

De la transgénesis a la edición génica en animales de producción.

La Motta, G. (1,2); Briski, O. (1,2); Ratner, L.(1,2); Salamone, D. (1), **Fernandez-Martin, Rafael** (1,2)*

(1) Laboratorio de Biotecnología Animal (LABBA) Facultad de Agronomía UBA.
(1) Instituto de Investigaciones en Producción Animal (INPA) UBA-CONICET. (2) NewOrgans Biotech SA. *martinf@agro.uba.ar

Nuestro grupo ha sido pionero en el país y la región en la obtención de terneros FIV, bovinos clonados, bovinos transgénicos, equinos clonados, y equinos y ovinos obtenidos por ICSI, y pioneros a nivel mundial en la obtención de embriones bovinos editados. En el 2004 el laboratorio trabajó en simplificar la obtención de animales transgénicos. Los transgénicos animales son generados en el mundo para dos propósitos: 1) Mejorar las capacidades agropecuarias (Aquabounty) o para la producción de proteínas terapéuticas (ATryn®, Ruconest®, Kanuma®). Los costos de liberar al mercado estos animales transgénicos o sus productos supera en tres o cuatro órdenes de magnitud el costo de generar el animal. Desde el sector público es muy difícil abordar los costos de desregular los productos transgénicos.

La aparición del sistema CRISPR CAS9 abre una nueva era en la manipulación de animales. Por edición génica se pueden generar cambios, no distinguibles de mutaciones al azar, o facilitar la introgresión de modificaciones existentes. Un par de años después de la aparición del método, editamos embriones bovinos para generar resistencia al síndrome de la vaca loca. Este síndrome es generado por un prion, capaz de inducir el plegamiento anómalo de la proteína PRNP y provocar el aspecto esponjiforme en el sistema nervioso central. El síndrome no tiene cura y es zoonótico. El gen *PRNP* no es esencial y su interrupción no tiene fenotipo aparente. Se diseñaron 5 guías, en una región codificante del exón 3 del gen *PRNP*, y se probaron en células somáticas. En embriones, los guías se probaron como plásmidos de ADN, y como ARN, por el arresto transcripcional de los embriones tempranos. El desarrollo *in vitro* de los embriones se afectó por la inyección de ADN, pero no de ARN. Se registraron deleciones e *indels*, inserciones o *deleciones* de unas pocas bases. En las mejores condiciones, un 75% de los embriones estaban editados.

En los últimos años estamos trabajando en edición génica para xenotrasplante. Por similitudes fisiológicas, por facilidad de manejo y por prolificidad, el cerdo es un buen candidato para obtener órganos. Antes de poder utilizar los órganos del cerdo, se necesitan realizar ciertas modificaciones que eviten el rechazo hiperagudo, la microcoagulación y el rechazo mediado por célula. Estas modificaciones requieren de eliminar funciones de genes porcinos e incluir actividades de genes humanos que generen ambientes de inmunotolerancia. En esta línea, estamos trabajando con embriones *in vitro*. Utilizando las herramientas como plásmidos de DNA, obtuvimos ediciones en simultáneo de

tres genes. Con la proteína CAS9 y los guías como ARN, obtuvimos embriones *in vitro* editados de forma más eficaz y sin riesgos de integraciones no deseadas. Recientemente constituimos una Start up con base tecnológica CONICET, NewOrgans Biotech SA, para con financiación privada poder recorrer el camino para dar una respuesta a los pacientes en las listas de espera.