

## Avances en clonación y edición génica en equinos

**Vichera, Gabriel**

KHEIRON Biotech S.A, Pilar, Bs As, Argentina. [gvichera@gmail.com](mailto:gvichera@gmail.com)

En los últimos años, la clonación de caballos se ha centrado en la multiplicación de individuos valiosos principalmente por motivos comerciales. La eficiencia del procedimiento de clonación por transferencia nuclear de células somáticas (SCNT) está relacionada con la capacidad de reprogramación de las células donantes de núcleo a un estado totipotencial, regulado por el ovocito receptor. Por esta razón, la plasticidad celular es crucial para garantizar la progresión del desarrollo embrionario y permitir el nacimiento de descendencia viable por esta técnica. En el equino, una reprogramación nuclear ineficiente con frecuencia lleva a anomalías asociadas a flexuras en extremidades, cordón umbilical agrandado y anomalías en la placenta. Las células madre mesenquimales (Msc) son células que han demostrado su multipotencia tanto *in vitro* como *in vivo*. En el presente estudio, se evaluó la eficacia de Msc derivadas de médula ósea (MO-Msc) como donantes de núcleo en el procedimiento de clonación equina y se comparó el desarrollo *in vivo* y presencia de anomalías anatómicas de los nacidos respecto a clones generados con fibroblastos adultos (FA). Como grupo control, se utilizaron preñeces generadas por inseminación artificial (IA) y posterior transferencia embrionaria. Todas las variables se analizaron mediante la prueba de Fisher ( $p < 0,05$ ). En el grupo Mo-Msc se obtuvieron 37 preñeces de las cuales 21 llegaron a término (56.8%), en el grupo FA se obtuvieron 41 preñeces con 17 a término (41.5%) y en el grupo control de IA 71 preñeces con 64 a término (90.1%). Ambos grupos de clonación alcanzaron tasas similares de partos, con mayores tasas de crías viables en el grupo MO-Msc (20/21, 95.2 %) y en el grupo IA (63/64, 98.4 %) que en el grupo FA (9/17, 52.9 %). Los clones generados con FA mostraron más complicaciones clínicas y defectos anatómicos y sólo 4/9 (44,4%) se consideraron normales. Los defectos presentes en los otros 5 nacidos viables de FA se relacionaron con defectos de flexión, miembro angular y malformaciones del cordón umbilical, mientras que ninguno de los potros nacidos vivos del grupo Mo-MSC tenía este tipo de defecto. Este estudio muestra por primera vez que las Mo-Msc pueden ser utilizadas de forma eficaz como donantes de núcleo en procedimientos de clonación en equinos y que los animales obtenidos son tan sanos como los producidos por IA, mostrando ausencia de anomalías relacionadas con deficiencias en la reprogramación nuclear.

Por otro lado, la tecnología de clonación puede tener ventajas muy importantes si se utiliza en combinación con la tecnología de edición génica, lo que permitiría obtener caballos con el trasfondo genético del individuo original, pero incorporando nuevas características deseadas en una única generación y de forma no aleatoria. El principal

interés en los caballos editados genéticamente se centra en la resistencia a enfermedades, la reversión de enfermedades genéticas y la mejora del rendimiento deportivo. Un gen de gran interés es la miostatina (MSTN), un regulador negativo del desarrollo de la masa muscular. Aquí, nuestro objetivo fue eliminar la expresión del gen MSTN, utilizando el sistema CRISPR/Cas9 y generar por primera vez embriones equinos editados genéticamente. Para ello nucleofectamos fibroblastos fetales (FF) de caballo con 1, 2 o 5  $\mu$ g de 2 gRNA (sgRNA 1 y sgRNA 2) diferentes dirigidos al primer exón de mstn. Una vez que los gRNA y Cas9 se insertaron en las células, fue necesario identificar aquellas células que tenían el mstn mutado. Las células individuales se aislaron, expandieron y genotiparon para el locus MSTN Exon 1 mediante amplificación por PCR y secuenciación de Sanger. Observamos que el aumento de las concentraciones de plásmido mejora la eficacia de la mutación. La eficiencia fue del 63,6% para gRNA1 (14/22 líneas celulares clonales editadas) y 96,2% para gRNA2 (25/26 líneas celulares clonales editadas). Se eligieron tres líneas celulares clonales para generación de embriones por SCNT: una con una edición monoalélica 3/153 (2%), una con edición bialélica heterocigota 3/155 (2%) y una con edición homocigota bialélica 3/159 (2%) que generaron blastocistos editados en todos los casos. Además, se utilizaron como controles líneas FF 8/140 (6%) y células Msc 9/73 (12%) sin editar. Las tasas de desarrollo más bajas que mostraron las células editadas como donantes nucleares probablemente se debieron a los mayores pasajes celulares necesarios para el aislamiento y la expansión de la línea celular. En resumen, demostramos que es posible editar fibroblastos equinos por CRISPR / Cas9 con alta eficiencia y especificidad, generando por primera vez embriones equinos editados genéticamente en estadio de blastocisto por SCNT. Nuestro objetivo a largo plazo es identificar secuencias de alelos naturales beneficiosas presentes en el genoma de algunos individuos e incorporarlas en otros para dotarlos de las características deseadas.