

Capítulo LXVIII

Clonación por transferencia nuclear en ganado bovino. Avances y aplicaciones en la ganadería del siglo XXI

Ana P. Alessio
Pablo Bosch

Los mamíferos han evolucionado hacia un tipo de reproducción sexual en la cual es condición la participación de dos sexos para generar descendencia con el fin de perpetuar la especie. Este tipo de reproducción, confiere a los animales ciertas ventajas respecto a los que se reproducen asexualmente, siendo la más relevante, la variabilidad genética en la descendencia, es decir, los hijos son genéticamente diferentes a los padres y entre sí. Esta condición ha permitido que las especies con reproducción sexual posean una gran capacidad de adaptación al medio ambiente cambiante. La posibilidad de multiplicar animales mamíferos de manera asexual, proceso que no ocurre naturalmente, ha cautivado durante mucho tiempo a la comunidad científica mundial. Si bien se ha logrado inducir el desarrollo embrionario partenogénico (individuos originados a partir de un solo progenitor), en los mamíferos, estos embriones no superan los estadios tempranos del desarrollo fetal.

Desde un punto de vista más aplicado a la producción animal, la propagación asexual de ciertos individuos genéticamente superiores de una población conllevaría a mejoras genéticas y a la eficiencia de los sistemas productivos pecuarios. Un ejemplo clásico de la biotecnología reproductiva es la bipartición de embriones al estadio de blastocisto, la cual es una manera de propagación asexual que permite incrementar la eficiencia reproductiva, ya que se generan dos individuos idénticos (gemelos) a partir de un solo embrión de alto potencial genético. Otra estrategia para generar múltiples embriones genéticamente idénticos es la disgregación de un embrión de hasta 8 células para obtener sus blastómeras constituyentes, cada una de las cuales posee el potencial para originar un nuevo individuo.

En forma experimental, se ha establecido que las blastómeras provenientes de embriones en los primeros estadios de desarrollo son totipotenciales, es decir, que cada una puede dar origen a todos los tipos celulares presentes en el animal adulto, como así también a las membranas asociadas y la placenta. En razón de la complejidad técnica asociada a esta última tecnología, la misma no se ha difundido comercialmen-

te. Las metodologías hasta aquí mencionadas permiten obtener una o más copias genéticas de un genotipo particular utilizando como punto de partida un embrión preimplantacional; por esa razón, el número de individuos que se pueden generar a partir del embrión original es naturalmente limitado. Es ya un hecho afortunado y comprobado que mediante la técnica de transferencia nuclear de células somáticas (TNCS) sea posible obtener teóricamente un número ilimitado de individuos genéticamente idénticos originados a partir de un animal, como veremos luego.

La transferencia nuclear es un término que señala la transferencia del núcleo de una célula al citoplasma de otra célula, generalmente un ovocito o cigoto, a la cual se le ha removido su propio material genético. Esta técnica fue desarrollada inicialmente en anfibios (McKinnell, 1962) y luego fue adaptada para ser aplicada a células y ovocitos mamíferos. Los primeros experimentos de transferencia nuclear en mamíferos se realizaron utilizando como donantes de núcleos blastómeras embrionarias las cuales se disgregaban a partir de un embrión preimplantacional para ser posteriormente transferidas al citoplasma de cigotos u ovocitos enucleados. Como resultado de estos experimentos fue posible obtener crías vivas (Prather *et al.*, 1987), lo cual no es sorprendente si se considera que el material nuclear de las blastómeras donantes es *per se* totipotente.

Lo que causó gran impacto, tanto dentro de la comunidad científica como fuera de ella, fue la difusión en 1997 de la noticia sobre el nacimiento del primer mamífero producido mediante la técnica de transferencia nuclear a partir de una célula aislada de la glándula mamaria de un animal adulto (Wilmut *et al.*, 1997). La oveja Dolly, nombre con el cual se conoce al primer clon mamífero generado a partir de una célula diferenciada adulta, se convierte de este modo en un ícono de los logros científicos del siglo XX, el cual sirvió como plataforma tecnológica para una gran cantidad de desarrollos biotecnológicos. Las implicaciones biológicas y biotecnológicas de la TNCS en la producción pecuaria moderna y biomedicina serán abordadas a lo largo del presente capítulo.

TÉCNICAS PARA PRODUCIR “COPIAS GENÉTICAS” O CLONES EN ESPECIES MAMÍFERAS

La palabra “clon” tiene diferentes significados de acuerdo al contexto en el cual se aplica, pero en general, implica múltiples copias idénticas de una molécula como el ADN u organismo unicelular o pluricelular. Por ejemplo, un grupo de microorganismos o células originadas a partir de un único antecesor, y por lo tanto idénticas entre sí, es considerado un clon. El clonado en animales pluricelulares implica la generación de individuos genéticamente idénticos mediante reproducción asexual utilizando diferentes metodologías o estrategias, como la bipartición embrionaria o la transferencia nuclear.

Bipartición embrionaria

Proceso mediante el cual un embrión preimplantacional, generalmente en estadio de blastocisto, es seccionado mediante microcirugía para obtener dos embriones viables con potencialidad para desarrollarse luego de la transferencia a hembras receptoras (Willadsen, 1979).

Transferencia nuclear

Implica la transferencia del núcleo de una célula proveniente de un embrión o animal adulto que se pretende clonar, a un ovocito o cigoto al que previamente se le ha removido su material genético (enucleado). Como donantes de núcleos se pueden utilizar blastómeras o células provenientes de animales adultos. Esta última técnica es conocida como TNCS (Campbell *et al.*, 1996). La TNCS presenta una serie de ventajas y un abanico más amplio de aplicaciones en combinación con otras metodologías, lo que ha conducido a su mayor difusión tanto en laboratorios académicos como comerciales. Por ese motivo, en este artículo abordaremos aspectos técnicos, biológicos y las aplicaciones de la TNCS con especial énfasis en el área de la producción de ganado bovino.

TRANSFERENCIA NUCLEAR DE CÉLULAS SOMÁTICAS (TNCS)

Desde su introducción, la TNCS ha alcanzado un grado de desarrollo tal, que constituye una técnica de uso rutinario en muchos grupos de investigación en todo el mundo y está siendo usada de manera creciente con fines comerciales. Las aplicaciones de esta técnica comprenden desde la multiplicación de individuos de gran valor genético en programas de mejoramiento animal hasta la conservación de especies en peligro de extinción. Además, de forma adicional, la TNCS representa un método transgénico alternativo que posibilita generar grandes animales con modificaciones complejas/precisas en lugares preestablecidos de sus genomas.

En este sentido, la TNCS promete reemplazar metodologías tradicionales como la microinyección pronuclear para generar animales transgénicos para la producción de proteínas recombinantes con aplicaciones terapéuticas y diagnósticas. Asimismo, en el futuro se espera que a través de la manipulación genética se pueda contar con células, tejidos y eventualmente con órganos completos “humanizados” para ser utilizados en terapia regenerativa y trasplante a pacientes humanos. No hay duda que las mejoras en la eficiencia global de los protocolos TNCS, especialmente en el ganado bovino, junto a los avances en el campo de la biología molecular, genómica, proteómica y otras disciplinas afines aportarán nuevas herramientas para desarrollos biotecnológicos en el campo de la salud humana y la producción animal.

TRANSFERENCIA NUCLEAR DE CÉLULAS SOMÁTICAS: ASPECTOS TÉCNICOS

Esta técnica se basa en el concepto de que el citoplasma del ovocito posee factores capaces de inducir cambios en el material nuclear de la célula donante del material genético. Dichas modificaciones epigenéticas, cuyas bases moleculares son poco conocidas, se traducen en cambios de la expresión génica que conducen a una reprogramación de la cromatina a un estado totipotencial, condición que posibilita el desarrollo de un individuo completo a partir del material genético transferido. El éxito del clonado por transferencia nuclear depende de una delicada serie de eventos que toman lugar en un corto período de tiempo durante el cual se produce la reprogramación nuclear, la cual tendrá grandes efectos en el futuro desarrollo embrionario, fetal y placentario.

El protocolo clásico para la producción de bovinos mediante la técnica de TNCS incluye los siguientes cinco pasos (Stice & Keefer, 1993): colección y maduración *in vitro* de ovocitos, enucleación, transferencia de núcleo y fusión, activación y cultivo embrionario y transferencia a hembras receptoras sincronizadas (Figura 1).

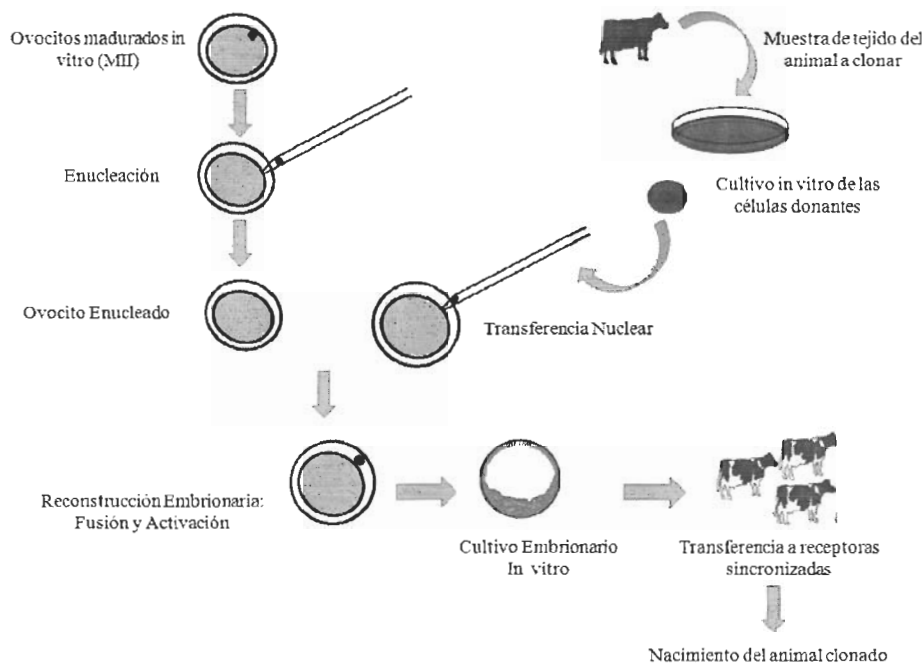


Figura 1. Esquema general de los pasos involucrados en la producción de animales por transferencia nuclear.

Colección y maduración *in vitro* de ovocitos

Los ovocitos inmaduros cubiertos por células que forman el cumulus oophorus (CO) se obtienen por aspiración o incisión de folículos antrales presentes en ovarios recolectados de hembras sacrificadas en mataderos. De esta manera, se puede contar con una gran dotación de ovocitos para la práctica de TNCS a un costo generalmente muy bajo. Los complejos ovocito-células del cumulus se inspeccionan en una lupa estereoscópica, con el fin de seleccionar los de buena calidad para ser colocados de inmediato en un medio de maduración en una incubadora con atmósfera controlada. Luego de la maduración *in vitro*, aproximadamente el 80-90% de los ovocitos inmaduros puestos a cultivar alcanzan el estadio de metafase de la segunda división meiótica (MII) y por lo tanto, han extruido el primer cuerpo polar. En bovinos, el tiempo de maduración *in vitro* es de aproximadamente 17-22 h. Los ovocitos recuperados en MII brindan las mejores condiciones para reprogramar el núcleo de la célula donante, por lo tanto, todos los protocolos de TNCS recomiendan su uso como citoplastos recipientes.

Enucleación

El proceso de remoción de material genético del ovocito para generar un citoplasto se conoce como enucleación, la cual consiste en la aspiración de una pequeña porción de citoplasma, generalmente cercana al primer cuerpo polar, la cual contiene los cromosomas de la metafase II (Li *et al.*, 2004). Normalmente, la enucleación se realiza utilizando micromanipuladores, los cuales permiten el movimiento de la micropipeta de enucleación en los tres planos del espacio. Uno de los micromanipuladores, usualmente el izquierdo, controla el movimiento de una pipeta de vidrio con punta roma (pipeta *holding*) la cual permite, mediante succión, sostener firmemente al ovocito para su enucleación. El otro micromanipulador, se encarga de la enucleación por aspiración de la metafase junto con la menor cantidad de citoplasma posible (Bosch *et al.*, 2004).

Transferencia del núcleo y fusión

Un fibroblasto, que es el tipo celular más utilizado, se inyecta en el espacio perivitelino del citoplasto, utilizando la misma aguja con la cual se enucleó al ovocito. La introducción del material genético donante dentro del citoplasto recipiente se realiza mediante la fusión de la membrana celular del fibroblasto con el oolema (membrana plasmática del citoplasto), a través de la aplicación de pulsos eléctricos generados por un electrofusor. Como consecuencia, el núcleo de la célula donante queda incluido en el ooplasma, donde luego de la disolución de la membrana nuclear, la cromatina queda expuesta a los factores que inducen la reprogramación.

Activación

Se considera un paso crucial para superar el arresto meiótico, en el que se encuentra el ovocito para permitir el desarrollo del embrión reconstituido. Se han reportado diferentes tratamientos que inducen la activación del ovocito y desencadenan el desarrollo embrionario, entre los cuales se incluyen pulsos eléctricos, tratamiento con etanol, ionomicina de calcio, etc. En cualquier caso, la finalidad es inducir la liberación del calcio almacenado en el retículo endoplásmico liso del ovocito el cual desata una serie de eventos intracelulares que resultan en la iniciación del desarrollo embrionario. Combinado con estímulos que inducen el aumento de la concentración de Ca^{2+} citosólico, se utilizan inhibidores de la síntesis proteica (cicloheximida ó puromicina) o inhibidores de proteínas serina-treonina kinasas (6-DMAP) que actúan bajando los niveles de factores promotores de la maduración (MPF) induciendo al ovocito a dividirse. Un protocolo muy difundido que es capaz de inducir una muy buena tasa de activación embrionaria en la especie bovina es la incubación secuencial de los ovocitos en una solución de ionomicina ($5 \mu\text{M}$) por 5 min seguido por incubación con 6-DMAP (2 mM) por 4 h.

Cultivo embrionario y transferencia a hembras receptoras sincronizadas

Los embriones bovinos reconstruidos son cultivados *in vitro* durante 7 días, momento en el cual alcanzan el estado de blastocisto y pueden ser transferidos por vía transvaginal a hembras receptoras sincronizadas. Como una alternativa, los embrio-

nes pueden ser congelados en etilenglicol utilizando protocolos de enfriamiento lento o vitrificados para su conservación por tiempo prolongado en N₂ líquido. En razón de la baja tolerancia de los embriones obtenidos por TNCS a la criopreservación, este procedimiento debe utilizarse con discreción. Normalmente, se transfieren entre 1-4 embriones por receptora, para aumentar las probabilidades de que se establezca la preñez, ya que la supervivencia embrionaria luego de la implantación es muy baja (Niemann *et al.*, 1993). Por otro lado, la transferencia de más de un embrión por receptora posibilita la ocurrencia de preñeces múltiples que están asociadas a un riesgo mayor de distocia y freemartinismo.

EFICIENCIA DEL CLONADO POR TRANSFERENCIA NUCLEAR

A pesar de los denodados esfuerzos para mejorar la eficiencia de la TNCS en términos del número de animales vivos por embrión reconstruido, en la mayoría de las especies domésticas, los porcentajes de éxito de esta metodología han permanecido muy bajos; sólo 1-5% de los embriones reconstruidos desarrollan a término. Sin embargo, en ganado bovino, la eficiencia de la TNCS ha experimentado mejoras técnicas que han conducido a incrementos de la proporción de embriones capaces de originar terneros vivos, siendo técnicamente factible superar el 10% (Cuadro 1). En gran medida, la baja eficiencia observada tiene su origen en procesos de diferenciación defectuosos, los cuales se manifiestan como problemas de implantación, placentación y organogénesis, que a su vez conducen a altas tasas de muertes embrionarias (Hill *et al.*, 2000), fetales y postnatales (Akagi *et al.*, 2013). La evidencia experimental indica que la mayor parte de estas complicaciones son causadas por una inapropiada reprogramación epigenética del núcleo donante lo que llevaría a un incorrecto patrón de expresión génica en los embriones producidos por TNCS (Wells, 2005).

Cuadro 1
Eficiencia de la TNCS en grandes animales

Especie	Número de animales*	% de crías viables	Comentarios
Bovinos	~ 3000	15-20	30% de los terneros clonados mostraron anomalías, como incremento del peso al nacer.
Ovinos	~ 400	5-8	Problemas similares a los observados en bovinos.
Caprinos	~ 400	3	-
Porcinos	~ 200	< 1	Algunos clones mostraron bajo peso al nacer.
Mulares	1	~ 1	-
Caballos	1	~ 1	-

*Número de animales estimado a partir de la TNCS desde 1997.

Adaptado de: Niemann & Lucas-Hahn, 2012.

APLICACIONES DE LA TNCS EN GANADERÍA Y EN BIOMEDICINA

La TNCS es una plataforma tecnológica que puede ser utilizada como herramienta en una amplia gama de aplicaciones potencialmente útiles tanto en producción animal como en salud humana. A continuación describimos de manera sucinta los principales campos de aplicación de esta tecnología.

Mejoramiento genético animal

A lo largo de los años se ha desarrollado una gran cantidad de herramientas teóricas y prácticas aplicadas al mejoramiento genético animal. Entre estas se destacan las pruebas de progenie y las biotecnologías reproductivas como la inseminación artificial, transferencia embrionaria y la ovulación múltiple, como también el sexado tanto de embriones como de semen y la fecundación *in vitro*. El clonado por transferencia nuclear se suma a estas herramientas clásicas, aunque no las reemplaza en los programas de mejoramiento animal. La principal ventaja de la introducción del clonado por TNCS es la diseminación más rápida de animales con un valor genético mayor que la media poblacional, permitiendo a los productores incrementar la performance de sus rebaños en una generación mediante la implantación de embriones generados por TNCS a partir de animales superiores. La situación ideal sería la combinación del clonado con la reproducción sexual. El clonado se usaría para determinar el valor genético de la línea materna mediante la evaluación de la progenie, obtenida mediante clonado. La línea materna con el mérito genético más alto es luego apareada con los mejores reproductores machos disponibles. Esta es una estrategia a través de la cual se podrían generar individuos genéticamente superiores.

Otro punto positivo asociado a la técnica de TNCS es la supuesta uniformidad fenotípica que se podría obtener en todos los clones obtenidos a partir de un determinado genotipo. Si bien se podría lograr una gran homogeneidad para caracteres discontinuos (ej. presencia o ausencia de cuernos), los cuales dependen de uno o pocos genes, no sucede lo mismo con caracteres continuos como producción de leche, peso al nacimiento, área del músculo *longissimus dorsi*, en los cuales el fenotipo resultante está afectado por un gran número genes y a su vez, está influenciado en mayor o menor medida por factores del medio ambiente (Van Vleck, 1999).

En resumen, la incorporación de la TNCS a programas de mejoramiento genético animal está supeditada al resultado de un análisis costo-beneficio. En la actualidad, los costos asociados a la TNCS son muy altos, en gran medida por la complejidad técnica y la baja eficiencia general de la técnica. Por lo tanto, en el caso que se logren mejoras significativas en la tasa de clones vivos logrados por embrión reconstituido, con seguridad, esta metodología ocupará el lugar que le corresponde en los programas de mejora genética en la especie bovina.

Conservación de germoplasma

La clonación por TN puede ser aplicada en programas destinados a la preservación de germoplasma de individuos de alto valor genético, razas bovinas autóctonas o rumiantes en peligro de extinción. Con este fin, se pueden preservar en nitrógeno lí-

quido, además de gametos, células somáticas del animal del cual se desea preservar la genética. En el futuro esas células somáticas estarán disponibles para generar un nuevo individuo por TNCS, el cual será genéticamente idéntico al animal del cual se obtuvieron las células. Ya sea por razones afectivas o productivas, el propietario de un animal puede optar por preservar sus células para eventualmente obtener en algún momento copias genéticas de ese individuo por medio de TNCS. La recolección de muestras de tejido para aislar células para TNCS no se restringe a animales vivos, ya que se pueden obtener a partir de cadáveres durante las primeras horas de producida la muerte del animal (Adams *et al.*, 2004). Otra circunstancia en la que la TNCS puede representar la única alternativa para recuperar la genética de un animal es en los casos de infertilidad adquirida tanto en machos como en hembras.

En relación con la preservación de especies en peligro de extinción la TNCS está llamada a ocupar un lugar prominente en programas de protección. Como prueba de principio, en el año 2000 nace una cría de gaur (*Bos gaurus*), bóvido salvaje amenazado, la cual fue generada por TNCS (Lanza *et al.*, 2001); lamentablemente, el gaur murió por un cuadro de disentería a las 48 h de nacido. Poco después, se reportó el nacimiento de un muflón europeo (*Ovis orientalis musimon*), quien se convirtió en el primer mamífero en peligro de extinción en ser clonado y sobrevivir más allá de los primeros días de vida (Loi *et al.*, 2001).

Producción de células madre embrionarias

Las células madre embrionarias (*Embryonic Stem Cells*) son células provenientes del macizo celular interno de un embrión en el estadio de blastocisto, las cuales poseen la capacidad de proliferar indefinidamente *in vitro* y diferenciarse en una variedad de tipos celulares presentes en el individuo adulto. Estas propiedades únicas de las células madre embrionarias ocuparán un lugar privilegiado como materia prima en protocolos de terapia regenerativa. Estas células se pueden obtener a partir de embriones humanos generados por fecundación *in vitro* o mediante la técnica de TNCS.

En el clonado con fines terapéuticos, como se lo conoce para diferenciarlo del clonado con fines reproductivos, las células obtenidas a partir de un paciente pueden ser cultivadas *in vitro* y utilizadas como donantes de núcleo para generar embriones (clones) a partir de los cuales es posible aislar células madre. Siendo estas células genéticamente idénticas a las células del individuo donante, su reintroducción no causaría rechazo inmunológico. De todas maneras, para aprovechar al máximo las propiedades de las células madre embrionarias y reducir las posibilidades de formación de tumores, el camino a seguir sería inducir la diferenciación *in vitro* de dichas células al tipo celular requerido por el paciente antes de implantarlas. Se están desarrollando protocolos que permiten dirigir la diferenciación de manera controlada hacia tipos celulares específicos, por ejemplo, para generar células musculares, nerviosas y otras, para ser utilizadas en el tratamiento de diversas enfermedades degenerativas o traumáticas.

Producción de animales transgénicos

La tecnología transgénica, es decir, la capacidad de modificar el genoma de un organismo mediante la introducción de ADN exógeno o la sustitución/remoción de

secuencias endógenas, se ha convertido en una herramienta con aplicaciones en el área de la salud humana y la producción animal. Para la generación de ganado transgénico mediante transferencia nuclear, las células que se utilizarán como donantes de núcleo son modificadas genéticamente, previas al procedimiento de transferencia nuclear. Los embriones generados se transfieren a hembras sincronizadas para dar origen a animales transgénicos. Entre los usos de los animales transgénicos, destacan la producción de fármacos (*gene pharming*), órganos para xenotrasplante y animales resistentes a enfermedades.

Producción de fármacos (*gene pharming*). El concepto de *gene pharming* hace referencia a la producción de proteínas humanas recombinantes de interés farmacológico en la glándula mamaria o en la sangre de animales transgénicos. Estas proteínas recombinantes se utilizan en el tratamiento de diversas enfermedades como arteriosclerosis, fibrosis quística, cáncer, enfermedades neurodegenerativas, hemofilia, enfermedad de Pompe, entre otras. Ejemplos de proteínas de uso terapéutico producidas mediante esta biotecnología incluyen $\alpha 1$ -antitripsina, lactoferrina, antitrombina III, hormona de crecimiento (hGH), α -glucosidasa y factor de coagulación IX, entre otras (Cuadro 2).

Xenotrasplantación. En razón del desfase entre la gran demanda de tejidos y órganos y la pobre oferta de los mismos a partir de donantes voluntarios, existe mucho interés en cubrir parte de dicha brecha con células, tejidos y órganos provenientes de animales. Sin embargo, existen limitantes de tipo biológico y ético que dificultan la implementación de dicha práctica. Debido a la gran similitud de los cerdos con la especie humana en lo referente a tamaño, anatomía y fisiología, estos animales son considerados los más apropiados como donantes de tejidos para futuras prácticas de xenotrasplantación. El principal problema asociado al trasplante de órganos de cerdo u otros animales a humanos es el rechazo inmunológico generado por antígenos presentes en la superficie de las células del animal donante.

En la actualidad, hay grupos de investigación dedicados a generar cerdos transgénicos que presentan mutaciones en los genes que codifican ciertos determinantes antigénicos de la superficie celular (modalidad denominada *knockout* de genes). El objetivo final de la investigación en esta área es generar animales que posean células, tejidos y órganos completamente “humanizados” los que se podrían trasplantar a pacientes humanos sin riesgo de rechazo inmunológico (Kues & Niemann, 2004). Rusia se colocó a la vanguardia de la xenotrasplantación a nivel mundial cuando en el año 2010 autorizó un tratamiento basado en el trasplante de células porcinas productoras de insulina a pacientes humanos con diabetes, convirtiéndose de este modo en el primer país en el mundo en aprobar la xenotrasplantación. Más allá de las limitaciones biológicas/técnicas que aún existen, cuestionamientos éticos y sanitarios relacionados con el trasplante de células animales a pacientes humanos tendrán que ser resueltos antes de la aplicación generalizada de esta modalidad terapéutica.

Producción de animales resistentes a enfermedades. Un aspecto muy interesante de la tecnología transgénica aplicada a la producción pecuaria es su potencial para generar líneas de animales resistentes a enfermedades mediante la introducción o remoción de genes específicos. Como ejemplo de tal aplicación se puede mencionar la producción de bovinos transgénicos que segregan una proteína antibacteriana re-

Cuadro 2
Proteínas recombinantes humanas producidas a partir de ganado transgénico

Característica Transgénica	Molécula	Método de transferencia génica	Especie
Incrementos en las tasas de crecimiento	Hormona de crecimiento (GH)	Microinyección	Porcinos
Incrementos en las tasas de crecimiento	Factor de crecimiento similar a insulina-1 (IGF-1)	Microinyección	Porcinos
Incrementos en los niveles de ácidos grasos poli-insaturados	Desaturasa	Microinyección/ TNCS	Porcinos
Metabolismo de fosfatasa	Fitasa	Microinyección	Porcinos
Composición de la leche	α -Lactoalbúmina	Microinyección	Porcinos
Resistencia al virus de la Influenza	Proteína Mx	Microinyección	Porcinos
Aumento de la resistencia a enfermedades	Inmunoglobulina A (IgA)	Microinyección	Porcinos Ovinos
Crecimiento de lana	Factor de crecimiento similar a insulina-1 (IGF-1)	Microinyección	Ovinos
Resistencia al virus Visna	Proteína de envoltura del virus visna	Microinyección	Ovinos
Resistencia a BSE*	Gen de la Proteína Priónica	TNCS	Ovinos
Composición grasa de la leche	Estearoil-desaturasa	Microinyección	Caprinos
Incrementos de proteínas lácteas	β -Caseína κ -Caseína	TNCS	Bovinos
Incrementos de lactoferrina en la leche	Lactoferrina Humana	Microinyección	Bovinos
Resistencia a Mastitis	Lisostafina	TNCS	Bovinos
Resistencia a BSE*	Gen de la Proteína Priónica	TNCS	Bovinos
Resistencia al virus de la Influenza	Short harpin RNA	Transducción Lentiviral	Aves

*BSE: bovine spongiform encephalopathy.
 Adaptado de: Kues & Niemann, 2011.

combinante, la lisostafina, en la glándula mamaria lo que incrementa la resistencia de estos animales a la mastitis bacteriana producida por *Staphylococcus aureus* (Liu *et al.*, 2013).

LEGISLACIÓN VIGENTE

Si bien se han producido enormes mejoras en los protocolos de TNCS, las elevadas tasas de mortalidad y la incidencia de anomalías epigenéticas de los animales clonados suponen dudas sobre la seguridad de los productos derivados de animales clonados y el bienestar animal. A raíz de estas controversias, y cuando la clonación comenzó a ganar interés comercial para la mejora de rebaños productivos, la FDA (U.S. Food and Drug Administration) inició en 2001 un exhaustivo análisis de los potenciales riesgos asociados al consumo de productos derivados de animales clonados.

Como resultado de estos estudios se concluyó que no existirían mayores riesgos al consumir productos alimenticios derivados de clones o su descendencia (<http://www.fda.gov/AnimalVeterinary/SafetyHealth/AnimalCloning/UCM055489>). A las mismas conclusiones arribó la EFSA (Agencia de Seguridad Alimentaria Europea) en 2008, 2009 y 2011. Sin embargo, en septiembre de 2008, el Parlamento Europeo votó 622-32 a favor de una propuesta para prohibir completamente el consumo de productos derivados de clones y su descendencia directa (generación F1) (Parlamento Europeo, 2008). La Comisión Europea propuso una flexibilización de esta medida la cual no fue implementada, por lo que la prohibición sigue en vigencia hasta que la decisión del Parlamento Europeo sea revisada.

CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS FUTURAS

La TNCS es una técnica con gran potencial en diferentes campos de aplicación, aunque su difusión se ha visto comprometida en gran medida por su baja eficiencia y seguridad. A pesar de estas limitaciones, la TNCS se ha posicionado como una herramienta valiosa para producir animales transgénicos de utilidad en investigación básica como también en biotecnología. La TNCS brinda la posibilidad de generar grandes animales con modificaciones complejas y precisas en su genoma, lo cual no era posible antes de su descubrimiento. La implementación de la TNCS en programas de mejoramiento genético, si bien podría acelerar el progreso genético, no reemplaza otras herramientas clásicas de la reproducción animal como la IA y la transferencia de embriones. La introducción de la TNCS de manera sistemática en dichos programas está en gran medida condicionada a una reducción de los altos costos asociados con la producción de animales por esta técnica y a lograr mejoras sustanciales de su eficiencia en términos de la proporción de clones saludables obtenidos.

Siendo la reprogramación nuclear inapropiada, el problema subyacente debe estar dirigido a explicar en gran medida los causales de las elevadas pérdidas embrionarias/fetales que se producen durante la gestación de los clones. Para ello es necesario avanzar en la comprensión de los mecanismos moleculares que gobiernan dicho proceso. Estos nuevos conocimientos servirán como fundamento para el desarrollo de protocolos de TNCS mejorados.

No existen dudas que la combinación de la TNCS con las nuevas herramientas de ingeniería genética posibilitará las intervenciones en el genoma animal con un grado de control impensado años atrás. Los conocimientos generados propondrán nuevos desafíos y perspectivas en la investigación biomédica y pecuaria para dar respuesta a una demanda creciente de nuevas biotecnologías para estos sectores.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Adams AM, Pratt SL, Gibbons JR, Arat S, Respass DS, Stice SL. 2004. Production of a cloned calf using kidney cells obtained from a 48-hour cooled carcass. *Reprod Fertil Dev* 16 (2): 133.
- Akagi S, Geshi M, Nagai T. 2013. Recent progress in bovine somatic cell nuclear transfer. *Anim Sci J*. 84 (3): 191-199.

- Bosch P, Hodges CA, Stice SL. 2004. Generation of transgenic livestock by somatic cell nuclear transfer. *Biotechnol Appl* 21 (3): 128-136.
- Campbell KH, McWhir J, Ritchie WA, Wilmut I. 1996. Sheep cloned by nuclear transfer from a cultured cell line. *Nature* 380 (6569): 64-66.
- Hill JR, Burghardt RC, Jones K, Long CR, Looney CR, Shin T, Spencer TE, Thompson JA, Winger QA, Westhusin ME. 2000. Evidence for placental abnormality as the major cause of mortality in first-trimester somatic cell cloned bovine fetuses. *Biol Reprod* 63: 1787-1794.
- Kues WA, Niemann H. 2004. The contribution of farm animals to human health. *Trends Biotechnol* 22 (6): 286-294.
- Kues WA, Niemann H. 2011. Advances in farm animal transgenesis. *Prev Vet Med* 102 (2): 146-56.
- Lanza RP, Cibelli JB, Diaz F, Moraes CT, Farin PW, Farin CE, Hammer CJ, West MD, Damiani P. 2000. Cloning of an endangered species (*Bos gaurus*) using interspecies nuclear transfer. *Cloning* 2 (2): 79-90.
- Li GP, White KL, Bunch TD. 2004. Review of enucleation methods and procedures used in animal cloning: state of the art. *Cloning Stem Cells* 6 (1): 5-13.
- Liu X, Wang Y, Guo W, Chang B, Liu J, Guo Z, Quan F, Zhang Y. 2013. Zinc-finger nickase-mediated insertion of the lysostaphin gene into the beta-casein locus in cloned cows. *Nat Commun.* 4: 2565.
- Loi P, Ptak G, Barboni B, Fulka J Jr, Cappai P, Clinton M. 2001. Genetic rescue of an endangered mammal by cross-species nuclear transfer using post-mortem somatic cells. *Nat Biotechnol.* 19 (10): 962-964.
- McKinnell RG. 1962. Intraspecific nuclear transplantation in frogs. *J Hered* 53: 199-208.
- Niemann H, Lucas-Hahn A, Stoffregen C. 1993. Cryopreservation of bovine oocytes and embryos following microsurgical operations. *Mol Reprod Dev* 36 (2): 232-235.
- Niemann H, Lucas-Hahn A. 2012. Somatic cell nuclear transfer cloning: practical applications and current legislation. *Reprod Domest Anim* 47 (Suppl) 5: 2-10.
- Prather RS, Barnes FL, Sims MM, Robl JM, Eyestone WH, First NL. 1987. Nuclear transplantation in the bovine embryo: assessment of donor nuclei and recipient oocyte. *Biol Reprod* 37(4): 859-866.
- Stice SL, Keefer CL. 1993. Multiple generational bovine embryo cloning. *Biol Reprod* 48 (4):715-719.
- Van Vleck LD. 1999. Implications of cloning for breed improvement strategies: are traditional methods of animal improvement obsolete? *J Anim Sci* 77 (Suppl 2): 111-121.
- Wells DN. 2005. Animal cloning: problems and prospects. *Rev Sci Tech* 24 (1): 251-264.
- Willadsen SM. 1979. A method for culture of micromanipulated sheep embryos and its use to produce monozygotic twins. *Nature* 277: 298-300.
- Wilmut I, Schnieke AE, McWhir J, Kind JA, Campbell KH. 1997. Viable offspring derived from fetal and adult mammalian cells. *Nature* 385 (6619): 810-813.