Clonación en Porcino

Algo más que ciencia ficción

Jonatan Sánchez-Osorio
Universidad de Murcia

1

CLON: DEFINICIÓN

Un organismo que presenta el mismo genoma nuclear que aquel del cual procede

2

CLONACIÓN EN LA NATURALEZA

- **Mitosis: división de una célula de un organismo en dos células hijas con el mismo set de cromosomas**
- **Individuos genéticamente idénticos procedentes del mismo padre por reproducción asexual: organismos unicelulares, pluricelulares y en vegetales**
- **Partición: división de un embrión temprano en varias porciones, cada una de las cuales forma un individuo completo. Gemelación natural.**

3

CLONACIÓN ARTIFICIAL

- Separación de blastómeros: embriones en estadio de 4-8 células
- Bisección de blastocistos
- Transferencia de núcleos
  - Origen embrionario o fetal
  - Origen adulto

4

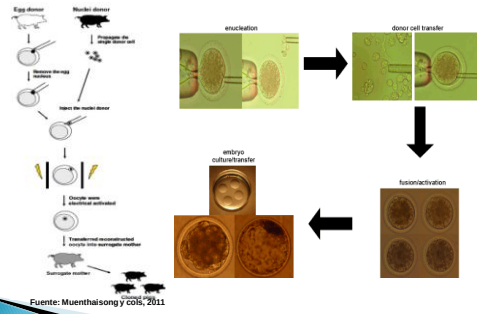
Separación de blastómeros

5

Bisección de blastocistos

6

Transferencia Nuclear



Fuente: Muenthaisong y cols, 2011

7

Transferencia Nuclear

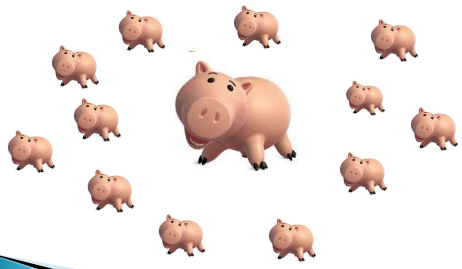
Descendencia viva obtenida por NT de células somáticas

Especie	Célula donante	Eficiencia (%)	Referencia
Ovino	Glándula mamaria (A)	1.74	Wilmut et al., 1997
Bovino	Fibroblastos (F)	1.50	Cibelli et al., 1998
Caprino	Fibroblastos (F)	1.40	Baguisi et al., 1999
Porcino	Granulosas (A)	1.25	Polejaeva et al., 2000

Al menos **16 especies** diferentes han sido clonadas con éxito
(Revisado por Niemann y cols, 2011)

8

¿CÓMO SE CLONA UN CERDO?



9

Transferencia Nuclear en Porcino

1. Obtención de los ovocitos

Post Mortem

Se obtienen los ovarios a partir de cerdas adultas (preferible) o prepúberes procedentes de matadero

Cerdas adultas mejores resultados
(Hyun y cols, 2003; Lai y cols, 2007)

Mayor aporte de factores citoplasmáticos

11

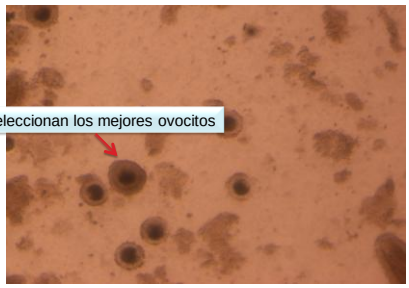
1. Obtención de los ovocitos

In vivo

- Mejores Resultados (Kühholzer y cols, 2001)
- Menos eficiente y más costoso

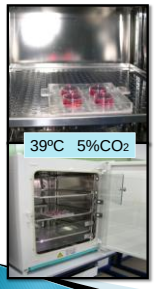
12

Obtención de los ovocitos



13

2.Maduración Ovocitos

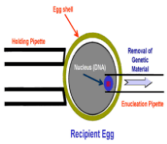


Maduración in vitro 36-40 horas
- 0-22h: Con Hormonas (eCG + hCG)
- 22-36h: Sin Hormonas

14

3.Enucleación

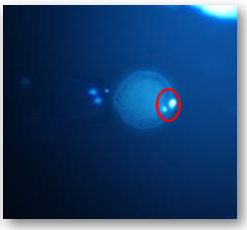
- Extracción de la placa metafásica y del corpúsculo polar



15

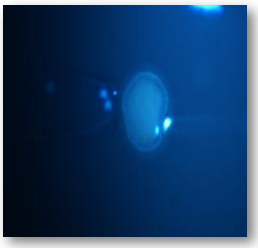
Enucleación

Teñimos el material genético para poder visualizarlo y extraerlo



16

Enucleación



17

Enucleación

18

Enucleación del ovocito

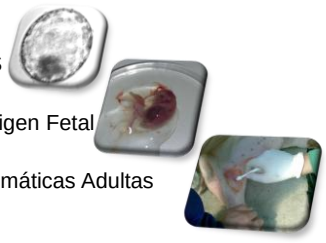
19

4. Inyección celular

- Selección de células:

1. Tipo Celular:

- Células ES
- Células Origen Fetal
- Células Somáticas Adultas



20

4. Inyección celular

Eficiencia Transferencia Nuclear

Cuanto mayor es el grado de diferenciación celular, más difícil resulta la reprogramación celular y menor es la eficiencia de la Transferencia Nuclear
(Hiragi y Solter, 2005)

21

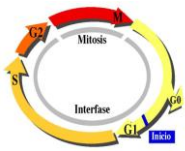
Transferencia Nuclear

REPROGRAMACIÓN NUCLEAR

Blastómeros embrionarios → Indiferenciación: **Totipotentes**

MCI del blastocisto → Escasa diferenciación: **Pluripotentes**

Células adultas: Diferenciación → **Quiescencia (G0, G1)**

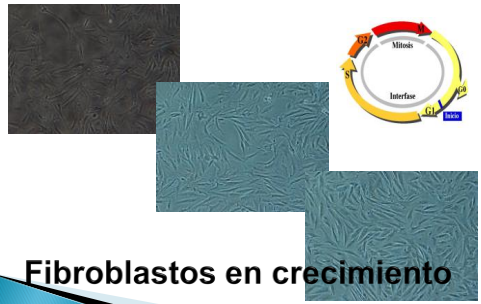


Reprogramación nuclear por factores citoplasmáticos del ovocito

22

- Selección de células:

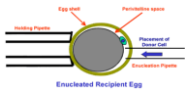
2. Ciclo Célular: Seleccionar células en G0



Fibroblastos en crecimiento

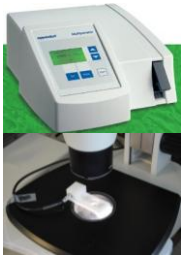
23

Inyección celular



24

5. Fusión y Activación

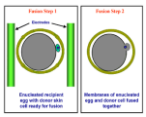


- Parámetros Fusión

140V/mm 40µsec 2 pulsos

- Parámetros Activación

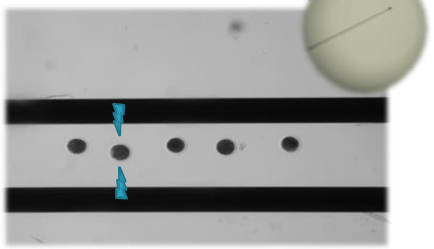
110V/mm 50µsec 2 pulsos



25

Fusión y Activación

Pipeta de Alineamiento



26

Transferencia Embrionaria

- Forma Quirúrgica
- Depositar en infundíbulo
- Minimizar Tiempo de cultivo *in vitro*

Supervivencia esperada ≈ 1-5% (del total de embriones transferidos)

Revisado por Vajta y cols, 2007

27

Primer cerdo clonado en España

Limitaciones intrínsecas en Porcino

- Dificultad para la obtención y transferencia *in vivo* de ovocitos y embriones. Procedimientos quirúrgicos.
- Dificultad para la producción y CIV de embriones porcinos
- Dificultad para la criopreservación de ovocitos y embriones porcinos

29

Problemas de la clonación

Tendones

Deficiencia pulmonar

Gastritis

Diabetes

Obesidad

Anemia

Hipertensión

Síndrome de la ternera gigante

30

Fenotipos Anormales en cerdos obtenidos por Transferencia Nuclear

- Signos de parto disminuidos
- Problemas respiratorios en neonatos
- Muertes repentinas
- Contracción de tendones
- Incremento anormal del tamaño de la lengua

Artrosis bilateral de la cabeza del fémur
Degeneración precoz de cartílagos articulares

31

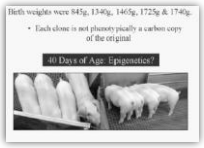
- Menor incidencia de alteraciones que en otras especies
- Las alteraciones no se transmiten a la descendencia, lo cual sugiere que está relacionado con **alteraciones epigenéticas**: metilaciones, fosforilaciones, acetilaciones, etc…

La descendencia de un clon es sana

32

Epigénesis

Cambios reversibles del ADN que provocan que unos genes se expresen o no, sin afectar a la propia secuencia de ADN



Rainbow Donante

Cc Clon

33

Transgénesis en el Porcino

- Animal Transgénico: Animales que han sido genéticamente modificados, mediante la introducción de ADN exógeno o alteración de un fragmento del propio ADN. De este modo se aumenta, disminuye o modifica la expresión de una determinada proteina.

34

Objetivo de la Transgénesis

Producir animales con una incorporación **estable** de ADN exógeno en su línea germinal

35

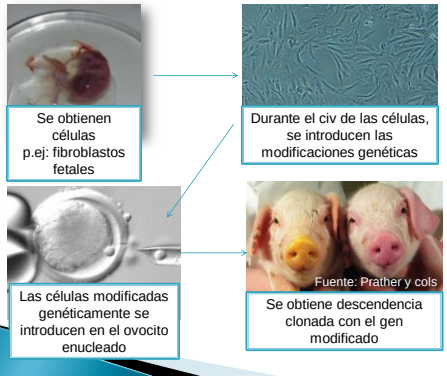
Transgénesis en Porcino

Métodos para la producción de animales Transgénicos:

- Vectores virales
- Microinyección pronuclear
- Transferencia de celulas pluripotenciales (ES)
- Transferencia mediada por espermatozoides
- **Transferencia de Nucleos transfectados**

36

Transferencia de Nucleos transfectados



37

Aplicaciones en Producción Porcina

38

Aplicaciones de la Transgénesis en la Especie Porcina

Producción Animal

1. Alterar la composición corporal
2. Mejorar la producción
3. Crear animales resistentes a enfermedades
4. Reducir las perdidas embrionarias
5. Crear animales mejor adaptados al ambiente

Poco futuro

39

Cerdos Transgénicos.Situación Actual

1. Alterar la composición de la carne
   - Gen para la Delta 12 acido graso desaturasa (hfat-1; Saeki y cols, 2004)
2. Mejorar la producción animal
   - Incorporación del gen para la hormona de crecimiento (GH1; Hammer, 1985)
   - Incorporación del gen para factores de crecimiento (IGF1; Pursel y cols, 1999)
   - Producción α-lactoalbumina bovina en leche (Bleck y cols, 1998)

40

Cerdos Transgénicos.Situación Actual

3. Crear animales resistentes a enfermedades
   - Resistencia frente a Influenza (Brenig y cols, 1990)
   - Knock-out del gen que codifica receptor intestinal de E. Coli K88 (Edfords y cols, 1986)
4. Reducir las perdidas embrionarias
5. Crear animales mejor adaptados al ambiente

Ninguna de estas modificaciones está aprobada para consumo humano

41

¿A qué sabe un cerdo clonado?

- No hay base científica que justifique la existencia de riesgos para la salud por el consumo de cerdos clonados o su descencencia (Rudenko y cols, 2007; Fox y cols, 2008).
- No hay diferencias en la composición de la carne de cerdos clonados con respecto a cerdos normales (Archer y cols, 2002).

Revisado por Niemann y Lucas-Hahn, 2012

¿Qué dice la ley al respecto?

42

Legislación actual en relación a animales clonados

43

Legislación actual en relación a animales clonados

- **FDA, EFSA, EFFAB** comparten la opinión que los productos procedentes de animales clonados sanos y su descendencia no suponen un riesgo para el consumo humano.
- 2009; Parlamento UE prohíbe el consumo de clones y su descendencia directa.
- 2010; Comisión UE prohíbe temporalmente (5 años) el consumo de animales clonados pero no su descendencia y propone creación de un sistema de trazabilidad.
- 2012, No hay acuerdo final respecto a la Ley. Actualmente, en discusión nueva propuesta.
- Paises con Legislación específica propia: Dinamarca, Noruega y Paises Bajos.
- Marco Legal Actual: Novel Food Directive, Regulation EC Nº 258/97

44

Aplicaciones Médicas

45

Aplicaciones de la Transgénesis en la Especie Porcina

Biomédicas

- Creación de modelos animales para el estudio de enfermedades humanas
- Obtención de tejidos y órganos utilizables en humanos (Xenotransplantes)
- Obtención de biofármacos

Grandes Posibilidades

46

¿Por qué el cerdo?

- Anatomía, fisiología y tamaño similar al humano
- Genoma y patrón de expresión génica similar al humano
- La incidencia de anomalías en el desarrollo de cerdos clonados es menor que en otras especies
- Ciclo reproductivo corto y grandes camadas
- Esperanza de vida larga
- Posibilidad de mantenerlos en ambientes controlados, garantizando su estado sanitario
- Menos implicaciones sociales que otras especies.

47

Cerdos Transgénicos. Situación Actual

- Creación de modelos para el estudio de enfermedades humanas
  - Retinitis Pigmentosa (Petters y cols, 1997)
  - Fibrosis Quística (Rogers y cols, 2008, Stoltz y cols, 2010)
  - Diabetes (Renner y cols, 2008)
  - Enfermedad de Huntington (Uchida y cols, 2001)
  - Enfermedades cardiovasculares: fat1 (Lai y cols, 2006; Li y cols 2006)

48

Cerdos Transgénicos. Situación Actual

- Obtención de Biofármacos
  - Hemoglobina humana (Sharma y cols, 1994)
  - Proteina C en leche (Van Cott y cols, 2001)
  - Factores de coagulación VIII y IX en leche (Lindsay y cols, 2004)

49

Cerdos Transgénicos. Situación Actual

- Obtención de órganos y tejidos compatibles con el ser humano: Xenotransplantes
  - Knock-out α-1,3- galactosyltransferasa (Phelps y cols, 2003; Kolber-Simonds y cols, 2004)

50

La clonación en la especie porcina posee gran interés por sus enormes posibilidades de aplicación en la mejora de la salud humana

51

G. I. Reproducción Animal

52