

El INTA a la vanguardia

Clonación de Embriones Bovinos

■ Dres. Ricardo Alberio, Gustavo Palma, Juan Aller y Germán Kaiser
Grupo de Biotecnología de la Reproducción
INTA Balcarce, Buenos Aires

■ Dres. Valeri Zakhartchenko y Ramiro Alberio
Departamento de Biología Molecular
Universidad de Munich, Alemania

Un grupo de investigadores del INTA Balcarce logró para nuestro país un significativo avance en la clonación de embriones bovinos.

Esta técnica adquiere relevancia en la generación de animales modificados genéticamente para la producción de proteínas de interés farmacéutico; para la industria, en la producción de proteína polimerizante, y en la generación de modelos animales para el estudio de enfermedades humanas como la fibrosis quística, esclerosis múltiple y enfermedad de priones, entre otras

- El clonado es la biotécnica que permite la producción asexual de un individuo idéntico a su progenitor o dicho más propiamente, al material nuclear con que se generó. El caso más sencillo y primero utilizado para lograr esto fue la partición mecánica de un embrión en dos o más partes. Los individuos nacidos producto de tal partición eran idénticos, gemelos o clones. Esta forma de producir un clon es limitada puesto que difícilmente se pueden producir más de dos individuos idénticos.



Otras técnicas se fueron desarrollando a lo largo del siglo XX, culminando con la que puede ser llamada la cuarta generación de métodos de clonación en el año 1997 con la utilizada para dar lugar al nacimiento de la oveja Dolly.

La finalidad de disponer de la metodología de clonado está relacionada con sus posibles aplicaciones; una de ellas, en producción animal, se vincula a la conservación de especies y razas en peligro de extinción. Con este motivo ha sido ya utilizada en algunas especies tales como el panda gigante y el *bos gaurus*. También desde un punto de vista zootécnico, es posible considerar la posibilidad de reproducir individuos que por sus niveles de producción o simplemente por sus características productivas, sea de interés multiplicar en forma idéntica.

La aplicación que actualmente despierta mayor interés es la relacionada con la industria farmacéutica para la obtención industrial de proteínas a partir de animales vivos (nutricéuticos). Para este tipo de aplicación, la clonación está asociada con la transgénesis, que se basa en la transferencia de genes de interés a una célula receptora y la posterior integración de ese gen en el genoma del organismo receptor. Si el gen se integra en el genoma del animal y expresa su función, el animal se denomina transgénico; ésta integración se realiza por medio de la clonación. La proteína producida por este animal es denominada "producto transgénico". El

empleo de la transferencia de genes para producir animales con nuevas características productivas cobra importancia en forma creciente en medicina humana y en la industria de los nutracéuticos. Un ejemplo de ello es la obtención de vacas lecheras con la capacidad de producir leche libre de lactosa, lo cual es de una gran importancia para una gran parte de la población mundial que no la tolera. Otro ejemplo es la posibilidad de "humanizar" o "maternizar" la leche bovina como alimento para lactantes. La leche de mujer carece de β -lactoglobulina pero está presente en la leche de vaca, ello genera la intolerancia de los bebés a esta última y la limitación en su uso. La producción de vacas lecheras sin el gen que expresa la β -lactoglobulina, permitiría emplear sin restricciones la leche de vaca en la alimentación de lactantes. Por último, la transferencia de genes humanos a los animales productores de leche permitiría la obtención de proteínas humanas para uso médico. La ingeniería transgénica está también destinada a la producción de proteínas recombinantes y de tejidos y órganos para alo- y xenotrasplante .

Puesto que los animales transgénicos son en realidad individuos aislados (difícilmente existirá una población de transgénicos) la clonación constituye la herramienta indispensable para reproducir los animales que presentan estas características buscadas, y también puede ser asociada con la transgénesis en algunos aspectos que podrían ser considerados de interés zootécnico. Por medio de la manipulación genética será tal vez posible producir individuos resistentes a determinadas enfermedades, individuos sin cuernos o simplemente individuos que posean alguna característica de interés productivo particular. La clonación permitirá multiplicar rápidamente la cantidad de individuos con tales características.

EL CLONADO

En términos generales, consiste en la colocación de una célula del individuo que se desea clonar dentro de un ovocito de vaca (óvulo) sin núcleo (se extirpa mecánicamente) que actúa únicamente como receptor. Una vez realizada esta maniobra se induce la fusión de ambas membranas celulares; el ovocito, que ahora tiene el núcleo que se desea reproducir, es activado para que inicie sus divisiones hasta llegar

al estadio de blastocisto 7 días más tarde. En este momento será transferido a la vaca receptora que lo gestará.

LA LABOR DEL INTA

El Grupo de Biotecnología de la Reproducción (GBR) de la Estación Experimental Agropecuaria Balcarce del INTA comienza a realizar investigaciones en la temática relativa a la producción de embriones a partir del año 1987. En esta primera etapa, las investigaciones estuvieron destinadas a la producción de embriones por medio de la superovulación.

En una segunda etapa de las investigaciones dirigidas a la producción de embriones, se comenzó con su producción *in vitro*, lo cual implicaba un avance muy importante con respecto a la tecnología hasta ahora implementada. El GBR fue el primero en el país en comenzar con estas investigaciones en el año 1991. La técnica de producción *in vitro* de embriones y su manejo apropiado constituyen elementos básicos para el desarrollo de la metodología de clonado. El proyecto para poner en marcha la metodología de clonado por medio de la transferencia nuclear, puesto en marcha en 1999 en el INTA Balcarce, tenía como fin realizar algunas investigaciones vinculadas a la biología de las gametas y del embrión temprano y por otra parte, disponer de la técnica para sus múltiples usos posteriores en biomedicina.

El proyecto para realizar estudios en clonación mencionado al comienzo, fue aprobado durante el 2000 y hacia fines de ese mismo año se dio inicio a las primeras actividades. Estas fueron precedidas por otro proyecto (Proyecto FONTAR INTA-BID) que permitió adecuar la estructura de laboratorios y de equipamiento necesarios para gran parte de los trabajos de puesta en marcha de esta biotecnología. Durante los meses de septiembre a diciembre de ese año los trabajos relativos al proyecto tuvieron como objetivos: la puesta a punto de la metodología del clonado bovino en el Laboratorio de Biotecnología de la Reproducción del INTA Balcarce, y realizar investigaciones dirigidas a mejorar la eficiencia de la técnica.

METODOLOGÍA UTILIZADA

Los trabajos consistieron en la producción de



embriones clones obtenidos a partir de células somáticas de animales adultos o de fetos. La metodología utilizada consistió en que las células somáticas del individuo a clonar fueron cultivadas, multiplicadas y preparadas para su uso posterior. Esta preparación consistió en llevarlas hasta un estadio de inactividad del ciclo celular (ausencia de división, G0). La quiescencia de una célula en tal estadio (G0) puede modificar la estructura de su cromatina y posibilitar así su reprogramación y desarrollo posterior. Estas células fueron guardadas congeladas hasta su uso. Se obtuvieron ovarios de un matorero próximo a la estación experimental. Estos ovarios fueron lavados y de ellos se obtuvieron los óvulos (ovocitos) que se encontraban en los folículos. Los óvulos fueron madurados durante un período de 16 horas. En este momento se procedió a extraer sus núcleos por medio de una micropipeta, inmediatamente después fue colocada la célula a clonar en contacto con la pared del óvulo sin núcleo. Los conjuntos de óvulos y células fueron colocados en una máquina llamada fusor celular la cual mediante pulsos eléctricos produce la fusión de la pared celular del óvulo con la de la célula a clonar ingresando el nuevo núcleo al óvulo y quedando constituido el embrión.

A continuación, se activó químicamente a este embrión para que diese comienzo a sus divisiones. Cuando producto de estas divisiones llegó al estadio de blastocisto (aproximadamente con 160 células) 7 días después de la fusión, el embrión estuvo en el momento apropiado para ser colocado en el útero de una vaca llamada receptora.

Durante los dos meses de trabajo destinados a esta etapa del proyecto, se trabajó con células somáticas de diferentes individuos y con dife-

rentes características de interés tanto zootécnico como biomédico. En las trece sesiones de clonado que se llevaron a cabo durante ese período, se pusieron a fusionar un total de 819 ovocitos con células somáticas. El éxito de la fusión fue muy alto puesto que se observó un 91.7% de fusiones. La etapa siguiente en la evaluación del proceso, fue la de óvulos fusionados que comenzaron la división. Así se observó que el 54% de estos óvulos eran embriones que habían comenzado la división celular entre las 24 y 36 hs. después de ser activados. Posteriormente, estos embriones de dos células debían seguir creciendo durante 6 días para llegar al estadio en que podían ser transferidos a las vacas receptoras. En esta etapa es en general donde se producen las mayores pérdidas ya que es muy difícil de mantener en el laboratorio condiciones de cultivo similares a las que se observan en el útero del animal vivo. A pesar de ello, a los 7 días después de la fusión se observó que un 41% de los embriones que habían comenzado la división alcanzaban el estadio deseado (llamados mórula y blastocisto) lo cual significa que un 22% de los ovocitos fusionados habían llegado a ser embriones susceptibles de ser transferidos a las vacas receptoras.

Esta performance general puede ser considerada excelente ya que fue similar a la obtenida en otros laboratorios del mundo que trabajan en la misma técnica desde hace varios años. Finalmente se procedió a la transferencia de los embriones producidos a vacas receptoras preparadas previamente a tal efecto. De estas transferencias resultaron 3 gestaciones al llevarse a cabo el diagnóstico de gestación 45 días después de transferidos los embriones. Dos de estas gestaciones se perdieron antes de los tres

meses y la tercera llegó hasta los 8 meses y 10 días (una semana antes de realizar la cesárea programada) momento en el cual la vaca receptora murió sin poderse determinar la causa de la misma. Se encontró que esta vaca tenía dos fetos hembra Holando Argentino (las células de la donante eran de una vaca adulta Holando Argentino), uno perfectamente normal y el otro con algunas deformaciones esqueléticas.

A pesar que los resultados de este trabajo no fueron coronados con el nacimiento de un ternero clon, esta experiencia en colaboración con la Universidad de Munich sirvió para poner a punto una técnica de alta complejidad en nuestro grupo así como para realizar algunas investigaciones puntuales.

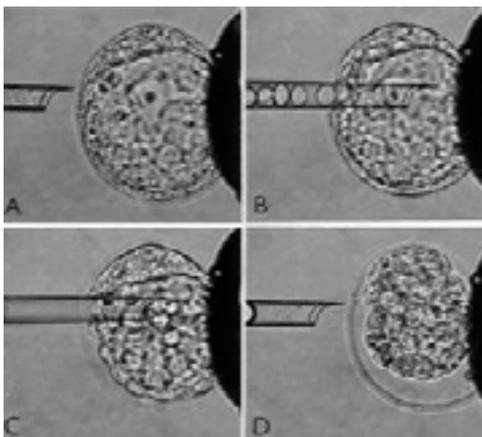
■ En esta figura se muestran etapas del proceso de obtención de células de un embrión mediante una micropipeta (fotos a y b) y su reinyección en otro embrión (c y d).

Esta es una de las técnicas de clonado en la cual se extraen células embrionarias y se transfieren a otro embrión produciendo clonación por quimerismo.

Esta es una de las formas más primarias de producir clones.

En nuestro caso, las células fueron obtenidas de una vaca adulta (no eran células embrionarias sino somáticas) y transferidas a un óvulo sin núcleo.

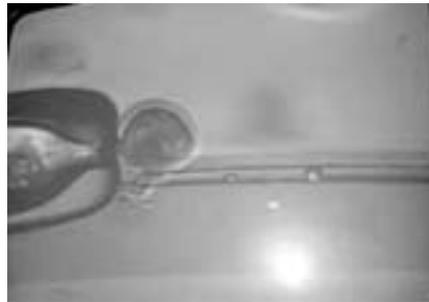
Con esta metodología es posible la producción de clones de una forma mucho más precisa que con el sistema anterior.



CONCLUSIÓN

Es posible afirmar que con lo realizado hasta el presente se demostró que el INTA está en condiciones de producir clones bovinos aún cuando esta técnica se encuentre, de momento, en fase experimental. Esto es sumamente importante, dado que la clonación de animales tiene gran relevancia en la generación de animales modificados genéticamente para la producción de proteínas de interés farmacéutico, como los factores de coagulación sanguínea; para la industria, en la producción de proteína polimerizante, quimosina, y en la generación de modelos animales para el estudio de enfermedades humanas, como la fibrosis quística, esclerosis múltiple, enfermedad de priones, entre otras.

■ En esta figura muestra la técnica usada en nuestro laboratorio y se aprecia el momento en que se está extrayendo el núcleo del ovocito (ovulo) que servirá posteriormente como receptor de la célula que se quiere clonar. En la micropipeta se observan los restos de núcleo que han sido extraídos. Con el mismo instrumental será después colocada la célula a clonar en la zona donde se encuentra la punta de la micropipeta.



En esta fotografía se muestra la ternera recuperada de la vaca muerta 15 días antes de la fecha prevista de parto. Se puede observar que la misma estaba prácticamente a término y era normal.

