

Globethics Repository



Bases Técnicas de la Transformación genética de organismos [Technical Basis of Genetic transformation of organisms]

This page was generated automatically upon download from the Globethics Repository.
More information on Globethics see <https://www.globethics.net>. Data and content policy
of Globethics Repository see <https://repository.globethics.net/pages/policy>.

Item Type	Article
Authors	Salcedo Sora, Enrique
Publisher	Universidad Militar Nueva Granada
Rights	Creative Commons Copyright (CC 2.5)
Download date	2026-07-16 04:43:32
Link to Item	http://hdl.handle.net/20.500.12424/214973

Bases Técnicas de la Transformación genética de organismos

Enrique Salcedo Sora Ph.D.

Centro de Investigaciones
Facultad de Medicina
Universidad Militar Nueva Granada

Introducción

La modificación de plantas y la transferencia nuclear y sus aplicaciones han sido de gran debate en el proceso de la validación ante la sociedad de tales trabajos científicos. En el presente documento he tratado de sintetizar los fundamentos de tales técnicas. Esto como parte del papel de difusión del conocimiento que intentamos cumplir quienes trabajamos en ciencias biológicas. Igualmente desgloso los avances y gran potencial de la transformación de insectos (mosquitos), eventos revolucionarios que han pasado desapercibidos en medio de la publicidad dedicada a otros organismos de mayor interés para los protagonistas del mercadeo internacional. Entre estos insectos están incluidos aquellos que son vectores de enfermedades endémicas en zonas tropicales y subtropicales como dengue, dengue hemorrágico, fiebre amarilla, y malaria.

En este documento espero profundizar en algunas de las ideas que intenté aportar en el panel sobre la Modificación Genética de Microorganismos llevado a cabo como parte del Congreso Internacional sobre Ética de la Investigación Científica, Universidad Militar “Nueva Granada” en Noviembre 20 del 2000. Me parece que tales discusiones deben continuar e involucrar a todos los grupos con intereses en el tema. En la mayoría de estas discusiones brilla por su ausencia la industria privada, que esta desarrollando y comercializando algunas de las aplicaciones de las técnicas de modificación genética con más impacto social o por lo menos con mayor publicidad.

Modificación genética de plantas

“Caminando entre las filas de plantas de *Pisum sativum* (arveja o guisante común), Mendel llevaba un par de pinzas en una mano y un pincel de cabello de camello en la otra. Reclinándose con alguna dificultad, él abría el capullo para descubrir el estamen con su antera (contiene el polen). Con las pinzas Mendel cortaba las anteras de un grupo de plantas, por lo cual el polen era removido y así la planta era efectivamente castrada” (Henig, R.M. 2000) (1). Las plantas del otro grupo al que Mendel no les cortaba las anteras contribuirían con su polen a las plantas feminizadas del grupo anterior a las cuales días después Mendel, usando su pincel de cabello de camello, les traspasaba el polen. Con suma delicadeza maniobrando el pincel con la destreza del artista en que él se había convertido, el polen era servido sobre el estigma del pistilo de la flor de turno (1).

Y así Gregor Johan Mendel sembró y contó alrededor de 10,000 plantas y 40,000 capullos, y desgranó y contó por lo menos 300,000 guisantes. Después de años de paciente cultivo Mendel obtuvo lo que era el linaje estable (“pure breeders”: transmiten la misma forma del carácter de progenie a progenie) para iniciar la hibridación sistemática de plantas. De allí él produjo las famosas generaciones F1, F2, y F3 de híbridos. Con F2 fue claro la de nuevo famosa relación 3:1 de los caracteres bajo análisis, dominantes y recesivos respectivamente.

Que las posibles formas alternativas de presentación de un carácter físico (fenotipo) se segraban, es decir que no se mezclaban ni desaparecían, era evidente. F3 permitió a Karl Correns (Tübingen, Alemania 1900), 35 años después, desglosar la relación 9:3:3:1.

El transcurrir de la teoría cromosómica ubicó el origen de la información (genotipo) necesaria para codificar tales caracteres en agrupaciones concatenadas de ADN. Las alternativas formas de estos caracteres (alelos) codificaban para estructuras con el mismo propósito, funcionalmente equivalentes – en principio –, pero con claras diferencias de forma, color, o tamaño, entre otros.

La mínima unidad discreta y heredable con información suficiente para producir una estructura funcional en la célula fue denominada gen. Palabra acuñada por Wilhelm Johannsen (Profesor de fisiología vegetal, Copenhagen Agricultural College) en 1909, cuatro años después de que William Bateson había acuñado la palabra “genética”. Sin embargo ninguna relación tenía con esta última, simplemente fue la solución ecléctica para relacionar las teorías previas (siglo XIX) de heredabilidad, como la de “pangenesi” de Darwin, o “pangen” de Hugo De Vries, con las nuevas evidencias e ideas en circulación. Así, intentando darle continuidad al marco de discusión precedido por dichas hipótesis pero libre de sus desaciertos, Johannsen retiró el sufijo “pangen” para ofrecer al mundo el vocablo “gen”.

La hibridación de plantas ha sido practicada en forma sistemática desde entonces hasta convertirse en una sofisticada rama de la genética (3). Sin embargo, en este momento la manera más efectiva de introducir un nuevo alelo o gen, y avanzar en el estudio funcional de un gen es la modificación genética de plantas basada en la aplicación de dos principales herramientas que permiten superar algunos de los obstáculos más importantes de la hibridación de plantas.

La primera es básicamente la tecnología del ADN recombinante ampliamente desarrollada desde los pasos iniciales dados en los años 1970s (2). La segunda es basada en la manipulación de sistemas de recombinación genética encontrados casualmente en bacterias que infectan tejidos vegetales. Esta última opción ha sido ampliamente acogida debido a la carencia de ADN extracromosomal (plásmidos principalmente) en las especies conocidas de plantas. A continuación desgloso uno de los sistemas más conocidos y usados para clonación y selección de plantas modificadas genéticamente.

Agrobacterium tumefaciens es una bacteria cilíndrica flagelada que habita la mayoría de suelos y que puede penetrar tejidos vegetales, en áreas donde estos han perdido las barreras físicas de protección. Cuando esta bacteria se logra localizar al interior del tejido vegetal, inicia un proceso similar al de conjugación (paso directo de material genético bacteria-bacteria) a través de un plásmido normalmente replicado en *A. tumefaciens*.

El plásmido Ti de esta bacteria transporta genes delimitados por secuencias repetidas de 25 pares de bases (bp) llamados segmentos T que tiene 23000 bp (T-DNA). Las secuencias repetidas de 25bp permiten al segmento T ser insertado en el cromosoma del huésped (planta) a través de un proceso de recombinación no homóloga con la actividad enzimática recombinogénica codificada por genes denominados *vir*.

Una vez el segmento T esta ubicado en el genoma vegetal, se inicia la expresión de enzimas que, utilizando precursores del hospedero, produce

hormonas de crecimiento (auxins y citokinins) y aminoácidos (octopine, nopaline, mannopine) para facilitar la generación de un tumor o callus donde se garantiza la reproducción en masa de *A. tumefaciens* (4). Junto con otras bacterias como *Agrobacterium rhizogenes*, *Corynebacterium sp.*, y *Pseudomonas sp.*, la bacteria en mención (*A. tumefaciens*) hace parte de un grupo de patógenos que promueven inapropiado crecimiento celular vegetal ("plant galls") (5).

Este sistema natural de transformación ha sido usado para inducir la inserción de genes foráneos, o controlar el nivel de expresión de genes vegetales. Más específicamente, se han usado los bordes de 25bp y el segmento *vir*: en un plásmido se han ligado entre estos bordes a los genes que se desean insertar en el genoma vegetal, y en un segundo plásmido (helper) se ha clonado un segmento *vir*. El esqueleto del primer plásmido proviene de un plásmido de *E. coli* al cual se le ha incluido un marcador (*e.g.* kanamycin) para seleccionar plantas que estén realmente expresando el gene en cuestión.

A través de procedimientos que siguen este principio general, con variaciones en el tipo de bacteria conjugante y optimizando las estructuras de los plásmidos utilizados, se han modificado genéticamente un número de plantas de importancia económica directa: *Zea mays* (maíz), *Oryza sativa* (arroz), *Solanum lycopersicum* (tomate), *Glycine soja* (soya), entre otros. Todo esto al mismo tiempo que se continúan los laboriosos estudios básicos en modelos vegetales como *Arabidopsis thaliana* impulsados por este tipo de tecnología.

De gran trascendencia para la transformación genética de organismos y que merece una futura discusión, es la información proveniente de las secuencias de genomas completos de algunas especies vegetales a través de esfuerzos corporativos multinacionales.

Modificación genética de artrópodos vectores de agentes infecciosos

Recientemente se ha logrado la transformación estable de vectores de agentes causantes de patologías como Malaria, Fiebre amarilla y Dengue/Dengue hemorrágico (7). Se están desarrollando estrategias de modificación genética que potencialmente podrían inhabilitar la capacidad del mosquito vector para incubar y transferir el agente infeccioso mismo.

Los plásmidos usados para transportar las secuencias a insertar en los embriones del vector contienen secuencias caracterizadas inicialmente en *Drosophila sp.*, y conocidas como altamente recombinantes o recombinogénicas.

A través de un proceso de transposición estas secuencias se trasladan y/o multiplican a lo largo del genoma en donde se encuentren presentes. Razón por la cual se les ha llamado genéricamente "transposones".

Aunque de inmensas implicaciones para la salud del trópico, estos trabajos han recibido mucha menos atención por parte de los protagonistas de la discusión de la relevancia social y otros parámetros de la ética de transformación genética de organismos.

Transposones conocidos con nombre propio como *Hermes*, *Mariner*, *Minos*, *piggyBac*, procedentes de *Drosophila sp.* o *Musca domestica*, han sido usados en trabajos publicados en los últimos dos años (9-16). Cepas de *Aedes aegypti* han sido establemente modificadas con un cassette que contenía *Hermes* de *M. domestica*, otras cepas fueron transfectadas con

un marcador derivado de *D. melanogaster* (*cinnabar*) y controlado por un promotor bacteriano estandar (*lacZ*) (9).

En un trabajo similar se usó el transposon *Mariner* (10). Un avance subsecuente fue el uso de promotores homólogos o por lo menos derivados también de mosquitos (*Maltase-like I*, *Apyrase*, y 3xP3: Pax-6-TATA) (11, 12).

Por otro lado se ha intensificado la adaptación de marcadores mas “universales” que son básicamente Green Fluorescent Protein (GFP), y marcadores de resistencia a antibióticos (*e.g.* hygromycin B phosphotransferase) (12, 13). Esta vez con este tipo de marcadores se ha alcanzado la transformación de vectores que transmiten *Plasmodium sp.* (13, 14, 15), protozooario causante de la Malaria.

El siguiente paso en transformación de mosquitos vectores contemplaría la posibilidad de insertar o más exactamente transponer genes cuyo producto logre inhibir o bloquear el paso del agente infeccioso en alguno de los órganos del vector.

Idealmente la expresión de este producto podría ser regulada para que su transcripción sea estimulada en los órganos de interés en el vector, y aún más, en el momento que se crea su expresión sea más relevante. Sorprendentemente ambos objetivos se han logrado en *Aedes aegypti* (16).

A través de una transposición mediada por *Hermes* de *M. domestica*, y con *cinnabar* como marcador, se logró la expresión efectiva de *Defensin A* (*DefA*) que es uno de los mayores factores generales del sistema inmunológico de este insecto. A su vez este gen (*DefA*) se clonó con una secuencia promotora de gen *vitellogenin* (*Vg*) de *Aedes aegypti*. La expresión regulada por este promotor es estimulada, después de una ingesta de sangre (*A. aegypti* es un insecto hematófago) en el cuerpo graso (parte del sistema inmune innato) del insecto femenino.

Altos niveles de *Defensin A* transgénica fueron alcanzados 24 horas después de ingesta en la hemolinfa de mosquitos femeninos alimentados con sangre, y persistieron por 20-22 días posteriores (16). Otro tipo de moléculas aún más específicas como anticuerpos contra receptores reconocidos por alguno de los estadios del patógeno en el vector son también herramientas muy prometedoras en este tipo de estudios (17). Estos trabajos representan un paso significativo hacia el desarrollo de estrategias de genética molecular para el control de la capacidad de los vectores activos en la transmisión de patógenos.

Tomando en consideración la eficiencia de los ciclos biológicos de patógenos transmitidos por artrópodos, y la complejidad y flexibilidad de los patógenos transmitidos, las estrategias de control de estas patologías típicamente tropicales requerirá de planes integrados y multidisciplinarios. Entre otros, desarrollo de vacunas, nuevos medicamentos, métodos clásicos para controlar mosquitos vectores, prevención y vigilancia epidemiológica, y la aplicación de métodos moleculares para la manipulación de vectores y patógenos igualmente (7).

Modificación genética a través de transferencia nuclear

Se le ha llamado transferencia nuclear a la transformación de una célula sexual femenina no fertilizada y enucleada (núcleo extraído) con la totalidad del material genético contenido en el núcleo de una célula donadora de la misma especie. Por lo general se utilizan células

completas y la transferencia del núcleo se logra después de una fusión celular efectiva. Es, por definición, un proceso practicado en eucariotes y especialmente en células de organismos multicelulares el cual ha representado una alternativa viable, y ofrecido crucial información acerca del desarrollo embrionario y diferenciación celular (2). El gran avance de este proceso ha sido la progresiva viabilidad de organismos producidos con células donadoras en estadios avanzados de diferenciación (casos conocidos en clonación de ovejas como “Dolly y Polly”) (6) después de haberse logrado iniciales resultados con células embrionarias.

Esta técnica fue inicialmente (1950s) aplicada en modelos anfibios (*e.g. X. laevis*) en donde tuvo amplia acogida para el estudio del desarrollo embriológico temprano. Se demostró por ejemplo que las primeras divisiones celulares después de la fertilización producen células totipotenciales: Ellas dan origen a todos los tipos de células que componen el animal totalmente desarrollado. Sin embargo, la viabilidad de anfibios producidos por transferencia nuclear era nula después de alcanzar estadios intermedios de desarrollo.

Al intentarse la transferencia nuclear en mamíferos los diferentes resultados iniciales no fueron reproducibles. Sin embargo, en grandes mamíferos de relevancia económica se venía impulsando la optimización de protocolos de transformación por inyección pronuclear, al igual que de transferencia nuclear. El primero de estos es un proceso de transformación con un gene específico, y consiste en la inyección al huésped fertilizado de un alto número de copias (200-300) del gen que se quiere que sea expresado en el animal adulto. Dicho gene puede provenir de la misma especie (homólogo) o puede ser foráneo (heterólogo). Con este tipo de tecnología se logró la producción de 35 gramos de alfa-1-antitrypsina humana por litro de leche de oveja (8).

Los subsecuentes adelantos consistieron en la clonación del organismo completo por transferencia nuclear. Inicialmente con células embrionarias como se comentó anteriormente, y posteriormente con células aparentemente diferenciadas. Esto último tiene revolucionarias implicaciones en ciencias básicas (2), aparte de las grandes connotaciones comerciales y éticas.

De una célula proveniente de un organismo multicelular adulto se puede producir una estructura embriológica (de-diferenciación) que eventualmente puede dar origen a un adulto aparentemente idéntico a organismos de la misma especie, productos de una fertilización natural. Organizaciones como Animal Breeding Research Organisation, PPL Therapeutics, y Roslin Institute (Edinburg) continúan liderando la transformación genética y clonación de mamíferos.

Una aplicación altamente relevante de la producción de células de embriones derivados de transfección con células somáticas o sexuales es la obtención de células indiferenciadas o pluripotenciales (stem cells). Tal aplicación fué obvia desde los primeros experimentos de fertilización *in vitro* realizados en los años 1960s en modelos mamíferos.

Líneas celulares derivadas de blastocitos de conejo con 5 a 9 días de edad producían en condiciones experimentales específicas, aglomerados celulares que contenían células sanguíneas, de músculo, tejido conectivo, neuronas y macrófagos entre otros (22). Más espectacular aún fue la observación de estas líneas pluripotenciales colonizando médula ósea de animales con anemia severa inducida por irradiación. Esta última observación incluyó la descripción de rutas de migración celular (hígado-médula ósea, pulmón-médula ósea) predeterminadas a edad fetal en el

animal que recibía las células pluripotenciales. Idea altamente controversial en la época pero confirmada a la fecha.

Consideraciones éticas de los posibles usos de la modificación genética a través de transferencia nuclear

Las posibilidades de producción y uso terapéutico de células pluri- o totipotenciales de embriones clonados, y la clonación misma de un organismo completo ha comenzado a competir con la transformación genética de plantas por el lugar central de discusión.

Dos procesos han permitido tales avances: la viabilidad de organismos producto de la transferencia del núcleo de células somáticas (no sexuales) y adultas (diferenciadas), y el avance en el cultivo de células pluripotenciales derivadas de los embriones de dichos organismos o productos de fertilización *in vitro* (18). Entidades legislativas al igual que corporaciones asesoras tienen un papel que cumplir en la legislación de la experimentación y uso de las aplicaciones derivadas de tales tecnologías como: 1. – Generación de células y tejidos para trasplante y terapia para condiciones como Parkinson, traumas de columna, condiciones cardíacas, diabetes, y artritis; 2. – Avances en embriología y desarrollo; 3. – Nuevos protocolos, usando células pluripotenciales, para desarrollo y pruebas de medicamentos.

Podemos citar aquellas instituciones que se han pronunciado en el debate de cultivo y uso de células derivadas de embriones humanos: International Council of Scientific Unions (ICSU), Biological and Toxins Weapons Conventions (BWC), Council of Europe (First convention on human rights and biomedicine based on the Strasbourg Council of Europe draft 1997), International Centre for Genetic Engineering and Biotechnology (Trieste, New Delhi), American Society for Microbiology (Guidelines for code of ethics), Human Fertilisation and embryology authority (U.K), Human genetics advisory Commission (U.K).

Con el debate aún en su clímax, nuevos avances en el aislamiento cada vez más frecuente de células pluripotenciales de tejidos adultos están relegando a una estancia no sostenible la generación de embriones humanos para el único propósito de obtener un reservorio de este tipo de células (23). Aún tejidos adultos clásicamente vistos como altamente diferenciados (e.g. Tejido neuronal) han producido células pluripotenciales funcionales con habilidad intrínseca de originar tanto células del tejido del sistema nervioso como células no relacionadas con tejido nervioso (25).

En consenso con la Unión Europea (EU) (Grupo de Ética en Ciencia y Nuevas Tecnologías coordinado por el juez francés de alta corte Nöelle Lenoir) se ha recomendado que se siga actuando con prudencia y precaución en la autorización al uso de embriones humanos para investigación (19). Específicamente, la EU manifestó que: “En el momento la creación de embriones por/para transferencia de núcleos de células somáticas sería prematura”.

País por país la excepción son aquellos que permiten o financian investigación con embriones y cultivo de células derivadas de ellos: Gran Bretaña ha legalizado la financiación de tales proyectos (20), y Estados Unidos de América aunque ha legislado al respecto no ha ofrecido financiación oficial (18). El gobierno Francés ha sometido un proyecto legislativo al parlamento para permitir la investigación con embriones humanos de hasta 6-7 días de edad (21).

El gobierno de Estados Unidos (Agosto 9 2001) dió vía libre al uso de líneas pluripotenciales ya existentes y almacenadas en laboratorios donde la adquisición de tales líneas celulares cumple con la reglamentación instaurada a la fecha. El WARF (Wisconsin Alumni Research Foundation) tiene la patente para Estados Unidos de células pluripotenciales, es decir que toda aplicación real derivada del uso de alguna de las 18 líneas pluripotenciales que posee o de las 10 líneas celulares desarrolladas por otras instituciones estadounidenses privadas, dará lucro específico a WARF. Instituciones a mencionarse son Geron de Merlo Park, BresaGen (Australia), y ES Cell International (ESI) (24).

Nuestra obligación como investigadores en ciencias básicas es promover la discusión alrededor de las consideraciones éticas involucrando las posibles aplicaciones de la modificación genética de organismos, pero principalmente aportando la información necesaria con la evidencia que se tenga a la fecha (2).

La seriedad y rigor científico con que se libren tales debates permitirán a la sociedad validar o no tales aplicaciones en su momento. Es decir cuando la comunidad esté lista para aceptar total responsabilidad de las consecuencias previstas de las aplicaciones de las tecnologías y líneas de investigación que se aprueben. Una consecuencia interesante de las posibles limitantes dadas a la investigación en modificación genética es el forzar al colectivo científico a pensar en diferentes alternativas y profundizar en conocimiento básico antes de pensar en aplicar lo que al momento no tiene aceptación social. Por ejemplo, continuar la investigación en los factores citoplasmáticos de células sexuales femeninas que promueven de-diferenciación, buscando la posibilidad de de-diferenciar células adultas sin necesidad de transferencia nuclear.

Consecuentemente, no se requeriría la producción de un embrión para generar stem cells y tejidos necesarios, lo cual aliviaría en parte los componentes éticos alrededor del uso de embriones.

Conclusiones

La modificación genética de organismos ha sido esencia misma del desarrollo y avance de la Genética y Biología Molecular.

En primer lugar, practicada como un proceso científico, la hibridación de plantas dio origen a los paradigmas centrales de la genética de principio de siglo XX. Posteriormente, la transformación de segmentos discretos de ADN (gen-específica) ha protagonizado el desarrollo de la biología del desarrollo, tecnologías del ADN recombinante, y modificación y clonación de organismos multicelulares.

Dentro del gran avance en las técnicas para transformación gen-específica, las aplicaciones dadas a los procedimientos disponibles para la transformación de plantas han sido el foco de la mayor parte de la discusión.

Objetivos logrados han sido la generación de plantas que producen cofactores (vitaminas) requeridas en la dieta de humanos, plantas resistentes a patógenos específicos, y plantas resistentes a ciertos herbicidas, entre los casos conocidos públicamente.

La investigación y posible uso de células derivadas de embriones de organismos multicelulares, especialmente humanos, continua siendo debatida en la mayor parte de países con potencial investigativo en el tema.

Al mismo tiempo se hacen avances parciales en aquellos territorios donde se permite y/o financia la investigación con dineros públicos o privados.

Con un gran impacto en salud pública en zonas tropicales y subtropicales (mayor parte de la población mundial), la modificación de vectores al igual que de los patógenos que estos transmiten (Malaria, Leishmania, Dengue, Dengue hemorrágico, Fiebre Amarilla, Tripanosomiasis, etc) no ha recibido toda la atención que merece.

Si lo ponemos en perspectiva, las entidades financiadoras y grupos interesados en el avance de las ciencias básicas y aplicadas deberían concentrar sus esfuerzos también en las aplicaciones de la modificación genética con potencial para ayudar a controlar las causas de patologías a las cuales alrededor de 4000 millones de habitantes permanecen en riesgo.

Referencias

- (1)Henig RM. A monk and two peas. The story of Gregor Mendel and the discovery of genetics. London. Weidenfeld & Nicolson. 2000.
- (2)Salcedo E. Modificación genética de organismos - Hagamos un pequeño recuento -. Revista *Med.* Faculta de Medicina, Universidad Militar Nueva Granada. 2000 vol 9. 15-22.
- (3)Watson JD, Gilman M, Witkowski J, Zoller M. Genetic engineering of plants. In: Recombinant DNA. Scientific American Books. Second edition. New York. W.H. Freeman & Co. 1992 pp 273-292.
- (4)Nelson DL. Cox MM. In: Principles of Biochemistry. Third edition. 2000 pp: .
- (5)http://www.biology.leeds.ac.uk/teaching/MSc/BIgy5003/5003_14/sld006.htm
- (6)Wilmut I, Schnieke AE, McWhir J, Kind AJ, Campbell KHS. Viable offspring derived from fetal and adult mammalian cells. *Nature* 1997 385, 810-813.
- (7)Beaty BJ. Genetic manipulation of vectors: A potential novel approach for control of vector-borne diseases. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 2000 97, 10295-10297.
- (8)<http://www.ri.bbsrc.ac.uk/library/research/cloning/nt-history2.html>
- (9)Jakinskiene N, Coates CJ, Benedict MQ, Cornell AJ, Salazar Raferty C, James AA, Collins FH. Stable transformation of the yellow fever mosquito, *Aedes aegypti*, with the *Hermes* element from the housefly. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1998 95, 3743-3747.
- (10)Coates CJ, Jasinskiene N, Miyashiro L, James AA. *Mariner* transposition and transformation of the yellow fever mosquito, *Aedes aegypti*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1998 95, 3748-3751.
- (11)Coates CJ, Jasinskiene N, Pott GB, James AA. Promoter-directed expression of recombinant fire-fly luciferase in the salivary glands of *Hermes*-transformed *Aedes aegypti*. *Gene* 1999 226, 317-325.
- (12)Berghammer AJ, Klingler M, Wimmer EA. A universal marker for transgenic insects. *Nature* 1999 402, 370-371.
- (13)Catteruccia F, Nolan T, Blass C, Müller H-M, Crisanti A, Kafatos FC, Loukeris TG. Toward Anopheles transformation: Minos element activity in anopheline cells and embryos. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 2000 97, 2157-2162.
- (14)Coates CJ. A mosquito transformed. *Nature* 2000 405, 900-901.
- (15)Catteruccia F, Nolan T, Loukeris TG, Blass C, Savakis C, Kafatos FC, Crisanti A. Stable germline transformation of the malaria mosquito *Anopheles stephensi*. *Nature* 2000 405, 959-962.
- (16)Kokoza V, Ahmed A, Cho W-L, Jasinskiene N, James AA. Engineering blood meal-activated systematic immunity in the yellow fever mosquito, *Aedes aegypti*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 2000 97, 9144-9149.

- (17) Brennan JDG, Kent M, Dhar R, Fujioka H, Kumar N. *Anopheles gambiae* salivary gland proteins as putative targets for blocking transmission of malaria parasites. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 2000 97, 13859-13864.
- (18) Lee S. Human Stem Cells Research: NIH Releases Draft Guidelines for Comment. Harvard Law & Health Care Society. Recent Developments in Health Law. The Journal of Law, Medicine & Ethics. 2000 28, 81-83.
- (19) Dickson D. European panel rejects creation of human embryos for research. Nature 2000 408, 277.
- (20) <http://www.wellcome.ac.uk/>
- (21) Butler D. France opens doors to use embryos in stem-cell research. Nature 2000 408, 629.
- (22) Edwards RG. (2001). IVF and the history of stem cells. Nature 413, 349-351.
- (23) Kiessling AA. (2001). In the stem-cell debate, new concepts need new words. Nature 413, 453.
- (24) Knight J. (2001). Stem-cell giveaway proposed as confusion reigns over cell count. Nature 412, 753-754.
- Rietze RL., Valcanis H., Brooker GF., Thomas T., Voss AK. And Bartlett PF. (2001). Purification of a pluripotent neural stem cell from the adult mouse brain. Nature 412, 736-739.