

Incorporación del Académico de Número MV /MSci. / PhD. Daniel Felipe Salamone

Presentación del Dr. Bernardo J. Carrillo

El Dr. Daniel Salamone se recibió en 1983 de Médico Veterinario en la Facultad de Ciencias Veterinarias de la Universidad de Buenos Aires y luego en 1997, cursó estudios de posgrado en el Western College of Veterinary Medicine de la Universidad de Saskatchewan en Saskatoon, Canadá, obteniendo el título de Master of Science. Además, en el año 2004 obtuvo el Doctorado en Biotecnología y Biomedicina en la Universidad de Massachusetts, Amherst, Massachusetts, EE.UU. con el grado de Doctor of Philosophy.

Luego de su graduación como Médico Veterinario en la UBA desde 1984 a 1992, formó parte como investigador en el Departamento de Patobiología del Centro de Ciencias Veterinarias C.I.C.V. del INTA Castelar. En 1992 también fue responsable del Programa de Fertilización in vitro de Munar y Asociados y, en 1994, es contratado por el Centro Argentino Brasileiro de Biotecnología de la Reproducción CABBIO para el desarrollo de proyectos en reproducción.

A pesar de su juventud, pues nació en la Pvcia. de Entre Ríos, en 1960, logró ser designado como Investigador Principal del CONICET, gracias a su incansable y valiosa labor, dedicada a la manipulación genética y materializada en numerosos trabajos, proyectos y publicaciones en importantes revistas científicas del exterior y contribuciones en Congresos que lo constituyen hoy en una figura referente del país y del extranjero en el campo de la transferencia embrionaria, clonación y producción “in vitro” de embriones y temas relacionados, que seguramente van a ser parte de su presentación titulada “Clones, Quimeras y otros seres extraordinarios”.

El foco principal de la investigación del Dr. Salamone es la micromanipulación embrionaria y transgénesis en bovinos, equinos, ovinos, caprinos, porcinos y varias especies felinas de vida silvestre.

Es profesor titular y Director del Laboratorio de Biotecnología Animal (LABA) de la UBA. Además es Director del Departamento de producción Animal de la Facultad de Agronomía de la UBA y es el nuevo presidente electo de la International Embryo Technology Society (IETS) y Chairman del próximo Congreso a realizarse en Bangkok.

Como lo demuestra en su C.V. es autor de cientos de trabajos y proyectos de investigación publicados en las más importantes revistas científicas de la especialidad en el extranjero y en el país, como así también tiene múltiples presentaciones científicas y de divulgación en el campo rural, universitario y social, que abarcan actividades realizadas y que enmarcan su natural disposición para divulgar estos trabajos de avanzada en clonación e investigación genética, mediante difusión en diarios, revistas y otras publicaciones masivas.

Todo esto fue reconocido y premiado con diversos premios, becas y distinciones por sus avances en el campo práctico de sus investigaciones logradas en el país y en el extranjero, como son entre otros los premios Konex, Innovar, etc. y el Premio Pérez Companc otorgado por nuestra Academia en el año 2003. Corresponde destacar en el Premio Konex 2013 en Ciencia y Tecnología, con Diploma al Mérito que fue, seleccionado por votación de un Gran Jurado, como una de las 5 personalidades que ostentan las trayectorias más destacadas en biotecnología del quehacer nacional en el ciclo de 10 años.

El Dr. Salamone ha tenido también destacada actuación en la formación de recursos humanos, con numerosos becarios y pasantes, además de dirigir tesis de doctorado en más de diez oportunidades.

Es Profesor Asociado por concurso público de antecedentes en fisiología, en la Catedra de Fisiología Animal de la Facultad de Agronomía de la UBA y ha cumplido con actividades docentes como Profesor Invitado en diversas Universidades del país como así también en el extranjero.

Ha dictado más de cien cursos en distintas ciudades e instituciones del país y fue llamado a dictar cursos en EE.UU., Brasil, Uruguay, Colombia, etc. en temas de transgénesis, clonación y micromanipulación genética.

Como conclusión debemos señalar que el Dr. Daniel Salamone representará un nuevo valor que enriquecerá nuestra Academia, no solo por lo personal y científico, sino además por los valores sociales que representa su actividad, una gran contribución por su trayectoria en un campo de real trascendencia y proyección científica en genética y biotecnología de la reproducción, lo que es de importante aplicación y difusión en el medio rural y social.

Enriquece su personalidad una gran modestia y calidad moral, que lo lleva a ser una persona de gran sencillez, buen trato y simpatía.

Dr. SALAMONE. ¡Nuestras cálidas Felicitaciones por su trayectoria en nombre de la ANAV!

¡Bienvenido a esta casa! ¡Muchas Gracias!

Dr. Bernardo J. Carrillo

10/08/17

Incorporación del Académico de Número MV /MSci. / PhD. Daniel Felipe Salamone

Conferencia

Clones, quimeras y otros seres extraordinarios

Daniel Felipe Salamone. MV, MSci, PhD^{1,2}.

¹ Profesor titular de la Cátedra de Fisiología Animal, Facultad de Agronomía. Universidad de Buenos Aires.

² Investigador Principal. CONICET. Laboratorio Biotecnología Animal (LabBA).

RESUMEN

En este artículo se describirán ejemplos de especies animales en las que se da la clonación o el quimerismo en forma natural. Se revisarán algunos de los trabajos pioneros de autores que inspiraron las líneas de investigación en las que he estado involucrado. Pero, primordialmente, se analizarán varios de los progresos que hemos alcanzado con diferentes equipos de colegas desde 1993. Se incluyen experimentos de fecundación *in vitro* (FIV), inyección intracitoplasmática de espermatozoides (ICSI), clonación, transgénesis y edición génica, realizadas en diferentes especies de mamíferos. La aplicación futura de estas tecnologías a la producción animal debería estar sujeta al seguimiento de pautas de bienestar animal y bioética, siendo fundamental nuestra capacidad de imaginación e innovación. Por otro lado, los animales que ya se han generado con algunos métodos (FIV, ICSI y clonación), cuyas figuras se presentan en esta revisión, son verdaderas postales del futuro que demuestran la factibilidad de las metodologías descriptas.

Palabras clave: clonación, quimerismo, FIV, ICSI, transgénesis, edición génica

SUMMARY

This article describes examples of animal species in which cloning and chimerism occur naturally. It will be described some of the pioneering works of authors that inspired our research lines. But, primarily, it will be analyzed several of the progress, that we have made in collaboration with different teams of colleagues since 1993. Experiments of *in vitro* fertilization experiments (IVF), intracytoplasmic sperm injection (ICSI), cloning, transgenesis and gene editing, in different mammal species, will be reviewed. The applications of these technologies to animal production may be subject to aspects of animal welfare and bioethics and it will be essential our imagination and innovation

capability. On the other hand, animals that have already been generated with some methods (IVF, ICSI and cloning), whose figures have been included in this review, are true postcards of the future that demonstrate the feasibility of the described methodologies.

Keywords: cloning, chimerism, IVF, ICSI, transgenesis, gene editing

INTRODUCCIÓN

LA NATURALEZA Y SUS EXPERIMENTOS

La naturaleza realiza los más alocados experimentos. Si uno observa la variedad de animales, no puede más que maravillarse. Sin embargo, los animales existentes descienden de los que han sobrevivido a enormes cantidades de intentos fallidos. Pensar bucólicamente que lo natural es lo lindo, lo bueno y sobre todo lo justo, es un error. La naturaleza es increíblemente sádica. Los errores genéticos llevan a que los animales que nacen con defectos sucumban. Incluso diferencias sutiles permiten que los depredadores tomen ventajas y, ante cualquier síntoma de debilidad de una presa, actúen beneficiándose.

Algunos pocos, los menos, tienen cambios beneficiosos y producidos al azar que, eventualmente, se reproducen y propagan en la población. Es curioso que las sirenas y los cíclopes no sean solo seres mitológicos sino también malformaciones que se dan en un número de nacimientos muy bajos, aún en los seres humanos, y en general tienen consecuencias fatales. Un ejemplo lo constituyen los bebés con el síndrome de las sirenas, los cuales nunca prosperaron más allá de la infancia. Sin embargo, en mamíferos hay grupos muy distintos que sufrieron un cambio evolutivo que implicó la pérdida, o atrofia, del miembro posterior hasta formar aletas y se adaptaron mucho mejor a vivir en las aguas. Así también, todo un grupo de mamíferos salió a la conquista del aire y nos enseñarán, cuando conozcamos en detalle e interpretemos el genoma de estas especies, cómo pudieron hacerlo. Precisamente, con el conocimiento del genoma de muchos mamíferos y las poderosas herramientas de edición génica que describiremos, una pregunta que deberíamos realizar es si usaremos estos conocimientos para generar nuevos animales con características extraordinarias. Estimo que muchas de estas metodologías mencionadas en la presente revisión, servirán para una “evolución animal guiada por humanos”. Ésta tendrá al menos como finalidad otorgar la resistencia a enfermedades y

mejorar el bienestar animal en un ambiente en constante cambio (calentamiento global, falta de agua, etc).

LAS BASES

La variedad del reino animal abarca desde formas relativamente primitivas compuestas por una sola célula a otras más evolucionadas, con millones de ellas, y que están organizadas constituyendo muchos tejidos, muy diferentes entre sí. Las diferencias entre las especies están en los núcleos donde se encuentran diferentes secuencias del ADN, las moléculas que almacenan la información genética para conformar un determinado organismo viviente. Pero las diferencias entre los tejidos es solo epigenética y es reversible, siendo así posible la reprogramación de una célula para constituir todo un animal a partir de los más variados tipos celulares.

Los animales se reproducen de diferentes formas. Los menos evolucionados, como los microscópicos protozoos, tienen descendencia por un proceso en el cual originan copias de sí mismos. Tecnologías como la clonación, por más avanzadas que parezcan, se asemejan a la forma más primitiva de reproducción. Los vertebrados, tienen gametos femeninos y masculinos, ellos poseen la mitad de la información genética que está presente en todas las células somáticas del organismo. Los gametos se originan a través de una forma de división celular que origina variabilidad genética denominada, meiosis. La combinación de los gametos femenino y masculino constituirá lo que llamamos fecundación y da como resultado un individuo con una información única. Las primeras dos metodologías que describimos involucran la realización de este proceso de fecundación, pero realizado *in vitro*.

PRIMER TERNERO PRODUCIDO POR FIV BOVINA EN LA ARGENTINA

La FIV consiste en reunir los gametos de ambos sexos en el laboratorio en las placas de Petri empleando medios artificiales y usando incubadoras para mantener los gametos o embriones en condiciones fisiológicas. Se imita, aunque aún con errores, lo que normalmente ocurre en el tracto genital femenino luego del apareamiento. Esta tecnología nos permitió comenzar a producir embriones en forma masiva en el laboratorio, a partir de oocitos colectados en el matadero. En conjunto con el Dr. Lino Barañao pudimos producir el primer ternero de maduración, fecundación y cultivo *in vitro* de la Argentina (Salamone & Barañao, 1995; Figura 1). Hoy esta tecnología es, después

de la inseminación artificial, la metodología de reproducción asistida más frecuentemente utilizada en bovinos.



Figura 1: En esta figura se muestra una fotografía de Cabbio (siglas de Centro Argentino Brasileiro de Biotecnología), el primer ternero obtenido por fecundación *in vitro* en la Argentina. Lleva este nombre en honor a la agencia gubernamental que financió el proyecto que lo generó.

CORDERO, EL PRIMER ANIMAL ICSI DE NUESTRO PAÍS Y UNA METODOLOGÍA CON FUTURO EN EQUINOS

La ICSI es una metodología que consiste, como su nombre lo indica, en aspirar un espermatozoide con una pipeta muy fina para luego inyectarlo en el citoplasma de un oocito maduro. Para realizar esta maniobra es necesario utilizar pipetas capilares controladas por un sistema de micromanipulación. La ICSI ha sido utilizada en los seres humanos y ha superado en frecuencia a la FIV tradicional. Recientemente, al cumplirse el 25° aniversario del primer bebé obtenido por esta técnica (Palermo *et al.*, 1992), fui invitado por el principal autor de este logro a publicar una revisión de las aplicaciones de esta tecnología en los mamíferos domésticos y salvajes para la revista “Reproduction” (Salamone *et al.* 2017). En dicho artículo describimos algunos de los aspectos que nos permitieron avanzar en la ICSI en bovinos y ovinos y nos llevaron a producir el primer animal ICSI del país que fue un cordero (Pereyra Bonnet *et al.*, 2010; Figura 2 A). Esta técnica tiene un gran potencial en equinos, dado que la superovulación, fecundación y desarrollo *in vivo* para luego colectar los embriones da resultados limitados en esta especie. Esto se debe a que hay un bajo número de oocitos que ovulan y son captados por el oviducto. Por el contrario, muchos gametos femeninos pueden ser colectados por aspiración transvaginal guiada por ecografía (OPU, de ovum pick up). Para la OPU se

pueden utilizar animales vivos y no superovulados. Desgraciadamente, hasta el día de hoy, los oocitos no pueden ser fecundados eficientemente *in vitro* por la técnica tradicional. Sin embargo, la ICSI parece solucionar este problema. Actualmente por ICSI producimos buenos porcentajes de blastocistos en equinos y hemos obtenido el nacimiento del primer potrillo de OPU e ICSI del país (Rodríguez *et al.*, 2019, Figura 2 B).

También, hemos explorado el uso de esta técnica en gatos con una alta tasa de blastocistos (Moro & Salamone, 2010). Esto nos permitió la aplicación de la ICSI al leopardo. En este caso, el semen empleado fue provisto por el banco genético del Ecoparque de Buenos Aires. Los oocitos fueron colectados de una leoparda a la que se había castrado para curarla de una infección reproductiva (Moro & Salamone, 2010). Dado que el desarrollo de los embriones fue limitado, realizamos experimentos de ICSI heteroespecífica. En este procedimiento se utilizaron espermatozoides del mismo leopardo, pero fecundamos oocitos madurados *in vitro* de gata doméstica. Esto nos permitió demostrar que el problema no estaba en el semen sino en el oocito y nos impulsó también a probar la ICSI heteroespecífica usando espermatozoides de chita. En ambos casos las tasas de producción de blastocistos fueron sorprendentemente altas, indicándonos que contamos con una poderosa herramienta para valorar *in vitro* protocolos de conservación de semen de especies exóticas.



Figura 2: A. Primer cordero producido por ICSI (Pereyra Bonnet *et al.*, 2010) y B. primer potrillo de OPU-ICSI en la Argentina (Rodríguez *et al.*, 2019).

LA NATURALEZA CLONA

Los armadillos del género *Dasyus* tienen un aspecto muy inusual porque están cubiertos por un caparazón que los cubre desde la nariz hasta el lugar más extremo de su

cola. Esto es tan inusual como sus características reproductivas, dado que, producen comúnmente de 2 a 4 mellizos idénticos. Se comenzó a sospechar que las crías eran idénticas cuando se observó que todos los miembros de la misma camada eran del mismo sexo. Esto sucede cuando la estructura celular indiferenciada propia de un solo embrión, se divide en varias.

CLONACIÓN EMBRIONARIA

Usando este concepto se desarrolló una de las formas de clonación embrionaria que genera gemelos. Básicamente, consiste en dividir al embrión en dos, cuando sus células son aún totipotenciales o, al menos, dividirlo en partes iguales si el embrión ya ha comenzado a diferenciarse (blastocisto). El objetivo es tener mellizos idénticos.

Alrededor de 1880, Hans Adolf Eduard Driesch, realizó por primera vez lo que puede considerarse la primera "clonación" artificial de un animal, utilizando un erizo de mar (Hamburger, 1999). Él separó un embrión de 2 células por agitación dando lugar al crecimiento de 2 individuos. Spemann realizó un experimento semejante pero usando salamandras, en el cual dividió embriones de 2 células mediante el uso de un pelo (Shampo et al, 1999).

Muchos años después, el investigador de origen dinamarqués Willadsen (1979), trabajando en el Reino Unido, repitió este experimento en la oveja produciendo gemelos idénticos a partir de embriones divididos en dos. Los animales nacidos con este método son genéticamente idénticos, ya que provienen de la división de un embrión, y comparten, no solo la información genética del núcleo, sino que también la de las mitocondrias que contienen ADN en su estructura.

Si bien numerosos grupos han utilizado esta tecnología, incluyendo al grupo de reproducción del INTA de Balcarce, los resultados, en términos de gemelos nacidos, aún son bajos. Por tal motivo, hemos realizado numerosos experimentos ya sea a partir de la separación de blastómeros de embriones tempranos (Hiriart et al, 2013) o por bipartición de embriones (Ynsaurralde et al., 2018). Con este último procedimiento, por observación ecográfica luego de la transferencia, detectamos que muy tempranamente los hemiclones alcanzan el tamaño de los embriones enteros y producen luego un nacimiento con características morfométricas normales.

CLONACIÓN POR TRANSFERENCIA NUCLEAR

Spemann, a finales de la década de 1920 (Hamburger, 1999), trabajando nuevamente con salamandras, a partir de un núcleo de embriones de 16 células que aún permanecía unido con una porción de citoplasma mayor, generada por ligamiento con un pelo al principio del desarrollo, produjo una salamandra normal a partir de esta blastómera. Al liberar el citoplasma ligado, el embrión recapitulaba el desarrollo embrionario. En 1938, en una publicación de sus resultados titulada "Desarrollo embrionario y de inducción", Spemann propuso clonar organismos a partir de células diferenciadas, o incluso adultos, utilizando el método de la transferencia nuclear. Las experiencias de Spemann, y tal vez de otros autores (Beetschen & Fischer, 2004), fueron fundamentales para el desarrollo de la clonación. Este pionero, recibió el premio Nobel en 1935.

Sin embargo, todavía no se contaba con las herramientas tecnológicas ya que la transferencia nuclear, como lo propuso Spemann, no se completó con éxito hasta las experiencias que de Briggs & King (1952). Pero fue recién Gurdon (1958, 1960, 1966) quien produjo nacimiento de animales. Por este motivo Gurdon también recibió el Premio Nobel de Medicina, 50 años después de su logro. A pesar de estos trabajos, algunos autores muy influyentes denostaron la clonación por transferencia nuclear y afirmaban que no era posible su realización en mamíferos. Sin embargo, Willadsen (1986) replicó los experimentos, que habían sido hechos por Gurdon en la oveja, produciendo el primer cordero por *transferencia nuclear*. Básicamente, removió el núcleo de un oocito maduro no fertilizado y le transfirió un núcleo celular de embriones de pocas células.

Años después empleando células fetales, el Dr. Campbell *et al.*, (1996), crearon los corderos clonados, Megan and Morag. Finalmente, Wilmut *et al.* (1997) publicaron el nacimiento de la oveja Dolly, la cual fue producida por clonación de células provenientes de un animal adulto.

Como inicialmente los resultados de clonación con células donantes adultas eran poco eficientes, se consideró entonces la posibilidad de usar células fetales. Con éstas como células donantes, los grupos del Instituto de Roslin (Schnieke *et al.*, 1997) y un argentino del grupo de Jim Robl en la Universidad de Massachusetts (Cibelli *et al.*, 1998) produjeron, respectivamente, los primeros ovinos y bovinos clonados y transgénicos. Se

demonstró entonces que la técnica de trasplante nuclear es extremadamente eficiente para producir animales transgénicos.

Mi primer contacto con la transferencia nuclear, utilizando células embrionarias, fue en 1991 en Japón a través de una beca JICA (del inglés: Japan Agency of Cooperation). Luego, cuando realicé mi doctorado en la universidad de Massachusetts, comencé a usar las técnicas de transferencia nuclear pero con el objetivo de mejorar la calidad de los oocitos (Salamone *et al.*, 2001). A mi vuelta a la Argentina en 2001, en colaboración con la empresa Biosidus, realizamos diferentes experimentos de clonación. El primero de ellos estaba destinado a incrementar la tasa de sobrevivencia de los embriones clonados a partir de células de animales adultos, en el cual se compararon diferentes sistemas de cultivo embrionario y tipos de células somáticas donantes. Fruto de esta experiencia nació un animal, que desgraciadamente murió durante el parto en febrero del año 2002. En un segundo experimento se comparó el desarrollo de embriones producidos de líneas fetales transfectadas o no, y se utilizaron también oocitos enucleados tratados previamente con roscovitina. En este experimento se produjo un gran número de animales clonados (Figura 3). Posteriormente, ya trabajando en la facultad de Agronomía de la UBA estudiamos el efecto de varios factores que influyen en el trasplante nuclear, incluyendo los métodos de enucleación, la activación (Canel *et al.*, 2010) y el tipo de célula donante (Salamone *et al.*, 2006).



Figura 3: Clones producidos por la empresa Biosidus

Para mejorar la eficiencia del método de clonación, evaluamos una nueva alternativa para producir clones equinos que también fue descrita para el bovino (Ribeiro *et al.*, 2009). La misma consiste en la agregación de embriones producidos por trasplante nuclear de

células somáticas a los que se les elimina la zona pelúcida (Gambini *et al.*, 2012 y 2014). Para ello se colocan dos o tres embriones tempranos en estrecho contacto en una estructura que llamamos micropozos. Estos son depresiones cóncavas realizadas en la placa de plástico, de modo tal que permiten que los embriones que se coloquen en un mismo pozo estén en estrecho contacto y se integren formando un solo embrión. La agregación del embrión mejoró el desarrollo *in vitro*, la calidad embrionaria, la tasa de preñez y los animales que nacieron derivaron de embriones agregados (Gambini *et al.*, 2012, 2014). Una de las ventajas de la aplicación de esta técnica, en equinos, resulta en una buena estrategia para mejorar los porcentajes de preñez sin la necesidad de transferir embriones adicionales, evitando producir mellizos, factor que no es deseado en esta especie. El primer potrillo clonado viable obtenido con este método nació el 4 de agosto de 2010 (Figura 4 A, Gambini *et al.*, 2012) y se ha logrado el nacimiento de otros tres animales tanto de caballos criollos, como de salto y de polo (Gambini *et al.*, 2014).

Es interesante hacer notar que la Argentina se ha transformado en uno de los países que produce un mayor número de clones equinos, los que se han destacado jugando en el Campeonato Argentino Abierto de Polo en Buenos Aires. También hemos usado la clonación por agregación en cerdos (Buemo *et al.*, 2016) y heteroespecíficamente usando oocitos enucleados de gatas y células donantes de chitas (Moro *et al.*, 2015a) y de tigres (Moro *et al.*, 2015b). Además, a partir de un perro muerto de 18 años, aislamos y criopreservamos sus células para luego enviarlas a Corea, donde se produjo el primer perro nacido por clonación con células donantes originadas en Latinoamérica (Figura 4 B).

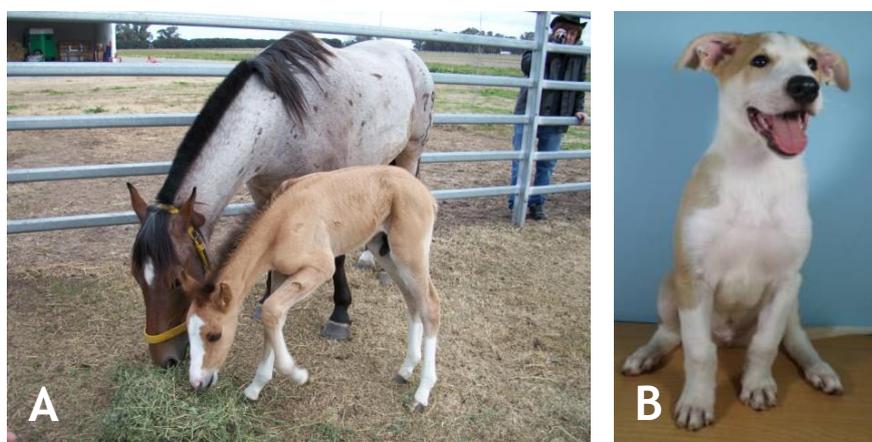


Figura 4: A). Primer clon equino llamado Ñandubay Bicentenario porque nació en el año 2010, bicentenario de la Revolución de Mayo (Gambini *et al.* 2012); B). Perro nacido por clonación a partir de un animal muerto en Argentina a los 18 años.

DESDE LA TRANSGÉNESIS A LA EDICIÓN GÉNICA

Trabajando en colaboración con la empresa Biosidus en septiembre de 2002 produjimos la primera vaca clonada, capaz de expresar la hormona de crecimiento humana (hGH) en su leche. Esta fue el primer animal transgénico generado en América del Sur (Figura 5 A). La producción de hGH humana en leche alcanzó niveles tales que estimamos que solo serían necesarios unos 15 animales para cubrir las necesidades mundiales actuales de esta proteína para uso terapéutico (Salamone *et al.*, 2006).

La re-clonación consiste en clonar nuevamente animales que se generaron con esta tecnología, es decir, se producen individuos que son clones de clones. Con este procedimiento obtuvimos tres terneros, uno se produjo a partir de células aisladas del cordón umbilical y dos se generaron usando fibroblastos de oreja (Figura 5 B). Es interesante notar que, cuando se re-clonaron fibroblastos de oreja, las tasas de desarrollo fueron menores a las de la clonación inicial (primera clonación), pero cuando se usaron células del cordón umbilical la sobrevivencia mejoró. Esto probablemente se debió a que las células del cordón umbilical son más indiferenciadas y más fáciles de reprogramar

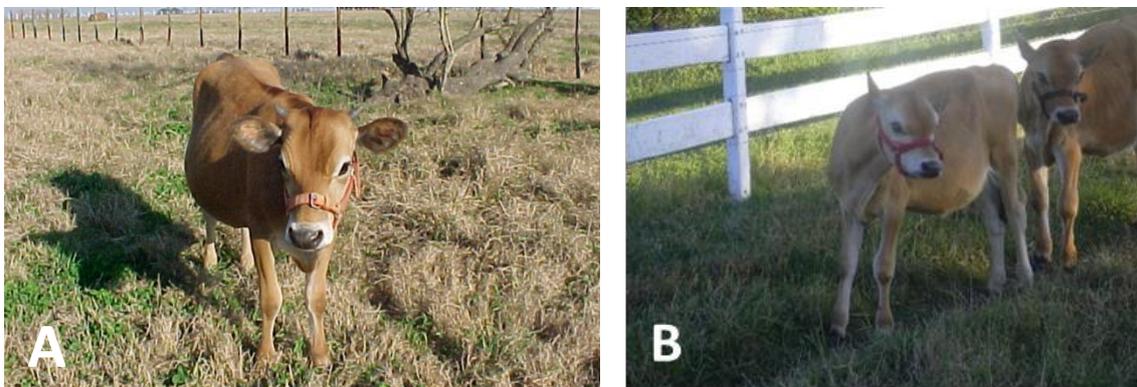


Figura 5: A) Pampa Mansa, primer animal transgénico producido en Sudamérica. B) Animales de re-clonación de Pampa Mansa a partir de fibroblastos de oreja. (Salamone *et al.*, 2006).

Debido a que un programa de clonación en bovinos es muy costoso, intentamos producir animales transgénicos mediante otras alternativas. Para tal fin, desarrollamos una metodología basada en la utilización la ICSI, en la cual los espermatozoides previamente se habían sumergido en una solución que contenía el transgén (Pereyra Bonnet *et al.*, 2008). En otras experiencias, inyectamos una vesícula citoplasmática a un cigoto, en los cuales la vesícula también fue previamente expuesta al transgén (Pereyra Bonnet *et al.*,

2011). Ambos procedimientos dieron buenas tasas de expresión del transgén en embriones preimplantados *in vitro*, pero fracasamos en la producción de crías transgénicas. Esto nos llevó a considerar un sistema activo para la integración del transgén. El primero de ellos consistió en utilizar transposones y la enzima transposasa. Así obtuvimos un cordero transgénico usando un sistema basado en *Sleeping Beauty* diseñado para producir el factor IX antihemofílico en glándula mamaria (Figura 6, Bevacqua *et al.*, 2017). Si bien este animal murió a los pocos días de nacido, debido a la alta eficiencia alcanzada, el resultado nos indicó que debíamos avanzar en esta dirección.

Por esto, al desarrollarse el sistema de edición génica CRISPR/Cas9 en el que los componentes también se inyectan en el cigoto en forma intracitoplasmática, continuamos investigando en ese rumbo. El sistema CRISPR/Cas9 se basa en una nucleasa y un ARN guía diseñado tanto para reconocer una secuencia específica de ADN, así como a la nucleasa Cas9. El sistema de CRISPR-Cas9 ha demostrado ser una herramienta simple y versátil para la edición genómica en embriones. La principal ventaja de este nuevo sistema es que el ajuste de la especificidad del mismo hacia nuevas secuencias diana es fácil y económico. Esto se debe a que requiere simplemente del cambio de la secuencia de la guía de ARN, siendo la misma enzima Cas9 adecuada para todas las secuencias.



Figura 6: Oveja transgénica para el factor antihemofílico IX producida con transposones (Bevacqua *et al.* 2017)

En un artículo que publicamos (Bevacqua *et al.*, 2016), reportamos que, no sólo realizamos el Knockout en gen PrnP asociado a la encefalopatía espongiiforme, sino que además introdujimos en este lugar específico una nueva secuencia.

QUIMERAS, VARIOS ORÍGENES EN UN SER

Las quimeras son seres fantásticos de la mitología griega, tienen en su estructura partes de diferentes especies (cabeza de cabra, cuerpo de león, etc.). La quimera biológica, por el contrario, consiste en individuos que provienen de células producidas a partir de diferentes embriones.

Un caso fascinante de quimerismo es el de los peces denominados Ceratias. Son la única quimera producida en la vida adulta y sirve para ilustrar el concepto de qué es una quimera. Dado que las Ceratias viven en la más profunda oscuridad, el encuentro entre hembra y macho presenta dificultades. Por esto los machos, que cuando son inmaduros viven libremente, al llegar a la madurez, muerden a la hembra en los flancos, secretan una sustancia química que funde los cuerpos de las hembras y, de ahí en adelante, éstos viven parasitariamente. Muchos órganos del sexo masculino degeneran, los sistemas circulatorios de machos y hembras se convierten en continuos, haciendo de los machos poco más que gónadas para proveer de semen a las hembras. Una hembra puede ser encontrada con múltiples machos fusionados.

Frecuentemente, los monos títies tienen el llamado "quimerismo de la línea germinal". En estos animales, algunos de los espermatozoides o de los óvulos presentes en sus gónadas vienen de otro individuo, su hermano mellizo, por lo que no contienen exclusivamente su propio ADN. En los títies la mayoría de los embarazos son de mellizos no idénticos, y una alta proporción de las crías son verdaderas quimeras. En el estudio genético de los mellizos se observa que todos sus tejidos pueden contener células derivadas su hermano/a. Esto sucede porque las placentas de los mellizos se fusionan en el desarrollo temprano e intercambian células madre de la sangre, pudiendo formar luego varios tejidos como piel, cerebro, músculo, espermatozoides, oocitos y otros.

Fehilly *et al.* (1984), en un trabajo en el que participó Williardsen, publicaron en la revista Nature la obtención de la primera quimera de oveja y cabra. El animal producido fue elegido como portada de la revista, lo que le dio una enorme publicidad. Las quimeras crecieron hasta la edad adulta y algunas fueron fértiles.

Uno de los experimentos que hemos realizado involucró lo que llamamos quimeras transitorias. El experimento consistió en la separación de blastómeros de embriones transgénicos verdes, expresando eGFP, seguido de la agregación con dos embriones

tetraploides, producidos por fusión de embriones de dos células (Hiriart *et al.*, 2013). Estimamos que produjimos una estructura que dará origen a la placenta con células tetraploides y que, eventualmente, se eliminarán luego del parto. Esta técnica nos permitirá no solo la multiplicación de embriones transgénicos, sino también la posibilidad de gestar una especie en otra, aunque ambas no estén tan emparentadas. Esta metodología también podría utilizarse para multiplicar los embriones de animales de alto valor genético, al poder dividir estos embriones en sus blastómeros para darle un mayor número de células por la complementación tetraploide.

CONSIDERACIONES FINALES

En un proyecto que estamos desarrollando con el Dr Rafael Fernández Martín y un talentoso grupo de jóvenes intentamos producir cerdos editados para que sean propicios para donar órganos a humanos (xenotransplante). Hemos avanzado en un tiempo récord, por lo menos con las pruebas *in vitro*, logrando editar 3 genes. Planeamos producir un total seis modificaciones, cada una de las cuales involucra numerosos eventos, con la intención de aumentar la seguridad sanitaria, la compatibilidad y la sobrevivencia de los órganos de cerdo para el xenotransplante. Creemos que es posible lograr los objetivos en corto plazo y a un bajo costo. Tecnologías como la edición génica sorprenden por la rapidez con que evolucionan y se popularizan entre los diferentes grupos de investigación. Este hecho, en mi opinión, democratizará su uso a nivel internacional y favorecerá su aplicación.

AGRADECIMIENTOS

Quisiera agradecer a los miembros de la Academia Nacional de Agronomía y Veterinaria por haber aprobado con generosidad, reconocirme y aceptarme entre sus Académicos de Número, nombramiento del que me siento honrado y al que deseo corresponder como de mí se espera.

Y, quisiera también hacer extensivo mi agradecimiento a todos aquellos que me acompañaron en muchos sentidos a lo largo de toda mi trayectoria, en la cual el área de investigación requiere especialmente de una actividad en equipo.

Por tal motivo, quisiera agradecer a los Dres. Lino Barañao y Carlos Munar, por acompañarme en muchos de mis logros y también al empresario, Marcelo Arguelles, quien confió en nosotros y financió varios de nuestros proyectos. Quiero agradecer

intensamente a todos los colaboradores y estudiantes que han participado en los experimentos que se describieron en esta revisión. Hago extensiva mi especial gratitud para Rafael Fernández Martín, que colaboró en muchos de nuestros éxitos. Y deseo hacer un agradecimiento muy especial al colega y amigo Rafael Fissore, ya que sin su apoyo probablemente no hubiera realizado mi doctorado en la Universidad de Massachusetts y mi destino hubiera sido diferente. Y, por último, quiero también agradecer a mis padres, que me enseñaron que el estudio es la mejor opción para el progreso, y a Inés García, Paula y Lucia Salamone, mis compañeras de ruta, que siempre estuvieron conmigo y le dieron sentido a mi vida.

BIBLIOGRAFÍA

- Beetschen, J.C. & Fischer, J.L., 2004. Yves Delage (1854-1920) as a forerunner of modern nuclear transfer experiments. *International Journal of Developmental Biology*. 48:607-612.
- Bevacqua, R.J., Fernandez-Martín, R., Canel, N.G., Gibbons, A., Texeira, D., Lange, F., Vans Landschoot, G., Savy, V., Briski, O., Hiriart, M.I., Grueso, E., Ivics, Z., Taboga, O., Kues, W.A., Ferraris, S., Salamone, D.F., 2017. Assessing Tn5 and Sleeping Beauty for transpositional transgenesis by cytoplasmic injection into bovine and ovine zygotes. *PLoS One*. 12: e0174025
- Bevacqua, R.J., Fernandez-Martín, R., Savy, V., Canel, N.G., Gismondi, M.I., Kues, W.A., Carlson, D.F., Fahrenkrug, S.C., Niemann, H., Taboga, O.A., Ferraris, S., Salamone, D.F., 2016. Efficient edition of the bovine PRNP prion gene in somatic cells and IVF embryos using the CRISPR/Cas9 system. *Theriogenology*. 86:1886-1896.
- Briggs, R. & King, T.J., 1952. Transplantation of living nuclei from blastula cells into enucleated frogs' eggs. *Proceedings of the National Academy of Sciences. USA*. 38: 455– 463.
- Buemo, C.P., Gambini, A., Moro, L.N., Hiriart, M.I., Fernández-Martín, R., Collas, P., Salamone, D.F., 2016. Embryo Aggregation in Pig Improves Cloning Efficiency and Embryo Quality. *PLoS One*. 11: e0146390
- Campbell, K.H.S., McWhir, J., Ritchie, W.A. & Wilmut, I., 1996. Sheep cloned by nuclear transfer from a cultured cell line. *Nature*. 380: 64– 66.
- Canel, N., Bevacqua, R., Fernández-Martín, R., Salamone, D.F., 2010. Activation with ionomycin followed by dehydroleucodine and cytochalasin B for the production of parthenogenetic and cloned bovine embryos. *Cellular Reprogramming (Formerly" Cloning and Stem Cells")*. 12: 491-499.
- Cibelli, J.B., Stice, S.L., Golueke, P.J., Kane, J.J., Jerry, J., Blackwell, C., Ponce de Leon, F.A., and Robl, J.M., 1998. Cloned transgenic calves produced from nonquiescent fetal fibroblasts. *Science*. 280: 1256-1258.
- Fehilly, C.B., Willadsen, S.M., Tucker, E.M., 1984. Interspecific chimaerism between sheep and goat. *Nature*. 307:634-636.
- Gambini, A., Jarazo, J., Olivera, R., Salamone, D.F., 2012. Equine cloning: in vitro and in vivo development of aggregated embryos. *Biology of reproduction*. 87:15
- Gambini, A., De Stefano, A., Bevacqua, R.J., Karlanian, F., Salamone, D.F., 2014. The aggregation of four reconstructed zygotes is the limit to improve the developmental competence of cloned equine embryos. *PLoS One*. 9: e110998
- Gurdon, J., Elsdale, T., Fischberg, M., 1958. Sexually mature individuals of *Xenopus laevis* from the transplantation of single somatic nuclei. *Nature*. 182: 64-65.
- Gurdon, J.B., 1960. The developmental capacity of nuclei taken from differentiating endoderm cells of *Xenopus laevis*. *Journal of Embryology and Experimental Morphology*. 8: 505– 526.
- Gurdon, J.B. & Uehlinger, V., 1966. "Fertile" intestine nuclei. *Nature*. 210:1240-1241.
- Hamburger, V., 1999. Hans Spemann on Vitalism in Biology: Translation of a Portion of Spemann's Autobiograph. *Journal of the History of Biology*. 32: 231-243,
- Hiriart, M.I., Bevacqua, R.J., Canel, N.G., Fernández-Martín, R., Salamone, D.F., 2013. Production of chimeric embryos by aggregation of bovine egfp eight-cell stage blastomeres with two-cell fused and asynchronous embryos. *Theriogenology*. 80:357-364.

- Moro, L.N. & Salamone, D. F., 2010. Development of domestic cat embryos generated by intracytoplasmic sperm injection exposed to ionomycin activation and different culture conditions. *Reproduction, Fertility and Development*. 23: 241–242.
- Moro, L.N., Jarazo, J., Buemo, C., Hiriart, M.I., Sestelo, A., Salamone, D.F., 2015a. Tiger, Bengal and Domestic Cat Embryos Produced by Homospecific and Interspecific Zona-Free Nuclear. *Reproduction in Domestic Animals*. 50: 849-857.
- Moro, L.N., Hiriart, M.I., Buemo, C., Jarazo, J., Sestelo, A., Veraguas, D., Rodriguez-Alvarez, L., Salamone, D.F., 2015b. Cheetah interspecific SCNT followed by embryo aggregation improves in vitro development but not pluripotent gene expression. *Reproduction* 150:1-10.
- Palermo, G., Joris, H., Devroey, P., Van Steirteghem, A.C., 1992. Pregnancies after intracytoplasmic injection of single spermatozoon into an oocyte. *Lancet* 340:17–18.
- Pereyra Bonnet, F., Bevacqua, R., La Rosa, I., Sipowicz, P., Radrizzani, M., Fernandez-Martin, R., & Salamone, D., 2011. Novel methods to induce exogenous gene expression in SCNT, parthenogenic and IVF preimplantation bovine embryos. *Transgenic Research*, 20: 1379-1388.
- Pereyra Bonnet, F., Fernández Martín, R., Olivera, R., Jarazo, J., Vichera, G., Gibbons, A., & Salamone, D., 2008. A unique method to produce transgenic embryos in ovine, porcine, feline, bovine and equine species. *Reproduction, Fertility and Development*, 20: 741-749.
- Pereyra-Bonnet, F., Gibbons, A., Cueto, M., Sipowicz, P., Fernández-Martín, R., Salamone, D., 2010. Efficiency of sperm mediated gene transfer in ovine by Laparoscopic Insemination, In Vitro Fertilization or Intracytoplasmic Sperm Injection with Different sperm/DNA incubation treatments. *J Reprod and Develop* 20:741-749.
- Ribeiro, E., da Costa Gerger, R.P., Ohlweiler, L.U., Ortigari Jr, I., Mezzalira, J.C., Forell, F., & Mezzalira, A., 2009. Developmental potential of bovine hand-made clone embryos reconstructed by aggregation or fusion with distinct cytoplasmic volumes. *Cloning and Stem Cells*, 11: 377-386.
- Rodriguez, M., Gambini, A., Clerico, G., Ynsaurralde-Rivolta, A., Briski, O., Largel, H., Sansinena, M., Salamone, D., 2019. Time of the first polar body extrusion influences the developmental competence of equine oocytes after ICSI. *Reprod Fertile, Develop* 31: 1805-1811
- Salamone, D.F. & Baraña, L., 1995. Producción de los Primeros Terneros Nacidos en la Argentina Por Maduración Y Fertilización In Vitro de Ovocitos Recuperados de Animales Sacrificados para Consumo. Seminario Internacional de Embriones Biotecnología y Tecnologías Avanzadas. 4-5 Mayo Montevideo. Uruguay. Pagina 125.
- Salamone, D.F., Damiani, P.R., Fissore, A., Robl, J.M., & Duby, R.T., 2001. Ooplasmic and nuclear maturation of calf oocytes: Assessment by biochemical and nuclear transfer approach. *Biology of Reproduction*, 64: 1761-1768.
- Salamone, D. et al. 2006. High-level expression of bioactive recombinant human growth hormone in the milk of a cloned transgenic cow. *J Biotechnol* 124: 469-72.
- Salamone, D.F., Canel, N.G., Rodríguez, M.B., 2017. Intracytoplasmic sperm injection in domestic and wild mammals. *Reproduction*. 154: F111-F124.
- Schnieke, A.E, Kind, A.J., Ritchie, W.A., Mycock, K., Scott, A.R., Ritchie, M., Wilmut, I., Colman, A., and Campbell, K.H., 1997. Human factor IX transgenic sheep produced by transfer of nuclei from transfected fetal fibroblasts. *Science* 278: 2130-2133.
- Shampo, M.A. et al., 1999. Hans Spemann--contributions to embryology. *Mayo Clin Proc* 74: 474.
- Willadsen, S.M., 1979. A method for culture of micromanipulated sheep embryos and its use to produce monozygotic twins. *Nature* 277:298-300.
- Willadsen, S.M., 1986. Nuclear transplantation in sheep embryos. *Nature* 320:63-65.
- Willadsen, S.M., Tucker, E.M, 1984. Interspecific chimaerism between sheep and goat. *Nature* 307: 634-636.
- Wilmut, I., Schnieke, A.E., McWhir, J., Kind, A.J., and Campbell, K.H., 1997. Viable offspring derived from fetal and adult mammalian cells 385: 810-813.
- Ynsaurralde Rivolta, A.E., Suvá, M., Alberio, V., Echegaray, C. V., Guberman, A., Bevacqua, R. J., & Salamone, D. F., 2018. Development and quality of in vitro bovine hemi embryos produced by blastomere separation and embryo bisection. *Reproduction, Fertility and Development*, 31: 164-164.