

# La glándula mamaria: biofábrica para la producción de proteínas recombinantes

Raquel Montesino<sup>1</sup>, ✉ Jorge R Toledo<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Departamento de Química de los Carbohidratos

<sup>2</sup> Departamento de Biotecnología Animal. Centro de Ingeniería Genética y Biotecnología Ave. 31, e/ 158 y 190, CP 10 600, Apartado Postal 6162, Playa, Ciudad de La Habana, Cuba  
E-mail: jorge.toledo@cigb.edu.cu

## RESUMEN

Los sistemas de expresión de proteínas recombinantes han evolucionado desde microorganismos como bacterias y levaduras hasta células de plantas y animales. Esto se debe a la necesidad de contar con hospederos que permitan la expresión de biofármacos proteicos con procesamientos postraduccionales específicos, que garanticen una actividad biológica similar a la de la proteína nativa. En esta revisión se presentan las principales ventajas y desventajas de los sistemas de expresión más utilizados en la actualidad, con especial énfasis en las capacidades de la glándula mamaria como biofábrica. Se han desarrollado varios métodos de modificación genética de este órgano; la utilización de uno u otro está condicionada fundamentalmente por las características específicas de la proteína de interés y la inmediatez en la obtención del producto final. Sin embargo, la glándula mamaria posee una "maquinaria" de glicosilación limitada, donde se sintetizan, sobre todo, estructuras oligosacarídicas de tipo complejo, biantenarico y monosialilado.

**Palabras claves:** glándula mamaria, proteínas recombinantes, glicosilación

*Biotecnología Aplicada 2006;23:271-278*

REVISIÓN

## ABSTRACT

**The mammary gland: bioreactor for the production of recombinant proteins.** Biological systems for the expression of recombinant proteins have evolved from microorganisms, such as bacteria and yeast, to animal and plant cells. This evolution has been driven mainly by the specific posttranslational modifications required for many recombinant proteins to display full biological activity. In this review we discuss the main advantages and drawbacks of the currently available expression systems, stressing the potentialities of the mammary gland as a biofactory. Several methods for the genetic modification of this organ have been developed; the choice of the method depending upon the specific characteristics of the molecule to be expressed, and the urgency for the final product. However, the mammary gland glycosylation machinery is limited to the synthesis of biantennary monosialylated complex oligosaccharides.

**Keywords:** mammary gland, recombinant proteins, glycosylation

## Introducción

La producción de proteínas recombinantes de interés biofarmacéutico a partir de microorganismos genéticamente transformados, como bacterias y levaduras, se ha establecido como un proceso relativamente barato y seguro [1]. Sin embargo, la actividad biológica de varias proteínas se afecta debido al inadecuado procesamiento postraduccionales en estos sistemas de expresión [2]. Por esta causa, la producción de muchos biofármacos proteicos en su forma activa requiere de la "maquinaria" biosintética de células eucarióticas superiores [3]. Los sistemas basados en el cultivo de células de mamíferos se han convertido en estrategias viables para la producción de proteínas biológicamente activas [4], aunque el cultivo de células superiores y la transformación genética estable de estas líneas celulares, son procesos costosos y exigentes desde el punto de vista técnico [5].

Se han obtenido animales genéticamente modificados que expresan proteínas recombinantes en sus tejidos y las secretan en los fluidos corporales [6]. La glándula mamaria se identifica como una alternativa apropiada para la producción de proteínas recombinantes con modificaciones postraduccionales propias de eucariotes superiores [7]. Las proteínas se sintetizan en las células que componen el epitelio mamario y de

inmediato se secretan en la leche, a partir de la cual estas se pueden purificar mediante procesos relativamente sencillos [8].

El empleo de mamíferos como biofábricas implica la creación de construcciones genéticas, en las que el gen que codifica para la proteína de interés está unido a secuencias reguladoras que permiten su expresión, específicamente en las células del epitelio glandular mamario, durante la lactancia [9]. La transgénesis mediante microinyección de ADN a embriones unicelulares es la técnica más empleada para la generación de animales cuyas glándulas mamarias secretan proteínas recombinantes en la leche [10, 11]. No obstante, esta tecnología presenta limitaciones que atentan contra su empleo, pues el proceso es técnicamente exigente y muy caro, e ineficiente cuando se trata de animales de interés productivo. Se estima que la generación de un rumiante transgénico demanda entre 200 000 y 500 000 dólares [12, 13]. Además, se requiere un largo periodo entre la incorporación del ADN al genoma del embrión y la colecta de la proteína recombinante en las líneas transformadas [14]. La expresión ectópica de los transgenes es otra limitación que posee el sistema, que pudiera afectar drásticamente la viabilidad del animal transformado [15].

1. Palomares LA, Estrada-Mondaca S, Ramirez OT. Production of recombinant proteins: challenges and solutions. *Methods Mol Biol* 2004;267:15-52.

2. Simmons LC, Yansura DG. Translational level is a critical factor for the secretion of heterologous proteins in *Escherichia coli*. *Nat Biotechnol* 1996;14:629-34.

3. Werner RG, Noe W, Kopp K, Schluter M. Appropriate mammalian expression systems for biopharmaceuticals. *Arzneimittelforschung* 1998;48:870-80.

4. Andersen DC, Krummen L. Recombinant protein expression for therapeutic applications. *Curr Opin Biotechnol* 2002;13:117-23.

5. Molowa DT, Mazanet R. The state of biopharmaceutical manufacturing. *Biotechnol Annu Rev* 2003;9:285-302.

6. Wall RJ. Transgenic livestock: progress and prospects for the future. *Theriogenology* 1996;45:57-68.

7. Clark AJ. Gene expression in the mammary glands of transgenic animals. *Biochem Soc Symp* 1998;63:133-40.

8. Pollock DP, Kutzko JP, Birck-Wilson E, Williams JL, Echelard Y, Meade HM. Transgenic milk as a method for the production of recombinant antibodies. *J Immunol Methods* 1999;231:147-57.

Para la generación de animales de granja transgénicos es necesario disponer de muchas hembras, donantes y receptoras. Estas son indispensables para tener éxito en la transformación genética e implantación de los embriones que darán lugar a las crías transgénicas. Asociados a estos gastos, se suman los costos elevados de los insumos y equipamientos que se requieren para desarrollar las técnicas de transferencia de ADN recombinante a embriones de mamíferos y el posterior cultivo *in vitro* [16].

La transferencia directa de material genético exógeno a las células del epitelio glandular mamario en mamíferos adultos, es una estrategia acertada para evadir los problemas actuales de la transgénesis. Esta alternativa podría disminuir el costo de la producción de biofármacos y reducir el tiempo necesario para su obtención [17]. El éxito del ensayo consiste en encontrar el vector o vehículo adecuado para transferir los genes de interés a las células epiteliales mamarias y que la transducción ocurra de forma masiva y eficiente.

Varios grupos de investigación han intentado desarrollar sistemas de expresión en la glándula mamaria, basados en la transferencia *in situ* de genes al epitelio secretor. Para ello se ha probado una variedad de vectores, como los basados en complejos de poliones [18], los métodos de transferencia génica por endocitosis mediada por receptor [19], el uso de "pistolas de genes" [20] y los vectores virales [21, 22]. Aunque se ha logrado la expresión de los transgenes en la leche, los bajos niveles de expresión y el corto tiempo que esta dura hacen que los procedimientos de transformación sean inviables en el contexto de un sistema productivo.

Particularmente los vectores adenovirales poseen ventajas que podrían facilitar la transferencia directa de material genético a las células diana, en el epitelio mamario. Estos se utilizan de forma exitosa en numerosos ensayos de terapia génica, debido a su elevada capacidad de transducir células quiescentes y en división [23]. Los sistemas de multiplicación para obtener títulos elevados se han optimizado; de esta forma se facilita su manipulación [24]. Además, no se integran al genoma de la célula hospedera, lo que permite que la expresión de los genes de interés no se vea afectada por eventos de baja expresión dependientes del sitio de integración [12]. Con el desarrollo de nuevos métodos de transformación adenoviral en la glándula mamaria, se han obtenido niveles de expresión de miligramos por mililitros en la leche de ratones y cabras. Estos resultados podrían ser un punto de partida para el desarrollo de sistemas de producción de proteínas recombinantes en la leche de mamíferos genéticamente modificados, mediante la transducción transiente de la glándula mamaria con vectores adenovirales. Sin embargo, el tiempo limitado en la expresión de los transgenes persiste aún como una desventaja considerable de este método.

### Expresión de proteínas recombinantes

El desarrollo en la tecnología del ADN recombinante, a mediados de la década de los 70 del pasado siglo, marcó el comienzo de la era moderna en la biotecnología. La industria biofarmacéutica con la generación de proteínas con fines terapéuticos, representa la mayor aplicación industrial de esta tecnología [25]. En este sentido, la

producción de proteínas recombinantes y el desarrollo de modelos animales forman parte de los objetivos fundamentales de varios grupos de investigación.

Muchos organismos se utilizan como biorreactores para la producción de proteínas heterólogas. Entre ellos se destacan las bacterias y las levaduras como los más simples y baratos, mientras los cultivos artificiales de tejidos y los organismos genéticamente modificados se consideran los más complejos y costosos [5]. La selección de un organismo u otro para la expresión de proteínas de interés biofarmacéutico está relacionada con los eventos postraduccionales específicos, necesarios para que ocurran los plegamientos correctos que garanticen la actividad biológica de la molécula. Este es un elemento que define los posibles hospederos que se deben escoger.

### Expresión de proteínas recombinantes en microorganismos procariontes

Para la producción de proteínas recombinantes en microorganismos procariontes, la especie más empleada y estudiada genética y fisiológicamente es *Escherichia coli* [26, 27]. Entre las ventajas que brinda este microorganismo como biorreactor están: 1) la rápida generación de biomasa, dada su elevada velocidad de crecimiento, 2) la fácil manipulación genética, 3) que no requiere de medios de cultivo ni equipamientos costosos y 4) la alta eficiencia en la incorporación del material genético foráneo [28].

Sin embargo, la expresión de proteínas en microorganismos procariontes tiene la desventaja de que estos no expresan muchas de las modificaciones postraduccionales necesarias para obtener proteínas recombinantes biológicamente activas. En estos hospederos no se forman puentes disulfuro entre las cisteínas durante la expresión intracelular, debido a que el ambiente intracelular es muy reductor. Además, durante su síntesis no enlazan oligosacáridos a las proteínas, ni modifican las tirosinas mediante sulfatación [1].

En las bacterias es poco probable la secreción de proteínas recombinantes al medio extracelular, y frecuentemente, cuando se expresan, estas proteínas se acumulan como agregados insolubles en el citoplasma, los cuales se denominan cuerpos de inclusión. Para la purificación a partir de estos cuerpos de inclusión, es necesario el uso de agentes caotrópicos que tienden a desnaturalizar la proteína recombinante. Estas sustancias alteran la estructura terciaria de las proteínas, lo que conduce a la disminución o eliminación de la actividad biológica inherente a estas moléculas [29].

### Expresión de proteínas recombinantes en microorganismos eucariontes inferiores

Las levaduras muestran importantes ventajas sobre las bacterias como hospederos para la producción de proteínas heterólogas de origen eucariótico [30]. Estas combinan la simplicidad de los sistemas de expresión bacterianos con los bajos costos de los medios de cultivo y, además, poseen un medio intracelular más apropiado para el procesamiento postraduccionales y la secreción [31].

Adicionalmente, las levaduras glicosilan las proteínas, lo que influye de manera positiva en la

9. Krnacik MJ, Li S, Liao J, Rosen JM. Position-independent expression of whey acidic protein transgenes. *J Biol Chem* 1995;270:11119-29.

10. Hammer RE, Pursell VG, Rexroad CE Jr, Wall RJ, Bolt DJ, Ebert KM, Palmiter RD, Brinster RL. Production of transgenic rabbits, sheep and pigs by microinjection. *Nature* 1985;315:680-3.

11. Baldassarre H, Wang B, Kafidi N, Gauthier M, Neveu N, Lapointe J, Sneek L, Leduc M, Duguay F, Zhou JF, Lazaris A, Karatzas CN. Production of transgenic goats by pronuclear microinjection of *in vitro* produced zygotes derived from oocytes recovered by laparoscopy. *Theriogenology* 2003;59:831-9.

12. Houdebine LM. Transgenic animal biorreactors. *Transgenic Res* 2000;9:305-20.

13. Wheeler MB. Production of transgenic livestock: promise fulfilled. *J Anim Sci* 2003;81:32-7.

14. Rudolph NS. Biopharmaceutical production in transgenic livestock. *Trends Biotechnol* 1999;17:367-74.

15. Massoud M, Attal J, Thepot D, Pointu H, Stinnakre MG, Theron MC, Houdebine LM. The deleterious effects of human erythropoietin gene driven by the rabbit whey acidic protein gene promoter in transgenic rabbits. *Reprod Nutr Dev* 1996;36:555-63.

16. Niemann H, Kues WA. Application of transgenesis in livestock for agriculture and biomedicine. *Anim Reprod Sci* 2003;79:291-317.

17. Schanbacher FL, Amstutz MD. Direct transfection of mammary gland: Opportunities for modification of mammary function and the production, composition and qualities of milk. In: Welch RAS, Burns DJW, Davis SR, Popay AI, Prosser CG (Eds.). *Biotechnology in Agriculture Series*, No. 18. Milk Composition, Production, and Biotechnology. CAB International, New York, NY; 1997:243-64.

18. Hens JR, Amstutz MD, Schanbacher FL, Mather IH. Introduction of the human growth hormone gene into the guinea pig mammary gland by *in vivo* transfection promotes sustained expression of human growth hormone in the milk throughout lactation. *Biochim Biophys Acta* 2000;1523:161-71.

19. Sobolev AS, Rosenkranz AA, Smirnova OA, Nikitin VA, Neugodova GL, Naroditsky BS, Shilov IN, Shatski IN, Ernst LK. Receptor-mediated transfection of murine and ovine mammary glands *in vivo*. *J Biol Chem* 1998;273:7928-33.

20. Kerr DE, Furth PA, Powell AM, Wall RJ. Expression of gene-gun injected plasmid DNA in the ovine mammary gland and in lymph nodes draining the injected site. *Animal Biotechnology* 1996;7:33-45.

21. Archer JS, Kennan WS, Gould MN, Bremel RD. Human growth hormone (hGH) secretion in milk of goats after direct transfer of the hGH gene into the mammary gland by using replication-defective retrovirus vectors. *Proc Natl Acad Sci* 1994;91:6840-4.

22. Yang J, Tsukamoto T, Popnikolov N, Guzman RC, Chen X, Yang JH, Nandi S. Adenoviral-mediated gene transfer into primary human and mouse mammary epithelial cells *in vitro* and *in vivo*. *Cancer Lett* 1995;98:9-17.

integridad estructural, solubilidad y actividad biológica de las cadenas polipeptídicas sintetizadas [32, 33]. Sin embargo, los sistemas de expresión basados en la levadura *Saccharomyces cerevisiae* han presentado problemas al tratar de llevar los procesos establecidos en el laboratorio a la escala industrial, en su mayoría relacionados con la inestabilidad de las multicopias de los plasmidios transformantes en un ambiente de elevada densidad celular [34].

La incorporación de cadenas de oligosacáridos que contienen más de 50 residuos de manosa, (Man) genera un perfil diferente al de la proteína nativa. Además, las manosas terminales, unidas al resto de la cadena mediante un enlace del tipo  $\alpha$ 1,3, confieren a la proteína una elevada inmunogenicidad en los mamíferos. La hipermanosilación también puede modificar la farmacocinética de las glicoproteínas, lo que limita la utilización de la molécula con fines terapéuticos [31].

Otro hospedero muy utilizado en la actualidad como sistema de expresión es la levadura metilotrófica *Pichia pastoris*. Esta se caracteriza por una eficiente utilización del metanol como fuente de carbono y energía, aunque igualmente puede crecer en una gran variedad de sustratos [35]. Desde el punto de vista de la glicosilación, y a diferencia de *S. cerevisiae*, en la levadura *P. pastoris* se sintetizan cadenas de oligosacáridos de menor grado de polimerización, que carecen de cadenas de manosas terminales, unidas por enlaces  $\alpha$ 1,3. Sin embargo, como solo se enlazan oligosacáridos de tipo oligomanosídico, se reduce la capacidad de este hospedero para la expresión de proteínas cuya actividad biológica esté directamente ligada a un patrón de glicosilación específico [36].

Recientemente se logró modificar genéticamente la ruta enzimática de glicosilación de la *P. pastoris*, y se obtuvieron cepas que generaron patrones de glicosilación de tipo complejo. Esta es una alternativa novedosa para la producción de proteínas recombinantes en microorganismos eucariontes inferiores, la cual permite la obtención de la proteína de interés con un patrón de glicosilación específico y con una elevada homogeneidad [37].

### Plantas como biorreactores para la expresión de proteínas recombinantes

Las plantas genéticamente transformadas representan una opción muy económica para los actuales sistemas de producción de biofármacos, debido a su bajo costo y capacidad de producción a gran escala, así como a la simplicidad de la cosecha y el almacenaje. La expresión de vacunas y anticuerpos en plantas despierta un interés especial en la actualidad, como sistema de producción de proteínas farmacéuticas [38, 39]. Las plantas se consideran unos de los sistemas de producción más seguros, ya que carecen de secuencias de ADN oncogénicas [40].

Elas poseen ventajas sobre otros sistemas de producción, particularmente debido a que son económicas y seguras, pero al igual que las levaduras, tienen la limitación de no generar perfiles de oligosacáridos de tipo complejo. En las plantas no existe el precursor de ácido siálico como las enzimas encargadas de la elongación de las cadenas oligosacáridicas: la  $\beta$ 1,4-

galactosiltransferasa y la sialiltransferasa [41]. Además, la adición de xilosa  $\beta$ 1,2 y fucosa  $\alpha$ 1,3 genera biomoléculas que resultan inmunogénicas en roedores y que podrían limitar su utilización como agentes terapéuticos en los seres humanos [42].

### Expresión de proteínas en cultivos celulares de mamíferos

La mayoría de las proteínas utilizadas con fines terapéuticos en los seres humanos, incluyendo las proteínas de la sangre como citoquinas e inmunoglobulinas, proteínas estructurales, hormonas y proteínas lisosomales, se dirigen hacia el lumen del retículo endoplasmático durante la traducción y, posteriormente, se transportan a través del aparato de Golgi a los compartimentos lisosomales, la matriz extracelular o al torrente sanguíneo [3]. La mayor parte de las modificaciones de las proteínas durante su síntesis ocurren en estos compartimientos y comprenden los procesos de corte del péptido señal, la formación de puentes disulfuro entre cisteínas, la sulfatación de tirosinas, la carboxilación, la metilación, la hidroxilación, la fosforilación, la N-glicosilación y la O-glicosilación [43].

Existen varias proteínas humanas de gran interés farmacéutico, como la eritropoyetina (EPOh), la  $\alpha$ 1-antitripsina, el activador hístico del plasminógeno (tPA), los factores de la cascada de coagulación VIII y IX, la proteína C y el fibrinógeno, cuya bioactividad, farmacocinética, estabilidad y solubilidad están estrechamente ligadas a numerosos procesos de modificación postraduccional como los mencionados antes. Debido a las características de estos biofármacos, se hace necesaria su expresión en células hospederas, cuya maquinaria metabólica sea similar a la de la célula productora nativa [4].

En la actualidad, más del 60% de las proteínas recombinantes de interés farmacéutico se producen en cultivos celulares [44]. A partir de que se estableció la primera línea celular en la década del 60 del pasado siglo [45], numerosos tipos celulares de diferentes tejidos y variadas especies se cultivan *in vitro*. Sin embargo, solo algunas de estas líneas se han modificado genéticamente como biorreactores, debido a las restricciones de bioseguridad asociadas con la producción de biofármacos [46]. Las células más utilizadas en estos momentos son las del ovario de hámster chino (CHO), las células derivadas del mieloma murino (NSO), las células del riñón del bebé de hámster (BHK), las del riñón de embrión humano (HEK-293) y las células derivadas de la retina humana (PERC6) [47].

Además del adecuado procesamiento postraduccional, la secreción al medio es una de las mayores ventajas de la producción de biofármacos en cultivos celulares. La mayoría de los productos proteicos desarrollados por esta vía, se modifican por ingeniería genética para promover su transporte al medio extracelular. Esto facilita, en gran medida, los procesos de purificación, pues el medio de cultivo es pobre en proteínas contaminantes [48]. El crecimiento acelerado de la industria farmacéutica propicia la generación de métodos cada vez más eficientes y específicos para optimizar la producción a partir de cultivos celulares [49, 50]. Sin embargo, independientemente de los

23. Schagen FH, Ossevoort M, Toes RE, Hoeben RC. Immune responses against adenoviral vectors and their transgene products: a review of strategies for evasion. *Crit Rev Oncol Hematol* 2004;50:51-70.

24. Kamen A, Henry O. Development and optimization of an adenovirus production process. *J Gene Med* 2004;1:184-92.

25. Walsh G. Pharmaceutical biotechnology products approved within the European Union. Review. *Eur J Pharmac and Biopharmac* 2003;55:3-10.

26. Marino MH. Expression systems for heterologous protein production. *Biopharm* 1989;2:18-33.

27. Thomas JG, Ayling A, Baneyx F. Molecular chaperones, folding catalysts, and the recovery of active recombinant proteins from *E. coli*. To fold or to refold. *Appl Biochem Biotechnol* 1997;66:197-238.

28. Georgiou G, Valax P. Expression of correctly folded proteins in *Escherichia coli*. *Curr Opin Biotechnol* 1996;7:190-7.

29. Mayer M, Buchner J. Refolding of inclusion body proteins. *Methods Mol Med* 2004;94:239-54.

30. Romano M. Advances in the use of *Pichia pastoris* for the high-level gene expression. *Curr Opin Biotechnol* 1995;6:527-33.

31. Sudbery PE. The expression of recombinant proteins in yeasts. *Curr Opin Biotechnol* 1996;7:517-24.

32. Kobata A. Structures and functions of the sugar chains of glycoproteins. *Eur J Biochem* 1992;209:483-501.

33. Varki A. Biological role of oligosaccharides: all of the theories are correct. *Glycobiology* 1993;3:97-130.

34. Srien F, Campbell JL, Bailey JE. Analysis of unstable recombinant *Saccharomyces cerevisiae* population growth in selective medium. *Biotechnol Bioeng* 1996;28:996-1006.

35. Wegner GH, Harder W. Methylophilic yeast. The *Pichia* yeast expression system. Ed by Phillips petroleum company, Oklahoma, EE.UU.; 1986:131-8.

36. Trimble RB, Atkinson PH, Tshopp JF, Townsend RR, Maley F. Structure of oligosaccharide on *Saccharomyces SUC2* invertase secreted by the methylophilic yeast *Pichia pastoris*. *J Biol Chem* 1991;266:22807-17.

37. Gerngross TU. Advances in the production of human therapeutic proteins in yeast and filamentous fungi. *Nature Biotech* 2004;22:1409-14.

38. Mason HS, Warzecha H, Mor T, Arntzen CJ. Edible plant vaccines: applications for prophylactic and therapeutic molecular medicine. *Trends Mol Med* 2002;8:324-9.

39. Schillberg S, Fischer R, Emans N. Molecular farming of recombinant antibodies in plants. *Cell Mol Life Sci* 2003;60:433-45.

40. Obermeyer G, Gehwolf R, Sebesta W, Hamilton N, Gadermaier G, Ferreira F, Commandeur U, Fischer R, Bentrup FW. Over-expression and production of plant allergens by molecular farming strategies. *Methods* 2004;32:235-40.

41. Blixt O, Allin K, Pereira L, Datta A, Paulson JC. Efficient chemoenzymatic synthesis of O-linked sialyl oligosaccharides. *J Am Chem Soc* 2002;124:5739-46.

factores que favorecen los cultivos celulares como sistemas ideales de expresión de proteínas complejas, los requerimientos biológicos de la técnica, así como la compleja infraestructura que se necesita para realizarlos, encarecen los biofármacos producidos en estos hospederos [5]. Una solución de costo-factibilidad podría estar en la utilización de los animales genéticamente modificados, que pueden llegar a convertirse en pequeñas biofábricas o biorreactores de proteínas recombinantes.

## Animales como biorreactores

Genéticamente se han modificado varias especies de animales para expresar proteínas recombinantes en sus fluidos corporales [6]. Se define como transgénico a un organismo al cual se le inserta en su genoma un segmento de ADN exógeno, cuya modificación se trasmite a su descendencia. La transferencia del material genético para la generación de animales transgénicos se realiza en etapas iniciales del desarrollo embrionario, lo que favorece el paso de la nueva información a la línea germinal del individuo genéticamente modificado. Las aplicaciones principales de los animales transgénicos se concentran en la obtención de modelos animales y en la producción de proteínas recombinantes [51].

Por lo general, las proteínas recombinantes producidas en el animal transgénico se expresan en las células de un tejido específico y se secretan en un fluido corporal determinado. La eficiencia del sistema se refleja en la capacidad secretora del tejido escogido y en la facilidad para colectar el fluido al que se vierte la proteína heteróloga [52]. En varios fluidos corporales de mamíferos se han expresado proteínas recombinantes de interés biofarmacéutico. Ejemplos de ello lo constituyen la secreción de anticuerpos humanos recombinantes en el fluido sanguíneo de diferentes líneas transgénicas de ratones, conejos, cerdos y ovejas [53, 54], así como la expresión de  $\alpha$ 1-antitripsina humana biológicamente activa en la sangre de conejos transgénicos [15].

Una primera limitación de la expresión de proteínas en la sangre, es separar la proteína recombinante de su homóloga en el hospedero, pues las características físico-bioquímicas de estas moléculas se mantienen muy conservadas entre los vertebrados. Además, las proteínas secretadas al suero sanguíneo son poco estables en este medio o afectan drásticamente la sobrevivencia del organismo hospedero, lo que ha determinado que en la actualidad se considere este sistema como poco idóneo para la expresión de proteínas recombinantes de interés biofarmacéutico [12].

En estudios recientes se obtuvieron resultados interesantes a partir de la expresión de biofármacos en la orina [55] y en el plasma seminal [56]. Sin embargo, la glándula mamaria, por su elevada capacidad secretora y la facilidad para la extracción de la leche, es el órgano más factible para la producción de proteínas recombinantes [57].

## La glándula mamaria

### Expresión de proteínas recombinantes en la glándula mamaria

La glándula mamaria está compuesta por un parénquima, que sostiene un árbol de ductos embebidos en una matriz

de grasa. Estos ductos ascienden desde el canal del pezón y se bifurcan en canales más finos hasta terminar en una estructura circular, denominada alvéolo (Figura 1 A). El alvéolo está recubierto por una capa de células epiteliales, rodeadas por una capa de células musculares sensibles al estímulo de la oxitocina (Figuras 1B y 1C). En presencia de esta hormona, las células musculares se contraen y la leche presente en el lumen del alvéolo sale al exterior [58]. Los terminales ductales desembocan en unos reservorios denominados galactóforos: dilataciones situadas inmediatamente detrás del pezón, donde confluye la leche. En los rumiantes, los galactóforos están conectados y se ensanchan hasta formar una cisterna donde se acumula la leche en grandes volúmenes; un grupo de ligamentos y el tejido conectivo mantienen la glándula fija al cuerpo, y todo el conjunto se recubre por una capa de piel que conforma la ubre (Figura 1 A), [59].

Las células epiteliales mamarias que recubren el alvéolo integran la unidad de síntesis y secreción. Durante el período de la lactancia, estas células epiteliales reciben señales hormonales, que activan los promotores de genes, los cuales codifican proteínas específicas que son producidas y secretadas en el fluido lácteo. Además, a través del epitelio mamario, ocurre el transporte de biomoléculas desde la sangre hasta la leche [60].

La leche es un fluido muy abundante y rico en proteínas en algunos mamíferos, sobre todo en los rumiantes, donde se llegan a producir 200 g de proteína por día y hasta 1 kg [14]. La glándula mamaria tiene capacidad para producir una variedad de proteínas recombinantes biológicamente activas como el tPA [61], la hormona de crecimiento humana (hGH), [62] el factor de crecimiento neuronal [63], la proteína C humana [64], la antitrombina humana (ATh) [65] y la lactoferrina humana [66] (Tabla 1).

### Transgénesis en la glándula mamaria

En 1987, Lothar Hennighausen y Heiner Westpal, del National Institute of Health, de EE.UU., en colaboración con Katy Gordon, del Integrated Genetics Institutes, marcaron un hito en el campo de la biotecnología cuando expresaron el activador hístico del plasminógeno humano en la glándula mamaria de ratones transgénicos [61]. Desde entonces se han realizado múltiples estudios que contribuyen al desarrollo de técnicas más eficientes para la generación de mamíferos transgénicos, productores de proteínas recombinantes en la leche.

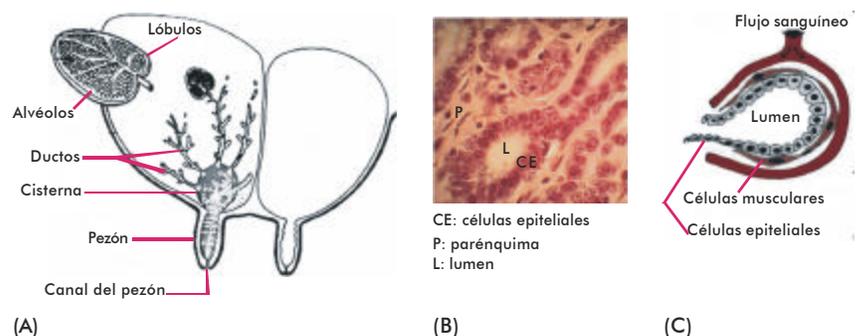


Figura 1. Características morfológicas de la glándula mamaria. A: Representación esquemática de la glándula mamaria de rumiantes. B: Corte del tejido glandular mamario de una hembra lactante: conjunto de células epiteliales que conforman la estructura alveolar. C: Esquema representativo del alvéolo mamario.

42. Bardor M, Faveeuw C, Fichette AC, Gilbert D, Galas L, Trottein F, Faye L, Lerouge P. Immunoreactivity in mammals of two typical plant glyco-epitopes, core  $\alpha$ (1,3)-fucose and core xylose. *Glycobiology* 2003;13:427-34.

43. Kaufman RJ. Post-translational modifications required for coagulation factor secretion and function. *Thromb Haemost* 1998;79:1068-79.

44. Hesse F, Wagner R. Developments and improvements in the manufacturing of human therapeutics with mammalian cell cultures. *Trends Biotechnol* 2002;18:173-80.

45. Hayflick L, Moorhead PS. The serial cultivation of human diploid cell strains. *Exp Cell Res* 1961;25:585-621.

46. Facklam TJ, Geyer S. The preparation and validation of stock cultures of mammalian cells. *Bioprocess Technol* 1991;13:54-85.

47. Wurm F, Bernard A. Large-scale transient expression in mammalian cells for recombinant protein production. *Curr Opin Biotechnol* 1999;10:156-9.

48. Berthold W, Walter J. Protein purification: aspects of processes for pharmaceutical products. *Biologicals* 1994;22:135-50.

49. Hu WS, Aunins JG. Large-scale mammalian cell culture. *Curr Opin Biotech* 1997;8:148-53.

50. Meissner P, Pick H, Kulangara A, Chatellard P, Friedrich K, Wurm FM. Transient Gene Expression: Recombinant Protein Production with Suspension-Adapted HEK-293EBNA Cells. *Biotech and Bioeng* 2001;75:197-203.

51. Thomson AJ, Marques MM, McWhir J. Gene targeting in livestock. *Reprod Suppl* 2003;61:495-508.

52. Keefer CL. Production of bioproducts through the use of transgenic animal models. *Anim Reprod Sci* 2004;83:5-12.

53. Lo D, Pursel V, Linton PJ, Sandgren E, Behringer R, Rexroad C, Palmiter RD, Brinster RL. Expression of mouse IgA by transgenic mice, pigs and sheep. *Eur J Immunol* 1991;21:1001-6.

54. Weidle UH, Lenz H, Brem G. Genes encoding a mouse monoclonal antibody are expressed in transgenic mice, rabbits and pigs. *Gene* 1991;98:185-91.

Tabla 1. Proteínas humanas de interés biofarmacéutico expresadas en la leche de mamíferos transgénicos [14]

| Proteína                           | Fuente del transgén  | Promotor                       | Niveles de expresión         |
|------------------------------------|----------------------|--------------------------------|------------------------------|
| <b>Vaca</b>                        |                      |                                |                              |
| Lactoferrina                       | ADN genómico         | $\alpha$ -S1 caseína bovina    | No disponible                |
| $\alpha$ -lactalbúmina             | No determinado       | No disponible                  | 2.4 mg/mL                    |
| <b>Cabra</b>                       |                      |                                |                              |
| Antitrombina III                   | No determinado       | $\beta$ -caseína de cabra      | 14 mg/mL                     |
| $\alpha$ S1 -antitripsina          | No determinado       | $\beta$ -caseína de cabra      | 20 mg/mL                     |
| Hormona de crecimiento             | No determinado       | Retrovirus                     | 1.2 x 10 <sup>-4</sup> mg/mL |
| Anticuerpo monoclonal              | ADN genómico         | $\beta$ -caseína de cabra      | 10 mg/mL                     |
| Activador tisular del plasminógeno | ADNc                 | $\beta$ -caseína de cabra      | 6 mg/mL                      |
| <b>Cerdo</b>                       |                      |                                |                              |
| Factor VIII                        | ADNc                 | WAP murino                     | 3 mg/mL                      |
| Proteína C                         | ADNc                 | WAP murino                     | 1 mg/mL                      |
| <b>Conejo</b>                      |                      |                                |                              |
| Calcitonina                        | Prot. de fusión      | $\beta$ -lactoglobulina bovina | 2.1 mg/mL                    |
| Superóxido dismutasa               | ADNc                 | WAP murino                     | 2.9 mg/mL                    |
| Eritropoyetina                     | ADNc                 | WAP de conejo                  | 50 $\mu$ g/mL                |
| Eritropoyetina                     | Prot. de fusión ADNc | $\beta$ -lactoglobulina bovina | 50 $\mu$ g/mL                |
| Hormona de crecimiento             | ADN genómico         | WAP murino                     | 50 $\mu$ g/mL                |
| Factor de crecimiento insulínico 1 | ADNc                 | $\alpha$ -S1 caseína bovina    | 1 mg/mL                      |
| Interleucina-2                     | ADN genómico         | $\beta$ -caseína de conejo     | 0.5 $\mu$ g/mL               |
| <b>Oveja</b>                       |                      |                                |                              |
| $\alpha$ 1-antitripsina            | Minigén              | $\beta$ -lactoglobulina ovina  | 35 mg/mL                     |
| Factor VIII                        | ADNc                 | $\beta$ -lactoglobulina ovina  | No disponible                |
| Factor IX                          | ADNc                 | $\beta$ -lactoglobulina ovina  | 5 $\mu$ g/mL                 |
| Fibrinógeno                        | ADN genómico         | $\beta$ -lactoglobulina ovina  | 5 mg/mL                      |

La expresión de elevados niveles de estas proteínas en la glándula mamaria depende, en gran medida, del casete de expresión utilizado y del método para la transferencia del material genético. En este sentido, la fortaleza del promotor es muy importante. Los promotores más utilizados son aquellos que en condiciones naturales regulan la expresión de las proteínas de la leche, lo que permite dirigir la expresión de la proteína recombinante de forma específica a las células epiteliales mamarias.

La fortaleza de los promotores propios de las proteínas de la leche varía entre las diferentes proteínas e incluso entre las diferentes especies. Los promotores de la kappa-caseína y la  $\alpha$ S2-caseína [12] son débiles, mientras que el promotor de la proteína ácida del suero de rata (WAPr) [9], el de la  $\alpha$ S1-caseína de cabra [67] y el de la  $\beta$ -lactoglobulina de oveja [68] son muy fuertes (Tabla 1).

Para un mismo casete de expresión, los niveles de producción de la proteína recombinante varían de una línea transgénica a otra. Esta variación se atribuye a un fenómeno denominado «efecto de posición», en el cual el silenciamiento en la expresión del transgén está determinado por la región de la cromatina, de la heterocromatina o de la eucromatina, en la que este se inserta [69, 9]. En la actualidad se han diseñado casetes para la expresión de proteínas recombinantes en la glándula mamaria, que comprenden la combinación de grandes secuencias reguladoras de los promotores y elementos reguladores lejanos, como los LCR (del inglés, *locus control regions*) [70], los *insulator* [71] y los MAR (del inglés, *matrix attachment regions*) [72]. Estos elementos reguladores pueden formar dominios de transcripción activa, independientes del sitio de integración.

La especificidad de los promotores es otro aspecto importante en la transgénesis, debido a la homología que presentan algunos transgenes con las proteínas endógenas del hospedero. Cuando el transgén se

expresa en tejidos ectópicos en las diferentes etapas de desarrollo del hospedero, puede afectar mucho su fisiología [15]. A este fenómeno se le denomina efecto colateral de la expresión ectópica del transgén. Algunas proteínas recombinantes, como la eritropoyetina, causan severos daños en el hospedero cuando se expresan bajo el control de promotores que no son regulados estrictamente [15, 17].

### Transferencia génica

Los primeros métodos para la transferencia de ADN heterólogo a embriones de mamíferos se basaron en vectores retrovirales. En 1974, Jaenisch [73] describió la infección de blastocistos de ratón con el virus SV40 y la persistencia del genoma viral integrado en los animales adultos; y en 1976 se obtuvo la transmisión mendeliana del virus de la leucemia murina (MMLV) en embriones de ratón microinyectados con este retrovirus [74]. Sin embargo, los oncoretrovirus tienen una capacidad de traducción limitada a células en división [75]. Debido a esto, la infección de embriones con vectores retrovirales en una etapa temprana de desarrollo fue una integración tardía y no homogénea en el tejido, y ello afectó considerablemente la eficiencia del método [76].

La reducida capacidad de clonación, de menos de 10 kb, es otro inconveniente para el uso de los vectores retrovirales aplicados a la transgénesis. Esto dificulta la clonación de las secuencias genómicas de las proteínas de interés, así como de las grandes regiones reguladoras, propias de los promotores de las proteínas de la leche y de los elementos reguladores distales [77]. Además, las secuencias terminales repetidas, que flanquean el genoma retroviral, interfieren con los promotores de mamíferos y suprimen o disminuyen la expresión de los genes que regulan [78]. De esta forma se desarrolla un fenómeno de silenciamiento de la expresión, mediado por metilación en los transgenes y cerca del sitio de integración [79].

55. Kerr DE, Liang F, Bondioli KR, Zhao H, Kreibich G, Wall RJ, Sun TT. The bladder as a bioreactor: urothelium production and secretion of growth hormone into urine. *Nat Biotechnol* 1998;16:75-9.

56. Dyck MK, Gagne D, Ouellet M, Senechal JF, Belanger E, Lacroix D, Sirard MA, Pothier F. Seminal vesicle production and secretion of growth hormone into seminal fluid. *Nat Biotechnol* 1999;17:1087-90.

57. Colman A. Production of therapeutic proteins in the milk of transgenic livestock. *Biochem Soc Symp* 1998;63:141-7.

58. Allen JC. Milk synthesis and secretion rates in cows with milk composition changed by oxitocin. *J Dairy Science* 1990;73:975-84.

59. Fleet IR, Goode JA, Hamon MH, Laurie MS, Linnell JL, Peaker M. Secretory activity of goat mammary glands during pregnancy and the onset of lactation. *J Physiology* 1975;251:763-73.

60. Linnell JL, Peaker M. The permeability of mammary ducts. *J Physiology* 1971; 216:701-16.

61. Gordon K, Lee E, Vitale JA, Smith AE, Westphal H, Hennighausen L. Production of human tissue plasminogen activator in transgenic mouse milk. 1987. *Biotechnology* 1992;24:425-8.

62. Devinoy E, Thepot D, Stinnakre MG, Fontaine ML, Grabowski H, Puissant C, Pavirani A, Houdebine LM. High level production of human growth hormone in the milk of transgenic mice: the upstream region of the rabbit whey acidic protein (WAP) gene targets transgene expression to the mammary gland. *Transgenic Res* 1994;3:79-89.

63. Coulibaly S, Besenfelder U, Fleischmann M, Zinovieva N, Grossmann A, Wozny M, Bartke I, Tögel M, Müller M, Brem G. Human nerve growth factor beta (hNGF-beta): mammary gland specific expression and production in transgenic rabbits. *FEBS Lett* 1999;444:111-6.

Otro método para la transferencia de material genético foráneo es la microinyección de ADN a embriones unicelulares. Hasta la actualidad, este método se ha utilizado como la técnica más universal de transferencia horizontal de material genético, desde el hallazgo de Gordon en 1980 [11]. La técnica consiste en la microinyección del ADN foráneo en el pronúcleo de embriones unicelulares y la inserción, al azar, del material genético en el embrión microinyectado [80, 10]. El método no ha variado sustancialmente en los últimos 25 años, y se aplica en ratones, hámsters, conejos, cerdos, ovejas, cabras y vacas [12]. En la mayoría de estos animales, los embriones se extraen de una hembra donante, se microinyecta el ADN foráneo en uno de los pronúcleos del cigoto y se transfiere a una hembra receptora, que engendra las crías transformadas. En vacas, es necesario madurar los ovocitos y fertilizarlos *in vitro* para obtener suficientes cigotos por hembra donante. Una vez nacidas las crías, denominadas fundadores, se analizan para determinar la presencia del transgén insertado en el genoma y los individuos positivos se cruzan entre sí, para obtener la línea genéticamente modificada.

Los inconvenientes principales de la microinyección aplicada a la generación de biorreactores, radican en la eficiencia de integración del transgén en rumiantes y otras especies mayores (menos del 2% en cerdos, ovejas y cabras; menos del 1% en vacas), así como en el tiempo que transcurre para llegar a obtener un pequeño rebaño que produzca la proteína recombinante de interés (Tabla 2). Por estas razones, se debe disponer de muchas hembras donantes y receptoras para obtener un fundador inicial, lo cual encarece más el proceso [6, 78].

La técnica de transferencia nuclear de células somáticas (TNCS) se utilizó inicialmente para crear una copia genética idéntica, o clon, de un animal [81], y en la actualidad representa un procedimiento alternativo para crear animales transgénicos. La TNCS a partir de células donantes genéticamente transformadas, permite la introducción directa de transgenes a ovocitos anucleados. Las células donantes son modificadas *in vitro* mediante la transfección de

ADN exógeno, antes de que el material genético sea introducido y reprogramado en los embriones. Esto permite la selección de los embriones transformado por los métodos convencionales de biología molecular, en cuanto a sitio de integración, número de copias y niveles de expresión de la proteína recombinante. La técnica posibilita, además, la selección del sexo en la línea de fundadores, en dependencia del individuo escogido como donante de tejido [82].

De esta forma, el 100% de los fundadores serán transgénicos e idénticos, si provienen de una misma línea celular modificada. Hasta este punto, la TNCS constituiría el método más eficiente para la obtención de mamíferos transgénicos como biorreactores. Sin embargo, persisten aún muchas limitaciones: la metodología es compleja, demanda equipamiento y reactivos muy caros, y la eficiencia es muy baja en animales de granja; los nacimientos a partir de embriones clonados e implantados en hembras receptoras oscilan entre el 3 y el 5%. En vacas, los fetos generados por TNCS, se pierden entre el día 35 y el 60 de gestación. La muerte fetal se incrementa en 60%, comparada con embriones generados a partir de la fertilización *in vitro* [83].

Otra causa muy frecuente de pérdida de crías son las complicaciones en el embarazo, debido al síndrome del feto gigante. También se observan anomalías pulmonares y deficiencias metabólicas tanto en los fetos como en las crías recién nacidas, lo que aumenta el índice de mortalidad. Estos problemas se asocian a deficiencias en la reprogramación del genoma diploide, que se refleja en alteraciones letales en los diferentes estadios de desarrollo del embrión clonado [84].

En los últimos cinco años, la transferencia de genes a embriones tempranos, mediada por vectores retrovirales (lentitransgénesis), ha resurgido con el empleo de nuevos vectores lentivirales [85]. Los lentivirus son una familia de retrovirus que infectan células tanto quiescentes como en división [86], con una elevada estabilidad y sin que se evidencie el indeseado efecto de silenciamiento génico [87]. Se ha obtenido el 60% de eficiencia de ratones transgénicos

64. Van Cott KE, Lubon H, Gwazdauskas FC, Knight J, Drohan WN, Velander WH. Recombinant human protein C expression in the milk of transgenic pigs and the effect on endogenous milk immunoglobulin and transferrin levels. *Transgenic Res* 2001;10:43-51.

65. Edmunds T, Van Patten SM, Pollock J, Hanson E, Bernasconi R, Higgins E, Manavalan P, Ziomek C, Meade H, McPherson JM, Cole ES. Transgenically produced human antithrombin: structural and functional comparison to human plasma-derived antithrombin. *Blood* 1998;91:4561-71.

66. Van Berkel PH, Welling MM, Geerts M, Van Veen HA, Ravensbergen B, Salaheddine M, Pauwels EK, Pieper F, Nuijens JH, Nibbering PH. Large scale production of recombinant human lactoferrin in the milk of transgenic cows. *Nat Biotechnol* 2002;20:484-7.

67. Meade HM. *Gene Expression Systems: Using Nature for the Art of Expression*. Ed. by Fernández JM, Hoeffler JM. Academic Press; 1999:399-427.

68. Wrihtg G, Carver A, Cottom D, Reeves D, Scott A, Simons P, Wilmut I, Garner I, Colman A. High level expression of active human alpha-1-antitrypsin in the milk of transgenic sheep. *Biotechnology* 1991;9:830-4.

69. Clark AJ, Bissinger P, Bullock DW, Damak S, Wallace R, Whitelaw CB, et al. Chromosomal position effects and the modulation of transgene expression. *Reprod Fertil Dev* 1994;6:589-98.

70. Dillon N, Grosveld F. Transcriptional regulation of multigene loci: multilevel control. *Trends Genet* 1993;9:134-7.

71. Chung JH, Whiteley M, Felsenfeld G. A 5' element of the chicken beta-globin domain serves as an insulator in human erythroid cells and protects against position effect in *Drosophila*. *Cell* 1993;74:505-14.

72. Forrester WC, Van Genderen C, Jenuwein T, Grosschedl R. Dependence of enhancer-mediated transcription of the immunoglobulin gene on nuclear matrix attachment regions. *Science* 1994;265:1221-5.

Tabla 2. Cronología de la producción de proteínas recombinantes en la glándula mamaria de líneas transgénicas en diferentes especies de mamíferos [14]

|   | Conejo           | Cerdo            | Oveja | Cabra | Vaca |
|---|------------------|------------------|-------|-------|------|
| Tiempo de gestación (meses)   | 1                | 4                | 5     | 5     | 9    |
| Madurez sexual (meses)  | 5                | 6                | 8     | 8     | 15   |
| Tiempo entre la introducción del transgén y el inicio de la lactación (meses) |                  |                  |       |       |      |
| Fundador hembra   | -                | -                | -     | -     | -    |
| Lactación inducida en la pubertad   |                  |                  |       |       |      |
| Lactación natural   | 7                | 16               | 18    | 18    | 33   |
| Fundador macho  | -                | -                | 22    | 22    | 45   |
| Lactación inducida en la pubertad (hijas)                                     |                  |                  |       |       |      |
| Lactación natural (hijas)   | 15               | 28               | 31    | 31    | 57   |
| Promedio de crías   | 8                | 10               | 1-2   | 1-2   | 1    |
| Rendimiento anual de leche (L/año)  | 4-5 <sup>a</sup> | 300 <sup>b</sup> | 500   | 800   | 8000 |
| Producción de materia prima de proteína recombinante / hembra / año (kg)      | 0.02             | 1.5              | 2.5   | 4     | 40   |

<sup>a</sup> Promedio de producción de 3 lactaciones por año

<sup>b</sup> Promedio de producción de 2 lactaciones por año

[88], el 70% de cerdos transgénicos [89] y el 100% de eficiencia en la generación de vacas transgénicas [90], mediante el sistema de transducción de embriones tempranos con vectores lentivirales. Estos resultados son los más importantes hasta el presente en el campo de la transgénesis aplicada a animales de granja.

### Modificación genética *in situ* del epitelio glandular mamario

La generación de líneas transgénicas de animales de granja para la expresión de proteínas heterólogas, es un proceso con muchas limitaciones aún. Como se describió antes, la eficiencia de integración del transgén es muy baja cuando se utiliza la técnica de microinyección. Además, el tiempo entre la microinyección del embrión y la obtención de la línea transgénica puede durar años en las especies más productivas (Tabla 2), y el costo en general es elevado [91].

La modificación genética *in situ* de la glándula mamaria puede ser una alternativa para evadir las limitaciones de la transgénesis. Este método consiste en transferir el ADN directamente a las células que constituyen el epitelio mamario de una hembra adulta. Una vez que ocurre la modificación genética, la proteína recombinante se secreta en la leche. La morfología de la glándula mamaria facilita el procedimiento: existe una comunicación directa a través de los finos canales ductales, desde el alvéolo hasta el terminal del canal del pezón, lo que permite acceder desde el exterior hasta las células epiteliales mamarias, sin necesidad de emplear la cirugía. Mediante la canalización del pezón, es posible introducir un catéter al galactóforo o la cisterna e infundir antibióticos, fármacos o material genético a la glándula mamaria [17].

El método de modificación genética *in situ* es aplicable a casi todas las especies de mamíferos, independientemente de su fondo genético, y permite la inserción de múltiples casetes de expresión. La regulación de estos no se ve restringida a promotores de tejido específicos y, además, se reduce considerablemente el tiempo entre la aplicación del método de modificación y la obtención del producto de interés [17]. Las principales limitaciones del método están asociadas con la baja eficiencia de la modificación genética y con el corto tiempo que se mantiene la expresión de la proteína heteróloga, lo que genera bajos niveles de producción.

En los últimos años se han desarrollado dos métodos fundamentales para la modificación genética *in situ* de la glándula mamaria: la transfección por métodos físico-químicos y la transducción basada en vectores virales. La transfección directa del epitelio mamario mediada por métodos físico-químicos se ensayó con varias metodologías. Entre ellas, se encuentran la transfección *in situ* con complejos asociados a poli-iones como DEAE-dextrana y poli-L-lisina [18], la endocitosis mediada por receptor [19] y la transfección mediada por pistolas de genes [92, 20]. En algunos casos se detectó la presencia del transgén y la expresión de la proteína recombinante, aunque los niveles fueron tan bajos que ninguno de estos métodos se valoró de manera positiva como una posible vía de producción de proteínas en la glándula mamaria.

Los vectores retrovirales también se han utilizado para la introducción directa de genes en las células epiteliales mamarias. La capacidad de estos vectores de insertarse en el genoma hospedero se empleó para generar modelos animales, útiles en estudios de cáncer de mama y terapia génica, mediante la técnica de infusión directa del virus a través del canal del pezón [93-95]. A partir de un vector retroviral incompetente para la replicación, basado en un híbrido del MMLV y el virus de la leucemia del Gibón, que contenía insertado el gen de la hGH, se infundió en la glándula mamaria de cabras con lactación inducida, y se comprobó la expresión del transgén en las células epiteliales mamarias [21]. La hGH recombinante se obtuvo en la leche de los animales tratados, a razón de 60 ng/mL en el primer día de ordeño, y disminuyó durante los próximos días, hasta obtenerse una meseta de expresión de 12 ng/mL entre los días del 9 al 15 de lactación. Con este estudio se evidenció la capacidad de transducción *in situ* de la glándula mamaria para la expresión de proteínas recombinantes, mediante la infusión directa de un vector retroviral. Sin embargo, los bajos niveles de expresión obtenidos desestiman este método como una posible aplicación práctica [21].

Los vectores adenovirales se emplean en ensayos de terapia génica [23, 96], y constituyen en la actualidad una herramienta importante para la transducción *in situ* de la glándula mamaria. Cuando el adenovirus infecta la célula diana no se integra al genoma celular, sino que permanece en el núcleo como una entidad independiente o epicromosomal. Por lo tanto, los casetes de expresión que portan la información genética, no se someten al efecto de silenciamiento génico dependiente del sitio de integración. De esta forma se pueden introducir genes con copias múltiples e independientes en las células epiteliales mamarias, mediante una infusión del vector viral a través del canal del pezón.

Mediante la transducción adenoviral *in situ* de la glándula mamaria durante el estadio terminal de la gestación en ratones, se obtuvieron promedios de expresión de 1.31 mg/mL de la hGH recombinante [93] y de 2.2 mg/mL de la EPOh recombinante [94], en la leche de los animales transducidos. Este procedimiento aplicado a cabras, como especie productiva, permitió obtener niveles de expresión de 1.35 g/L de la EPOh en la leche [95]. El método de transformación adenoviral *in situ* de la glándula mamaria permite producir concentraciones elevadas de proteínas recombinantes como la EPOh, que resultan letales al hospedero cuando se generan animales transgénicos [15, 98].

Las principales desventajas del método de transducción adenoviral *in situ* de la glándula mamaria radican en el corto tiempo de expresión (10 días en ratones y 8 días en cabras) y en la imposibilidad de volver a transducir los animales con el vector adenoviral. Este efecto está relacionado con la fuerte respuesta inmune del hospedero contra las proteínas virales que se expresan en las células transformadas [22, 100]. Sin embargo, la potencialidad de este método de transformación como sistema productivo, se refleja en los elevados rendimientos de proteína recombinante por animal, en el corto tiempo que transcurre entre la transducción adenoviral y la producción de la proteína recombinante, así como en la posibilidad de producir

73. Jaenisch R. Infection of mouse blastocysts with SV 40 DNA: normal development of infected embryos and persistence SV 40-specific DNA sequences in the adult animals. *Cold Spring Harbor Symp Quant Biol* 1974;39:375-80.

74. Jaenisch R. Germ line integration and Mendelian transmission of the exogenous Moloney leukemia virus. *Proc Natl Acad Sci* 1974;73:1260-7.

75. Wolf E, Scherthaner W, Zakhartchenko V, Prella K, Stojkovic M, Brem G. Transgenic technology in farm animals: progress and perspectives. *Exp Physiol* 2000;85:615-25.

76. Haskell R, Bowen RA. Efficient production of transgenic cattle by retroviral infection of early embryos. *Mol Reprod Dev* 1995;40:386-90.

77. Brem G. Transgenic animals. *Biotechnology*, ed. Rehm HJ & Reed G VCH, Weinheim; 1993:745-832.

78. Wells K, Moore K, Wall R. Transgene vectors go retro. *Nat Biotech* 1999;17:25-6.

79. Chan AWS, Homan EJ, Ballou LU, Burns JC, Bremel DR. Transgenic cattle produced by reverse-transcribed gene transfer in oocytes. *Proc Natl Acad Sci* 1998;95:14028-33.

80. Brem G, Brenig B, Goodman HM, Selden RC, Graf F, Kruff B, Springmann K, Hondele J, Meyer J, Winnacker EL, Kr Ausslich H. Production of transgenic mice, rabbits and pigs by microinjection into pronuclei. *Zuchthygiene* 1985;20:251-2.

81. Campbell KH, McWhir J, Ritchie WA, Wilmut I. Sheep cloned by nuclear transfer from a cultured cell line. *Nature* 1996;380:64-6.

82. Cibelli JB, Stice SL, Golueke PJ, Kane JJ, Jerry J, Blackwell C. Cloned transgenic calves produced from nonquiescent fetal fibroblasts. *Science* 1998;280:1256-8.

83. Hill JR, Rousell AJ, Cibelli JB, Edwards JF, Hooper NL, Miller MW, Thompson JA, Looney CR, Robl JM, Westhusin ME, Stice SL. Clinical and pathological features of cloned transgenic calves and fetuses (13 case studies). *Theriogenology* 1999;51:1451-65.

84. Stice SL, Ruzicido SJ. Increasing cloning efficiencies requires a better understanding of developmental abnormalities and gene expression in manipulated embryos. *J Anim Sci* 2001;79:285-9.

85. Pfeifer A, Verma IM. Gene therapy: promises and problems. *Annu Rev Genomics Hum Genet* 2001;2:177-211.

86. Follenzi A, Ailles LE, Bakovic S, Geuna M, Naldini L. Gene transfer by lentiviral vectors is limited by nuclear translocation and rescued by HIV-1 pol sequences. *Nat Genet* 2002;25:217-22.

87. Pfeifer A, Ikawa M, Dayn Y, Verma IM. Transgenesis by lentiviral vectors: lack of gene silencing in mammalian embryonic stem cells and preimplantation embryos. *Proc Natl Acad Sci* 2002;99:2140-5.

88. Ikawa M, Tanaka N, Kao WW, Verma IM. Generation of transgenic mice using lentiviral vectors: a novel preclinical assessment of lentiviral vectors for gene therapy. *Mol Ther* 2003;8:666-73.

proteínas recombinantes que resultan tóxicas para los hospederos transgénicos [98, 99].

### Glicosilación de proteínas recombinantes expresadas en la glándula mamaria

La expresión de proteínas recombinantes en la glándula mamaria tiende a modificar el patrón de glicosilación de las proteínas nativas hacia estructuras específicas de este tejido [98, 101]. La ATH plasmática nativa presenta estructuras oligosacáridicas de tipo complejo, dianténarias, con ramificaciones de lactosamina (Gal-GlcNAc) y disialiladas en los extremos con la presencia del ácido N-acetil neuramínico (Neu5Ac). Sin embargo, cuando esta proteína se expresa en la glándula mamaria de cabras transgénicas se observa un cambio en el patrón de N-glicosilación, en el que predominan las estructuras de tipo complejo, dianténarias, con ramificaciones de tipo lactosadamina (GalNAc-GlcNAc), no común en vertebrados, y monosialiladas, mediante la unión del ácido N-glicolil neuramínico (Neu5Gc) [101].

Eventos similares de modificación del patrón de glicosilación de proteínas recombinantes, se observaron al caracterizar la EPOh expresada en la leche materna de ratones [98] y cabras, mediante modificación transiente del epitelio glandular mamario (Montesino y cols., manuscrito en preparación).

Otro elemento característico es la fucosilación. Ambas proteínas recombinantes, ATH y EPOh, expresadas en la leche contienen un residuo de fucosa enlazado a la GlcNAc, que se une a la Asn del sitio de N-glicosilación (*sequon*), aunque este monosacárido no se encuentra en la ATH nativa aislada del torrente sanguíneo [65].

Este patrón de glicosilación específico de la glándula mamaria puede afectar la actividad biológica de las glicoproteínas que se expresan en la leche de los mamíferos genéticamente modificados. Además, se generan

oligosacáridos que pueden activar la respuesta inmune de los pacientes tratados con biofármacos producidos en la leche. Un ejemplo de ello es el monosacárido Neu5Gc o antígeno de Hanganutziu-Deicher, que no está presente en las glicoproteínas humanas [103].

La función biológica de las modificaciones del patrón de glicosilación de las glicoproteínas expresadas en la glándula mamaria no está definida, aunque se podría relacionar con un mecanismo de economía celular. Esta glándula funciona durante la lactancia como una biofábrica que está secretando continuamente una gran cantidad de proteínas al lumen de la cisterna. La simplificación de la maquinaria enzimática del sistema de endomembranas, que es responsable del perfil de glicosilación de las glicoproteínas secretables, podría facilitar el transporte y secreción de estas proteínas.

La glándula mamaria constituye un sistema de expresión con varias limitaciones aún. No existe un método de transferencia génica eficiente que garantice la generación de animales de granja transgénicos; además, el patrón de glicosilación específico de este órgano limita la producción de proteínas recombinantes, cuya actividad biológica depende de estructuras multianténarias y polisialiladas. Sin embargo, el desarrollo de nuevos métodos de transferencia génica como la lentitransgénesis o transducción adenoviral *in situ* de la glándula mamaria, podría constituir una alternativa para generalizar el uso de este sistema de expresión. Un conocimiento más profundo de los eventos moleculares que modulan el perfil de isoformas de las glicoproteínas que se expresan en la glándula mamaria, permitiría la manipulación genética de las exoglicosidasas y glicosiltransferasas que intervienen en la síntesis de los oligosacáridos. Estas modificaciones permitirían obtener los fenotipos que garanticen la actividad biológica de glicoproteínas recombinantes de interés.

89. Hofmann A, Kessler B, Ewerling S, Weppert M, Vogg B, Ludwig H, Stojkovic M, Boelhauve M, Brem G, Wolf E, Pfeifer A. Efficient transgenesis in farm animals by lentiviral vectors. *EMBO Rep* 2003;4:1054-60.

90. Hofmann A, Zakhartchenko V, Weppert M, Sebald H, Wenigerkind H, Brem G, Wolf E, Pfeifer A. Generation of transgenic cattle by lentiviral gene transfer into oocytes. *Biol Reprod* 2004;71:405-9.

91. Colman A. Dolly, Polly and other 'ollies': likely impact of cloning technology on biomedical uses of livestock. *Genet Anal* 1999;153:167-73.

92. Furth PA, Shamay A, Wall RJ, Hennighausen L. Gene transfer into somatic tissues by jet injection. *Anal Biochem* 1992;205:365-8.

93. Golovkina TV, Prakash O, Ross SR. Endogenous mouse mammary tumor virus Mtv-17 is involved in Mtv-2-induced tumorigenesis in GR mice. *Virology* 1996;218:14-22.

94. Ozturk-Winder F, Renner M, Klein D, Muller M, Salmons B, Gunzburg WH. The murine whey acidic protein promoter directs expression to human mammary tumors after retroviral trans-

duction. *Cancer Gene Ther* 2002;9:421-31.

95. Bao L, Jaligam V, Zhang XY, Kutner RH, Kantrow SP, Reiser J. Stable transgene expression in tumors and metastases after transduction with lentiviral vectors based on human immunodeficiency virus type 1. *Hum Gene Ther* 2004;15:445-56.

96. Nadeau I, Kamen A. Production of adenovirus vector for gene therapy. *Biotechnol Adv* 2003;20:475-89.

97. Sánchez O, Toledo JR, Rodríguez MP, Castro FO. Adenoviral vector mediates high expression levels of human growth hormone in the milk of mice and goats. *J Biotechnol* 2004;114:89-97.

98. Toledo JR, Sánchez O, Montesino Seguí R, Fernández García Y, Rodríguez MP, Cremata JA. Differential *in vitro* and *in vivo* glycosylation of human erythropoietin expressed in adenovirally transduced mouse mammary epithelial cells. *Biochim Biophys Acta* 1726: 48-56.

99. Toledo JR, Sánchez O, Montesino R, García G, Montañez M, Zamora PA, Rodríguez MP, Cremata J. High expression level of recombinant human erythropoietin in the milk of non-transgenic goats. *J Biotechnol* 2006;123:

225-35.

100. Van Linthout S, Lusky M, Collen D, De Geest B. Persistent hepatic expression of human apo A-I after transfer with a helper-virus independent adenoviral vector. *Gene Ther* 2002;9:1520-8.

101. Zhou Q, Kyazike J, Echelard Y, Meade HM, Higgins E, Cole ES, Edmunds T. Effect of genetic background on glycosylation heterogeneity in human antithrombin produced in the mammary gland of transgenic goats. *J Biotechnology* 2005;117:57-72.

102. Yuen CT, Storring PL, Tiplady RJ, Izquierdo M, Wait R, Gee CK, Gerson P, Lloyd P, Cremata JA. Relationships between the N-glycans structures and biological activities of recombinant human erythropoietins produced using different culture conditions and purification procedures. *J Haematol* 2003;121:511-26.

103. Chou HH, Takematsu H, Díaz S, Iber J, Nickerson E, Wright KL, Muchmore EA, Nelson DL, Warren ST, Varki A. A mutation in human CMP-sialic acid hydroxylase occurred after the Homo-Pan divergence. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1998;95:11751-6

Recibido en septiembre de 2006. Aprobado en diciembre de 2006.