



universidad
de león



FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y AMBIENTALES

**LA MODIFICACIÓN GENÉTICA EN GANADERÍA
COMO ESTRATEGIA ALTERNATIVA PARA LA
MEJORA DE LAS PRODUCCIONES ANIMALES**
GENETIC MODIFICATION IN LIVESTOCK AS AN
ALTERNATIVE STRATEGY FOR IMPROVING
ANIMAL PRODUCTION

Autor: Pablo Lariño González

Tutores: Yolanda Bayón González

Y Margarita Marqués Martínez

GRADO EN BIOTECNOLOGÍA

JULIO 2023

ÍNDICE

1. INTRODUCCIÓN	1
2. OBJETIVOS.....	2
3. METODOLOGÍA UTILIZADA EN LA BÚSQUEDA DE BIBLIOGRAFÍA.....	3
4. OBTENCIÓN DE ANIMALES MODIFICADOS GENÉTICAMENTE.....	4
4.1 Microinyección pronuclear y sus alternativas	4
4.2 Transferencia nuclear de células somáticas (SCNT) y <i>gene targeting</i>	5
4.3 Editores del genoma	7
5. APLICACIONES DE LA MODIFICACIÓN GENÉTICA A LA MEJORA DE LAS PRODUCCIONES ANIMALES	9
5.1 Modificaciones beneficiosas para la salud del consumidor	9
5.1.1. <i>Eliminación de proteínas alergénicas</i>	9
5.1.2. <i>Alimentos cardiosaludables</i>	10
5.2 Mejora del rendimiento productivo	13
5.2.1. <i>Rendimiento de la canal</i>	13
5.2.2 <i>Producción de lana y pelo</i>	17
5.2.3. <i>Rendimiento quesero</i>	19
5.3 Sostenibilidad de la Producción Animal	19
5.3.1 <i>Reducción del impacto ambiental</i>	19
5.3.2 <i>Adaptación al cambio climático</i>	22
5.3.3 <i>Mejora del manejo animal</i>	23
6. CONCLUSIONES	24
7. REFERENCIAS	25

RESUMEN

La finalidad de este Trabajo de Fin de Grado ha sido realizar una revisión bibliográfica sobre las aportaciones que la modificación genética puede ofrecer a la mejora de la producción en ganadería. Se han logrado resultados interesantes en investigaciones de ámbitos muy diversos como, por ejemplo, adaptaciones en alimentos con un beneficio para la salud del consumidor. También se han conseguido incrementos del rendimiento en la canal de los animales o la mejora de las propiedades de productos como la lana. Por otro lado, en el ámbito de la sostenibilidad se han abordado, con resultados valiosos, algunos estudios centrados en la protección del medio ambiente o la adaptación al cambio climático. Las diferentes investigaciones desarrolladas demuestran la eficacia y versatilidad de las modificaciones generadas, particularmente utilizando las actuales técnicas de edición genética.

Palabras Clave: Alimentos Cardiosaludables, Ganadería, Medio Ambiente, Modificación Genética, Rendimiento de la Canal, Sostenibilidad.

ABSTRACT

The purpose of this Final Degree Project has been to carry out a review on the contributions that genetic modification can offer to the improvement of livestock production. Interesting results have been achieved in research in very diverse fields such as, for instance, adaptations in foodstuffs with a benefit for the health of the consumer. Increases in animal carcass yield or improved properties of products such as wool have also been achieved. On the other hand, in the field of sustainability, some studies focused on environmental protection or adaptation to climate change have been carried out with valuable results. The various research projects carried out demonstrate the effectiveness and versatility of the modifications generated, particularly using current gene editing techniques.

Keywords: Carcass Yield, Enviroment, Genetic Modification, Heart-healthy foods, Livestock, Sustainability.

LISTADO DE ABREVIATURAS

- ASIP** (*agouti signaling protein gene*): gen de la proteína de señalización Agouti
- BLG** (*β -lactoglobulin*): β -lactoglobulina
- Cas** (*CRISPR associated gene*): gen asociado a CRISPR
- CLA** (*conjugated linoleic acid*): ácido linoleico conjugado
- CRISPR** (*clustered regularly interspaced short palindromic repeat*): repeticiones palindrómicas cortas agrupadas y regularmente espaciadas
- DSB** (*double-strand break*): rotura de doble cadena
- FGF5** (*fibroblast growth factor 5 gene*): gen del factor de crecimiento de fibroblastos 5
- GM** (*genetically modified*): modificado genéticamente
- HDR** (*homology directed repair*): reparación dirigida por homología
- IGF1** (*insulin like growth factor 1 gene*): gen del factor de crecimiento insulínico tipo 1
- IGF2** (*insulin like growth factor 2 gene*): gen del factor de crecimiento insulínico tipo 2
- MSTN** (*myostatin gene*): gen de la miostatina
- MUFA** (*monounsaturated fatty acids*): ácidos grasos monoinsaturados
- NHEJ** (*non-homologous end joining*): unión de extremos no homólogos
- PMEL** (*pre-melanosomal 17 protein gene*): gen de la proteína pre-melanosomal 17
- PUFA** (*polyunsaturated fatty acids*): ácidos grasos poliinsaturados
- SCD** (*stearoyl-CoA desaturase*): estearoil-CoA desaturasa
- SCNT** (*somatic cell nuclear transfer*): transferencia nuclear de células somáticas
- SFA** (*saturated fatty acids*): ácidos grasos saturados
- TALEN** (*transcription activator-like effector nucleases*): nucleasas efectoras de tipo activador de la transcripción
- WT** (*wild type*): silvestre
- ZFN** (*zinc finger nucleases*): nucleasas de dedos de zinc

1. INTRODUCCIÓN

La Producción Animal se puede considerar como un conjunto de conocimientos biológicos, técnicas de producción y sistemas de explotación, que tienen como objetivo la obtención de productos útiles al hombre, teniendo en cuenta su coste y calidad, respetando el medio ambiente y a los animales implicados (Buxadé, 1995).

En el ámbito de la ganadería a nivel global, Asia es el mayor productor de leche, con cifras tres veces más altas que Europa, segunda región en este aspecto. En cambio, en el caso de la producción de carne, destaca América, y particularmente América del Sur, con la mayor cantidad generada de carne de bovino (FAO, 2022). En la **Figura 1** se muestra una representación de la importancia relativa de las distintas producciones ganaderas para cada región, donde se observa que en todas ellas destaca la producción láctea. Según datos de la Oficina Europea de Estadística, en España existen más de 23 millones de cabezas de ganado porcino y más de 14 millones de ganado ovino, lo que nos sitúa en el primer lugar de la Unión Europea en ambas especies, mientras en ganado bovino ocupamos el cuarto lugar (INE, 2009). Las comunidades autónomas con más ganancias debido a las exportaciones en el sector agroalimentario fueron: Cataluña (12878 millones de euros -M€-) y Andalucía (12491 M€). Por otra parte, si nos referimos específicamente a la producción final ganadera, las comunidades que más destacan son: Cataluña (3435 M€) y Castilla y León (3102 M€) (Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación, 2022).

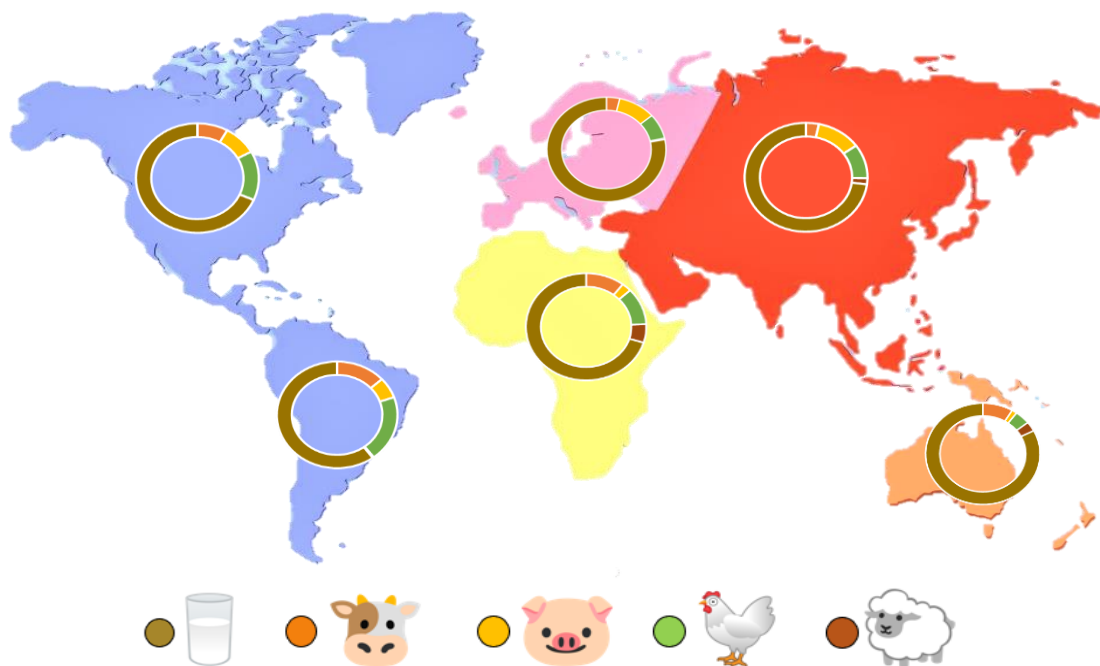


Figura 1. Representación relativa de la producción láctea y cárnica (ganado bovino, porcino, ovino y aves de corral) en cada región en miles de toneladas (OCDE-FAO, 2022) (Imagen de elaboración propia).

En términos generales, la Cría y Mejora Animal comenzó en el Neolítico, con la domesticación de las primeras especies ganaderas, asegurando así las reservas de alimentos para momentos de carestía. Aunque se considera que fue el ganadero R. Bakewell quien, en el siglo XVIII sentó las primeras bases de la Mejora Animal, es a principios del siglo XX cuando se fijan los conocimientos científicos que permitieron el desarrollo de esta disciplina. Entre las figuras importantes en estos inicios cabe citar a investigadores considerados pilares de la Genética Cuantitativa y la Genética de Poblaciones como R. Fisher, J. S. Haldane o S.G. Wright (Oldenbroek y Waaij, 2014). Sería pasada la mitad del siglo XX cuando descubrimientos cruciales en el área de la Genética Molecular, hicieron posible la implementación en el ámbito de la Mejora Genética Animal de estrategias como la selección asistida por marcadores o la selección genómica. Asimismo, el desarrollo actual de las metodologías de modificación genética permite prever su incorporación como una estrategia más.

En 1985, los avances en la tecnología de ADN recombinante y la microinyección pronuclear en cigotos se aplicaron por primera vez en animales de granja (en concreto conejo, oveja y cerdo), consiguiendo la expresión del gen de la hormona de crecimiento humano controlada por el promotor de la metalotioneína I de ratón (Hammer *et al.*, 1985). Con posterioridad, la utilización de la transferencia nuclear permitió un importante desarrollo de la modificación genética en especies ganaderas (Schnieke *et al.*, 1997).

Las finalidades prácticas que se han perseguido han sido muy diversas. Una de las principales es la utilización de estos animales como biorreactores (*molecular pharming*), es decir, emplear las rutas metabólicas para sintetizar biomoléculas que posteriormente serán purificadas de fuentes como la leche, clara de huevo o plasma seminal (Lievens *et al.*, 2015). En la actualidad se comercializan algunos productos terapéuticos humanos, que se obtienen de animales transgénicos. Otras aplicaciones destacables de los animales modificados genéticamente se centran en su potencial en xenotrasplantes, la generación de modelos de enfermedades humanas, la obtención de animales resistentes a enfermedades o la mejora de las producciones animales.

2. OBJETIVOS

En el presente Trabajo de Fin de Grado se realiza una revisión bibliográfica, sobre el último aspecto citado, es decir, la aplicabilidad de la modificación genética para la mejora de las producciones animales en el ámbito de la ganadería. El principal objetivo es valorar cómo esta metodología puede suplir determinadas necesidades específicas, complementando las

estrategias de la Mejora Genética que se aplican en la actualidad. Los objetivos específicos, que se recogen en la **Figura 2**, fueron:

- Analizar las modificaciones realizadas en beneficio de la salud del consumidor.
- Valorar las estrategias utilizadas para la mejora del rendimiento productivo en los animales modificados.
- Identificar las investigaciones llevadas a cabo con el fin de mejorar la sostenibilidad de las producciones.

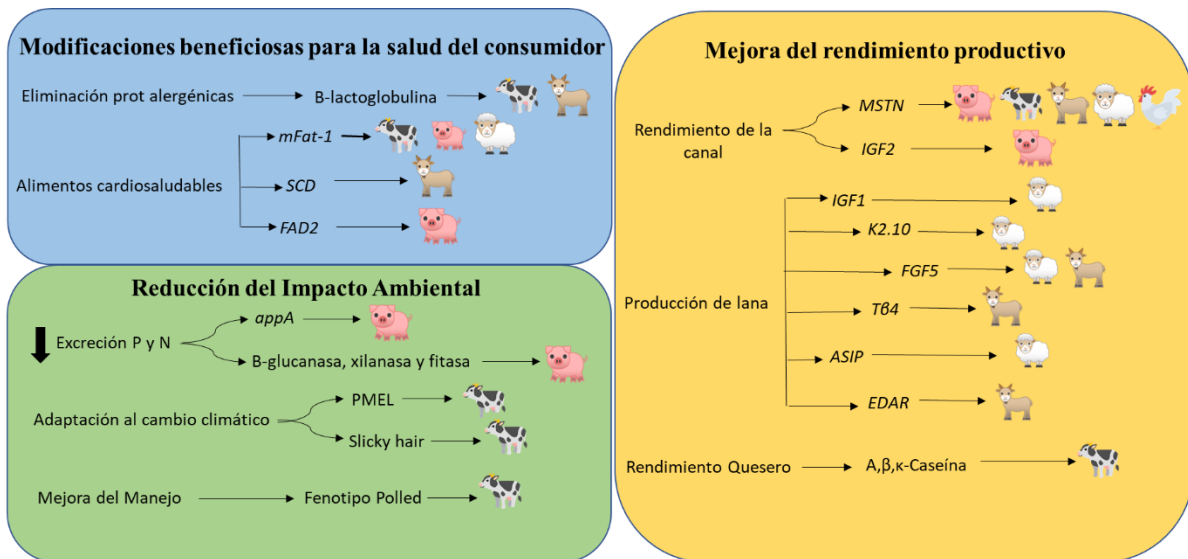


Figura 2. Esquema central donde se contemplan los distintos ámbitos de estudio en la modificación genética orientada a la mejora de las producciones animales (Imagen de elaboración propia).

3. METODOLOGÍA UTILIZADA EN LA BÚSQUEDA DE BIBLIOGRAFÍA

Para recopilar los artículos a partir de los cuales se llevó a cabo esta revisión bibliográfica se emplearon bases de datos como *PubMed*, *Springerlink* o *Scopus*. Para optimizar las búsquedas y tratar de restringir los resultados a los artículos de nuestro interés se han seguido una serie de pasos:

1. Establecer una batería de palabras que nos permitan definir los temas de los que van a tratar los artículos: *transgenic*, *genetically modified*, *genome editing* o *livestock* entre otras, separadas por operadores booleanos como “AND”. Además, se empleó un filtro por especies ganaderas, para mostrar las publicaciones relacionadas fundamentalmente con el ganado bovino, ovino, caprino, porcino o avícola.
2. Aplicar una restricción de tiempo a los resultados obtenidos de las bases de datos, mostrándose solo los artículos publicados desde hace 10 años hasta la actualidad.

3. A la hora seleccionar los artículos, se realiza una lectura del resumen, lo que permite descartar aquellos cuyo contenido no se ajuste al tema del trabajo.
4. A partir de los artículos seleccionados, obtener otros estrechamente relacionados, bien a través de la bibliografía de dichos trabajos o empleando el buscador *Google Scholar* que permite obtener aquellas publicaciones que presenten el artículo seleccionado en sus referencias.

Es necesario destacar que, para determinados apartados de esta revisión también se ha modificado la ‘naturaleza’ de las publicaciones a la hora de realizar la búsqueda. De este modo, en el apartado centrado en las aplicaciones de la modificación genética se han usado, en su mayoría, artículos de investigación, mientras que, para el apartado de las técnicas de modificación genética, se han empleado, principalmente, artículos de revisión y capítulos de libro para obtener una visión más amplia de las distintas metodologías.

4. OBTENCIÓN DE ANIMALES MODIFICADOS GENÉTICAMENTE

4.1 **Microinyección pronuclear y sus alternativas**

La primera metodología utilizada para la obtención de animales transgénicos fue la microinyección pronuclear (Gordon *et al.*, 1980). Se basa en la inyección directa de la construcción de ADN en uno de los pronúcleos de un cigoto (**Figura 3A**) que, seguidamente, es transferido a una hembra receptora. Este procedimiento es muy poco eficiente en animales domésticos, ya que sólo 5-8 % de los animales que nacen son transgénicos (Li *et al.*, 2016) y, además, presenta una limitación importante, como es la ausencia de control sobre la región de integración del transgén en el genoma, pudiéndose producir efectos de posición y patrones de expresión inadecuados.

Para tratar de compensar la baja eficiencia asociada a la microinyección pronuclear, se desarrollaron diferentes alternativas para la introducción del transgén en el cigoto, incluyendo la utilización de genomas virales modificados o de transposones.

El uso de vectores lentivirales (**Figura 3B**) ha demostrado ser una técnica muy eficiente para la generación de animales modificados genéticamente como rumiantes, conejos o aves, entre otros (Hiripi *et al.*, 2010; Lu *et al.*, 2013; Crispo *et al.*, 2015b). El proceso de producción de las partículas virales recombinantes se basa en la transfección de unas células conocidas como empaquetadoras, con un vector que contiene el transgén de interés flanqueado por las secuencias de integración características del virus, además de los vectores de empaquetamiento

(con los genes virales *gag* y *pol*) y de pseudotipado (con el gen de la envuelta, *env*). De esta forma se obtienen las partículas virales que se utilizarán para la modificación genética, ya sea mediante microinyección en el espacio perivitelino o transducción tras eliminación de la zona pelúcida (Fässler, 2004).

Por lo que respecta a los transposones (**Figura 3C**), los empleados en modificación genética son de clase II. De manera natural, estos son elementos móviles del genoma que pueden desplazarse mediante un mecanismo de corta-pegar, por el que una secuencia precisa de ADN es escindida de una zona del genoma e incorporada en otra distinta (Yum *et al.*, 2016). Esta propiedad puede ser aprovechada para dirigir la integración de un transgén, microinyectando en el cigoto el transposón junto con un vector de expresión que permita la expresión de la transposasa (Tan *et al.*, 2012).

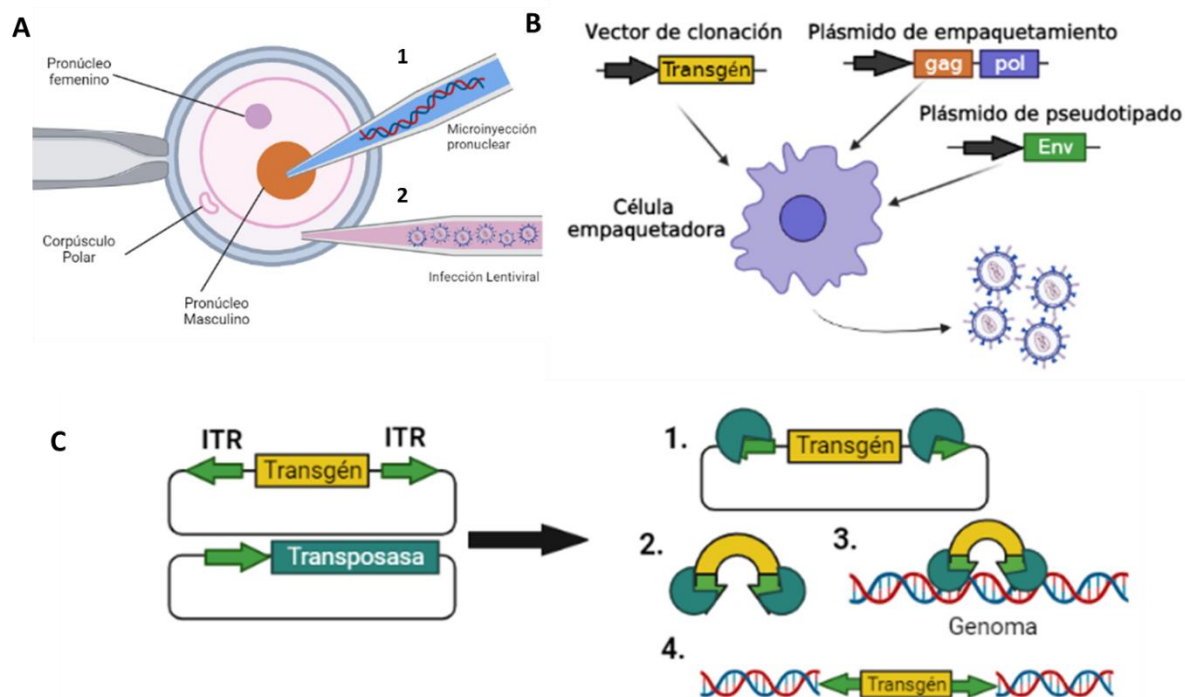


Figura 3. A) Modificación genética en cigotos mediante microinyección pronuclear de DNA (1) o infección de partículas lentivirales en el espacio perivitelino del cigoto (2). B) Metodología para la producción de partículas lentivirales. C) Funcionamiento de los sistemas de transposición en transgénesis. (1): La transposasa se une a las secuencias ITR (*inverted terminal repeat*) del transposón que flanquean el transgén; (2-4): el transgén es escindido del transposón e integrado en el genoma del cigoto (Imágenes de elaboración propia mediante BioRender).

4.2 Transferencia nuclear de células somáticas (SCNT) y *gene targeting*

La transferencia nuclear como técnica orientada a la generación de animales transgénicos consiste en la reconstrucción de un embrión mediante la transferencia de una célula somática con el genoma previamente modificado en un ovocito enucleado, para producir un embrión con las características genéticas deseadas (Polejaeva, 2021). Es importante destacar que, a pesar de

la limitada eficiencia de la técnica de clonación (Wang *et al.*, 2020), es la metodología más frecuentemente empleada en los artículos revisados para este trabajo. El proceso general se muestra en la Figura 4 y comprende el cultivo, modificación genética y selección, de las células somáticas donantes de núcleo; la enucleación de ovocitos y la transferencia nuclear y, finalmente, el cultivo de embriones y la transferencia a la hembra receptora en la que tendrá lugar la gestación (Ranjitha *et al.*, 2022).

Una de las principales ventajas que presenta la transgénesis vía SCNT es la posibilidad de realizar una modificación genética precisa de una secuencia diana (“*target*”) del genoma de las células donantes mediante *gene targeting*. Esta tecnología se basa en el mecanismo de recombinación homóloga, que se produce como consecuencia de un doble sobrecruzamiento entre las secuencias del gen diana y las regiones homólogas clonadas en un vector, denominado vector de *gene targeting*. La eficacia de este sistema quedó demostrada cuando McCreath *et al.* (2000) generaron corderos en los que se había modificado específicamente el gen del $\alpha 1$ procolágeno (*COL1A1*), combinando SCNT con *gene targeting*.

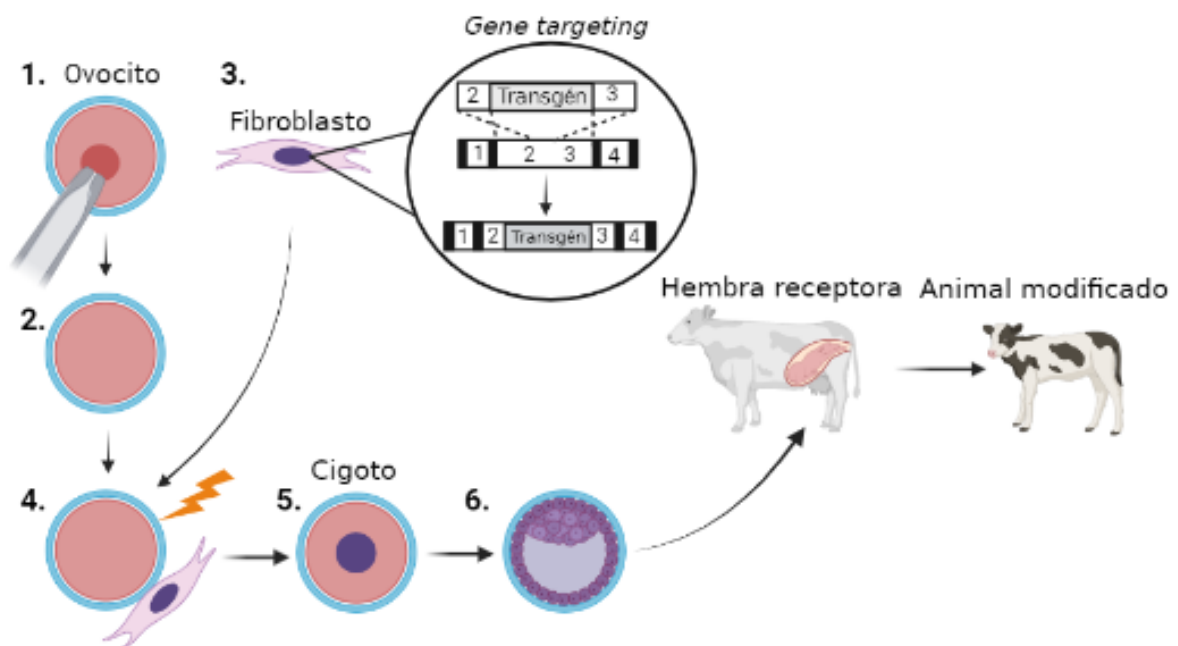


Figura 4. Generación de animales con modificaciones genéticas precisas mediante *gene targeting* y transferencia nuclear de células somáticas (SCNT). (1, 2) Obtención de ovocitos de una hembra donante y enucleación. (3) Transfección de la célula somática (por ejemplo, un fibroblasto fetal) con un vector de *gene targeting* y selección de la célula portadora de la modificación deseada para utilizarla como donante del material genético nuclear. (5) Estimulación química para que comience el desarrollo embrionario. (6) Transferencia a la hembra receptora. Imagen de elaboración propia mediante BioRender, basada en: Ga *et al.* (2007) y Lee *et al.* (2021).

4.3 Editores del genoma

Estos sistemas han supuesto la mayor revolución de las últimas décadas en el ámbito de la modificación genética. La aplicabilidad y practicidad de la edición génica ha ido mejorando desde los primeros editores, las ZFNs (*Zinc Finger Nucleases*), seguido de las TALENS (*Transcription Activator-Like Effector Nucleases*) y, por último, el sistema CRISPR/Cas9 (*Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeat/CRISPR Associated gene*) (Perleberg *et al.*, 2018).

Las ZFN son nucleasas programables creadas artificialmente mediante la fusión de dos módulos proteicos: un módulo de unión al ADN del tipo “dedos de zinc” (ZF) y el dominio con actividad nucleasa de la enzima de restricción *FokI*. Cada ZF individual consta, aproximadamente, de 30 aminoácidos y reconoce un triplete de nucleótidos de la secuencia de ADN (**Figura 5A**). Por ello, una de las claves para la aplicación de este editor para el reconocimiento de secuencias específicas en el genoma fue el diseño de *arrays* que contuviesen varios dominios ZF. De este modo, el empleo de 3 a 6 módulos permite el reconocimiento de secuencias de 9-18 pb de longitud, suficiente para conferir especificidad. Respecto al dominio nucleasa de *FokI*, una característica a destacar es que tiene que dimerizar para cortar el ADN (Gaf *et al.*, 2013). Por tanto, un par de ZFN deben unirse al ADN en una distancia y orientación adecuadas para posibilitar la dimerización de *FokI* (Shamshirgaram *et al.*, 2022).

Al igual que las ZFN, los editores TALEN (**Figura 5B**) también son proteínas quiméricas producidas por la unión de una serie de módulos de unión al ADN (TALE) y el dominio con actividad nucleasa de *FokI*. Cada TALE tiene una longitud de 33 a 35 aminoácidos que reconocen un solo nucleótido en la secuencia de ADN diana. Al igual que ocurre con las ZFN, deben diseñarse un par de TALEN para permitir la dimerización de *FokI* y el consiguiente corte en el ADN (Gaf *et al.*, 2013). En comparación con el sistema anterior, el diseño de TALEN es más sencillo y requiere de menos tiempo; no presenta limitaciones en la selección de sitios diana, y el número de efectos *off-target* es menor. Sin embargo, son sustancialmente más grandes, lo que dificulta su transfección en las células (Perisse *et al.*, 2021).

A diferencia de los editores genéticos descritos anteriormente, el sistema CRISPR/Cas9 ha surgido como una alternativa potencialmente más fácil de diseñar y muy eficiente para introducir alteraciones genéticas específicas. El reconocimiento de la secuencia diana en el ADN tanto en el caso de ZFN como en TALEN se lleva a cabo a través de ingeniería de proteínas, necesitando una correcta organización y ensamblaje de los módulos TALE o ZF para

cada nueva secuencia de interés. Por el contrario, el sistema CRISPR/Cas9 (**Figura 5C**) ofrece una mayor simplicidad, ya que el reconocimiento se realiza mediante una molécula de ARN guía complementaria de la secuencia diana (Menchaca *et al.*, 2020).

En esencia, el sistema requiere de la nucleasa Cas9, que lleva a cabo el corte en el ADN, y del sgRNA o ARN guía, que formará un complejo ribonucleoproteico con la Cas9 y la trasladará hasta la secuencia diana. La longitud de la molécula de sgRNA es de aproximadamente 100 nucleótidos de ARN monocatenario, de los cuales 80 nucleótidos son constantes y contribuyen a la formación de una estructura particular (tracrRNA) que Cas9 tiene que reconocer. Los otros 20 nucleótidos son complementarios a la secuencia diana en el ADN y se diseñan en función de esta (Shamshirgaram *et al.*, 2022).

Estos editores del genoma brindan la posibilidad de modificar con elevada eficiencia el genoma, a través de la generación de una rotura de doble hebra (DSB) en el ADN (**Figura 5D**), en un gen de interés predeterminado (Tan *et al.*, 2016). La modificación puede consistir en inactivar dicho gen a causa de inserciones o deleciones introducidas vía reparación de extremos no homólogos (NHEJ), o bien en el reemplazamiento de la secuencia diana con un fragmento de DNA exógeno mediante la reparación dirigida por homología (HDR).

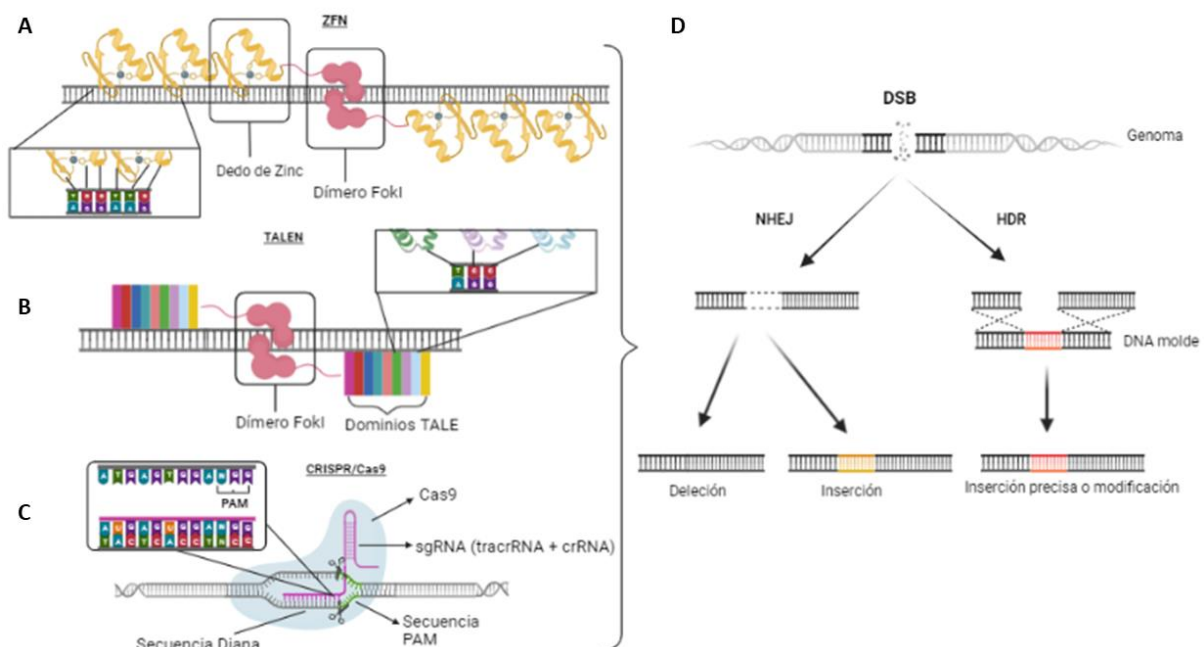


Figura 5. Sistemas de edición génica. A) Estructura de las ZFN (cada dedo de zinc reconoce 3 nucleótidos). B) Representación del editor TALEN (cada dominio TALE reconoce 1 nucleótido). C) Sistema CRISPR/Cas9. D) Mecanismo de reparación de una rotura de doble hebra (DSB) en el ADN mediante unión de extremos no homólogos (NHEJ) o reparación dirigida por homología (HDR) (Imagen de elaboración propia mediante BioRender).

5. APLICACIONES DE LA MODIFICACIÓN GENÉTICA A LA MEJORA DE LAS PRODUCCIONES ANIMALES

5.1 Modificaciones beneficiosas para la salud del consumidor

5.1.1. Eliminación de proteínas alergénicas

Las alergias son reacciones de hipersensibilidad tipo I (**Figura 6A**), mediadas generalmente por inmunoglobulinas de tipo IgE, donde el propio alérgeno provoca una interacción anómala con estas IgE unidas a la superficie de mastocitos y basófilos, desencadenando la liberación de sus mediadores internos, causantes de diversos síntomas (Rajani *et al.*, 2020). En nuestro contexto, tiene particular importancia la alergia de algunas personas a la β -lactoglobulina (BLG), que es la principal proteína del suero de la leche de vaca y que, aunque es producida por muchos mamíferos no se encuentra en la leche humana. Los síntomas de esta reacción aparecen más frecuentemente en bebés y pueden ser de tipo cutáneo, digestivo, respiratorio, o en los casos más graves de *shock* anafiláctico (Chavarrias, 2022). Los métodos clásicos para generar formulas hipoalergénicas se basan en la hidrólisis enzimática de la proteína; sin embargo, este método no es del todo funcional pues los péptidos resultantes de la fragmentación aún contienen antigenicidad residual, además del elevado coste del proceso, y el sabor amargo de la leche a causa de la exposición de aminoácidos hidrófobos (Jabed *et al.*, 2012).

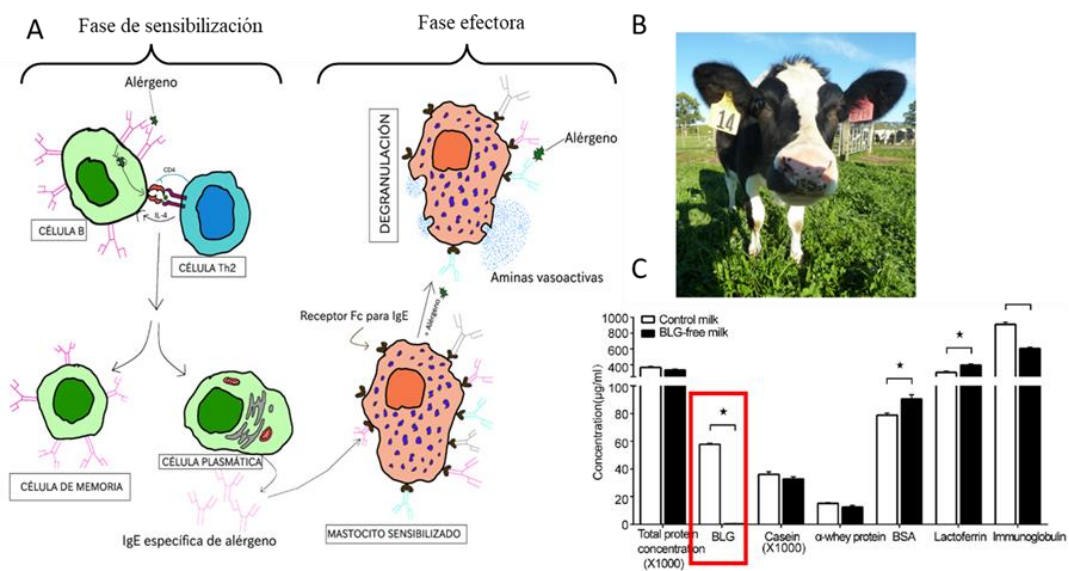


Figura 6. A) Esquema de las fases de la reacción de hipersensibilidad tipo I (Imagen de elaboración propia). B) Foto de la vaca *knock-down* productora de leche hipoalergénica, obtenida por Jabed *et al.* (2012). C) Concentración de diversas proteínas en muestras de leche control (blanco) y de vacas modificadas genéticamente (negro). Los niveles de β -lactoglobulina se resaltan mediante un cuadro rojo (Sun *et al.*, 2018).

Se han realizado diversas investigaciones, sobre todo en ganado vacuno, destinadas a generar animales modificados genéticamente cuya leche no contenga β -lactoglobulina. Uno de los

primeros éxitos se obtuvo basándose en la tecnología de microRNAs, que inducen la degradación del RNA mensajero e inhiben su traducción. Así, mediante modificación de fibroblastos fetales y transferencia nuclear se logró obtener una vaca *knock-down* (Daisy, **Figura 6B**) que no producía BLG en la leche (Jabed *et al.*, 2012). Con posterioridad se han obtenido, mediante edición génica, animales *knock-out* que no sintetizan BLG, utilizando por ejemplo las herramientas ZFN (Sun *et al.*, 2018) (**Figura 6C**) o TALEN (Wei *et al.*, 2018), ambos en ganado vacuno, o el sistema CRISPR/Cas9 en cabra (Zhou *et al.*, 2017).

5.1.2. Alimentos cardiosaludables

En la actualidad, las enfermedades no transmisibles (ENT) son protagonistas de numerosos programas de concienciación social, pues se han establecido como las causantes de tres cuartas partes de las muertes a nivel global. En el caso de las enfermedades cardiovasculares, los estudios epidemiológicos, clínicos y animales las han relacionado con un consumo elevado de grasas, particularmente las que contienen niveles altos de ácidos grasos saturados (SFA), que pueden incrementar el nivel de colesterol y el riesgo de aterosclerosis, mientras que los **ácidos grasos monosaturados (MUFA) y poliinsaturados (PUFA)** son más saludables (Kromhout *et al.*, 2002). Por ello, se ha sugerido que una forma de disminuir el riesgo se basaría en modificar la composición de la grasa de los alimentos.

Es de señalar el caso de la leche, cuyo consumo directo o de sus derivados constituye una parte importante de la dieta en muchas regiones. En la leche de especies como vaca, oveja y cabra, la proporción de SFA supone más del 70 % de los ácidos grasos, cuando la cantidad recomendada no excedería del 8 % (Shingfield *et al.*, 2008). Dado que tal reducción no es posible cambiando la alimentación del animal, una estrategia que se ha investigado es la modificación genética de los animales productores, para que expresen ciertas enzimas de tipo desaturasas. Así, Reh *et al.* (2004) generaron, mediante microinyección pronuclear, cabras transgénicas que integraron el gen de la enzima esteroil-CoA desaturasa (SCD) de rata, bajo el control del promotor de la β -lactoglobulina bovina (de expresión específica en tejido mamario). Los resultados indicaron que dos, de las cuatro hembras transgénicas presentaban, al principio de la lactación (día 7), una grasa de la leche con menor proporción de SFA, con un incremento de la proporción de ácidos grasos monosaturados (MUFA), aunque el efecto disminuyó al avanzar la lactación (día 30) (**Figura 7**). Es de señalar que en otra de las hembras se comprobó que la expresión de SCD había originado un incremento del isómero 18:2 cis9 trans11 del ácido linoleico conjugado a partir de la forma monosaturada C18:1 trans11. Este

resultado es muy interesante dado que se sabe que las **formas conjugadas del ácido linoleico (CLA)** y, en particular el isómero citado, tienen propiedades potencialmente anticancerígenas y anti-ateroscleróticas, y pueden, entre otros efectos, disminuir la acumulación de grasa y regular la respuesta inmunológica (Reh *et al.*, 2004).

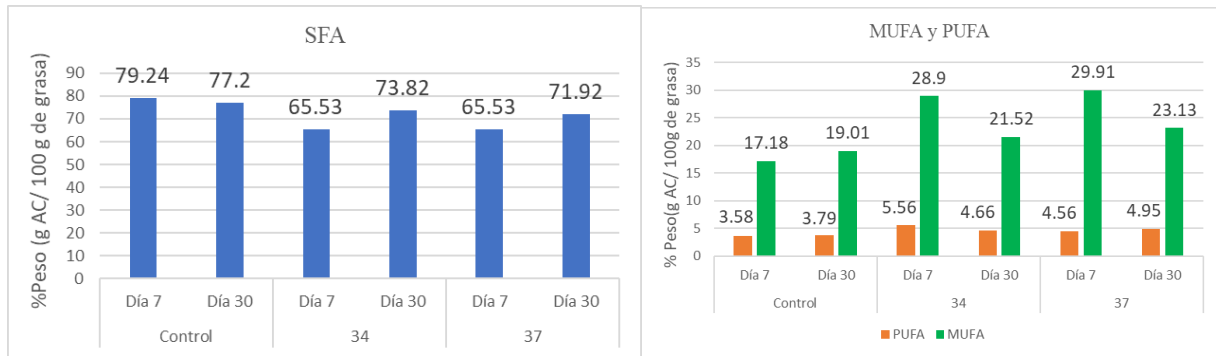
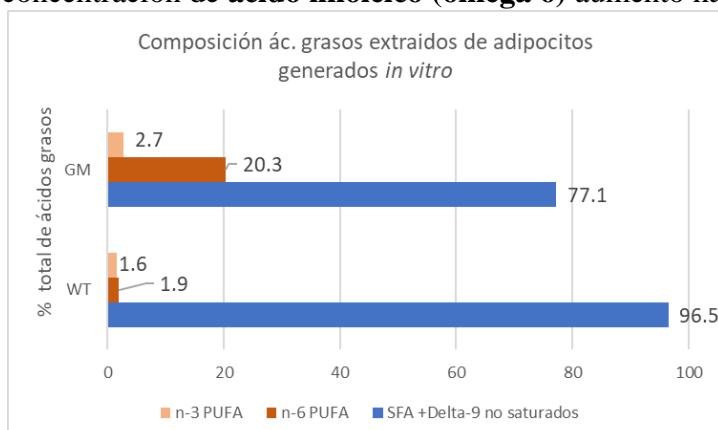


Figura 7. Perfiles globales de SFA, MUFA y PUFA, en los individuos transgénicos y control, medidos en los días 7 y 30 de lactación. Gráfico de elaboración propia a partir de los resultados de Reh *et al.* (2004).

Otro aspecto importante respecto a la composición de la grasa de los alimentos se refiere a los PUFA llamados omega 6 (n-6) y omega 3 (n-3), derivados del ácido linoleico (18:2, n-6) y linolénico (18:3, n-3), respectivamente. Estos se conocen como **ácidos grasos esenciales** y deben ser aportados en la dieta, dado que tanto el hombre como el resto de los mamíferos carecen de las enzimas necesarias para su síntesis. Por ello, algunos estudios han ido dirigidos a obtener animales transgénicos que expresaran estas enzimas procedentes de otros organismos. Este es el caso de Saeki *et al.* (2004), quienes mediante microinyección pronuclear, generaron cerdos que incorporaron el gen de la $\Delta 12$ desaturasa de ácidos grasos (FAD2) (con actividad n-6) propio de *Spinacia oleracea* (espinaca) bajo un promotor murino específico de adipocitos. Dicho estudio fue el pionero en comprobar la eficacia de la expresión de un gen de planta en un mamífero.

Al analizar la composición procedente de la biopsia de tejido adiposo blanco, la concentración de **ácido linoleico (omega 6)** aumentó hasta un 20 % frente a los controles. Por



otra parte, en el ensayo *in vitro* la concentración de este mismo compuesto fue 10 veces mayor en los animales transgénicos (**Figura 8**).

Figura 8. Composición de ácidos grasos en adipocitos generados *in vitro* de cerdos transgénicos (GM) y controles (WT). Gráfica elaborada a partir de los resultados de Saeki *et al.* (2004).

No obstante, entre los ácidos grasos poliinsaturados (PUFA), los que se consideran más importantes en la dieta son los **omega-3**. Esta familia de ácidos grasos esenciales presenta una gran relevancia, no sólo por sus efectos beneficiosos en pacientes con enfermedades cardiovasculares, sino también en relación con otras patologías, como la depresión, cáncer, o enfermedades autoinmunes (Shahidi y Ambigaipalan, 2018). Este grupo lo componen los ácidos grasos que derivan del ácido linolénico y entre sus fuentes podemos citar pescados como el salmón, halibut o el bacalao, semillas como la chía o la nuez, y también algunos aceites vegetales (Shahidi y Ambigaipalan, 2018).

Por otro lado, se sabe que en la dieta es conveniente una proporción adecuada entre los ácidos grasos omega 6 y omega 3, donde el ideal sería de 1:1, mientras que en la alimentación humana actual esa proporción puede encontrarse en el rango 8/1-16/1 para n-6/n-3 (Simopoulos, 2003). En base a esto, una estrategia abordada para aumentar la concentración de ácidos grasos omega 3 ha sido la expresión del gen *fat-1* procedente de *Caenorhabditis elegans* o *Caenorhabditis brigssae*. La enzima codificada por dicho gen cataliza la conversión de los ácidos grasos omega-6 (n-6) a omega-3 (n-3), mediante la incorporación de un doble enlace adicional. Los primeros estudios se realizaron en 2004 en modelos murinos (Kang *et al.*, 2004). Desde entonces, se ha trasladado esta tecnología a especies ganaderas (**Figura 9**).

Entre estas investigaciones podemos citar las de Lai *et al.* (2006) y Zhang *et al.* (2012) en cerdo, Zhang *et al.* (2013) en oveja y Wu *et al.* (2012) en vacuno. En ellas se analizó la grasa muscular, y en el caso de Wu *et al.* (2012) también la de la leche. El vector de expresión utilizado en todos estos ensayos fue similar. Tal y como se observa en la **Figura 9A**, constaba de un promotor sintético de expresión constitutiva (CAG) seguido de la secuencia codificante del gen *fat-1* adaptado para mamíferos, y un *cassette* de selección positiva (promotor-*neo*). El vector se utilizó para modificar fibroblastos fetales en cultivo y se generaron los animales transgénicos mediante transferencia nuclear. En todos estos estudios se consiguió una adecuada expresión del gen *mfat-1* en los individuos transgénicos generados, que se tradujo en una disminución del contenido en ácidos grasos n-6 y un aumento de los n-3 (**Figura 9B y 9C**) poniendo así de manifiesto la utilidad de este sistema para la producción de alimentos con un contenido lipídico más saludable.

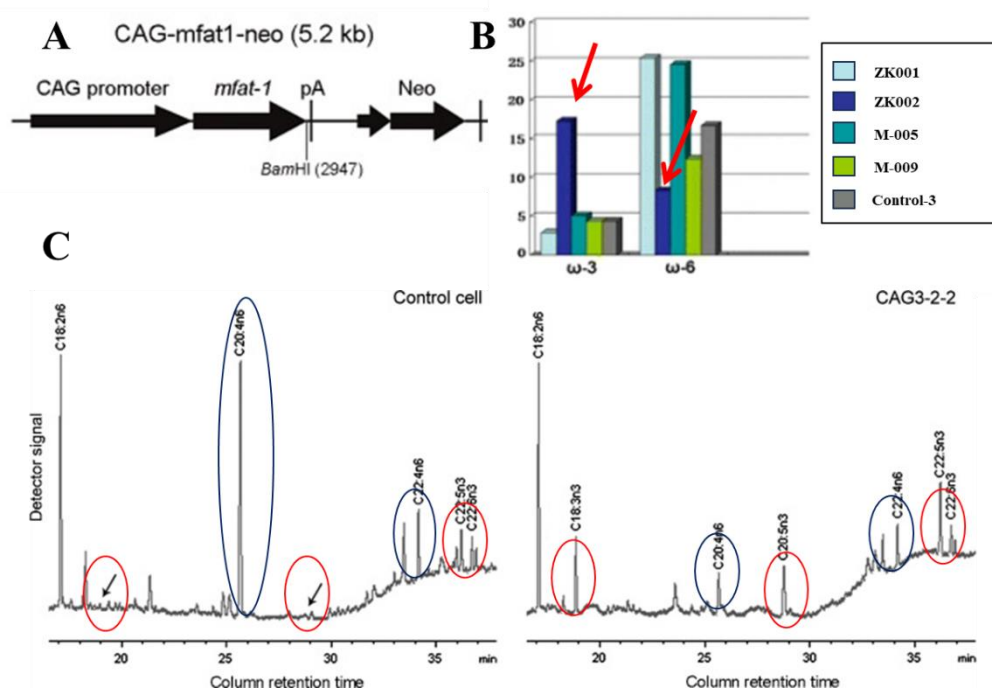


Figura 9. A) Vector empleado para la expresión en animales de granja del gen *mfat-1* propio de *Caenorhabditis elegans* (Zhang *et al.*, 2013). B) Histograma comparativo para los niveles de ácidos grasos n-6 y n-3 de una vaca transgénica (ZK002/azul oscuro), señalada con flechas negras, respecto a otras no transgénicas (Wu *et al.*, 2012). C) Perfil de ácidos grasos generado por cromatografía de gases para células control (izda.) y transgénica (dcha.). Se puede observar cómo aumentan los niveles de n-3 (óvalos rojos) y se reducen los de n-6 (óvalos azules) respecto a los controles (Zhang *et al.*, 2012).

5.2 Mejora del rendimiento productivo

5.2.1. Rendimiento de la canal

De acuerdo con las estimaciones realizadas por la FAO, en el año 2050 la población mundial habrá alcanzado los 9,1 billones de personas, cifra un 34 % más alta que en la actualidad (FAO, 2009). Con el fin de alimentar a la creciente población, en su mayoría urbana, la producción de alimentos deberá incrementarse en un 70 %. Concretamente, se estima que la producción cárnica, objeto de estudio de este apartado, aumentará en alrededor de 200 millones de toneladas, alcanzando así los 470 millones. Para poder hacer frente a esta producción de forma sostenible, las técnicas de mejora convencional deberán ser complementadas con nuevas estrategias a las que la modificación genética puede contribuir, por ejemplo, aumentando el rendimiento cárnico del animal. En este contexto, entre los genes diana de la modificación que se han investigado se encuentran principalmente *IGF2* y *MSTN*.

IGF2 (*Insulin Like Growth Factor 2*) codifica un factor de crecimiento prenatal que afecta a la masa del músculo esquelético y el depósito de grasa, a través de la regulación de la expresión de MyoD (proteína 1 de diferenciación miogénica) y de la diferenciación del metabolismo de

preadipocitos (Sélénou *et al.*, 2022). Los estudios llevados a cabo por Xiang *et al.* (2018) establecieron, mediante mapeo de QTLs que la variación de un nucleótido en el intrón 3 de este gen es un objetivo idóneo para aumentar la producción de carne magra. Tras esto, microinyectaron el sistema CRISPR/Cas9 en cigotos porcinos para producir diversas mutaciones en dicho intrón y así generar cerdos con la modificación deseada. Cruzando dos de estos machos con hembras *Wild Type*, obtuvieron una piara de 20 cerdos F1, de los cuales 14 presentaban alelos mutados. De acuerdo con los resultados obtenidos en la generación F1, mostrados en la **Figura 10**, consiguieron elevar características como el peso corporal y el peso de la canal hasta un 34 %.

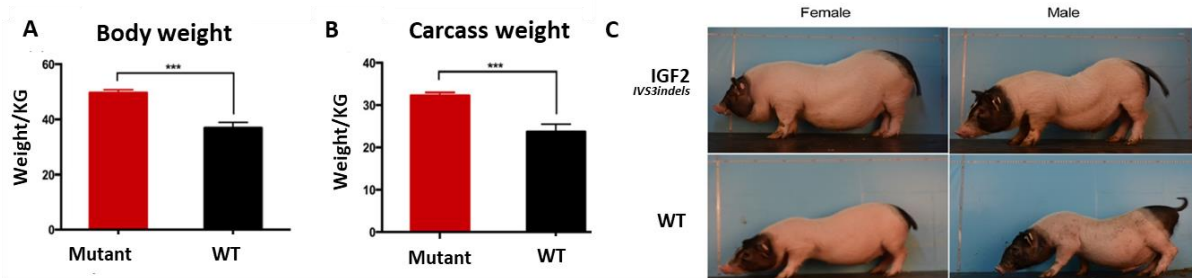


Figura 10. A) y B) Peso corporal y peso de la canal de los animales modificados genéticamente (*IGF2^{ivs3 INDELS}*) frente a los individuos *Wild Type* (WT) (Xiang *et al.*, 2018). C) Imágenes de animales de ambos sexos de los genotipos indicados (Xiang *et al.*, 2018).

Por su parte, la miostatina o factor 8 de crecimiento y diferenciación (GDF-8), pertenece a la superfamilia del factor de crecimiento β (TGF- β) y está implicada en la inhibición de la miogénesis a través de diferentes rutas de señalización (**Figura 11A**). Se expresa, mayoritariamente, en las células del músculo esquelético, y circula por la sangre en forma de propéptido, cuya escisión es necesaria para la activación de la función. Juega un papel importante como regulador negativo del desarrollo muscular, determinando un fenotipo de hipertrofia muscular (Lee *et al.*, 2020; Li *et al.*, 2020). De forma natural, la presencia de este fenotipo se había detectado principalmente en algunas razas de ganado como el vacuno y ovino, causado por mutaciones en el gen codificante (*MSTN*). Sobre esta base se han abordado, con resultados notables, numerosas investigaciones de modificación genética con el objetivo de inhibir la producción de miostatina en especies ganaderas. En la **Tabla 1** se recogen las investigaciones más destacables, la mayor parte de las cuales han utilizado el sistema de edición génica CRISPR/Cas9. Es necesario concretar que, a excepción de Lee *et al.* (2020) y O'Hara *et al.* (2021), quienes introdujeron mutaciones de tipo *knock-down*, el resto se basaron en la anulación de la expresión génica generando individuos *knock-out*. Además, Zhang *et al.* (2018) y Ge *et al.* (2021), de forma simultánea al *knock-out* para *MSTN* introdujeron otras secuencias génicas específicas, dando lugar a modificaciones del tipo *knock-out/knock-in*.

Tabla 1. Ejemplos de edición génica mediante el sistema CRISPR para la modificación del gen *MSTN* en diferentes especies ganaderas.

Animal objeto de la modificación	Tipo Celular	Técnica de modificación	Metodología de transferencia	Referencia
Cabra Alpha Cashmere	GFF	CRISPR/TALEN	SCNT	(Zhang <i>et al.</i> , 2019)
Cabra Shaanbei Cashmere	Cigoto	CRISPR/Cas9	Microinyección	(Li <i>et al.</i> , 2018)
Cabra Blancas del delta del rio Yangtze	Cigoto	CRISPR/Cas9	Microinyección	(He <i>et al.</i> , 2018)
Cabra Arbas Cashmere	GFF	CRISPR/Cas9	SCNT	(Zhang <i>et al.</i> , 2018)
Cabra Shaanbei Cashmere	GFF	CRISPR/Cas9	Microinyección	(Wang <i>et al.</i> , 2015)
Cabra	Cigoto	CRISPR/Cas9	Microinyección	(Guo <i>et al.</i> , 2016)
Cabra	GFF	CRISPR/Cas9	SCNT	(Ni <i>et al.</i> , 2014)
Oveja Mongolian	SEF/sSMSC	CRISPR/Cas9	SCNT	(Zhang <i>et al.</i> , 2019)
Oveja Texel	Cigoto	CRISPR/Cas9	Inyección	(Crispo <i>et al.</i> , 2015a)
Oveja Tan	Cigoto	CRISPR/Cas9	Microinyección	(Wang <i>et al.</i> , 2016)
Oveja Hu	Cigoto	C-CRISPR/Cas9	Microinyección	(Guo <i>et al.</i> , 2023)
Vacuno	Mioblastos	CRISPR/Cas9	SCNT	(Ge <i>et al.</i> , 2021)
Vacuno	Cigoto	CRISPR/Cas9	Electroporación	(Namula <i>et al.</i> , 2019a)
Buffalo de agua	Cigoto	CRISPR/Cas9	Microinyección	(Su <i>et al.</i> , 2018)
Cerdo Erhualian/Landrace	PFF	CRISPR/Cas9	SCNT	(Wang <i>et al.</i> , 2015)
Cerdo Hubei White	PFF	CRISPR/Cre-Loxp	SCNT	(Bi <i>et al.</i> , 2016)
Cerdo Large White	PFF	CRISPR/Cas9/ssODN	SCNT	(Wang <i>et al.</i> , 2016)
Cerdo Debao	PFF	CRISPR/Cas9	Microinyección	(Su <i>et al.</i> , 2018)
Cerdo Duroc/Large White/Landrace	Cigoto/Ovocito	CRISPR/Cas9	Electroporación	(Namula <i>et al.</i> , 2019b)
Cerdo Liang Guang Small Spotted	LPKCS	CRISPR/Cas9	SCNT	(Li <i>et al.</i> , 2020)
Cerdo GuangDong Small-ear Spotted	PKF	CRISPR/Cas9	-	(Wei <i>et al.</i> , 2020)
Cerdo Duroc/Large White/Landrace	Cigoto	CRISPR/Cas9	Electroporación	(Le <i>et al.</i> , 2020)
Cerdo Bama	PKF	CRISPR/Cas9	SCNT	(Zhu <i>et al.</i> , 2020)
Cerdo	PFF	CRISPR/Cas9-BE	-	(Wang <i>et al.</i> , 2020)
Cerdo Liang Guang Small Spotted	LPKCS	CRISPR/Cas9	SCNT	(Dingwei <i>et al.</i> , 2021)
Cerdo Bama	PEF/Cigoto	CRISPR/Cas9-BE	Microinyección	(Song <i>et al.</i> , 2022)
Caballo	HFF	CRISPR/Cas9	SCNT	(Moro <i>et al.</i> , 2020)
Gallina	Musc.tibial anterior	CRISPR/Cas9	AdV	(Xu <i>et al.</i> , 2020)
Gallina White Leghorn	PGC-Pw66	CRISPR-D10ACas9n	Micronyección	(Kim <i>et al.</i> , 2020)
Gallina	DF-1	CRISPR-Rad52	-	(Wang <i>et al.</i> , 2017)
Codorniz	Mioblasto	CRISPR/Cas9	-	(Park <i>et al.</i> , 2020)
Codorniz	Blastodermo	CRISPR/Cas9	AdV	(Lee <i>et al.</i> , 2020)

SEF: fibroblastos auriculares ovinos; **sSMSC:** células satélites de musculo esquelético de oveja; **PFF:** fibroblastos fetales porcinos; **ssODN:** oligodesoxinucleótidos de cadena sencilla; **BE:** editor de bases; **LPKCS:** células renales porcinas; **PKF:** fibroblastos renales porcinos; **PEF:** fibroblastos embrionarios porcinos; **SNP:** polimorfismo de un solo nucleótido; **HFF:** fibroblastos fetales equinos; **AdV:** adenovirus; **PGC:** células germinales primordiales; **DF-1:** línea celular de pollo.

Como puede observarse en la tabla, la mayor parte de las investigaciones se concentran en el ganado porcino, donde se han logrado buenos resultados ya desde los primeros estudios de Qian *et al.* (2015), quienes empleando ZFN lograron incrementar la cantidad de tejido magro de la canal y disminuir la grasa corporal en cerdos Meishan (**Figura 11B y 11C**). También se

han realizado investigaciones de gran relevancia en otros tipos de ganado como el bovino y ovino, pudiendo destacar, entre otros, los estudios de Proudfoot *et al.* (2015) y Guo *et al.* (2023), respectivamente. En el primero se logró obtener un *knock-out* del gen de la miostatina mediante TALEN, resultando en el nacimiento de un toro editado y una novilla *Wild Type* (Figura 11D). Por otra parte, Guo *et al.* (2023) consiguieron generar ovejas de la raza autóctona Hu modificadas mediante c-CRISPR, las cuales presentaban hipertrofia muscular (Figura 11E) con un incremento del 50 % en el tamaño medio de las fibras musculares.

Estos buenos resultados se han mantenido en el ganado caprino, donde resalta la modificación de la raza de cabras Shaanbei Cashemere, raza local china altamente recomendada para la producción de carne debido a su bajo contenido graso, en comparación con la carne de vacuno o cordero (Wang *et al.*, 2017). Wang *et al.* (2015) generaron cabras modificadas las cuales presentaron un notable incremento en el peso corporal respecto a los WT (Figura 11F y 11G), (Wang *et al.*, 2018). Por último, Lee *et al.* (2020) editaron el gen *MSTN* en codornices, observando un incremento en el peso corporal e hiperplasia muscular, respecto a los heterocigotos y WT (Figura 11H y 11I).

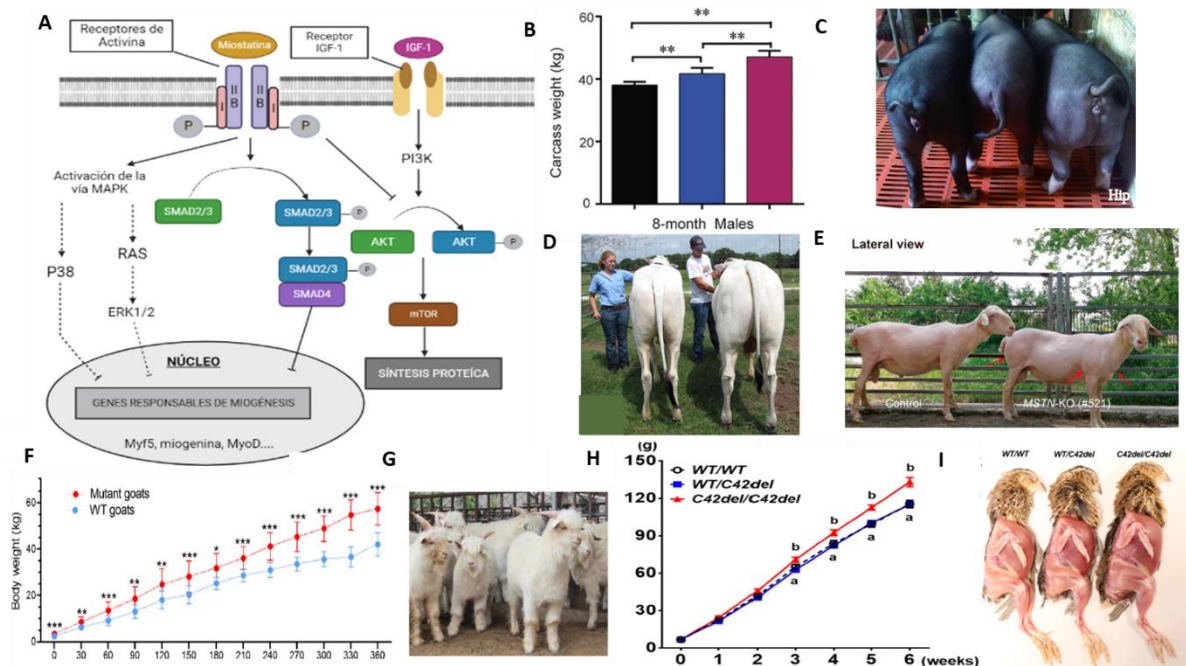


Figura 11. A) Vías de señalización de la miostatina, y su papel en la inhibición de la miogénesis (Imagen de elaboración propia mediante BioRender). B) Peso medio de la canal de cerdos WT (negro), heterocigoto (azul) y homocigótico *knock-out* (morado) de 8 meses de edad (Qian *et al.*, 2015). C) Cerdos de los genotipos indicados en B) situados de izquierda a derecha D) Novilla WT (izda.) y toro mutado (dcha.) (Proudfoot *et al.*, 2015). E) Imagen de ovejas *MSTN*-Knockout (dcha.) y control (izda.) (Guo *et al.*, 2023) F) y G) Variación en el peso corporal de cabras modificadas y WT desde el día 0 al 360, e imagen de cabras modificadas tomada en el día 160, respectivamente (Wang *et al.*, 2018). H) Comparación del peso corporal de codornices hembra control (WT) (línea negra discontinua), heterocigotas (azul) y homocigotas (rojo) para la modificación (Lee *et al.*, 2020). I) Aves de los genotipos indicados en H) situados de izquierda a derecha.

5.2.2 Producción de lana y pelo

El término lana hace referencia a las fibras que constituyen el pelaje propio del ganado ovino, aunque en términos generales también se asocia con las fibras del pelo de otras especies como cabras, yaks o camélidos (llama, alpaca, etc.). Debido a su relevancia en la industria textil, el interés por modificar genéticamente algunos de los aspectos de la producción de lana (cantidad, estructura de la fibra, etc.) se inició hace ya casi tres décadas. Sin embargo, la disminución de la comercialización de lana ante el incremento de las fibras sintéticas (Doyle *et al.*, 2021) ha determinado que el interés en estas investigaciones haya disminuido.

La lana se origina en los folículos pilosos, de cuyo número y tipo (primarios o PHF y secundarios o SHF) dependen las futuras propiedades del vellón. Como aparece reflejado en la **Tabla 2**, las primeras investigaciones se dirigieron a la sobreexpresión de genes como *IGF1*, con influencia en la cantidad de lana. El gen *IGF1* (*Insulin Like Growth Factor I*) es el mediador de muchas de las acciones de la hormona del crecimiento, por lo que pareció un candidato de interés para ser sobreexpresado en los folículos de oveja. Los resultados de estos trabajos permitieron obtener los primeros animales transgénicos con un aumento en la producción de lana de un 6,2 %, además de un ligero incremento en el parámetro conocido como *bulk* (volumen ocupado por un determinado peso de lana, relacionado con el rizo de la misma); sin embargo, otras propiedades como el diámetro de fibra o la medulación no resultaron modificadas (Damak *et al.*, 1995). En este sentido, se obtuvieron resultados más interesantes con el gen de la queratina *K2.10*, cuya sobreexpresión conllevó la mejora de propiedades como el aumento del lustre de la lana o la disminución del rizo (Bawden *et al.*, 1998).

Tabla 2. Investigaciones llevadas a cabo para mejorar la producción de lana mediante modificación genética.

Genes	Ganado	Técnica	Transgénicos generados	Referencia
<i>IGF1</i>	Ovino	Microinyección	5	(Damak <i>et al.</i> , 1996)
<i>K2.10</i>	Ovino	Microinyección	6	(Bawden <i>et al.</i> , 1998)
<i>FGF5</i>	Ovino/Caprino	CRISPR/Cas9	26	(Wang <i>et al.</i> , 2016)
			16	(Li <i>et al.</i> , 2017)
			5	(Zhang <i>et al.</i> , 2020)
<i>Tβ4</i>	Caprino	CRISPR/Cas9 PiggyBac	5	(Shi <i>et al.</i> , 2017)
			15	(Dai <i>et al.</i> , 2019)
			1	(Li <i>et al.</i> , 2019)
<i>ASIP</i>	Ovino	CRISPR/Cas9	6	(Zhang <i>et al.</i> , 2017)
<i>EDAR</i>	Caprino	CRISPR/Cas9	2	(Hao <i>et al.</i> , 2018)
Se tienen en cuenta tanto los nacidos vivos como muertos				

Más recientemente, los genes diana de la mayoría de las investigaciones han sido *FGF5* y *Tβ4*. El gen *FGF5* (*Fibroblast Growth Factor 5*) es el principales regulador de la longitud del pelo (Wang *et al.*, 2016) ya que codifica una proteína de señalización cuya función es inhibir el crecimiento de este, mediante el bloqueo de la activación de las células de la papila dérmica (Wang *et al.*, 2015). La disrupción de este gen mediante edición génica (vía CRISPR/Cas9) ha demostrado ser eficaz para el aumento de la longitud de las fibras de lana en ganado ovino , así como en el peso del vellón (Li *et al.*, 2017).

De particular interés son los trabajos realizados en cabras Cashmere, productoras de uno de los tipos de lana más escasos y valorados (**Figura 12A**) (Wang *et al.*, 2016; Li *et al.*, 2017). En estos animales se ha observado que la inactivación de *FGF5* determina no sólo un incremento en la longitud de la fibra, sino también en el número de SHF que producen la finísima fibra de cachemir (Wang *et al.*, 2016). En esta raza también se han realizado estudios con el gen *Tβ4*, codificante de la proteína timosina beta-4, implicada entre otras funciones en promover el rápido crecimiento del pelo en las zonas próximas a los bordes de las heridas (Shi *et al.*, 2017). Los resultados obtenidos han demostrado que la sobreexpresión de *Tβ4*, utilizando transgénesis y SCNT (Dai *et al.*, 2019) o mediante transposones (Shi *et al.*, 2017), es una estrategia eficiente para incrementar la relación SHF/PHF. La finura de la lana también ha sido objeto de modificación en la oveja, detectándose un incremento significativo en la densidad de fibras de lana fina (**Figura 12B**) tras la inactivación del gen *FGF5* (Zhang *et al.*, 2020).

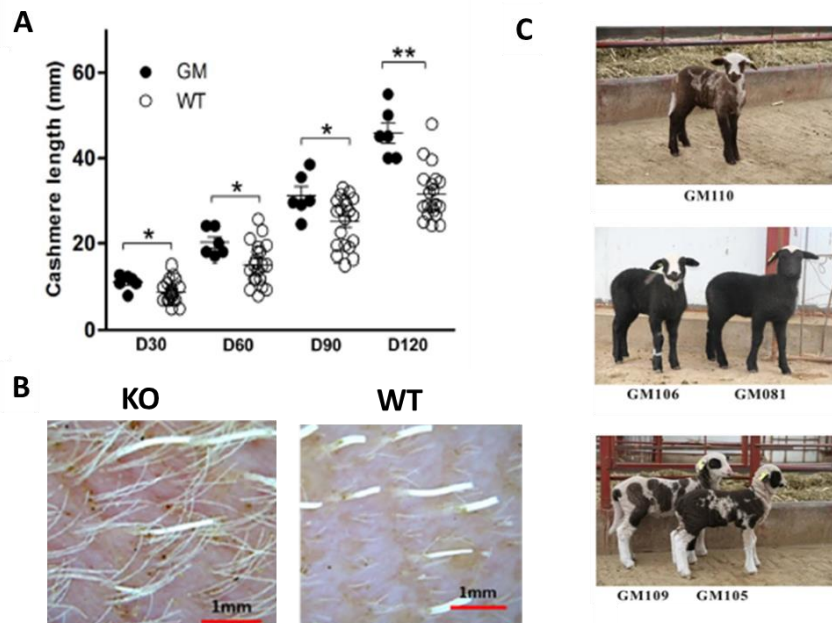


Figura 12. A) Diferencias en la longitud de las fibras de cachemir de los animales modificados (GM) respecto a los *Wild Type* (WT), medidos en diferentes días (D) (Wang *et al.*, 2016). B) Densidad de lana final y basta en la región del pecho de ovejas *knock-out* (KO) para el gen *FGF5* y control WT (Zhang *et al.*, 2020). C) Corderos transgénicos generados por la modificación del gen *ASIP* vía CRISPR/Cas9 (Zhang *et al.*, 2017).

Por último, otra propiedad modificada con éxito es el color de la lana, que constituye un rasgo importante para su valor. Mediante edición génica, Zhang *et al.* (2017) consiguieron generar corderos con diferentes patrones de color (**Figura 12C**) inactivando el gen *ASIP* (*Agouti signaling protein*). Dicho gen codifica la proteína Agouti, que funciona como un inhibidor del receptor de melanocortina 1 (MCR1R), evitando así el proceso de síntesis de eumelanina, la cual junto con la feomelanina determinan el color del pelo en mamíferos.

5.2.3. Mejora del rendimiento quesero

El rendimiento quesero se define como la cantidad de queso obtenido a partir de una cantidad determinada de leche; por lo general, se expresa sobre 100 L o kg de leche (Reynaud Cabello, 2013). Con el fin de mejorar esta propiedad, varios estudios se centraron en el aumento de la concentración de proteína a través de la sobreexpresión de caseínas. Esta fracción constituye el 80 % de las proteínas presentes en la leche bovina, pudiendo diferenciarse varios tipos de caseínas: α_{s1} -, α_{s2} -, β - y κ -caseína. Estas se encuentran agrupadas en grandes micelas coloidales altamente asociadas con las propiedades fisicoquímicas de la leche. Por ello, un aumento de estas proteínas, además de repercutir en los aspectos nutricionales, también sería clave para la mejora en las propiedades del producto a nivel de la industria láctea. Con este fin, Brophy *et al.* (2003) introdujeron construcciones codificantes de la β - y κ -caseína bovina en fibroblastos fetales y, mediante SCNT generaron un total de 14 terneros modificados genéticamente. Los resultados obtenidos permitieron demostrar el aumento de la concentración de proteína en los animales transgénicos, duplicándose en el proceso la concentración de κ -caseína y aumentando entre el 8 % y el 20 % la de β -caseína (Brophy *et al.*, 2003).

5.3 Sostenibilidad de la Producción Animal

5.3.1 Reducción del impacto ambiental

De acuerdo con los datos publicados por el Departamento de Agricultura de Estados Unidos, la producción anual mundial de ganado porcino ronda los 1200 millones de cabezas, centralizándose más de la mitad de la producción en China. La alimentación de estos cerdos domésticos destaca en componentes como el grano de cereal o la harina de semillas oleaginosas y sus derivados, los cuales contienen fitatos y polisacáridos no amiláceos (PNA), que no pueden ser digeridos por dichos animales. Es por ello que estos compuestos se han denominado factores antinutricionales, ya que han demostrado tener evidentes efectos negativos en la digestión y absorción de nutrientes, dificultando la interacción de las enzimas endógenas con el quimo y ralentizando así la tasa de difusión nutricional en el intestino (Zhang *et al.*, 2018). Los

consiguientes nutrientes no digeridos, contienen altas concentraciones de fósforo y nitrógeno, lo que conlleva que las heces de los animales sean una fuente importante de contaminación del aire, suelo y agua, dándose en esta última las condiciones idóneas para el crecimiento de algas en detrimento de otros seres vivos (Zhang *et al.*, 2018). En la **Figura 13** se representa una cuantificación de estos efectos basada en los datos de Shirali *et al.* (2013).

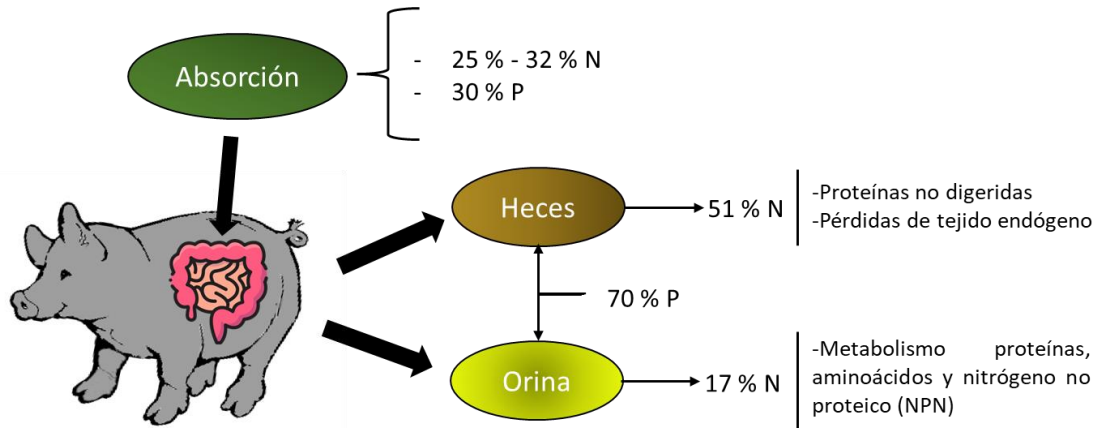


Figura 13. Porcentajes de absorción/excreción del nitrógeno y fósforo ingeridos en la dieta (basada en cereales y harina de soja) de cerdos de cebadero. Imagen de elaboración propia con los datos de Shirali *et al.* (2013).

Entre las estrategias para reducir esta contaminación se encuentra la suplementación de la ración de los cerdos con enzimas degradantes de fitatos y polisacáridos no amiláceos (lo que supone un gasto económico) y, a nivel experimental, también se ha planteado la modificación genética de los animales para que expresen dichas enzimas. En este sentido, en 2001 Golovan *et al.* dieron a conocer una línea de cerdos transgénicos, a los que denominaron *Enviro pigs*, que expresaban el gen de la fitasa *appA* de una cepa no patógena *Escherichia coli* controlado por un promotor de acción específica en la glándula parótida, con objeto de que la enzima se liberase únicamente en la saliva. En estos animales se demostró que, el contenido de fósforo de las heces se reducía un 75 % en los cerdos al destete y un 56 % para aquellos en cebo (**Figura 14A**). Estos resultados evidenciaron la eficacia de la modificación genética basada en la expresión de fitasa, que permite digerir el fósforo procedente de las plantas de la dieta en forma de fitato, con lo que se obvia la necesidad de suplementación con fosfato inorgánico y se reduce la contaminación ambiental provocada por las heces (Golovan *et al.*, 2001). Además, se demostró la seguridad para el consumo de estos animales (ausencia de expresión del transgén en músculo, riñón, hígado o piel) (Forsberg *et al.*, 2014a) y la calidad de sus productos (igual composición respecto a cerdos no transgénicos en tejido muscular y otros tejidos) (Forsberg *et al.*, 2014b).

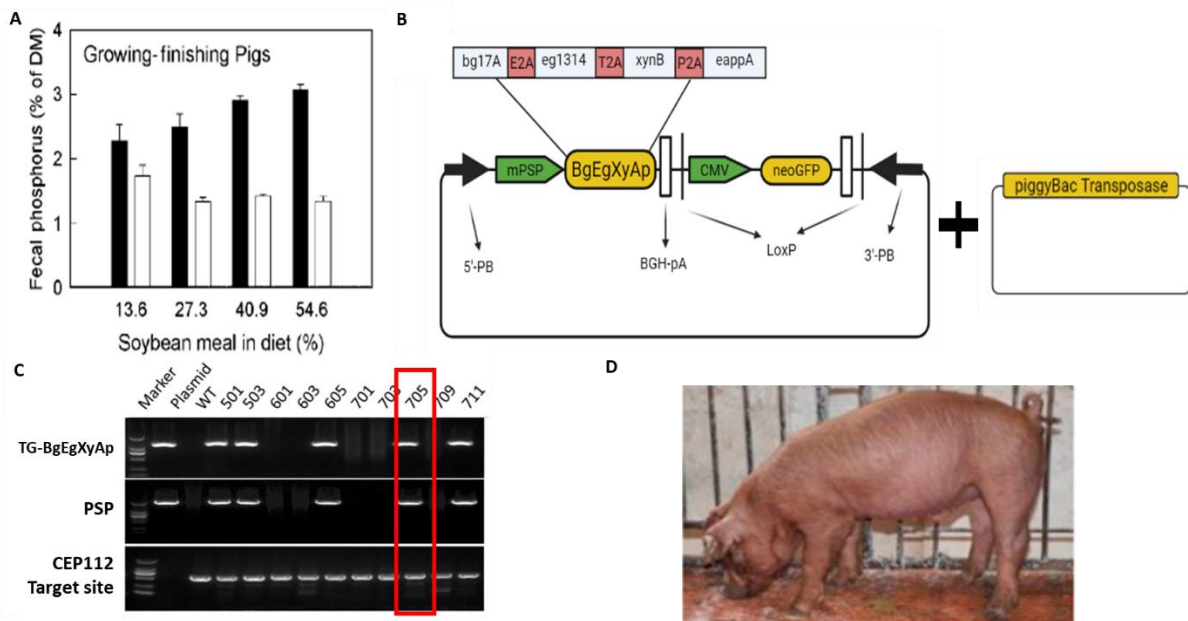


Figura 14. A) Fósforo fecal (% de materia seca, DM) en cerdos en cebo que expresan fitasa (blanco) y animales control (negro), alimentados con distintos porcentajes de harina de soja (Golovan *et al.*, 2001). B) Representación de las construcciones utilizadas por Zhang *et al.* (2018) empleando el sistema PiggyBac. El plásmido incluye los genes de las enzimas β -glucanasa (*bg17A* y *eg1314*), xilanasa (*xynB*) y fitasa (*eappA*), bajo el promotor de la proteína secretora de la parótida (*mPSP*) (Imagen de elaboración propia con BioRender). C) Identificación por PCR de los cerdos transgénicos; se resalta con un cuadro rojo el correspondientes a la imagen D (Li *et al.*, 2020).

Posteriormente, los estudios abordaron la producción simultánea de varias enzimas con el mismo objetivo medioambiental. Así, Zhang *et al.* (2018) emplearon la tecnología de transposición *PiggyBac* (Figura 14B), aplicada en fibroblastos fetales porcinos que utilizaron en SCNT. Se centraron además de en el gen de la fitasa, en los de la β -glucanasa y la xilanasa (que digieren polisacáridos no amiláceos), cuyas enzimas se expresaron de manera correcta. Los cerdos multitransgénicos generados presentaban digestibilidad similar a los cerdos con expresión exclusiva de fitasa, además de una emisión reducida de fósforo y nitrógeno en el estiércol y un mayor crecimiento respecto a los animales control. Más recientemente, aplicando la tecnología CRISPR/Cas9, se consiguió generar cerdos con una construcción génica similar a la empleada por Zhang y colaboradores, integrada en el intrón 5 del gen de la proteína centrosómica *CEP112* (Figura 14C y 14D). Dichos cerdos presentaron actividades significativas en saliva para las tres enzimas: fitasa, xilanasa y β -glucanasa (Li *et al.*, 2020). En conclusión, los estudios llevados a cabo han demostrado, a través de diferentes metodologías, cómo la modificación genética puede contribuir a la disminución de la contaminación medioambiental ocasionada por la producción porcina intensiva.

5.3.2 Adaptación al cambio climático

La situación actual de incremento de temperaturas a nivel global esta cambiando de manera drástica las condiciones del entorno en el que habita el ganado, ocasionando estados desfavorables de estrés, que limitan su capacidad productiva. La detección en determinadas poblaciones de variantes genéticas que confieren termotolerancia ha sido la base para el desarrollo de ciertas estrategias para paliar este estrés. En algún caso se ha probado a realizar la introgresión de esta variante mediante cruzamientos con la población portadora. Sin embargo, esta opción precisa de varias generaciones y afectaría a la producción, sobre todo, en poblaciones muy seleccionadas. Por otra parte, el reciente desarrollo de la edición génica ha permitido como alternativa la introducción de dicha mutación de forma específica (sin alterar el resto del genoma y por tanto su capacidad productiva) y en solo una generación (Laible *et al.*, 2015).

Uno de los genes estudiados es *PMEL*, codificante de la proteína pre-melanosomal 17, una proteína de membrana expresada en células pigmentadas y que interviene en la maduración de melanosomas, además del almacenamiento y polimerización de estos pigmentos en dichos orgánulos. En algunas razas bovinas como la escocesa Highland se ha descrito una mutación en este gen consistente en una delección de tres pares de bases sobre la secuencia correspondiente al péptido señal, que se ha relacionado con una dilución de color. En base a estos datos los investigadores han sugerido que este efecto de aclaramiento del color sería muy beneficioso para regular mejor la temperatura y mantener los niveles de producción en climas cálidos, sobre todo en razas de pelaje oscuro ya que este absorbe mucha más radiación solar que los claros (Schmutz *et al.*, 2013).

En 2021 Laible y sus colaboradores utilizaron el sistema CRISPR/Cas9 para generar esta mutación en la raza Holstein que posee gran parte de su capa negra (**Figura 15**). Nacieron dos terneros, ambos homocigóticos para la mutación, que mostraron un notable aclaramiento de las zonas coloreadas de su capa. Uno de ellos murió poco después de nacer y el otro a los cuatro meses como consecuencia de una infección. En este último se realizó una cuantificación de la claridad del color en pelo y piel mediante colorimetría. Los resultados indicaron valores semejantes entre el ternero *PMEL* y los tres



Figura 15. Imagen del ternero con la delección en el gen *PMEL* junto con un ternero control (Laible *et al.*, 2021).

controles para las zonas blancas de la capa y diferencias altamente significativas ($p < 0,0001$) en las zonas coloreadas (Laible *et al.*, 2021).

Otra mutación que también parece conferir mayor capacidad de termoregulación es la detectada originalmente en la raza de ganado vacuno caribeña Senepol y que determina el fenotipo llamado *slicky hair* que se caracteriza por un pelo más corto y brillante. Es una delección en el gen *PRLR* que determina una forma truncada de un receptor de la hormona prolactina (Hansen, 2020). También en este caso se ha conseguido introducir esta mutación mediante edición génica utilizando el sistema CRISPR/Cas9 generando dos terneros con este fenotipo, aunque los datos concretos de la investigación no han sido hechos públicos por la empresa responsable de la misma, Acceligen (Minnesota, Estados Unidos). Es de señalar que la FDA (*Food and Drug Administration*) de EEUU dio luz verde en 2022 a la comercialización de estos animales y sus descendientes al ser considerados seguros para su consumo (Nature Biotechnology, 2022).

5.3.3 Mejora del manejo animal

El bienestar animal es clave para conseguir una producción animal respetuosa y eficiente y, por ello, es inherente al concepto de sostenibilidad. En los últimos veinte años, los términos de bienestar animal y sostenibilidad han ido adquiriendo cada vez más importancia, y se ha prestado una atención creciente a mejorar las condiciones productivas y las prácticas ganaderas. Una de las prácticas de manejo que podría ser susceptible de mejora mediante modificación genética es la que tiene que ver con el descornado/desmochado en el ganado bovino. Ambas técnicas tienen la finalidad de aumentar la seguridad durante el manejo de los animales, además de disminuir el riesgo de daños físicos entre ellos como consecuencia de comportamientos agresivos (Mueller *et al.*, 2019). El primero de estos términos hace referencia a la acción del serrado de los cuernos del animal una vez se han formado, mientras que el segundo procedimiento se lleva a cabo entre la cuarta y sexta semana de vida y puede realizarse a través de la cauterización o empleando sustancias químicas. Estas actividades pueden resultar estresantes para el animal, promoviendo cambios neuroendocrinos como el aumento de la concentración plasmática de cortisol (Mainau *et al.*, 2012), además de cambios de comportamiento (Mueller *et al.*, 2019). Es por esto que, primando el bienestar animal, se ha propuesto la modificación genética para evitar estas prácticas.

La identificación de la causa genética del ganado sin cuernos (*polled*) ha estado sujeta a una intensa investigación, conociéndose actualmente 4 alelos diferentes de carácter dominante

presentes en el cromosoma 1, causantes de este fenotipo: P_M (mongolian *polled*), P_G (guarani *polled*), P_F (friesian *polled*) y P_C (celtic *polled*) (Henning *et al.*, 2022). Cabe destacar que no hay ninguna proteína o transcrito asociado a las diferentes variantes *polled*, además del desconocimiento del mecanismo causante de este fenotipo.

Las investigaciones en modificación genética se han centrado en el alelo P_C , presente en las razas del norte de Europa como es el caso de la raza Angus, y que está asociado a una duplicación de 212 pb que reemplaza a una delección de 10 pb. Fue en 2016 cuando Carlson y sus colaboradores, basándose en el empleo de la tecnología TALEN (**Figura 16A**) junto a la reparación dirigida por homología, llevaron a cabo la introgresión del alelo P_C en fibroblastos embrionarios, que posteriormente fueron clonados vía SCNT (Carlson *et al.*, 2016).

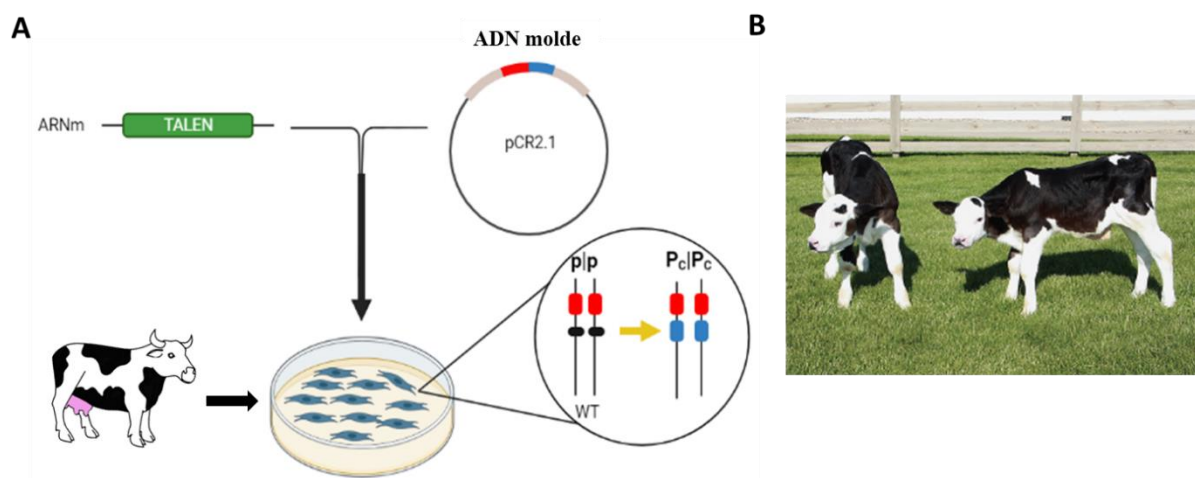


Figura 16. A) Esquema del experimento de edición genética llevado a cabo por Carlson *et al.* (2016). El editor TALEN se transfirió en las células somáticas en forma de ARN mensajero, junto con el ADN molde usado para la reparación dirigida por homología (clonado en el plásmido pCR2.1) (Imagen de elaboración propia empleando BioRender). C) Terneros obtenidos (Buri a la izquierda y Spotigy a la derecha)(Carlson *et al.*, 2016).

El experimento resultó exitoso, obteniéndose dos especímenes sin cuernos y homocigotos para el alelo en cuestión, *Buri* y *Spotigy* (**Figura 16**), que presentaban un fenotipo idéntico al producido en la naturaleza. El análisis de los posibles efectos *off-target* en dichos animales produjo resultados altamente positivos al confirmar la ausencia de otras modificaciones fuera de la secuencia diana. Dicha mutación, tal y como demostraron Young *et al.* (2020) resultó ser heredable, obteniendo progenie sin cuernos a base de cruzamientos con hembras con cuernos, empleando a *Spotigy* como donante de semen.

6. CONCLUSIONES

Primera. En beneficio de la salud del consumidor, se ha logrado disminuir la alergenicidad de productos como la leche, además de implantar un perfil de ácidos grasos favorable en la carne y en la leche para reducir el riesgo de patologías cardiovasculares.

Segunda. Los avances en las metodologías de edición genética han sido fundamentales para poder mejorar, de forma eficiente, el rendimiento de algunas producciones en las especies ganaderas, lo que puede suponer una interesante contribución a la Mejora Animal de cara a hacer frente a las futuras problemáticas derivadas del incremento de población mundial y la necesidad de elevar la producción de alimentos.

Tercera. Las estrategias desarrolladas han probado su utilidad para poder abordar determinadas formas de Producción Animal de manera más sostenible, como reducir la contaminación ambiental asociada a la cría porcina intensiva o mejorar el bienestar animal del ganado vacuno.

7. REFERENCIAS

- Bawden, C. S., Powell, B. C., Walker, S. K. y Rogers, G. E. (1998) "Expression of a wool intermediate filament keratin transgene in sheep fibre alters structure", *Transgenic Research*, 7(4), 273-284.
- Bi, Y., Hua, Z., Liu, X., Hua, W. *et al.* (2016) "Isozygous and selectable marker-free MSTN knockout cloned pigs generated by the combined use of CRISPR/Cas9 and Cre/LoxP", *Scientific Reports*, 6(31729).
- Brophy, B., Smolenski, G., Wheeler, T., Wells, D. *et al.* (2003) "Cloned transgenic cattle produce milk with higher levels of β -casein and κ -casein", *Nature Biotechnology*, 21, pp. 157–162.
- Buxadé, C. (1995) *Estructura, etnología, anatomía y fisiología*. España: Mundi-Prensa.
- Chavarrías, M. (2022) *El Diario: β -lactoglobulina y alergia a la leche*. Disponible en: https://www.eldiario.es/era/ss-lactoglobulina-alergia-leche_1_9719696.html (Accedido: 25/06/2026).
- Crispo, M., Mulet, A. P., Tesson, L., Barrera, N. *et al.* (2015a) "Efficient generation of myostatin knock-out sheep using CRISPR/Cas9 technology and microinjection into zygotes", *PLoS ONE*, 10(8), pp. 1–18.
- Crispo, M., Vilarin, M., Cuadro, F., Barrera, N. *et al.* (2015b) "Embryo development, fetal growth and postnatal phenotype of eGFP lambs generated by lentiviral transgenesis", *Transgenic Research*, 24, pp. 31–41.
- Dai, B., Liang, H., Guo, D., Yuan, J. *et al.* (2019) "The Overexpression of T β 4 in the Hair Follicle Tissue of Alpas Cashmere Goats Increases Cashmere Yield and Promotes Hair Follicle Development", *Animals*, 10(1), pp. 75–91.
- Damak, S., Su, H., Jay, N. P. y Bullock, D. W. (1996) "Improved Wool Production In Transgenic Sheep Expressing Insulin-like Growth Factor 1", *Nature Biotechnology*, 14, 185-188.
- Carlson, D. F., Lancto, C. A., Zang, B., Kim, E. *et al.* (2016) "Production of hornless dairy cattle from genome-edited cell lines", *Nature Biotechnology*, 34(5), pp. 479–481.
- Dingwei, P., Qiang, L. R., Wu, Z., Min, W. *et al.* (2021) "Editing the cystine knot motif of MSTN enhances muscle development of", 43(03), pp. 261–270.
- Fässler, R. (2004) "Lentiviral transgene vectors", *Embo Reports*, 5, pp. 28-29.
- Food and Agriculture Organization of the United States (2022)[Sitio Web Oficial].Disponible en: <https://stats.oecd.org/viewhtml.aspx?QueryId=114440&vh=0000&vf=0&l&il=&lang=en#>(Accedido:20/11/2022)
- Forsberg, CW., Meidinger, RG., Murray, D., Keirstead, ND. *et al.* (2014a) "Comparative carcass and tissue nutrient composition of transgenic Yorkshire pigs expressing phytase in the saliva and conventional Yorkshire pigs", *Journal of Animal Science*, 92(10), pp. 4417-39.
- Forsberg, CW., Meidinger, RG., Ajakaiye, A., Murray, D. *et al.* (2014b) "Phytase properties and locations in tissues of transgenic pigs secreting phytase in the saliva", *Journal of Animal Science*, 92(8), pp. 3375-3387.
- Gaf, T., Gersbach, C. A. y Barbas, C. F. (2013) "ZFN, TALEN and CRISPR/Cas-based methods for genome engineering", *Trends in Biotechnology*, 31(7), pp.397-403.

- Ga, V. (2007) "Handmade cloning: the future way of nuclear transfer?", *Trends in Biotechnology*, 25(6), pp. 16–19.
- Ge, L., Kang, J., Dong, X., Luan, D. *et al.* (2021) "Myostatin site-directed mutation and simultaneous PPAR γ site-directed knockin in bovine genome", *Journal of Cellular Physiology*, 236(4), pp. 2592–2605.
- Golovan, S. P., Meidinger, R. G., Ajakaiye, A., Cottrill, M. *et al.* (2001) "Pigs expressing salivary phytase produce low-phosphorus manure", *Nature Biotechnology*, 19(8), pp. 741–745.
- Gordon, J. O. N. W., Scangost, G. A., Plotkin, D. J., Barbosaf, J. A. y I, F. H. R. (1980) "Genetic transformation of mouse embryos by microinjection of purified DNA", 77(12), pp. 7380–7384.
- Guo, R., Wan, H., Meng, C., Hongbing, G. *et al.* (2023) "Efficient and Specific Generation of *MSTN*-Edited Hu Sheep Using C-CRISPR", *Genes*, 14(6), pp. 1216-1227.
- Guo, R., Wan, Y., Xu, D., Cui, L. *et al.* (2016) "Generation and evaluation of Myostatin knock-out rabbits and goats using CRISPR/Cas9 system", *Scientific Reports*, 6(29855).
- Hammer, R. E., Pursel, V. G., Rexroad, C. E., Wall, R. J. *et al.* (1985) "Production of transgenic rabbits, sheep and pigs by microinjection", *Nature*, 315(6021), p. 680—683.
- Hansen, P. J. (2020) "Prospects for gene introgression or gene editing as a strategy for reduction of the impact of heat stress on production and reproduction in cattle", *Theriogenology*, 154, pp. 190-202.
- Hao, F., Yan, W., Li, X., Wang, H. *et al.* (2018) "Generation of Cashmere Goats Carrying an EDAR Gene Mutant Using CRISPR – Cas9-Mediated Genome Editing", *International Journal of Biological Sciences*, 14(4), pp.427-436.
- He, Z., Zhang, T., Jiang, L., Zhou, M. *et al.* (2018) "Use of CRISPR/Cas9 technology efficiently targeted goat myostatin through zygotes microinjection resulting in double-musled phenotype in goats", *Bioscience Reports*, 38(6), pp. 1–8.
- Hennig, S. L., Owen, J. R., Lin, J. C., McNabb, B. R. *et al.* (2022) "OPEN A deletion at the polled P - C locus alone is not sufficient to cause a polled phenotype in cattle", *Scientific Reports*, 12(2067).
- Hiripi, L., Negre, D., Kvell, F. L. y Cosset, K. (2010) "Transgenic rabbit production with simian immunodeficiency virus-derived lentiviral vector", *Transgenic Research*, 19(5), pp.799-808.
- Instituto Nacional de Estadística (2009) [Sitio Web Oficial]. Disponible en: https://www.ine.es/censoagrario/censoag_folleto.pdf (Accedido: 13/03/2023)
- Jabed, A., Wagner, S., Mccracken, J., Wells, D. N. y Laible, G. (2012) "Targeted microRNA expression in dairy cattle directs production of β -lactoglobulin-free , high-casein milk", 109(42), pp.16811-16816.
- Jin, K., Chen, C., Sun, X., Zhu, C. *et al.* (2021) "Identification and Generation of Transgenic Mice and Goats with *Capra hircus* SCD1 Gene", *Pakistan Journal of Zoology*, 53(6), pp. 2217–2225.
- Kang, J. X., Wang, J., Wu, L. y Kang, Z. B. (2004) "Fat-1 mice convert n-6 to n-3 fatty acids", *Nature*, 427(504).
- Kim, G. D., Lee, J. H., Song, S., Kim, S. W. *et al.* (2020) "Generation of myostatin-knockout chickens mediated by D10A-Cas9 nickase", *FASEB Journal*, 34(4), pp. 5688–5696.
- Kim, Y. G., Cha, J. y Chandrasegaran, S. (1996) "Hybrid restriction enzymes: Zinc finger fusions to Fok I cleavage domain", *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 93(3), pp. 1156–1160.
- Kromhout, D., Menotti, A., Kestlelout, H. y Sans, S. (2002) "Prevention of coronary heart disease by diet and lifestyle: evidence from prospective cross-cultural, cohort, and interventional studies", *Circulation*, 105, pp. 893-898.
- Lai, L., Kang, J. X., Li, R., Wang, J. *et al.* (2006) "Generation of cloned transgenic pigs rich in omega-3 fatty acids", *Nature Biotechnology*, 24(4), pp. 435–436.
- Laible, G., Cole, S. A., Brophy, B., Wei, J. *et al.* (2021) "Holstein Friesian dairy cattle edited for diluted coat color as a potential adaptation to climate change", *BMC Genomics*, 22(1), pp. 1–12.
- Le, Q. A., Hirata, M., Nguyen, N. T., Takebayashi, K. *et al.* (2020) "Effects of electroporation treatment using different concentrations of Cas9 protein with gRNA targeting Myostatin (*MSTN*) genes on the development and gene editing of porcine zygotes", *Animal Science Journal*, 91(1), pp. 1–7.
- Lee, E. J., Ji, K. B., Lee, J. H., Oh, H. J. *et al.* (2021) "Application of the modified handmade cloning technique to pigs", *Journal of Animal Science and Technology*, 63(2), pp. 281–294.
- Lee, J., Kim, D. H. y Lee, K. (2020) "Muscle hyperplasia in Japanese quail by single amino acid deletion in *MSTN*

propeptide", *International Journal of Molecular Sciences*, 21(4).

Li, C., Zhou, S., Li, Y., Li, G. *et al.* (2018) "Trio-based deep sequencing reveals a low incidence of off-target mutations in the offspring of genetically edited goats", *Frontiers in Genetics*, 9(449).

Li, G., Zhang, X., Wang, H., Mo, J. *et al.* (2020) "CRISPR/Cas9-mediated integration of large transgene into pig CEP112 locus", *G3: Genes, Genomes, Genetics*, 10(2), pp. 467–473.

Li, R., Zeng, W., Ma, M., Wei, Z. *et al.* (2020) "Precise editing of myostatin signal peptide by CRISPR/Cas9 increases the muscle mass of Liang Guang Small Spotted pigs", *Transgenic Research*, 29(1), pp. 149–163.

Li, W., Liu, C., Zhang, X., Chen, L. *et al.* (2017) "CRISPR / Cas9-mediated loss of FGF5 function increases wool staple length in sheep", *FEBS Journal*, 284(17), pp. 2764–2773.

Li, X., Hao, F., Hu, X., Wang, H. *et al.* (2019) "Generation of T β 4 knock-in Cashmere goat using CRISPR / Cas9", *International Journal of Biological Sciences*, 15(8).

Li, Y., Di, Lian., Deng, Shoulong., Zhang, Xiaosheng. *et al.* (2016) "Efficient production of pronuclear embryos in breddign and nonbreeding season for generating transgenic sheep overexpressing TLR4", *Journal of Animal Science and Biotechnology*, 7(38), pp. 1-8.

Lievens, A., Petrillo, M., Querci, M. y Patak, A. (2015) "Genetically modified animals: Options and issues for traceability and enforcement", *Trends in Food Science and Technology*, 44(2), pp. 159–176.

Lu, J., Wei, C., Zhang, X., Xu, L. *et al.* (2013) "The effect of myostatin silencing by lentiviral-mediated RNA interference on goat fetal fibroblasts", *Molecular Biology Reports*, 40, pp. 4101–4108.

Mainau, E., Temple, D. y Manteca, X. (2012) FAWEC, Disponible en: <https://www.fawec.org/es/> (Accedido: 02 de Marzo de 2023).

McCreath, K. J., Howcroft, J., Campbell, K. H. S. y Colman, A. (2000) "Production of gene-targeted sheep by nuclear transfer from cultured somatic cells", *Nature*, 405, pp. 1066–1069.

Menchaca, A., Dos Santos-Neto, P. C., Mulet, A. P. y Crispo, M. "CRISPR in livestock: From editing to printing", *Theriogenology*, 1(150), pp. 247-254.

Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación (2022) [Sitio Web Oficial]. Disponible en: <https://www.mapa.gob.es/es/estadistica/temas/estadisticas-agrarias/economia/cuentas-economicas-agricultura/> (Accedido: 25/05/2023)

Moro, L. N., Viale, D. L., Bastón, J. I., Arnold, V. *et al.* (2020) "Generation of myostatin edited horse embryos using CRISPR/Cas9 technology and somatic cell nuclear transfer", *Scientific Reports*, 10(15587), pp. 1–10.

Mueller, M. L., Cole, J. B., Sonstegard, T. S. y Van Eenennaam, A. L. (2019) "Comparison of gene editing versus conventional breeding to introgress the POLLED allele into the US dairy cattle population", *Journal of Dairy Science*, 102(5), pp. 4215–4226.

Namula, Z., Wittayarat, M., Hirata, M., Hirano, T. *et al.* (2019a) "Genome mutation after the introduction of the gene editing by electroporation of Cas9 protein (GEEP) system into bovine putative zygotes", *In Vitro Cellular and Developmental Biology - Animal*. In Vitro Cellular & Developmental Biology - Animal, 55(8), pp. 598–603.

Namula, Z., Wittayarat, M., Hirata, M., Hirano, T. *et al.* (2019b) "Genome mutation after the introduction of the gene editing by electroporation of Cas9 protein (GEEP) system into bovine putative zygotes", *In Vitro Cellular and Developmental Biology - Animal*. In Vitro Cellular & Developmental Biology - Animal, 55(8), pp. 598–603.

Nature Biotechnology (2022) *CRISPR beef cattle get FDA green light*. Disponible en: <https://www.nature.com/articles/s41587-022-01297-z> (Accedido: 27/06/2023).

Ni, W., Qiao, J., Hu, S., Zhao, X. *et al.* (2014) "Efficient gene knockout in goats using CRISPR/Cas9 system", *PLoS ONE*, 9(9), pp. 1–7.

Organización para la Cooperación y el Desarrollo Económicos-Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación (2022) [OCDE-FAO Agricultural Outlook]. Disponible en: <https://stats.oecd.org/viewhtml.aspx?QueryId=114440&vh=0000&vf=0&l&il=&lang=en> (Accedido: 8/11/2022)

Oldenbroek, K. y Van Der Waaij, L. (2014). *Textbook animal breeding Animal breeding and genetics for BSc students*. Wageningen UR (University and Research Centre).

- Palacios, M. (2019) *Sociedad Internacional de Bioética (SIBI)*. Disponible en: <http://sibi.org/wordpress/wp-content/uploads/2019/02/%C2%BFPor-qu%C3%A9-fracasa-la-clonaci%C3%B3n-en-mam%C3%ADferos-no-humanos.pdf> (Accedido: 26/06/2023).
- Palmiter, R. D., Brinster, R. L., Hammer, R. E., Trumbauer, M. E. *et al.* (1982) "Dramatic growth of mice that develop from eggs microinjected with metallothionein-growth hormone fusion genes", *Nature*, 300(5893), p. 611—615.
- Park, J. W., Lee, J. H., Han, J. S., Shin, S. P. y Park, T. S. (2020) "Muscle differentiation induced by p53 signaling pathway-related genes in myostatin-knockout quail myoblasts", *Molecular Biology Reports*. Springer Netherlands, 47(12), pp. 9531–9540.
- Perisse, L. V., Fan, Z., Singina, G. N., White, K. L. *et al.* (2021) "Improvements in Gene Editing Technology Boost Its Applications in Livestock", *Frontiers in Genetics*, 11, pp. 1-21.
- Perleberg, C., Kind, A. y Schnieke, A. (2018) "Genetically engineered pigs as models for human disease", *Disease Models & Mechanisms*, 11(1).
- Polejaeva, I. A. (2021) "Generation of genetically engineered livestock using somatic cell nuclear transfer", *Reproduction*, 162, pp. 11-23.
- Proudfoot, C., Carlson, D. F., Huddart, R., Long, C. R. *et al.* (2015) "Genome edited sheep and cattle", *Transgenic Research*, 24, pp. 147-153
- Qian, L., Tang, M., Yang, J., Wang, Q. *et al.* (2015) "Targeted mutations in myostatin by zinc-finger nucleases result in double-muscling phenotype in Meishan pigs", *Scientific Reports*, 5(14435), pp. 1-13.
- Rajani, H. F., Shahidi, S. y Gamori, M. M. (2020) "Protein and antibody engineering: suppressing dreganulation of the masr cell and type I hypersensitivity", *Current Protein & Peptide Science*, 21(8), pp. 831-841.
- Ranjitha, H. B., Ramesh, M., Behera, S., ValiyaValappil, D. *et al.* (2022) "Genetic Engineering Tools and Techniques in Livestock Production", *Sustainable Agriculture Reviews*, 57(5), pp. 175–207.
- Reh, W. A., Maga, E. A., Collette, N. M. B., Moyer, A. *et al.* (2004) "Hot Topic : Using a Stearoyl-CoA Desaturase Transgene to Alter Milk Fatty Acid Composition", *Journal of Dairy Science*, 87(10), pp. 3510–3514.
- Reynaud Cabello, D. P. (2013) *Evaluación del rendimiento quesero práctico y su correlación con ecuaciones predictivas de rendimiento teórico, en la producción de queso gauda elaborado a partir de leche con y sin adición de retentado proveniente de la ultrafiltración de leche*. Memoria para optar al título de Ingeniero en Alimentos. Universidad de Chile.
- Saeki, K., Matsumoto, K., Kinoshita, M., Suzuki, I. *et al.* (2004) "Functional expression of a $\Delta 12$ fatty acid desaturase gene from spinach in transgenic pigs", *PNAS*, 101(17), pp. 6361–6366.
- Schmutz, S. M. y Dreger, D. L. (2013) "Interaction of MC1R and PMEL alleles on solid coat colors in Highland cattle", *Animal Genetics*, 44(1), pp. 9–13.
- Schnieke, A. E., Kind, A. J., Ritchie, W. A., Mycock, A. *et al.* (1997) "Human factor IX transgenic sheep produced by transfer of nuclei from transfected fetal fibroblasts", *Science*, 278(5346), pp. 2130-2133.
- Sélénou, C., Brioude, F., Giabicani, E., Sobrier, M. L. y Netchine, I. (2022) "IGF2 : Development, Genetic y Epigenetic Abnormalities", *Cells*, 11(12).
- Shahidi, F. y Ambigaipalan, P. (2018) "Omega-3 Polyunsaturated Fatty Acids and Their Health Benefits", *Annual Review of Food Science and Technology*, 9, pp. 345–381.
- Shamshirgaram, Y., Liu, J., Sumer, H., Verman, P. J. *et al.* (2022) "Tools for efficient Genome Editing; ZFN, TALEN and CRISPR", *Molecular Biology*, 2495(1), pp. 29-46.
- Shi, B., Ding, Q., He, X., Zhu, H. *et al.* (2017) "T b 4 -overexpression based on the piggyBac transposon system in cashmere goats alters hair fiber characteristics", *Transgenic Research*, 26(1), pp. 77–85.
- Shingfield, K. J., Chilliard, Y., Toivonen, V., Kairenius, P. y Givens, D. I. (2008) "Trans fatty acids and bioactive lipids in ruminant milk", *Advances in Experimental Medicine and Biology*, 606, pp. 3-65
- Shirali, M., Knap, P. W., Duthie, C., Kanis, E. *et al.* (2012) "Nitrogen excretion at different stages of growth and its association with production traits in growing pigs", *Journal of animal science*, 90, pp. 1756–1765.
- Simopoulos, A. P. (2003) "Importance of the ratio of omega-6/omega-3 essential fatty acids evolutionary aspects", *World Review of Nutrition and Dietetics*, 92, pp.1-22.

- Song, R., Wang, Y., Zheng, Q., Yao, J. *et al.* (2022) "One-step base editing in multiple genes by direct embryo injection for pig trait improvement", *Science China Life Sciences*, 65(4), pp. 739–752.
- Su, X., Cui, K., Du, S., Li, H. *et al.* (2018) "Efficient genome editing in cultured cells and embryos of Debaopig and swamp buffalo using the CRISPR/Cas9 system", *In Vitro Cellular and Developmental Biology - Animal*, 54(5), pp. 375–383.
- Sun, Z., Wang, M., Han, S., Ma, S. *et al.* (2018) "Production of hypoallergenic milk from DNA-free beta-lactoglobulin (BLG) gene knockout cow using zinc-finger nucleases mRNA", *Scientific Reports*, 8(15430).
- Tan, W., Proudfoot, C., Lillico, S. G. y Whitelaw, C. B. A. (2016) "Gene targeting, genome editing: from Dolly to editors", *Transgenic Research*, 25(3), pp. 273-287.
- Tan, W. S., Carlson, D. F., Walton, M. W., Fahrenkrug, S. C. *et al.* (2012) "Precision Editing of Large Animal Genomes", in *Advances in Genetics*, 80, pp. 37–97.
- Van Eenennaam, A. L., De Figueiredo Silva, F., Trott, J. F. y Zilberman, D. (2021) "Genetic Engineering of Livestock: The Opportunity Cost of Regulatory Delay", *Annual Review of Animal Biosciences*, 9, pp. 453–478.
- Wang, H., Li, G., Zhong, C., Mo, J. *et al.* (2020) "Generation of Multi-Transgenic Pigs Using PiggyBac Transposons Co-expressing Pectinase, Xylanase, Cellulase, β -1.3-1.4-Glucanase and Phytase", *Frontiers in Genetics*, 11, pp. 1–10.
- Wang, K., Ouyang, H., Xie, Z., Yao, C. *et al.* (2015) "Efficient Generation of Myostatin Mutations in Pigs Using the CRISPR/Cas9 System", *Scientific Reports*, 5(16623).
- Wang, K., Tang, X., Liu, Y., Xie, Z. *et al.* (2016) "Efficient Generation of Orthologous Point Mutations in Pigs via CRISPR-assisted ssODN-mediated Homology-directed Repair", *Molecular Therapy - Nucleic Acids*, 5(396).
- Wang, L., Cai, B., Zhou, S., Zhu, H. *et al.* (2017) "RNA-seq reveals transcriptome changes in goats following myostatin gene knockout", *PLoS ONE*, 12(12), pp. 1–23.
- Wang, L., Yang, L., Guo, Y., Du, W. *et al.* (2017) "Enhancing targeted genomic DNA editing in chicken cells using the CRISPR/Cas9 system", *PLoS ONE*, 12(1), pp. 1–17.
- Wang, X., Cai, B., Zhou, J., Zhu, H. *et al.* (2016) "Disruption of FGF5 in Cashmere Goats Using CRISPR / Cas9 Results in More Secondary Hair Follicles and Longer Fibers", *PLoS ONE*, 11(11).
- Wang, X., Qu, J., Li, J., He, H. *et al.* (2020) "Epigenetic Reprogramming During Somatic Cell Nuclear Transfer: Recent Progress and Future Directions", *Frontier in Genetics*, 11:205.
- Wang, X., Niu, Y., Zhou, J., Yu, H. *et al.* (2016) "Multiplex gene editing via CRISPR/Cas9 exhibits desirable muscle hypertrophy without detectable off-target effects in sheep", *Scientific Reports*, 6(32271).
- Wang, X., Niu, Y., Zhou, J., Zhu, H. *et al.* (2018) "CRISPR / Cas9-mediated MSTN disruption and heritable mutagenesis in goats causes increased body mass", *Animal Genetics*, 38(6), pp. 1-8.
- Wang, X., Yu, H., Lei, A., Zhou, J. y Zeng, W. (2015) "Generation of gene-modified goats targeting MSTN and FGF5 via zygote injection of CRISPR / Cas9 system", *Scientific Reports*, 5(13878), pp. 1–9.
- Wei, J., Wang, E., Maclean, P., Brophy, B. *et al.* (2018) "Cattle with a precise zygote-mediated deletion safely eliminate the major milk allergen beta-lactoglobulin", *Scientific Reports*, 8(1).
- Wei, Y. Y., Zhan, Q. M., Zhu, X. X., Yan, A. F. *et al.* (2020) "Efficient CRISPR/Cas9-mediated gene editing in Guangdong small-ear spotted pig cells using an optimized electrotransfection method", *Biotechnology Letters*, 42(11), pp. 2091–2109.
- Wu, X., Ouyang, H., Duan, B., Pang, D. y Zhang, L. (2012) "Production of cloned transgenic cow expressing omega-3 fatty acids", *Transgenic Research*, 21, pp. 537–543.
- Xiang, G., Ren, J., Hai, T., Fu, R. *et al.* (2018) "Editing porcine IGF2 regulatory element improved meat production in Chinese Bama pigs", *Cellular and Molecular Life Sciences*, 75(24), pp. 4619–4628.
- Xu, K., Han, C. X., Zhou, H., Ding, J. M. *et al.* (2020) "Effective MSTN Gene Knockout by AdV-Delivered CRISPR / Cas9 in Postnatal Chick Leg Muscle", *International Journal of Molecular Science*, 21(7).
- Young, A. E., Mansour, T. A., McNabb, B. R., Owen, J. R. *et al.* (2020) "Genomic and phenotypic analyses of six offspring of a genome-edited hornless bull", *Nature Biotechnology*, 38, pp. 225-232.
- Yum, S., Lee, S., Kim, H., Choi, W. *et al.* (2016) "Efficient generation of transgenic cattle using the DNA transposon and their analysis by next-generation sequencing", *Scientific Reports*, 6(27185), pp. 1-12.

- Zhang, J., Cui, M. L., Nie, Y. W., Dai, B. *et al.* (2018) "CRISPR/Cas9-mediated specific integration of fat-1 at the goat MSTN locus", *FEBS Journal*, 285(15), pp. 2828–2839.
- Zhang, J., Liu, J., Yang, W., Cui, M. L. *et al.* (2019) "Comparison of gene editing efficiencies of CRISPR/Cas9 and TALEN for generation of MSTN knock-out cashmere goats", *Theriogenology*, 132, pp. 1–11.
- Zhang, P., Liu, P., Dou, H., Chen, L. *et al.* (2013) "Handmade Cloned Transgenic Sheep Rich in Omega-3 Fatty Acids", *PLoS ONE*, 8(2).
- Zhang, P., Zhang, Y., Dou, H., Yin, J. *et al.* (2012) "Handmade cloned transgenic piglets expressing the nematode fat-1 gene", *Cellular Reprogramming*, 14(3), pp. 258–266.
- Zhang, R., Li, Y., Jia, K., Xu, X. *et al.* (2020) "Crosstalk between androgen and Wnt/ β -catenin leads to changes of wool density in FGF5-knockout sheep", *Cell Death & Disease*, 11(407), pp. 1-12.
- Zhang, X., Li, W., Liu, C., Peng, X. *et al.* (2017) "Alteration of sheep coat color pattern by disruption of ASIP gene via CRISPR Cas9", *Scientific Reports*, 7(8149), pp. 1–10.
- Zhang, X., Li, Z., Yang, H., Liu, D. *et al.* (2018) "Novel transgenic pigs with enhanced growth and reduced environmental impact", *eLife*, 7, pp. 1–19.
- Zhang, Y., Wang, Y., Yulin, B., Tang, B. *et al.* (2019) "CRISPR/Cas9-mediated sheep MSTN gene knockout and promote sSMSCs differentiation", *Journal of Cellular Biochemistry*, 120(2), pp. 1794–1806.
- Zhou, W., Wan, Y., Guo, R., Deng, M. *et al.* (2017) "Generation of beta-lactoglobulin knock-out goat using CRISPR/Cas9", *PLoS ONE*, 12(10).
- Zhu, X. X., Zhan, Q. M., Wei, Y. Y., Yan, A. F. *et al.* (2020) "CRISPR/Cas9-mediated MSTN disruption accelerates the growth of Chinese Bama pigs", *Reproduction in Domestic Animals*, 55(10), pp. 1314–1327.