los peces que presentan altas tasas de crecimiento, podría provocar deformación de la cabeza y otras anomalías. También exhiben edad temprana de madurez sexual, pero su viabilidad es baja (Kapuscinski, 2005).

Por lo general, muestran una capacidad de nado reducida y un rendimiento reproductivo inferior. También son más activos y agresivos cuando se alimentan, y están más dispuestos a correr riesgos frente a la exposición a la depredación. Por lo tanto, es posible que se produzcan cambios en la función cerebral en estos peces genéticamente modificados (Ponzoni y Nguyen, 2008).

Sin embargo, se necesita más investigación para resolver los problemas respecto a bienestar animal.

En resumen, se podría argumentar que los beneficios de los peces transgénicos podrían ser mayores que sus desventajas, pero solo si la genética y las características fisiológicas de los transgénicos fueran cuidadosamente evaluadas, de forma independiente, aplicando los métodos de contención adecuados para prevenir potenciales daños ecológicos, y si se utilizan los correctos métodos de evaluación de riesgo.

13. EVALUACIÓN Y GESTION DE RIESGOS EN PECES TRANSGÉNICOS

Para poder desarrollar una biotecnología segura, es necesario, elaborar un buen plan de evaluación de riesgos, que se acompañe de una metodología adecuada para disminuir o eliminar los mismos. Los riesgos a tener en cuenta se engloban en dos grandes grupos: riesgos ecológicos o ambientales, y riesgos para salud humana, sin olvidar las cuestiones en bienestar animal y sanidad animal.

Existe un amplio consenso científico de que la evaluación del riesgo y la gestión de los OGM deben ser específicas para cada caso en particular, idea que se ha consagrado en el Protocolo de Cartagena de seguridad alimentaria de la biotecnología (Anexo III, Evaluación de riesgo).

13.1 Análisis de riesgos

Existe mucha confusión en torno a los riesgos que los organismos transgénicos puedan acarrear en lo que respecta a la seguridad de los alimentos y el medio ambiente. La adopción de decisiones basadas en principios científicos es uno de los principales objetivos.

En términos generales, el análisis de riesgos consta de cuatro procesos:

- Identificación del peligro: por peligro se entiende al daño que resulta definido de la exposición a un material que puede provocar un daño.
- Evaluación de riesgo: probabilidad que ese peligro ocurra.
- Gestión de riesgos: ponderar las diferentes opciones científicas y normativas, y aplicar las medidas necesarias para su mitigación y monitoreo.
- Comunicación del riesgo: a todas las partes involucradas para garantizar la transparencia del proceso.

Es necesario hacer un examen exhaustivo de todos los riesgos y preguntarnos: ¿qué puede salir mal? ¿qué probabilidad hay de que ocurra? Y ¿cuáles serán las consecuencias si esto ocurre? Por lo que, para establecer todos los riesgos posibles es necesario un enfoque caso a caso, se debe considerar: los genes insertados, los rasgos que se han alterado en el OGM, usos previstos para ese transgénico y entorno en el que vive.

Cualquier intento de predecir el riesgo asociado con un OGM basado en un único parámetro, es un grave error (Maclean y Laight, 2000).

13.2 Riesgo ambiental

Estudios previos han identificado numerosos daños ambientales que pueden producirse por el escape de los peces transgénicos al medio natural. Podemos agruparlos en dos grandes grupos: uno considera el posible daño sobre especies especiales, como aquellas en peligro de extinción, de interés económico o cultural. Y el otro, la capacidad de recuperación ecológica de las poblaciones acuáticas dañadas.

Algunos analistas consideran el escape de los peces transgénicos como uno de los principales peligros a considerar. Aquí se plantean dos situaciones que pueden ocurrir si los peces escapan al medio ambiente. La primera, que la presencia de los peces transgénicos en el medio natural provoque la extinción local de su propia especie (peligro de extinción) (Muir y Howard, 1999); la segunda, que ocurra el desplazamiento de otras especies por los peces transgénicos (peligro de invasión) (Muir y Howard, 2002).

Existen limitaciones en la capacidad de extrapolar fenotipos simples para las interacciones ecológicas complejas que se producen en la naturaleza. Antecedentes genéticos también puede dar forma a los efectos fenotípicos de los transgenes, los cuales, con el tiempo y entre diferentes poblaciones silvestres (Delvin y col., 2006).

Delvin y sus colaboradores (2006), produjeron truchas arcoíris transgénicas que tenían un mayor tamaño corporal que las salvajes en la madurez sexual, y los colocaron en un mismo ambiente. Los resultados obtenidos reflejaron el exitoso establecimiento de la trucha transgénica en el medio, lo que puede traer como consecuencia la formación de nuevas especies, representando un peligro para la población nativa y el ecosistema.

Para poder cuantificar estos peligros, se necesita una metodología estandarizada y fiable que permita hacer buenas predicciones. La metodología más próxima a estas

características es la “*net fitness methodology*” desarrollada por Muir y colaboradores (2004).

13.2.1 Método de recopilación de datos de aptitud en transgénicos

La metodología utilizada por Muir (2004) “*net fitness methodology*”, consiste en la recopilación de datos de la aptitud de rasgos del transgén en individuos reales y sus homólogos silvestres no genéticamente modificados, seguido de la introducción de estos datos en un modelo matemático que pueda predecir el destino de los peces transgénicos a través de varias generaciones. Idealmente, su contraparte no transgénico, ha de ser verdaderamente salvaje, es decir, debe provenir de un ambiente natural.

El primer paso de este método consiste en medir seis componentes de aptitud de los transgénicos. Estos son: fecundidad, fertilidad, viabilidad, edad de madurez sexual, éxito en el apareamiento y longevidad. Todos estos parámetros son tomados en cuenta para cubrir el ciclo de vida completo de los OGM.

El segundo paso es cuantificar el efecto conjunto de estos seis rasgos de aptitud, para predecir el destino de los peces transgénicos.

Los estudios realizados aplicando este método han demostrado diferentes combinaciones en los valores de estos seis rasgos de aptitud. Uno de los escenarios es la extinción de los transgénicos en algún momento posterior a su fuga; un segundo escenario, implica la propagación del transgénico a través de las poblaciones salvajes sin impacto en el tamaño de la población. Y por último, que al inicio se produzca la expansión de los peces transgénicos, para luego descender el tamaño de las poblaciones transgénicas y silvestre. Este último escenario, podría deberse al “gen de Troya” del que hablaban Muir y Howard (1999), refiriéndose a *Oryzias latipes* (un pez de acuario japonés) modificado con el gen humano de la hormona de crecimiento, por el que un solo ejemplar que escapase y se reprodujese podría acabar con poblaciones enteras.

Muir y Howard (2002), sugirieron que la madurez sexual es uno de los rasgos de aptitud que tiene mayor influencia sobre la probabilidad de propagación de los transgenes a través de las poblaciones silvestres, seguido de la viabilidad, ventaja de apareamiento, fertilidad del macho y fecundidad de la hembra.

A pesar de algunos avances en esta área, todavía se está muy lejos de poder tener toda la información completa para la evaluación y el manejo de la bioseguridad de los peces transgénicos, debido a la falta de conocimiento científico sobre los rasgos de los OGM, la ecología de los ambientes naturales en los que podrían penetrar estos organismos y la interacción entre los dos (Kapusinski, 2005; Delvin y col., 2006).

13.2.2 Manejo de riesgo ambiental

Si las conclusiones combinadas de la caracterización del peligro para el medio ambiente y la evaluación de la inocuidad de los alimentos, son que los animales genéticamente modificados o sus transgenes se propagarán en el medio ambiente

en una medida que representa un riesgo para el suministro de alimentos de consumo humano, se deben estudiar la necesidad de aplicar medidas de contención para impedir o reducir la fuga de animales transgénicos o de sus gametos viables hacia el medio ambiente (<http://www.fao.org/docrep/007/y5316s/y5316s05.htm>).

En la evaluación del daño ambiental, se debe considerar posibles interacciones genotipo-ambiente.

Las propuestas para la reducción de riesgos están enfocadas y relacionadas con métodos de confinamiento y contención para impedir la entrada de peces transgénicos en el medio natural (Maclean y Laight, 2000; Delvin y col., 2006).

Hay medidas de contención biológica, mecánica y física/química para los peces en sistemas de acuicultura. La contención biológica implica, la supresión de la capacidad del animal para reproducirse, como por ejemplo, la esterilización de los peces y mediante la inducción de triploidía. La contención mecánica consiste en la utilización de algún tipo de dispositivo para impedir o reducir la salida de animales del sistema de acuicultura (por ejemplo, rejillas en las tuberías de salida de los depósitos o estanques con base de tierra para peces) y la contención física consiste en convertir en letal la vía de escape del agua mediante el cambio de una característica física del agua (como por ejemplo, calentar el agua de salida a una temperatura letal y luego enfriarla antes de su descarga) (FAO: <http://www.fao.org/docrep/007/y5316s/y5316s05.htm>).

La tarea para evaluar los impactos ambientales de un organismo transgénico, es entender que efecto ha tenido la modificación genética en cada una de las características pertinentes a las interacciones del organismo con los miembros de otras especies, su entorno físico, y luego predecir todos los efectos que pudieran ocurrir en el ecosistema.

13.3 Riesgo para la salud humana

En los casos de la utilización de los peces transgénicos con destino al consumo humano, es importante evaluar como en cualquier otra tecnología de alimentos los problemas de salud que los mismos puedan acarrear, su composición, inocuidad, y los efectos a largo plazo que los mismos puedan provocar.

La inserción de genes extraños en las especies transgénicas podría resultar en la producción de toxinas o alérgenos que no estaban presentes previamente. Otro problema a considerar es, que la mayor resistencia a enfermedades que presentan algunas líneas transgénicas podría dar lugar a la formación de nuevos organismos patógenos, lo que podría transmitirse a los seres humanos a través del consumo (FAO, 2003, 2004).

Para poder determinar los riesgos que los organismos transgénicos puedan tener sobre la salud humana, se considera que deben compararse las características del organismo transgénico con las de ese mismo organismo sin modificar. Se debe tener en cuenta como se ha generado ese organismo modificado, examinar su calidad nutricional, presencia potencial de toxinas y si ha habido cambios en sus

características alergénicas. En general, esta estrategia es aplicada por las agencias reguladoras de la mayoría de los países.

Dos ensayos de seguridad alimentaria han sido reportados con peces transgénicos. Uno de ellos se realizó en Cuba con tilapia GH transgénica y tilapia no transgénica, con primates no humanos y humanos voluntarios sanos (Guillén y col., 1999). A seis de los primates no humanos, se les administró por vía intravenosa un recombinante de tilapia GH por día, durante 30 días. Se les extrajo muestras de sangre antes y después del tratamiento para estudios bioquímicos. También se evaluaron diariamente indicadores clínicos como el peso, temperatura rectal, frecuencia respiratoria y frecuencia cardíaca. Tras el experimento, los animales fueron sacrificados y se les realizó la necropsia. Los resultados no mostraron efectos biológicos adversos de la tilapia GH en los primates, con parámetros sin efecto significativo sobre los perfiles bioquímicos, y características morfológicas de los órganos y tejidos normales (Guillén y col., 1999). Para evaluar la seguridad del consumo de la carne de tilapia GH transgénica, veintidós voluntarios humanos, fueron divididos aleatoriamente en dos grupos, uno recibió tilapia transgénica y el otro tilapia no transgénica dos veces al día, durante cinco días (Guillén y col., 1999). Distintos parámetros clínicos y bioquímicos fueron evaluados, mostrando que no había diferencia entre los individuos que habían consumido tilapia transgénica o normal.

Por otra parte, en China, se ha evaluado la seguridad alimentaria de la carpa transgénica para GH en ratones. Los resultados indicaron que los ratones que habían consumido carpa genéticamente modificada no mostraban diferencias frente a los grupos control, en cuanto a su crecimiento, análisis bioquímicos, o capacidad reproductiva.

Cabe destacar, que aunque los diferentes estudios científicos demuestren que los peces transgénicos son seguros para su consumo, los consumidores serán el eslabón final para determinar el éxito de estos productos (Aerni, 2011). Para ello, los beneficios que el consumidor aprecie en estos alimentos, deben ser mayores los riesgos.

14. EDICIÓN DEL GENOMA (“genome editing”)

Una nueva alternativa frente a los organismos transgénicos?

La industria de la biotecnología nació en 1973, cuando Herbert Boyer y Stanley Cohen insertaron ADN ajeno manipulado por ellos en el laboratorio en bacterias. Pocos años después Boyer había cofundado *Genentech (Genetic Engineering Technology)*, y la empresa empezó a usar *Escherichia coli* modificado con un gen humano para fabricar insulina para diabéticos.

En 1974, Jaenisch, creó el primer ratón transgénico usando un virus, infectando los blastocistos de ratón con el ADN de SV40 (simian virus 40). Se produjo el desarrollo normal de los embriones infectados, y se observó la persistencia de las secuencias de ADN de SV40 en los animales adultos (Jaenisch, 1974). Sin embargo, la primera producción exitosa de ratones transgénicos utilizando la técnica de microinyección

directa de ADN en el pronúcleo de un óvulo fertilizado fue reportada por Gordon y colaboradores (1980). En todos estos y otros primeros ejemplos de ingeniería genética, los investigadores se veían limitados a usar técnicas que insertaban ADN ajeno en la célula al azar. Todo lo que podían hacer era esperar a que sucediera lo mejor.

A través de la tecnología conocida como edición del genoma se ha logrado introducir, modificar o borrar genes bajo diseño (Sander, 2014).

En términos técnicos, los organismos producidos por edición de genoma no deberían ser considerados OGM, puesto que idealmente su genoma no tiene material genético adicional.

En la actualidad, existen tres métodos para editar un genoma de manera precisa y ágil: ZNF (Nucleasas dedo de zinc), TALEN (activador de efector de transcripción de nucleasas) y CRISPR/Cas9 (repeticiones palindrómicas cortas agrupadas y regularmente interespaciadas) (Gaj y col., 2013).

Los tres métodos explotan una propiedad que tienen todas las células, que es la de reparar su ADN cuando se rompen las dos cadenas que lo conforman. Cuando una cadena de ADN se rompe, las células utilizan una de dos alternativas para reparar los posibles daños: la primera se conoce como unión de extremos no homólogos, y la otra, reparación asistida por plantilla. En el primer caso, lo que hace la célula es pegar a los extremos rotos del ADN unas proteínas específicas, las cuales se unen entre sí para acercar los extremos fracturados y pegarlos nuevamente. La segunda opción se utiliza cuando el cromosoma se rompe pero existe un segmento adicional de ADN que es idéntico en secuencia a uno y otro lado de la fractura, la célula utiliza este segmento como guía fiel para reparar el ADN.

De este modo, los investigadores han logrado editar un genoma cortando el ADN en el sitio deseado con una "tijera" molecular programable y al mismo tiempo introducir un ADN guía para engañar a las células y hacer que utilicen esta plantilla para reparar el daño e introducir así todos los cambios deseados.

Cada sistema de edición tiene su propio mecanismo de programación: en los sistemas ZNF y TALEN la misma proteína que actúa como tijera es la que se programa para que corte en un sitio predefinido. En contraste, el sistema CRISPR/Cas9 tiene dos componentes independientes: la proteína Cas9 que actúa como tijera y un pequeño ARN guía que le dice a Cas9 dónde ejercer su acción (Gaj y col., 2013).

CRISPR se empleó originalmente para "knock-out" genes diana en diversos tipos de células y organismos, pero las modificaciones a la enzima Cas9 han extendido la aplicación de CRISPR para activar o reprimir selectivamente genes diana y purificar regiones específicas del ADN (Auer y col., 2014).

Los sistemas de edición de genomas son más sencillos de utilizar que la transgénesis, ya que permite modificar varios genes a la vez y con mejores resultados. La mayoría de las técnicas de manipulación genética convencionales insertan el nuevo ADN en un punto al azar del genoma, y sólo permiten añadir un gen. En gran medida, estas dificultades son las que han generado las fuertes críticas

frente a los organismos genéticamente modificados, por considerarse que podrían tener efectos dañinos. Por otra parte, CRISPR y las otras herramientas dan a los científicos una forma precisa de borrar y editar trozos específicos de ADN, pudiendo también cambiar un único par de bases.

Actualmente se han realizado experimentos en animales con edición de genoma. En Roslin (Escocia, Instituto Nacional de Biosciencia), por ejemplo, el Dr. Whitelaw ha cambiado tres genes en cerdos domesticados vulnerables a la peste porcina africana, que pueden devastar rebaños, para parecerse a los de los cerdos salvajes que son resistentes a la enfermedad (Whitelaw, 2014). Este autor en conjunto con investigadores de Uruguay (Menchaca y col. 2016), han publicado recientemente una serie de avances sobre edición génica en la especie ovina y caprina, donde indican que en pocos años esta tecnología superará incluso nuestra imaginación. No se han reportado bovinos con esta tecnología y los ejemplos de cerdos, cabras y ovejas son muy escasos aun.

Alejo Menchaca (IRAUy) y Martina Crispo (Instituto Pasteur), utilizaron herramientas CRISPR-Cas dirigidas contra el gen de la miostatina en embriones de ovejas de la raza *Merino Superfino*, la que produce lana de mayor calidad en el mundo. Lograron inactivarlo en estas ovejas, y obtuvieron animales más musculados, de mayor tamaño, y con mayor masa muscular (figura 17). Demostrando de esta manera, que es posible combinar en un solo experimento, y con éxito, dos características de interés ganadero (Crispo y col., 2015).



Figura 17: corderos de la raza Superfina Merino. El de arriba es un cordero no modificado genéticamente. El cordero de abajo, su genoma ha sido editado mediante herramientas CRISPR-Cas y se ha inactivado el gen de la miostatina, lo cual provoca un incremento de la masa muscular. Estos corderos se describen en el artículo Crispo y colaboradores (2015).

Investigadores chinos han producido perros Beagle con mayor masa muscular, más voluminosos por carecer de un gen que inhibe el desarrollo muscular (Figura 18), una edición que podría hacerse para producir perros más rápidos (Zou y col., 2015).



Figura 18: Beagle con genoma editado, presentan mayor masa muscular y son más voluminosos por falta del gen que inhibe el desarrollo muscular. Disponible en: <http://www.nytimes.com/>

Utilizando CRISPR-Cas9 en la búsqueda de tratamientos para enfermedades humanas, los investigadores también están alterando los cerdos con intención de hacer crecer órganos humanos que puedan ser utilizados para trasplantes.

Dos trabajos publicados en *Nature Biotechnology*, han demostrado el potencial del sistema CRISPR para modificar el ADN con fines terapéuticos, in vivo, en modelos animales. Por una parte un equipo del *Massachusetts Institute of Technology* optimizó los métodos para introducir los componentes del sistema CRISPR en las células, destinados a reparar ADN defectuoso. Los investigadores lograron corregir una mutación responsable de la enfermedad hepática tirosinemia hereditaria (error del metabolismo, en donde el cuerpo humano no puede romper el aminoácido tirosina) en una proporción significativa de células hepáticas en un modelo de ratón (Yin, 2014).

En el otro estudio paralelo, un equipo de investigadores de la Universidad de Pensilvania, conseguía corregir una enfermedad metabólica hepática en ratones recién nacidos (Yang y col., 2016). Se pensó que modificar el genoma inmediatamente con el sistema CRISPR tras el nacimiento era una buena opción para la enfermedad hepática, en tanto al repararse su ADN las células modificadas podrían proliferar y mantener la corrección en sucesivas generaciones de células

hepáticas. Se observó, una reversión de la mutación en aproximadamente el 10 por ciento de los hepatocitos, así como una mayor supervivencia de los ratones.

Los dos estudios de CRISPR en modelos de ratón de enfermedades hepáticas son prometedores para el tratamiento de estas enfermedades, bien en adultos o en recién nacidos. Indudablemente, todavía queda camino por recorrer hasta asegurar que un método u otro son completamente seguros y efectivos para su utilización en humanos. Sin embargo, las últimas investigaciones plantean una utilización de CRISPR, en un gran abanico de enfermedades genéticas.

Dadas las ventajas que presentan estas técnicas de edición de genoma, podrían ser en el futuro, una buena alternativa para sustituir a los organismos genéticamente modificados.

15. DISCUSIÓN

A lo largo de los años se han producido una gran variedad de organismos transgénicos de origen animal, tanto terrestre como acuáticos. Las técnicas han ido mejorando, y con ello la eficiencia del método. Se ha tenido éxito en especies comerciales, logrando obtener animales más productivos, y también en otros rasgos no ligados a la producción.

Según Powers (1989), los peces representan un buen modelo para la aplicación de la transgénesis, dado que presentan características ventajosas que los hacen aptos para su manipulación genética.

Las técnicas de ingeniería genética han sido empleadas para mejorar la tasa de crecimiento, incrementando la resistencia a enfermedades, control de la reproducción, maduración y esterilidad, resistencia a bajas temperaturas y a la congelación, que les permitan adaptarse a diferentes condiciones ambientales, logrando de esta forma, obtener animales más productivos que permitan aplicar sistemas de producción más eficientes y con un menor impacto sobre los ecosistemas.

En la búsqueda de obtener peces transgénicos tolerantes al frío y resistentes a la congelación, Fletcher y col. (1988) introdujeron en el salmón Atlántico el gen de la AFP de tipo I del pez plano (*Pseudopleuronectes americanus*), demostrando que el transgénico se integro al genoma pez, y se transmitía a la siguiente generación. Sin embargo estos animales no eran resistentes a la congelación. Por otro lado, Wang y col. (1995), lograron introducir la proteína tipo III del abadejo del océano en el pez rojo (*Carassius Auratus*). Reportando un aumento a la tolerancia al frío en esta especie.

Con la utilización de la proteína antimicrobiana, lisozima derivada de pollo, Yazawa y col. (2006), logran demostrar que la introducción del gen que codifica esta proteína en pez cebra, proporciona un aumento en la resistencia a enfermedades de origen bacteriano en esa especie. Resultados similares, fueron reportados por Dunham y col. (2002), en el bagre del canal, a través de la inserción en su genoma del péptido cecropina B de la polilla de seda (*Hyalophora cecropa*).

Diferentes métodos han sido aplicados con el objetivo de poder controlar la reproducción de los peces transgénicos y obtener individuos estériles. La técnica antisentido ha demostrado ser el método más eficiente para este fin en peces a través de la modificación genética. Uzbekova y col. (2000), utilizaron esta técnica en trucha arcoíris, pero los niveles de GnRH no se vieron afectados y los peces no eran estériles. Sin embargo, Hu y col. (2006), logran demostrar la posible eficiencia de esta técnica en carpa, determinando que el 30 por ciento de la población en estudio no desarrollo gónadas.

Uno de los principales intereses en la aplicación de transgénesis en peces ha sido obtener el máximo de biomasa en el menor tiempo y con el menor costo posible. Por esta razón, para lograr tales objetivos, se han realizado construcciones utilizando la hormona del crecimiento en especies de interés comercial, como la carpa común, tilapia y el salmón del Atlántico, obteniendo resultados prometedores.

Wang y col. (2001), reportan un aumento del crecimiento y una mayor conversión de los alimentos, en carpa GH con una construcción "all fish". Por otro lado, Maclean y Laight, (2000), Rahman y col. (2001), obtienen resultados similares en la tilapia GH de salmón Chinook, y Hew y col. (1995) en el salmón del Atlántico GH de salmón Chinook. En cuanto a la variación en los coeficientes de digestibilidad de la materia seca, proteína bruta y energía en estas especies transgénicas respecto a sus contrapartes no transgénicas, Rahman y col. (2001) reportan que la tilapia transgénica los utiliza de manera más eficiente, mientras que en el caso del salmón, Cook y col. (2000), no encontraron variación en estos coeficientes.

Otras investigaciones, han logrado demostrar la posible aplicación de los peces transgénicos en otros ámbitos, como es el caso de la industria farmacéutica, en control ambiental y en medicina humana.

Algunos resultados obtenidos en estas aéreas fueron reportados por Hwang y col. (2004), logrando producir a partir de tilapia transgénica el factor VII de coagulación humana; Zeng y col. (2005), construyen medakas transgénicas que expresan GFP en presencia de estrógenos, Blechinger y col. (2002) obtiene buenos resultados en *Danio rerio* que expresa GFP en respuesta al cadmio, pudiendo ser utilizados para control ambiental. En el caso de su aplicación en medicina humana, Wright y Pohajdak, (2001), Pohajdak y col. (2004), Alexander y col. (2006), obtienen importantes avances para el tratamiento de la diabetes tipo I en humanos utilizando a la tilapia que expresan una insulina "humanizada" como modelo.

En relación a las objeciones impuestas frente a los peces transgénicos, se podría decir, que muchas de ellas no son convenientes. En cuanto a la objeción de que los peces escapasen a los ecosistemas naturales, Tiedje y col, (1989), Kapuscinski y Hallerman, (1990), (1991), Hallerman y Kapuscinski, (1992) consideran que es una preocupación ecológica importante. Dunham, (1999), Muir y Howard, (2002), comparten esta posición, y consideran que deben aplicarse medidas de bioseguridad adecuadas para la gestión de los posibles riesgos, evaluación, manejo y gestión de los mismos.

Los posibles riesgos que los peces transgénicos pueden producir en el medio ambiente deben ser correctamente evaluados. Estudios previos han identificado numerosos daños ambientales que pueden producirse por el escape de los peces transgénicos al medio natural. En este aspecto, se plantearon dos posibles situaciones, Muir y Howard, (1999), (2002), hablan de peligro de extinción, o peligro de invasión frente a la presencia de los peces transgénicos en el medio natural. Para poder cuantificar estos peligros, Muir y col. (2004) determinan que es necesario aplicar una metodología estandarizada que permita hacer buenas predicciones. Por otra parte, Maclean y Laight, (2000), Delvin y col. (2006), proponen la aplicación de métodos de confinamiento y contención para impedir la entrada de peces transgénicos en el medio natural.

En cuanto a los riesgos que los OGM puedan tener sobre la salud humana, Guillén y col., (1999), realizaron ensayos con tilapia GH transgénica y tilapia no transgénica en humanos voluntarios sanos. Demostrando a través de la evaluación de distintos parámetros clínicos y bioquímicos, que no había diferencia entre los individuos que habían consumido tilapia transgénica o normal.

Se podría argumentar que los beneficios de los peces transgénicos podrían ser mayores que sus desventajas, siempre y cuando sean evaluados de forma independiente, aplicando los métodos de contención adecuados para prevenir potenciales daños ecológicos, y si se utilizan los correctos métodos de evaluación de riesgo. Sin embargo, aunque los diferentes estudios científicos demuestren que los peces transgénicos son seguros para su consumo, los consumidores serán el eslabón final para determinar el éxito de estos productos.

16. CONCLUSIONES

El tema de los organismos transgénicos es un tema complejo, lleno de matices y opiniones contrapuestas, y está claro, que es necesario un cambio en la percepción que se tiene de la modificación genética en sí misma.

En la actualidad, los organismos transgénicos son una realidad, ya están entre nosotros, y van a seguir apareciendo más, en diversas especies de peces, como en otras especies de interés comercial y productivo.

Con el tiempo, han surgido diversas aplicaciones para la utilización de los peces transgénicos, algunas de las cuales, podrían permitir no solamente obtener mejoras a nivel productivo, sino que también reducir el impacto que la sobrepesca está provocando sobre los ecosistemas, permitiendo así obtener un sistema de producción más sostenible en el tiempo.

Podríamos decir, que los peces transgénicos, suponen riesgos relativos poco cuantificables, y que dichos riesgos son en su mayoría problemáticas más relacionadas con el sistema productivo actual, y el posible impacto medio ambiental que puedan acarrear, que con la tecnología en sí, y que fundados o no, dichos riesgos, deben ser estudiados, reglamentados y/o prevenidos, para evitar consecuencias mayores. En balance, si bien hay riesgos, parece que siempre que su uso se haga de una manera responsable, los beneficios serán tales que justifican el riesgo. Es de importancia, que cada caso sea evaluado en forma individual, por sus propios meritos y que no se generalice.

En otros ámbitos de la ingeniería genética, es posible que en el futuro la técnica de "gene editing" cumpla el papel que hoy se pretende que cumpla la transgénesis, pero eso lo dirá el futuro.

17. BIBLIOGRAFIA

1. Aerni, P. (2011). Do political attitudes affect consumer choice? Evidence from a large-scale field study with genetically modified bread in Switzerland. *Sustainability*, 3(9): 1555-1572.
2. Agbioworld: Cultivos y Alimentos Genéticamente Modificados. Disponible en: <http://www.agbioworld.org/biotech-info/articles/spanish/resumen.html>). Fecha de consulta: 19/2/2016.
3. Alexander, E.L., Dooley, K.C., Pohajdak, B., Xu, B.Y., Wright, J.R. (2006). Things we have learned from tilapia islet xenotransplantation. *General and Comparative Endocrinology*, 148(2):125-131.
4. Auer, T.O., Durore, K., De Cian, A., Concordet, J.P., Del Bene, F. (2014). Highly efficient CRISPR/Cas9-mediated knock-in in zebrafish by homology-independent DNA repair. *Genome Research*, 24(1):142-153.
5. Baghian, A., Jaynes, J., Enright, F., Kousoulas, K.G. (1997). An amphipathic α -helical synthetic peptide analogue of melittin inhibits herpes simplex virus-1 (HSV-1)-induced cell fusion and virus spread. *Peptides*, 18(2):177-183.
6. Beardmore, J.A. (1997). Transgenics: autotransgenics and allotransgenics. *Transgenic Research*, 6(1): 107-108.
7. Bechinger, B. (1997). Structure and functions of channel-forming peptides: magainins, cecropins, melittin and alamethicin. *Journal of Membrane Biology*, 156(3): 197-211.
8. Bell, J.G., Henderson, R.J., Tocher, D.R., McGhee, F., Dick, J.R., Porter, A., Sargent, J.R. (2002). Substituting fish oil with crude palm oil in the diet of Atlantic salmon (*Salmo salar*) affects muscle fatty acid composition and hepatic fatty acid metabolism. *The Journal of Nutrition*, 132(2): 222-230.
9. Benavides, F.J., Guénet, J.L., (2003). Manual de Genética de Roedores de Laboratorio: Principios Básicos y Aplicaciones. 312p. Disponible en: <http://secal.es/wp-content/uploads/2014/10/00-GENETICA-indice.pdf.pdf>. Fecha de consulta: 28/5/2016.
10. Bevan, M. W., Flavell, R. B., Chilton, M. D. (1983). A chimaeric antibiotic resistance gene as a selectable marker for plant cell transformation. *Nature*, 304: 184-187.
11. Biociencia, 2009: EEUU autoriza el primer medicamento obtenido de la leche de cabras transgénicas. Disponible en: <http://www.elmundo.es/elmundosalud/2009/02/09/biociencia/1234179641.htm>]. Fecha de consulta: 17/3/2016.

12. Biotecnología aplicada a la acuicultura. Disponible en:
<http://www.argenbio.org/adc/uploads/pdf/Biotecnologia%20y%20acuicultura.pdf>. Fecha de consulta: 1/6/2016
13. Blechinger, S.R., Warren, J.T., Kuwada, J.Y., Krone, P.H. (2002). Developmental toxicology of cadmium in living embryos of a stable transgenic zebrafish line. *Environmental health perspectives*, 110(10): 1041.
14. Bolivar, F.G. (2007). *Fundamentos y casos exitosos de la biotecnología Moderna*. 2ª Ed. México, colegio Nacional. 718p.
15. Brown, N. (2000). Organising/disorganising the breakthrough motif: Dolly the cloned ewe meets Astrid the hybrid pig. *Contested futures: sociology of prospective science and technology*, 87-110. Disponible en:
<http://www.york.ac.uk/media/satsu/documents-papers/Brown-2000-dolly.PDF>.
 Fecha de consulta: 12/4/2016.
16. Buono, R.J., Linser, P.J. (1991). Transient expression of RSV-CAT in transgenic zebrafish made by electroporation. *Molecular Marine Biology and Biotechnology*, 1:271-275.
17. Caldovic, L., Hackett, P.B. (1995). Development of position-independent expression vectors and their transfer into transgenic fish. *Molecular Marine Biology and Biotechnology*, 4(1): 51-61.
18. Carvan, M.J., Sonntag, D.M., Cmar, C.B., Cook, R.S., Curran, M.A., Miller, G.L. (2001). Oxidative stress in zebrafish cells: potential utility of transgenic zebrafish as a deployable sentinel for site hazard ranking. *Science of the Total Environment*, 274(1):183-196.
19. Chiou, P.P., Lin, C.M., Perez, L., Chen, T.T. (2002). Effect of cecropin B and a synthetic analogue on propagation of fish viruses in vitro. *Marine Biotechnology*, 4(3): 294-302.
20. Chou, C.Y., Horng, L.S., Tsai, H.J. (2001). Uniform GFP-expression in transgenic medaka (*Oryzias latipes*) at the F0 generation. *Transgenic Research*, 10(4): 303-315.
21. Chourrout, D., Guyomard, R., Houdebine, L.M. (1986). High efficiency gene transfer in rainbow trout (*Salmo gairdneri Rich.*) by microinjection into egg cytoplasm. *Aquaculture*, 51(2): 143-150.
22. Clark, A. (2002). Generation of transgenic livestock by pronuclear injection. *Methods Molecular Biology*, 180: 273-87.
23. Cubbit, A.B. Analysis of fluorescent protein toxicity (1995). Disponible en:
<http://www.genomicgastronomy.com/zebrafishdocuments/Cubitt%20Analysis%20of%20Fluorescent%20Protein%20Toxicity.pdf>. De consulta: 1/3/2016

24. Cook, J.T., McNiven, M.A., Richardson, G.F., Sutterlin, A.M. (2000). Growth rate, body composition and feed digestibility/conversion of growth-enhanced transgenic Atlantic salmon (*Salmo salar*). *Aquaculture*, 188(1): 15-32.
25. Crispo, M., Vilarino, M., dos Santos-Neto, P. C., Nunez-Olivera, R., Cuadro, F., Barrera, N., Menchaca, A. (2015a). Embryo development, fetal growth and postnatal phenotype of eGFP lambs generated by lentiviral transgenesis. *Transgenic Research*, 24(1): 31-41.
26. Crispo, M., Schlapp, G., Meikle, M. N., Mulet, A. P., Barrera, N., Cuadro, F., Menchaca, A., (2015b). Advances in the Generation of Genetically Modified (GM) Animal Models: Meeting report. *Transgenic Research*, 24(6): 1087-1090.
27. Daher, K.A, Selsted, M.E., Lehrer, R.I. (1986). Direct inactivation of viruses by human granulocyte defensins. *Journal of Virology*, 60(3): 1068-74.
28. Davidson, A.E., Balciunas, D., Mohn, D., Shaffer, J., Hermanson, S., Sivasubbu, S., Cliff, M.P., Hackett, P.B., Ekker, S.C. (2003). Efficient gene delivery and gene expression in zebrafish using the Sleeping Beauty transposon. *Developmental Biology*, 263:191-202.
29. Davies, P.L., Fletcher, G.L., Hew, C.L., (1989a). Fish antifreeze protein genes and their use transgenic studies. En: Maclean, N. (Ed.) *Oxford Surveys on Eukaryotic Genes*, p: 85-109.
30. Davis, S.A., Catchpole, E.A., Pech, R.P. (1999). Models for the introgression of a transgene into a wild population within a stochastic environment, with applications to pest control. *Ecological Modelling*, 119(2): 267-275.
31. Devlin, R.H., Donaldson, E.M. (1992). Containment of genetically altered fish. En: Hew, C.L., Fletcher, G.L., *Transgenic fish*, Singapore, World Scientific, p: 229-265.
32. Devlin, R.H., Yesaki, T.Y., Donaldson, E.M., Hew, C.L. (1995). Transmission and phenotypic effects of an antifreeze/GH gene construct in coho salmon (*Oncorhynchus kisutch*). *Aquaculture*, 137(1): 161-169.
33. Devlin, R.H., Biagi, C.A., Yesaki, T.Y., Smailus, D.E., Byatt, J.C. (2001). Growth of domesticated transgenic fish. *Nature*, 409(6822): 781-782.
34. Devlin, R.H., Sundström, L.F., Muir, W.M. (2006). Interface of biotechnology and ecology for environmental risk assessments of transgenic fish. *Trends in Biotechnology*, 24(2): 89-97.
35. Devlin, R.H., Sakhrani, D., Biagi, C.A., Eom, K.W. (2010). Occurrence of incomplete paternal-chromosome retention in GH-transgenic coho salmon being assessed for reproductive containment by pressure-shock-induced triploidy. *Aquaculture*, 304(1): 66-78.

36. Díaz, M.G.C. (2006). Evolución histórica de la Biología (VIII): Hacia la ingeniería de la vida. Encuentros de la Biología. Disponible en: <http://www.encuentros.uma.es/encuentros109/109.pdf> . Fecha de consulta: 21/5/2016.
37. Du, S.J., Gong, Z.Y., Fletcher, G.L., Shears, M.A., King, M.J., Idler, D.R., Hew C.L. (1992). Growth enhancement in transgenic Atlantic salmon by the use of an “all fish” chimeric growth hormone gene constructs. *Biotechnology (N.Y.)* 10: 176-181.
38. Dunham, R.A. (1999). Utilization of transgenic fish in developing countries: potential benefits and risks. *Journal of the World Aquaculture Society*, 30(1): 1-11.
39. Dunham, R.A., Warr, G.W., Nichols, A., Duncan, P.L., Argue, B., Middleton, D., Kucuktas, H. (2002). Enhanced bacterial disease resistance of transgenic channel catfish *Ictalurus punctatus* possessing cecropin genes. *Marine Biotechnology*, 4(3): 338-344.
40. Dunham, R.A. (2004). *Aquaculture and Fisheries Biotechnology: Genetic Approaches*. London, British Library, p. 371.
41. Echelard, Y., Meade, H., Ziomek, C. (2005). The first biopharmaceutical from transgenic animals: ATryn. *Modern Biopharmaceuticals*, 4(11): 995-1016.
42. Edmunds, T., Van Patten, S.M., Pollock, J., Hanson, E., Bernasconi, R., Higgins, E., Cole, E.S. (1998). Transgenically produced human antithrombin: Structural and functional comparison to human plasma-derived antithrombin. *Blood*, 91(12): 4561-4571.
43. FAO: Pesca y acuicultura. Disponible en: <http://www.fao.org/fishery/aquaculture/es>. Fecha de consulta: 19/2/2016.
44. FAO: Programa de información de especies acuáticas: *Cyprinus carpio*. Disponible en: http://www.fao.org/fishery/culturedspecies/Cyprinus_carpio/es#tcNA00EA. Fecha de consulta: 20/2/2016.
45. FAO: La agricultura mundial en la perspectiva del año 2050 (2009). Disponible en: http://www.fao.org/fileadmin/templates/wsfs/docs/Issues_papers/Issues_papers_SP/La_agricultura_mundial.pdf. Fecha de consulta: 15/1/2016.
46. FAO: Programa de información de especies acuáticas: *Oreochromis niloticus*. Disponible en: http://www.fao.org/fishery/culturedspecies/Oreochromis_niloticus/es. Fecha de consulta: 20/2/2016.
47. FAO: Programa de información de especies acuáticas: *Salmo salar*. Disponible en:

http://www.fao.org/fishery/culturedspecies/Salmo_salar/es#tcNA0050.

Fecha de consulta: 20/2/2016

48. FAO (2003,2004): El Estado Mundial de Agricultura y la Alimentación. Repercusiones de los cultivos transgénicos en la salud y el medio ambiente. Disponible en: <http://www.fao.org/docrep/006/y5160s/y5160s10.htm>. Fecha de consulta: 12/3/2016
49. FAO/OMS (2007). Consulta Mixta FAO/OMS sobre la inocuidad de Expertos "de los Alimentos Obtenidos de Animales de ADN Recombinante. Sede de la Organización Mundial de la Salud Ginebra (Suiza), 26 de febrero–2 de marzo de 2007." Disponible en: <http://www2.uned.es/experto-biotecnologia-alimentos/docu/Inocuidad%20Alimentos%20ADN%20recom%202007sp.pdf>. Fecha de consulta: 7/6/2016.
50. FAO: Estado mundial de la pesca y la acuicultura, SOFIA 2012. Disponible en: <http://www.fao.org/docrep/016/i2727s/i2727s01.pdf> . Fecha de consulta: 10/12/2015
51. FAO, El estado mundial de la pesca y la acuicultura, SOFIA 2014. Roma. 253 p. disponible en: <http://www.fao.org/3/a-i3720s>. Fecha de consulta: 20/2/2016
52. FAO: Fish to 2030: Prospects for Fisheries and Aquaculture. Disponible en: <http://www.fao.org/docrep/019/i3640e/i3640e.pdf>. Fecha de consulta: 12/3/2016
53. FAO, situación actual en la producción de animales transgénicos. Disponible en: <http://www.fao.org/docrep/007/y5316s/y5316s05.htm>. Fecha de consulta: 29/4/2016.
54. Farrell, A.P., Bennett, W., Devlin, R.H. (1997). Growth-enhanced transgenic salmon can be inferior swimmers. *Canadian Journal of Zoology*, 75(2): 335-337.
55. Fletcher, G.L., Shears, M.A., King, M.J., Davies, P.L., Hew, C.L. (1988). Evidence for antifreeze protein gene transfer in Atlantic. *Canadian Journal Fisheries and Aquatic Sciences*, 45:352-357.
56. Fletcher, G.L., Davies, P.L., Devlin, R.H. (1992). Genetic engineering of freeze-resistant Atlantic salmon. En: Hew, C.L., Fletcher G.L. (Eds) *Transgenic Fish*. London, World Scientific Publishing, p. 109-208.
57. Fletcher, G.L., Hew, C.L., Davies, P.L. (2001). Antifreeze proteins of teleost fishes. *Annual Review of Physiology*, 63(1): 359-390.
58. Fuentes, M.L.C., Pérez, F.A., Flageu, M.A. (2012). El pez cebra, al servicio de la investigación contra el cáncer. Disponible en:

<https://digitum.um.es/xmlui/bitstream/10201/29730/1/EI%20pez%20cebra%2c%20al%20servicio%20de%20la%20investigaci%C3%B3n%20en%20c%C3%A1ncer.pdf>. Fecha de consulta: 15/10/2015.

59. Food and Drug Administration (2015): determina que el consumo del salmón AquAdvantage es tan seguro como el salmón no diseñado genéticamente. Disponible en: <http://www.fda.gov/ForConsumers/ConsumerUpdates/ConsumerUpdatesEnEspanol/ucm473531.htm>. Fecha de consulta: 4/3/2016.
60. Food and Drug Administration (FDA): evaluación del salmón diseñado genéticamente. Disponible en: <http://www.fda.gov/ForConsumers/ConsumerUpdates/ConsumerUpdatesEnEspanol/ucm473531.htm#1>. Fecha de consulta en: 4/3/2016.
61. Furth P.A., St Onge, L., Boger, H., Gruss, P., Gossen, M., Kistner, A., Bujard, H., Hennighausen, L. (1994). Temporal control of gene expression in transgenic mice by a tetracycline-responsive promoter. U.S.A, National Academy of Sciences, 91: 9302-9306.
62. Gaj, T., Gersbach, C.A., Barbas, C.F., (2013). ZFN, TALEN, and CRISPR/Cas-based methods for genome engineering. Trends in Biotechnology, 31(7): 397-405.
63. Gjedrem, T., Baranski, M. (2009). The Success of selective Breeding in Aquaculture. En: Gjedrem, T., Baranski, M., Selective Breeding in Aquaculture: An Introduction. London, International Publisher Science, Technology Medicine, p: 13-22.
64. 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.
65. Gordon, J.W., Scangos, G.A., Plotkin, D.J., Barbosa, J.A., Ruddle, F.H. (1980). Genetic transformation of mouse embryos by microinjection of purified DNA. Proceedings of the National Academy of Sciences, 77(12): 7380-7384.
66. Gordon, J.W., Ruddle, F.H. (1981). Integration and stable germ line transmission of genes injected into mouse pronuclei. Science, 214:1244-1246.
67. Gothilf, Y., Toyama, R., Coon, Du, S.J., Dawid, I.B., Klein, D.C. (2002). Pineal-specific expression of green fluorescent protein under the control of the serotonin-N-acetyltransferase gene regulatory regions in transgenic zebrafish. Developmental Dynamics, 225 (3): 241-249.
68. Guillén L., Leonart, R., Agramonte, A., Morales, R., Morales, A., Hernández C.A., Vázquez, M.M., Díaz, M., Herrera, M.T., Alvarez, L., Hernández, O., De la Fuente, J. (1998). Physiological changes in the juvenile euryhaline teleost,

- the tilapia *Oreochromis hornorum*, injected with *E. coli*-derived homologous growth hormone. *Marine Biotechnology*, 6(3):142-51.
69. Guillen, L., Berlanga, J., Valenzuela, C.M., Morales, A., Toledo, J., Estrada, M.P., Puentes, P., Hayes, O., De la Fuente, J. (1999). Safety evaluation of transgenic tilapia with accelerated growth. *N.Y., Marine Biotechnology*, p: 12-14.
 70. Gura, T. (1995). Antisense has growing pains. *Science*, 270(5236): 575-577.
 71. Hackett, P.B. (1993). The molecular biology of transgenic fish. En: Hochachka, P.; Mommsen, T. *Biochemistry and Molecular Miology of Fishes*. Amsterdam, Elsevier, p 207-240.
 72. Hackett, P.B., Alvarez, M.C. (2000). The molecular genetics of transgenic fish. En: Fingerma, M., Nagabhushanam, R., *Recent Advances in Marine Biotechnology*, New Hampshire, Science Publishers, Enfield, 4: 77-154.
 73. Hallerman, E.M., Kapuscinski, A.R. (1992). Ecological implications of using transgenic fishes in aquaculture. *Marine Science Symposium*, 194: 56-66.
 74. Hallerman, E.M., McLean, E., Fleming, I.A. (2007). Effects of growth hormone transgenes on the behavior and welfare of aquacultured fishes: A review identifying research needs. *Applied Animal Behaviour Science*, 104(3): 265-294.
 75. Hamada, K., Tamaki, K., Sasado, T., Watai, Y., Kani, S., Wakamatsu, Y., Ozato, K., Kinoshita, M., Kohno, R., Takagi, S., Kimura, M.(1998). Usefulness of the medaka beta-actin promoter investigated using a mutant GFP reporter gene in transgenic medaka (*Oryzias latipes*). *Molecular Marine Biology and Biotechnology*, 7(3):173-80.
 76. Harding, M.M., Anderberg, P.I., Haymet, A.D.J. (2003). 'Antifreeze' glycoproteins from polar fish. *European Journal of Biochemistry*, 270(7): 1381-1392.
 77. Her, G.M., Yeh, Y.H., Wu, J.L. (2003). Liver regulatory sequence in the liver fatty acid binding protein (L-FABP) gene is sufficient to modulate liver regional expression in transgenic zebrafish. *Developmental Dynamics*, 227(3): 347-356.
 78. Hernández, O., Guillén, I., Estrada, M.P., Cabrera, E., Pimentel, R., Piña, J.C., Abad, Z., Sánchez, V., Hidalgo, Y., Martínez, R., Leonart, R., De la Fuente, J. (1997). Characterization of transgenic tilapia lines with different ectopic expression of tilapia growth hormone. *Molecular Marine Biology Biotechnology*, 6: 364-375.
 79. Hew C.L., Fletcher, G.L., Davies, P.L. (1995). Transgenic salmon: tailoring the genome for food production. *Journal of Fish Biology*, 47: 1-19.

80. Higashijima, S.I, Okamoto, H., Ueno, N., Hotta, Y., Eguchi, G.(1997). High-frequency generation of transgenic zebrafish which reliably express GFP in whole muscles or the whole body by using promoters of zebrafish origin. *Developmental Biology*, 192(2): 289-99.
81. Hill, J.E., Kapuscinski, A.R., Pavlowich, T. (2011). Fluorescent transgenic zebra danio more vulnerable to predators than wild-type fish. *Transactions of the American Fisheries Society*, 140(4): 1001-1005.
82. Hostletler, H.A., Peck, S.L., Muir, W.M.(2003). High efficiency production of germ-line transgenic Japanese medaka (*Oryzas latipes*) by electroporation with direct current-shifted radio frequency pulses. *Transgenic Research*, 12: 413-424.
83. Hostletler, H.A., Collodi, P., Devlin, R.H., Muir, W.M. (2005). Improved phytate phosphorus utilization by Japanese medaka transgenic for the *Aspergillus niger* phytase gene. *Zebrafish*, 2(1): 19-31.
84. Hrytsenko, O., Rayat, G.R., Xu, B.Y., Krause, R., Pohajdak, B., Rajotte, R.V., Wright, J.R. (2011). Lifelong stable human insulin expression in transgenic tilapia expressing a humanized tilapia insulin gene. *Transgenic Research*, 20(6): 1397-1398.
85. Hu, W., Wang, Y., Zhu, Z. (2006). A perspective on fish gonad manipulation for biotechnical applications. *Chinese Science Bulletin*, 51(1):1-6.
86. Hwang, G., Müller, F., Rahman, M. A., Williams, D. W., Murdock, P. J., Pasi, K. J., Maclean, N. (2004). Fish as bioreactors: transgene expression of human coagulation factor VII in fish embryos. *Marine Biotechnology*, 6(5): 485-492.
87. Inoue, K., Akita, N., Shiba, T., Satake, M., Yamashita, S. (1992). Metal-inducible activities of metallothionein promoters in fish cells and fry *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 185: 1108-1114.
88. INTA (2012): Rosita ISA produce "leche maternizada". Disponible en: <http://intainforma.inta.gov.ar/?p=11838>. Fecha de consulta: 10/3/2016.
89. IRAUy: Los corderos que iluminan a la ciencia nacional. Disponible en: http://www.irauy.org.uy/download/corderos_transgenicos.pdf. Fecha de consulta: 20/2/2015.
90. Jaenisch, R. (1974). Infection of mouse blastocysts with SV40 DNA: normal development of the infected embryos and persistence of SV40-specific DNA sequences in the adult animals. En symposia on quantitative biology, N.Y., Cold Spring Harbor Laboratory, 39: 375-380.
91. Kapuscinski, A.R., Hallerman, E.M. (1991). Implications of introduction of transgenic fish into natural ecosystems. *Canadian, Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 48(S1): 99-107.

92. Kapuscinski, A. (2005). Current scientific understanding of the environmental biosafety of transgenic fish and shellfish. *Scientific and Technical Review* 24(1): 309-322.
93. Khaw, H.L., Ponzoni, R.W., Yee, H.Y., bin Aziz, M.A., Bijma, P. (2016). Genetic and non-genetic indirect effects for harvest weight in the GIFT strain of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Aquaculture*, 450: 154-161.
94. Kinoshita, M., Yamauchi, M., Sasanuma, M., Ishikawa, Y., Osada, T., Inoue, K., Wakamatsu, Y., Ozato, K. (2003). A transgene and its expression profile are stably transmitted to offspring in transgenic medaka generated by the particle gun method. *Zoological Science*, 20: 869-875.
95. Kistner, A., Gossen, M., Zimmermann, F., Jerecic, J., Ullmer, C., Lubbert, H., Bujard, H. (1996). Doxycyclinemediated quantitative and tissue-specific control of gene expression in transgenic mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 93:10933- 10938.
96. Kramer, M. G., Redenbaugh, K. (1994). Commercialization of a tomato with an antisense polygalacturonase gene: The FLAVR SAVR™ tomato story. *Euphytica*, 79(3): 293-297.
97. Krasnov, A., Pitkänen, T.I., Reinisalo, M., Mölsä, H. (1999). Expression of human glucose transporter type 1 and rat hexokinase type II complementary DNAs in rainbow trout embryos: Effects on glucose metabolism. *Marine Biotechnology*, 1(1): 25-32.
98. Krasnov, A., Pitkänen, T.I., Reinisalo, M., Mölsä, H. (1999). Transfer and expression of glucose transporter and hexokinase genes in salmonid fish. *Aquaculture*, 173(1): 319-332.
99. Kusik, B.W., Carvan, M.J., Udvardia, A.J. (2008). Detection of mercury in aquatic environments using EPRE reporter zebrafish. *Marine biotechnology*, 10(6): 750-757.
100. Legler, J., Broekhof, J.L., Brouwer, A., Lanser, P.H., Murk, A.J., van der Saag, P.T., van der Burg, B. (2000). A novel in vivo bioassay for (xeno-) estrogens using transgenic zebrafish. *Environmental Science & Technology*, 34(20): 4439-4444.
101. Liu, Z.J., Zhu, Z.Y., Roberg, K., Faras, A., Guise, K., Kapuscinski, A.R., Hackett, P.B. (1990). Isolation and characterization of beta-actin gene of carp (*Cyprinus carpio*). *DNA Sequence*, 1(2):125-36.
102. Lynch, M., Walsh, B. (1998). *Genetics and analysis of quantitative traits*. Sunderland, MA: Sinauer, V1, 874p.
103. Maclean, N., Talwar, S. (1984). Injection of cloned genes into rainbow trout eggs. *Journal of Embryology and Experimental Morphology*. 82:187.

104. Maclean, N., Penman, D., and Talwar, S. (1987a) .Introduction of novel genes into fish. *Biotechnology* 5:257-261.
105. Maclean, N., Penman, D. (1990). The application of gene manipulation to aquaculture. *Aquaculture*, 85 (1-4), 1-20.
106. Maclean, N. (1998). Regulation and exploitation of transgenes in fish. *Reviews in Mutation Research*, 399(2): 255-266.
107. Maclean, N., Laight, R. (2000). Transgenic fish: an evaluation of benefits and risks. *Fish and Fisheries*, 1: 146-172.
108. Martínez, R., Estrada, M.P., Berlanga, J., Guillén, I., Hernández, O., Cabrera, E., Pimentel, R., Morales, R., Herrera, F., Morales, A., Piña, J.C., Abad, Z., Sánchez, V., Melamed, P., Lleonart, R., De la Fuente, J. (1996). Growth enhancement in transgenic tilapia by ectopic expression of tilapia growth hormone. *Molecular Marine Biology and Biotechnology*, 5: 62-70.
109. Martínez, R., Arenal, A., Estrada, M.P., Herrera, F., Huerta, V., Vázquez, J., Sánchez, T., De la Fuente, J. (1999). Mendelian transmission, transgene dosage and growth phenotype in transgenic hybrid tilapia (*Oreochromis hornorum*). *Aquaculture*, 174: 271-283.
110. Mason, A.J., Hayflick, J.S., Zoeller, R.T., Young, W.S., Phillips, H.S., Nikolics, K., Seeburg, P.H. (1986). A deletion truncating the gonadotropin-releasing hormone gene is responsible for hypogonadism in the hpg mouse. *Science*, 234(4782): 1366-1371.
111. Mattingly, C.J., McLachlan, J.A., Toscano, W.A. (2001). Green fluorescent protein (GFP) as a marker of aryl hydrocarbon receptor (AhR) function in developing zebrafish (*Danio rerio*). *Environmental health perspectives*, 109(8): 845.
112. McKenzie, D.J., Martinez, R., Morales, A., Acosta, J., Morales, R., Taylor, E.W., Estrada, M.P. (2003). Effects of growth hormone transgenesis on metabolic rate, exercise performance and hypoxia tolerance in tilapia hybrids. *Journal of Fish Biology*, 63(2): 398-409.
113. Menchaca, A. (2013). Comunicación personal, disponible en: <http://infocampo.com.ar/nota/campo/43575/uruguay-crearon-ovejas-verde-fluorescente>. Fecha de consulta: 10/3/2016.
114. Menchaca, A., Anegón, I., Whitelaw, C. B. A., Baldassarre, H., Crispo, M. (2016). New insights and current tools for genetically engineered (GE) sheep and goats. *Theriogenology*, 86(1): 160-169.
115. Mendoza, R. (2015). Peces transgénicos. Disponible en: http://www.conacyt.gob.mx/cibiogem/images/cibiogem/Herramientas-ensenanza-investigacion/Seminarios/Docs/Mendoza_PECES-GM.pdf. Fecha de consulta: 17/3/2016

- 116.Morris, E.J. (2011). Open field release of a self-limiting transgenic *Aedes aegypti* mosquito strain to combat dengue- a structured risk-benefit analysis. *Asia-Pacific Journal of Molecular Biology and Biotechnology*, 19(3): 107-110.
- 117.Muir, W.M., Howard, R.D. (1999). Possible ecological risks of transgenic organism release when transgenes affect mating success: Sexual selection and the Trojan gene hypothesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 96: 13853-13856.
- 118.Muir, W.M., Howard, R.D. (2001). Fitness components and ecological risk of transgenic release; a model using Japanese medaka (*Oryzias latipes*). *The American Naturalist*, 158:1-16.
- 119.Muir, W.M., Howard, R.D. (2002). Methods to assess ecological risks of transgenic fish releases. En: Letourneau, D.K., Burrows, B.E., *Genetically engineered organisms: Assessing environmental and human health effects*, London, CRC Press, p: 356-379.
- 120.Muir, W.M. (2004). The threats and benefits of GM fish. *EMBO reports*, 5(7): 654-659.
- 121.Naylor, R.L., Goldberg, R.J., Primavera, J.H., Kautsky, N., Beveridge, M.C.M., Clay, J., Folke, C., Lubchenco, J., Mooney, H., Troell, M., 2000. Effect of aquaculture on world fish supplies. *Nature*, 405: 1017-1024.
- 122.Ng, H.B.G., Lam, S.H., Sukardi, H., Gong, Z. (2011). Potential applications of transgenic fish to environmental monitoring and toxicology. En Fletcher, G.L., Rise, M.L., *Aquaculture Biotechnology*, 390: 267-280.
- 123.Nguyen, N.H., Ponzoni, R.W. (2008). Transgenics fish: risk and benefit. *Global Acuaculture Advocate*, Sep-Oct, p: 100-102.
- 124.Palmiter, R.D. , Brinster, R.L. , Hammer, R.E. , Trumbauer, M.E. , Rosenfeld, M.G. , Birnberg, N.C. , Evans, R.M. (1982). Dramatic growth of mice that develop from eggs microinjected with metallothionein-growth hormone fusion genes. *Nature*, 300(5893): 611-615.
- 125.Pan, X., Zhan, H., Gong, Z. (2008). Ornamental expression of red fluorescent protein in transgenic founders of white skirt tetra (*Gymnocorymbus ternetzi*). *Marine Biotechnology*, 10(5): 497-501.
- 126.Peces ornamentales, empresa taiwanesa Taikong. Disponible en: www.azoo.com.tw. Fecha de consulta: 8/9/2015
- 127.Peces ornamentales, empresa GloFish. Disponible en: <https://www.glofish.com>. Fecha de consulta: 8/9/2015.
- 128.Pérez, J.E., Nirchito, M. (1993). Agricultura, Acuicultura e Ingeniería genética. 5(1):14-19. Disponible en: <http://www.ojs.udo.edu.ve/index.php/saber/article/view/1416>.

Fecha de consulta: 17/10/2015.

129. Phelps, C.J., Koike, C., Vaught, T.D., Boone, J., Wells, K.D., Chen, S.H., Jobst, P.M. (2003). Production of α 1, 3-galactosyltransferase-deficient pigs. *Science*, 299(5605): 411-414.
130. Pohajdak, B., Mansour, M., Hrytsenko, O., Conlon, J.M., Dymond, L.C., Wright, J.R. (2004). Production of transgenic tilapia with Brockmann bodies secreting [desThrB30] human insulin. *Transgenic Research*, 13(4): 313-323.
131. Ponzoni, R. W., Nguyen, N. H., & Khaw, H. L., Lind, C. E., (2012). Selective breeding in fish and conservation of genetic resources for aquaculture. *Reproduction in Domestic Animals*, 47(s4): 255-263.
132. Powers, D. A. (1989). Fish as model systems. *Science*, 246(4928): 352-358.
133. Powers, D.A., Hereford, L., Cole, T., Chen, T.T., Lin, C.M., Kight, K., Creech, K., Dunham, I. (1992). Electroporation: a method for transferring genes into the gametes of zebrafish (*Brachydanio rerio*), channel catfish (*Ictalurus punctatus*) and common carp (*Cyprinus carpio*). *Molecular Marine Biology and Biotechnology*, 1:301-6.
134. Protocolo de Cartagena Sobre Seguridad de la Biotecnología, Montréal, (2000). Anexo III Evaluación del riesgo. Términos utilizados, Artículo 3. Disponible en: <https://www.cbd.int/>. Fecha de consulta: 18/3/2016
135. Rahman, M.A., Ronyai, A., Engidaw, B.Z., Jauncey, K., Hwang, G.L., Smith, A., Maclean, N. (2001). Growth and nutritional trials on transgenic Nile tilapia containing an exogenous fish growth hormone gene. *Journal of Fish Biology*, 59(1): 62-78.
136. Sander, J.D., Joung, J.K. (2014). CRISPR-Cas systems for editing, regulating and targeting genomes. *Nature Biotechnology*, 32(4): 347-355.
137. Sarmasik, A., Warr, G., Chen, T.T. (2002). Production of transgenic medaka with increased resistance to bacterial pathogens. *Marine Biotechnology*, 4: 310-322.
138. Schnieke, A.E., Kind, A.J., Ritchie, W.A., Mycock, K., Scott, A.R., Ritchie, M., Campbell, K.H. (1997). Human factor IX transgenic sheep produced by transfer of nuclei from transfected fetal fibroblasts. *Science*, 278(5346): 2130-2133.
139. Shears, M.A., Fletcher, G.L., Hew, C.L., Gauthier, S., Davies, P.L. (1991). Transfer, expression, and stable inheritance of antifreeze protein genes in Atlantic salmon (*Salmo salar*). *Molecular Marine Biology Biotechnology*, (1): 58-63.
140. Shentu, H., Wen, H.J., Her, G.M., Huang, C.J., Wu, J.L., Hwang, S.P.L. (2003). Proximal upstream region of zebrafish bone morphogenetic protein 4

- promoters directs heart expression of green fluorescent protein. *Journal of Genetics and Development*. 37(3):103-112.
141. Sherry, T.W., Holmes, R.T. (1996). Winter habitat quality, population limitation, and conservation of Neotropical-Nearctic migrant birds. *Ecology*, 77(1): 36-48.
142. Sin, F. (1997). Transgenic fish. *Reviews in Fish Biology and Fisheries*. 7: 417-441.
143. Stuart, G.W., McMurray, J.V., Westerfield, M. (1988). Replication, interation and steable germline transmission of foreign secuences injected into early zebrafish embryos. *Develop*, 103: 403-402.
144. Stuart, G.W., Vielkind, J.R, McMurray, J.V., Westerfield, M. (1990). Stable lines of transgenic zebrafish exhibit reproducible patterns of transgene expression. *Develop*, 109: 577-584.
145. Sundström, L.F., Löhmus, M., Johnsson, J.I., Devlin, R.H. (2004). Growth hormone transgenic salmon pay for growth potential with increased predation mortality. *Proceedings of the Royal Society of London B: Biological Sciences*, 271(Suppl 5): S350-S352.
146. Takagi, S., Sasado, T., Tamiya, G., Ozato, K., Wakamatsu, Y., Takeshita, A., Kimura, M. (1994). An efficient expression vector for transgenic medaka construction. *Molecular Marine Biology Biotechnology*, 3(4):192-199.
147. Thermes, V., Grabher, C., Ristoratore, F., Bourrat, F., Choulika, A., Wittbrodt, J., Joly, J.S. (2002). «I-SceI meganuclease mediates highly efficient transgenesis in fish». *Mechanisms of Development*, 118 (1-2): 91-98.
148. Thodesen, J., Gjerde, B., Grisdale-Helland, B., Storebakken, T. (2001). Genetic variation in feed intake, growth and feed utilization in Atlantic salmon (*Salmo salar*). *Aquaculture*, 194(3): 273-281.
149. Tiedje, J.M., Colwell, R.K., Grossman, Y.L., Hodson, R.E., Lenski, R.E., Mack, R.N., Regal, P.J. (1989). The planned introduction of genetically engineered organisms: ecological considerations and recommendations. *Ecology*, 70(2): 298-315.
150. Uzbekova, S., Chyb, J., Ferriere, F., Bailhache, T., Prunet, P., Alestrom, P., Breton, B. (2000). Transgenic rainbow trout expressed sGnRH-antisense RNA under the control of sGnRH promoter of Atlantic salmon. *Journal of Molecular Endocrinology*, 25(3): 337-350.
151. Varela, J. C. (2015). Implicaciones de la reciente autorización de comercialización para el consumo humano del salmón modificado genéticamente. *IUS ET SCIENTIA*, 1(1): 93-109.
152. Wachinger, M., Kleinschmidt, A., Winder, D., von Pechmann, N., Ludvigsen, A., Neumann, M., Brack-Werner, R. (1998). Antimicrobial peptides melittin

- and cecropin inhibit replication of human immunodeficiency virus 1 by suppressing viral gene expression. *Journal of General Virology*, 79(4): 731-740.
153. Wan, H., He, J., Ju, B., Yan, T., Lam, T.J., Gong, Z. (2002). Generation of two-color transgenic zebrafish using the green and red fluorescent protein reporter genes gfp and rfp. *Marine Biotechnology*, 4(2): 146-154.
154. Wang, R., Zhang, P., Gong, Z., Hew, C.L. (1995). Expression of the antifreeze protein gene in transgenic goldfish (*Carassius auratus*) and its implication in cold adaptation. *Molecular Marine Biology Biotechnology*, 4: 20-26.
155. Wang, Y., Hu, W., Wu, G., Sun, Y., Chen, S., Zhang, F., Zhang, X. (2001). Genetic analysis of “all-fish” growth hormone gene transferred carp (*Cyprinus carpio* L.) and its F1 generation. *Chinese Science Bulletin*, 46(14): a1-a4.
156. Whitelaw, B. (2014). Abstracts from the UC Davis Transgenic Animal Research Conference IX. *Transgenic Research*, 23(1): 187.
157. Wilmut, I., Archibald, A.L., McClenaghan, M., Simons, J.P., Whitelaw, C.B., Clark, A.J. (1991). Production of pharmaceutical proteins in milk. *Experientia* 47(9):905-12.
158. Winn, R.N. (2001). U.S. Patent No. 6,307,121. Washington, DC: U.S. Patent and Trademark Office.
159. Wilson, G. G., Wang, H., Heiter, D. F., Lunnen, K. D. (2012). Las enzimas de restricción en Microbiología, Biotecnología y Bioquímica. *Encuentro*, 93: 19-48.
160. Wright, J.R., Pohajdak, B. (2001). Cell therapy for diabetes using piscine islet tissue. *Cell Transplantation*, 10(2): 125-143.
161. Wu, G., Sun, Y., Zhu, Z. (2003). Growth hormone gene transfer in common carp. *Aquatic Living Resources*, 16(05): 416-420.
162. Wu, S.M., Hwang, P.P., Hew, C.L., Wu, J.L. (1998). Effect antifreeze protein on cold tolerance in juvenile tilapia (*Oreochromis mossambicus*) and milkfish (*Chanos chanos*). *Zoological Studies*, 37: 39-44.
163. Yang, D.S., Hon, W.C., Bubanko, S., Xue, Y., Seetharaman, J., Hew, C.L., Sicheri, F. (1998). Identification of the ice-binding surface on a type III antifreeze protein with a “flatness function” algorithm. *Biophysical Journal*, 74(5): 2142-2151.
164. Yang, Y., Wang, L., Bell, P., McMenemy, D., He, Z., White, J., Batshaw, M. L. (2016). A dual AAV system enables the Cas9-mediated correction of a metabolic liver disease in newborn mice. *Nature Biotechnology*, 34: 334–338.

165. Yazawa, R., Hirono, I., Aoki, T. (2006). Transgenic zebrafish expressing chicken lysozyme show resistance against bacterial diseases. *Transgenic Research*, 15(3): 385-391.
166. Yin, H., Xue, W., Chen, S., Bogorad, R.L., Benedetti, E., Grompe, M., Anderson, D.G. (2014). Genome editing with Cas9 in adult mice corrects a disease mutation and phenotype. *Nature Biotechnology*, 32(6): 551.
167. Zelenin, A.V., Alimov, A.A., Barmintzev, A.O., Beniumov, I.A., Zelenina et al., (1991). The Delivery of Foreign Genes into Fertilized Fish Eggs Using High-Velocity Microprojectiles. *FEBS Lett.* 287: 118-120.
168. Zeng, Z., Shan, T., Tong, Y., Lam, S.H., Gong, Z. (2005). Development of estrogen-responsive transgenic medaka for environmental monitoring of endocrine disrupters. *Environmental Science & Technology*, 39(22): 9001-9008.
169. Zhang, P., Hayat, M., Joyce, C., Gonzales-Villaseñor, L.I., Lin, C.M., Dunham, R.A., Chen, T.T., Power, D.A. (1988). Gene transfer, expression and inheritance of pRSV-rainbow trout GH cDNA in the common carp, *Cyprinus carpio*. *Molecular Reproduction and Development*, 25:3-13.
170. Zhang, X., Gong, Z. (2013). Fluorescent transgenic zebrafish Tg (nkx2. 2a: mEGFP) provides a highly sensitive monitoring tool for neurotoxins. *PloS one*, 8(2), e55474.
171. Zhong, Q.W., Fan, T.J. (2002). [Advances in fish antifreeze protein research]. *Sheng wu hua xue yu sheng wu wu li xue bao Acta biochimica et Biophysica Sinica*, 34(2): 124-130.
172. Zhu, Z., Li, G., He, L., Chen, S. (1985). Novel gene transfer into the fertilized eggs of gold fish (*Carassius auratus* L. 1758). *Journal of Applied Ichthyology* 1(1): 31-34.
173. Zhu, Z., Xu, K., Li, G., Xie, Y., He, L. (1986). Biological effects of human growth hormone gene microinjected into the fertilized eggs of loach *Misgurnus anguillicaudatus* (Cantor). *Kesine Tongbao*, 31(14): 988-990.
174. Zou, Q., Wang, X., Liu, Y., Ouyang, Z., Long, H., Wei, S., Ni, Q. (2015). Generation of gene-target dogs using CRISPR/Cas9 system. *Journal of Molecular Cell Biology*, 7(6): 580-583.
175. Zuelke, K.A. (1998). Transgenic modification of cow's milk for value-added processing. *Reproduction, Fertility and Development*, 10(8): 671-676.

