

Capítulo LXXXIV

Biotecnología aplicada a la producción de animales transgénicos en la especie bovina

Francisco A. García-Vázquez
Aitor de Ondiz Sánchez

Actualmente la producción de animales modificados genéticamente ha supuesto un gran avance en el área de la ciencia y la salud. Los avances tecnológicos han permitido desarrollar una amplia variedad de animales transgénicos en diferentes especies. La finalidad de dichos animales es diversa; entre estas aplicaciones destacamos los modelos de enfermedades humanas, fuente de órganos en xenotransplantes o como bio-reactores para la producción de determinados fármacos. Otro de los campos donde la transgénesis presenta especial interés es la producción animal. El hecho de crear animales transgénicos capaces de resistir a enfermedades, de mejorar los índices productivos o reducir el efecto contaminante de la actividad ganadera son algunas de las aplicaciones de estos animales en el área agrícola. Estos ejemplos serían de gran aplicación sobre todo en aquellos territorios donde las condiciones económicas o climáticas no sean las más adecuadas para la producción, creando animales más resistentes o con unas determinadas características como mayor producción de leche o modificación de su composición, al igual que la producción cárnica. En este Capítulo describiremos, en primer lugar, las técnicas más utilizadas para la producción de animales transgénicos, y en segundo lugar las aplicaciones de estos animales en la producción, especialmente en la especie bovina.

METODOLOGÍAS PARA LA PRODUCCIÓN DE ANIMALES MODIFICADOS GENÉTICAMENTE

Microinyección pronuclear

Mediante esta técnica se creó el primer animal transgénico (Gordon *et al.*, 1980), basándose en la microinyección de genes directamente en el pronúcleo masculino de cigotos de ratón recién fecundados (Figura 1). Esta técnica ha sido la más usada en la producción de ratones transgénicos desde la década de los 80 con una eficiencia actual próxima al 30% (Wheeler & Walters, 2001). En 1985, Hammer *et al.* crearon los primeros animales transgénicos de granja mediante esta metodología.

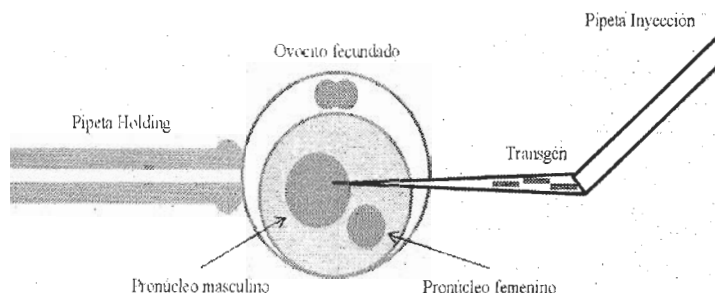


Figura 1. Esquema de la microinyección pronuclear.

Pero esta técnica es particularmente costosa y presenta una baja eficiencia cuando es aplicada a animales de producción, tales como las especies bovina (0,7-3,2%) y porcina (0,3-0,4%). Por ejemplo, en la especie bovina, solo se pueden transferir unos pocos embriones a cada hembra receptora, por lo que se requiere de un gran número de hembras para obtener algún animal transgénico, con lo que conlleva el mantenimiento de estos animales durante al menos los 9 meses de gestación.

Transferencia nuclear (Clonación)

La transferencia nuclear (TN) consiste en la fusión o inyección de una célula donadora (material genético) con un ovocito enucleado (o un embrión en estadios iniciales). La producción de animales mediante TN requiere de múltiples etapas (Figura 2).

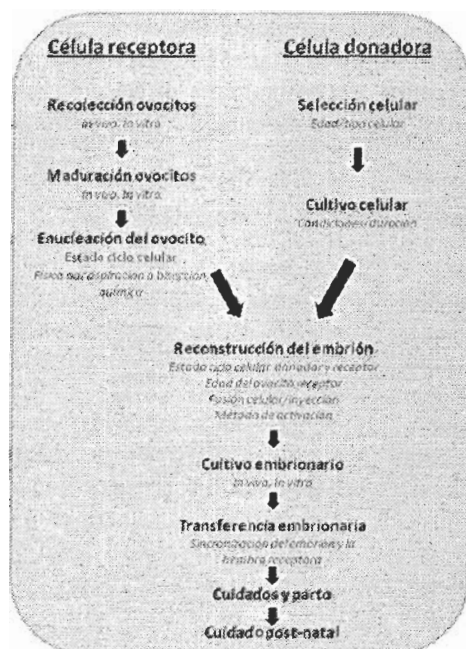


Figura 2. Etapas para la producción de animales clonados (modificado de Campbell *et al.* 2007).

La primera descendencia viva mediante TN fueron dos ovejas nacidas en 1995 usando cultivos de células embrionarias como donadores del núcleo y ovocitos enucleados (ovocitos en metafase II) como células receptoras (Campbell *et al.*, 1996). Posteriormente, se produjo descendencia pero en este caso utilizando células derivadas de tejidos adultos y fetales (Wilmut *et al.*, 1997), en el caso de la oveja “Dolly”. Desde entonces esta tecnología ha sido aplicada con éxito a un gran número de especies animales tales como la especie bovina, murina, ovina, porcina, equina, canina y otras (revisado por Campbell *et al.*, 2007).

Una modificación de esta técnica es la “transgénesis por transferencia nuclear”, que consiste en la transfección de genes exógenos en células en cultivo, obteniendo de tal modo células modificadas genéticamente que posteriormente son fusionadas o inyectadas en la célula receptora, tal y como se ha descrito anteriormente en la TN. En 1998 nacieron los primeros bovinos clonados y transgénicos (Cibelli *et al.*, 1998). De un total de 276 embriones reconstruidos, únicamente 33 llegaron a estadio de blastocisto (12%), de los cuales 28 fueron transferidos a 11 hembras receptoras; obteniendo finalmente, un total de 4 terneros.

Inicialmente, el éxito de la TN fue realmente bajo, en el rango del 1 al 5%. En la actualidad esta situación ha mejorado, situándose esta eficiencia en alrededor del 30%. Sin embargo, se requieren algunas mejoras y modificaciones en la técnica como: 1) simplificar la metodología, 2) reducir los costos y 3) mejorar la supervivencia al nacimiento (Campbell *et al.*, 2007). Algunos clones han nacido con diversas alteraciones, algunas de ellas fatales. Diversas evidencias sugieren que estas alteraciones se deben principalmente al cultivo *in vitro* de células y embriones y no a la técnica de clonación *per se*. Afortunadamente, en la segunda generación de clones la prevalencia de dichas alteraciones ha disminuido. Esta metodología ofrece un amplio rango de oportunidades en investigación básica y aplicada, tanto en agricultura como en biomedicina. En concreto en el caso de producción animal las aplicaciones son varias, como la clonación para producción alimentaria (cárnica y lechera) o clonación de animales con un valor genético excepcional.

Transgénesis mediada por espermatozoides (SMGT)

Esta tecnología de transgénesis comenzó a desarrollarse cuando Lavitrano *et al.* (1989) utilizaron esta metodología para la producción de animales modificados genéticamente. La transgénesis mediada por espermatozoides (SMGT) consiste en la habilidad intrínseca de las células espermáticas para unir e interiorizar ADN exógeno y transferirlo hacia el interior del ovocito. Esta técnica fue desarrollada en primer lugar en animales de laboratorio (ratón y rata) mostrando una gran eficiencia. Posteriormente, la SMGT fue adaptada a un gran número de especies animales, incluyendo las especies de granja, obteniendo un gran éxito sobre todo en la especie porcina (Lavitran *et al.*, 2002). A lo largo de los años tras su descubrimiento se han ido incorporando nuevas aplicaciones para aumentar su rendimiento como es el caso de la inyección intracitoplasmática de espermatozoides (García-Vázquez *et al.*, 2009, 2010), transgénesis mediada por testículo (TMGT) y uso de recombinasas (García-Vázquez *et al.*, 2010). En la especie bovina se han realizado diversos estudios aplicando esta técnica desde el año 2000 (Rieth *et al.*, 2000) hasta la actualidad (Cánovas *et al.*, 2010). She-

mesh *et al.* (2000) obtuvieron 2 terneros utilizando los espermatozoides como vectores del ADN; la incorporación del gen exógeno al espermatozoide se realizó con la ayuda de enzimas de restricción y lipofección.

Transgénesis mediada por virus

Otra metodología, muy desarrollada en los últimos años, es el uso de virus como vectores de genes exógenos. Estos virus han sido modificados para que pierdan su carácter patogénico, aunque siguen siendo capaces de infectar células y de transportar una pequeña cantidad de ADN (revisado por Gadea y García-Vázquez, 2010). Para generar animales transgénicos se han utilizado fundamentalmente los retrovirus, aunque su uso presenta diversas limitaciones como el hecho de que únicamente permiten la transferencia de construcciones génicas de tamaño inferior a 10 kb, son virus silentes durante el desarrollo embrionario; por otro lado la utilización de retrovirus ha permitido la transferencia de los genes, pero estos no son expresados adecuadamente en los animales transgénicos (revisado por Pfeifer, 2004).

En los últimos años se están utilizando los lentivirus (dentro de la familia de los retrovirus) principalmente por su alta eficiencia para la producción de mamíferos transgénicos (Whitelaw *et al.*, 2004). Los vectores lentivirales pueden ser introducidos por microinyección directa en el espacio perivitelino del cigoto, por cultivo con cigotos sin zona pelúcida o en el blastocelo de embriones. En ratones, se ha demostrado una eficiencia entre el 10-30% de cigotos infectados, de los cuales entre 60-90% expresaban el transgén. Dicha eficacia también ha sido demostrada en la especie porcina y bovina, donde en 2004 se produjo el nacimiento del primer ternero transgénico mediante esta tecnología (Hofmann *et al.*, 2003, 2004).

Células madre ("Stem cells")

Las células madre se definen como aquellas que son capaces de dividirse indefinidamente y diferenciarse en varios tipos celulares o tejidos. Las células madre embrionarias (CME) son células pluripotentes que derivan de la masa celular interna (MCI) del embrión en estadio de blastocisto y pueden dar lugar a cualquier tipo celular de las 3 capas germinales. En la actualidad, existe un gran interés en el cultivo de este tipo de células debido a las ventajas que presenta la creación de animales genéticamente modificados utilizando células transformadas previamente *in vitro*, ya que se les pueden introducir genes exógenos manteniendo sus características de pluripotencialidad; además el sitio de la integración del transgén en el genoma, también puede ser controlado reemplazando los genes existentes. Estas células pluripotentes se introducen mediante microinyección en el blastocelo de los embriones, para dar lugar a animales quiméricos, es decir, que provienen de líneas celulares de dos individuos diferentes.

Los ratones fueron los primeros mamíferos donde se aislaron y cultivaron las CME (Evans & Kaufman, 1981). Una de las limitaciones de esta técnica para producir animales transgénicos de granja consiste en que los animales, al ser quiméricos, deben ser cruzados para llevar el transgén a todos los tejidos, lo que puede tardar mucho tiempo en caso de especies como el ganado vacuno. Además, el aislamiento y la crea-

ción de líneas de CME *in vitro* son todavía técnicas incipientes en determinadas especies como la porcina y bovina, y se necesitan más estudios para establecer completamente la correcta manipulación *in vitro* de células CME de dichas especies (revisado por Melo *et al.*, 2007). En la actualidad el futuro de las CM se encuentra en las CM inducidas (o iPS por sus siglas en inglés) que son células pluripotentes que no derivan de un embrión, sino que proceden de células somáticas. A éstas se les induce un estado de pluripotencialidad mediante el tratamiento con determinados factores de transcripción que dan lugar a la reprogramación celular (Takahashi & Yamanaka, 2006).

APLICACIONES DE LA TRANSGÉNESIS EN PRODUCCIÓN ANIMAL

Producción de leche

La modificación de la composición de la leche mediante ingeniería genética ha sido frecuentemente planteada. Las proteínas de la leche son producidas exclusivamente en la glándula mamaria y solo durante el periodo de lactación. Mediante el uso de promotores y componentes reguladores que codifican los genes de la proteína de la leche, es posible dirigir la expresión de un transgén a la glándula mamaria. Trabajos de este tipo han sido realizados inicialmente en el ratón, donde varios estudios demostraron que la composición y funcionalidad de la leche podrían cambiar mediante la expresión de un gen específico en la glándula mamaria (Maga *et al.*, 1998). Tras estos trabajos iniciales, se ha avanzado progresivamente en animales de granja, como es el caso de la vaca.

En la actualidad, la leche representa una importante fuente de alimentación no solo en su forma natural, sino en todos sus productos derivados. La proteína láctea, 80% de la cual es caseína, es uno de los componentes más importantes debido a su valor nutricional. La fracción de caseína de la leche de vaca comprende cuatro proteínas ($\alpha 1$ y $\alpha 2$, β y κ). De especial importancia es la κ -caseína la cual da lugar a una disminución del tamaño de las micelas lo que conlleva una mejora en la estabilidad térmica y en la producción de queso. Por otro lado, la β -caseína está implicada en el control de los niveles de calcio. En 2003, Brophy *et al.* obtuvieron 11 terneros transgénicos mediante transferencia nuclear, de los cuales 9 producían leche con altos niveles de β y κ -caseína.

La modificación de las propiedades de la leche también podría ser beneficiosa en la salud humana. Un ejemplo es la expresión de la lactoferrina humana en la leche para consumo. Se han demostrado las propiedades antibacterianas, antifúngicas y antivirales que posee la lactoferrina humana. Además, esta proteína estimula el crecimiento intestinal de los recién nacidos alimentados con leche materna. La producción de la lactoferrina humana recombinante en la leche de cuatro vacas transgénicas en una alta concentración, es un paso prometedor para mejorar la defensa de los recién nacidos (van Berkel *et al.*, 2002). Además de la mejora del valor nutricional de la leche (menos grasa, sin lactosa, etc.), existen otros aspectos como la mejora del crecimiento y la supervivencia de los animales de granja en sus fases iniciales que puede conseguirse a través de la modificación de las características de la leche mediante la tecnología de transgénesis. Esto requiere la producción de animales transgénicos que produzcan leche: en mayor

cantidad, con alto contenido de nutrientes y/o que contenga proteínas con un efecto beneficioso (revisado por Gadea y García-Vázquez, 2010).

Producción de carne

La mejora de la composición de la carne así como el aumento de la producción de la misma o el índice de conversión alimentaria son importantes aplicaciones de la transgénesis en animales de granja. Uno de los primeros intentos en este aspecto fue la producción de ratones que expresaban la hormona del crecimiento de la rata. Estos ratones mostraron un incremento en la relación entre crecimiento y peso corporal (Palmiter *et al.*, 1982). Sin embargo, la expresión de la hormona del crecimiento en cerdos transgénicos mostró solo un ligero aumento en el crecimiento de estos animales y una gran incidencia de enfermedades (Pursel *et al.*, 1989). En años sucesivos se crearon cerdos que incorporaban el plásmido portador del gen de la hormona del crecimiento regulado por el promotor de la metalotioneína (Nottle *et al.*, 1999), mostrando importantes mejoras económicas traducidas en un aumento en la relación de crecimiento, índice de conversión alimentaria y grasa corporal, además de no presentar efectos adversos en la salud de estos animales.

Estudios realizados en razas bovinas mostraron que la mutación en el gen de la miostatina se relaciona con un aumento de la masa muscular (Grobet *et al.*, 1997). La miostatina es un regulador negativo del músculo esquelético en los mamíferos, y su deficiencia provoca un crecimiento muscular. Estos estudios ofrecen nuevas perspectivas en la aplicación de la transgénesis animal en producción animal.

OTRAS APLICACIONES

Resistencia a enfermedades

Otra importante aplicación de la transgénesis en la agricultura es la creación de animales resistentes a enfermedades. La mastitis es una enfermedad de la glándula mamaria causada por patógenos que encuentran su vía de infección a través del canal del pezón. Esta enfermedad causa a la industria láctea grandes pérdidas económicas en todo el mundo. Hasta la actualidad, no existe un tratamiento efectivo o estrategias reproductivas que aumenten la resistencia a la mastitis. Una alternativa es la producción de vacas transgénicas que incorporen el gen de la lisostafina. *Staphylococcus aureus* es el patógeno que causa la mastitis, y tiene especial sensibilidad a la lisostafina. En el año 2005, Wall *et al.* crearon las primeras vacas transgénicas con el gen de la lisostafina. Estos animales expresaban dicha proteína en el epitelio mamario secretándola en la leche y eliminando la bacteria de una manera dosis-dependiente.

Animales ecológicos

Otra de las aplicaciones de la transgénesis en producción animal es la cría de animales no contaminantes, como es el caso de la producción de cerdos transgénicos expresando fitasa en la saliva, lo que conlleva a una digestión del fósforo de la dieta y una disminución de la excreción del mismo en los purines reduciendo la contaminación (Golovan *et al.*, 2001).

Además, existen otras aplicaciones no relacionadas con la producción animal como son la generación de animales transgénicos como modelos de enfermedades humanas, animales transgénicos que reduzcan/eliminen el rechazo de órganos utilizados en xenotransplantes o como fábrica de proteínas farmacéuticas en los diferentes fluidos corporales (leche, orina, plasma seminal, sangre, etc.).

PROBLEMAS Y PERSPECTIVAS

La metodología de la transgénesis ha sido aplicada con relativo éxito en la mayoría de las especies de granja. Sin embargo, esta aplicación en la especie bovina ha sido relativamente baja debido a problemas técnicos, logísticos y financieros (Eyes-ton, 1999). Técnicamente hablando, la especie bovina es una de las especies más compleja para la producción de organismos modificados genéticamente debido a diferentes razones:

- La obtención de cigotos de una simple ovulación o incluso de hembras superovuladas es tediosa y muy costosa.
- Es una especie monotoca, lo que limita el número de embriones que pueden ser transferidos a una hembra receptora.
- La integración del transgén en esta especie es menor que en otras especies agrícolas.
- El intervalo generacional es largo.

El tiempo estimado para generar animales transgénicos, por ejemplo en el ganado vacuno, es de unos 5-7 años. Teniendo esto en cuenta, el beneficio económico introducido por la nueva característica debe ser significativo para compensar la pérdida de productividad provocada por la exclusión del programa de selección artificial. Por otra parte, el alto costo en el proceso de creación de transgénicos nos permite obtener sólo unos pocos animales modificados genéticamente. Por esta razón, se requiere un proceso laborioso de reintroducción de los animales en el rebaño por cruzamiento. Con el fin de que estos procesos sea económicamente factibles, es esencial poseer un profundo conocimiento acerca de los avances en la asistencia técnica de reproducción, tales como la inseminación artificial asociada a la transferencia de embriones, o la producción *in vitro* de embriones.

CONCLUSIONES

Día a día y año tras año, la biotecnología genética y reproductiva, entre las cuales encontramos la transgénesis, se desarrolla de una manera vertiginosa, permitiendo crear prácticamente “animales a la carta”. Sin embargo, cercano a la realidad encontramos los problemas sociales del uso y consumo de aquello que lleva por nombre “transgénesis animal”. Es muy probable que hasta cuando esta biotecnología no supere la barrera de la sociedad, y se demuestre fehacientemente el beneficio de la agricultura transgénica tanto para la salud de los animales como para los consumidores, no encontraremos en los mercados productos animales transgénicos para consumo humano.

AGRADECIMIENTOS

Al Dpto. de Fisiología de la Facultad de Veterinaria (Universidad de Murcia), en especial al Dr. Joaquín Gadea por introducirnos en el apasionante mundo de la transgénesis animal.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Brophy B, Smolenski G, Wheeler T, Wells D, L'Huillier P, Laible G. 2003. Cloned transgenic cattle produce milk with higher levels of beta-casein and kappa-casein. *Nat Biotechnol* 21: 157.
- Campbell KHS, McWhir J, Ritchie WA, Wilmut I. 1996. Sheep cloned by nuclear transfer from a cultured cell line. *Nature* 380: 64.
- Campbell KH, Fisher P, Chen WC, Choi I, Kelly RD, Lee JH, Xhu J. Somatic cell nuclear transfer: Past, present and future perspectives. 2007. *Theriogenology*. Sep 1(68) Suppl 1: 214.
- Cánovas S, Gutierrez-Adan A, Gadea J. 2010. Effect of exogenous DNA on bovine sperm functionality using the sperm mediated gene transfer (SMGT) technique. *Mol Reprod Dev* 77: 687.
- Cibelli JB, Stice SL, Golueke PJ, Kane JJ, Jerry J, Blackwell C, Ponce de León FA, Robl JM. 1998. Cloned transgenic calves produced from nonquiescent fetal fibroblasts. *Science* 280: 1256.
- Evans MJ, Kaufman MH. 1981. Establishment in culture of pluripotential cells from mouse embryos. *Nature* 292: 154.
- Eyeston WH. 1999. Production of transgenic cattle expressing a recombinant protein in milk. In: *transgenic animals in agriculture*. Edited by: JD Murray, GB Anderson, AM Oberbauer and MM McGloughlin. CABI publishing. ISBN: 0 85199 293 5. Pp: 177.
- Gadea J, García-Vázquez FA. Métodos de generación de cerdos transgénicos. 2010. *ITEA* 106: 15.
- García-Vázquez FA, García-Roselló E, Gutiérrez-Adán A, Gadea J. 2009. Effect of sperm treatment on efficiency of EGFP-expressing porcine embryos produced by ICSI-SMGT. *Theriogenology* 72: 506.
- García-Vázquez FA, Ruiz S, Matás C, Izquierdo-Rico MJ, Grullón LA, De Ondiz A, Vieira L, Avilés-López K, Gutiérrez-Adán A, Gadea J. 2010. Production of transgenic piglets using ICSI-sperm-mediated gene transfer in combination with recombinase RecA. *Reprod.* 140: 259.
- Golovan SP, Meidinger RG, Ajakaiye A, Cottrill M, Wiederkehr MZ, Barney DJ. 2001. Pigs expressing salivary phytase produce low-phosphorus manure. *Nat Biotechnol* 19: 741.
- Gordon JW, Scangos GA, Plotkin DJ, Barbosa JA, Ruddle FH. 1980. Genetic transformation of mouse embryos by microinjection of purified DNA. *Proc Natl Acad Sci USA* 77: 7380.
- Grobet L, Martin LJ, Poncelet D, Pirottin D, Brouwers B, Riquet J. 1997. A deletion in the bovine myostatin gene causes the double-muscling phenotype in cattle. *Nat Genet* 17: 71.

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

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

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

Lavitrano M, Camaioni A, Fazio VM, Dolci S, Farace MG, Spadafora C. 1989. Sperm cells as vectors for introducing foreign DNA into eggs: genetic transformation of mice. *Cell* 57: 717.

Lavitrano M, Bacci ML, Forni M, Lazzereschi D, Di Stefano C, Fioretti D, Giancotti P, Marfe G, Pucci L, Renzi L, Wang H, Stoppacciaro A, Stassi G, Sargiacomo M, Sinibaldi P, Turchi V, Giovannoni R, Della Casa G, Seren E, Rossi G. 2002. Efficient production by sperm-mediated gene transfer of human decay accelerating factor (hDAF) transgenic pigs for xenotransplantation. *Proc Natl Acad Sci USA* 99: 14230.

Maga EA, Anderson GB, Cullor JS, Smith W, Murray JD. 1998. Antimicrobial properties of human lysozyme transgenic mouse milk. *J Food Prot* 61: 52.

Melo EO, Canavessi AM, Franco MM, Rumpf R. 2007. Animal transgenesis: state of the art and applications. *J Appl Genet* 48: 47.

Nottle MB, Nagashima H, Verma PJ, Du ZT, Grupen CG, McIlpatrick SM, Ashman RJ, Harding MP, Giannakis C, Wigley PL, Lyons IG, Harrison DT, Luxford BG, Campbell RG, Crawford RJ, Robins AJ. 1999. Production and analysis of transgenic pigs containing a metallothionein porcine growth hormone gene construct. In: Murray, JD, Anderson GB, Oberbauer AM, McGloughlin MM. (eds.), *Transgenic Animals in Agriculture*. CABI Publishing, New York, USA. Pp. 145.

Palmiter RD, Brinster RL, Hammer RE, Trumbauer ME, Rosenfeld MG, Birnberg NC, Evans RM. 1982. Dramatic growth of mice that develop from eggs microinjected with metallothionein-growth hormone fusion genes. *Nature* 300: 611.

Pfeifer A. Lentiviral transgenesis. 2004. *Transgenic Res* 13: 513.

Pursel VG, Pinkert CA, Miller KF, Bolt DJ, Campbell RG, Palmiter RD. 1989. Genetic engineering of livestock. *Science* 244: 1281.

Rieth A, Pothier F, Sirard MA. 2000. Electroporation of bovine spermatozoa to carry DNA containing highly repetitive sequences into oocytes and detection of homologous recombination events. *Mol Reprod Dev* 57: 338.

Shemesh M, Gurevich M, Harel-Markowitz E, Benvenisti L, Shore LS, Stram Y. 2000. Gene integration into bovine sperm genome and its expression in transgenic offspring. *Mol Reprod Dev* 56: 306.

Takahashi K, Yamanaka S. 2006. Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. *Cell* 126:663.

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

Wall RJ, Powell AM, Paape MJ, Kerr DE, Bannerman DD, Pursel VG, Wells KD, Talbot N, Hawk HW. 2005. Genetically enhanced cows resist intramammary *Staphylococcus aureus* infection. *Nat Biotechnol* 23: 445.

Wheeler MB, Walters EM. Transgenic technology and applications in swine. *Theriogenology* 2001 56: 1345.

Whitelaw CB, Radcliffe PA, Ritchie WA, Carlisle A, Ellard FM, Pena RN, Rowe J, Clark AJ, King TJ, Mitrophanous KA. 2004. Efficient generation of transgenic pigs using equine infectious anaemia virus (EIAV) derived vector. *FEBS Lett* 571: 233.

Wilmot I, Schnieke AE, McWhir J, Kind AJ, Campbell KHS. 1997. Viable offspring derived from fetal and adult mammalian cells. *Nature* 385: 810.