

IMPACTO DE LA BIOTECNOLOGÍA REPRODUCTIVA EN LA CONSERVACIÓN DE LOS ANIMALES EN RIESGO DE EXTINCIÓN

Dra. Mariana Rojas (M.V.)
Rodrigo Castro (Lic.Cs. Vet.)
Rodrigo Alvarez (B.Q.)
Michel Guillomot (Ph.D.)
Dr. Felipe Venegas (M.V.)



Huemul en la reserva nacional Tamango CONAF

INTRODUCCIÓN

La deforestación y fragmentación de los bosques nativos, sumado al reemplazo de sus especies arbóreas por otras de carácter comercial y la llegada de asentamientos humanos, han generado cambios en el paisaje nacional, lo cual ha reducido, enormemente, la disponibilidad de hábitat para los animales que en ellos viven (Acosta, 2001). La reducida capacidad de adaptación que poseen algunas especies, ha permitido que se vean seriamente afectadas, al punto de ser consideradas en peligro de

Este estudio que fue financiado por el proyecto ECOS-CONICYT CO2 BO3 (Chile-Francia). Se ha realizado en el marco del convenio firmado por el Buin Zoo y la Universidad de Chile. Agradecemos a los Drs: Ignacio Idalsoaga, Pilar Soto, Sebastián Celis de Buin-Zoo y a la Dra Estefanía Flores de la Fac de Cs Veterinarias y Pecuarias de la U. de Chile, también al Sr Iván Benoit de la Corporación Nacional Forestal.

extinción, tal es el caso del huemul (*Hippocamelus bisulcus*) (figura 1) y

del gato guiña (*Oncifelis guigna*) (figura 2). El Pudu (*Pudu pudu*) (figura 3) ha logrado adaptarse mejor y está catalogada como vulnerable (Ver Glade, 1993).

La reproducción natural, debería ser el método de elección para aumentar la población de estas especies vulnerables y en riesgo de extinción, sin embargo, se sabe que cuando las poblaciones de especies silvestres se encuentran en declinación esto no ocurre. En este caso, la biotecnología reproductiva puede ayudar mucho, al establecer bancos

de recurso genéticos; y en eso se trabaja en el Laboratorio de Embriología Comparada de la Universidad de Chile (Rojas et al, 2005; Venegas et al 2006). Se piensa que, a partir del material almacenado en el banco de reserva genética de los distintos jardines zoológicos y Universidades, será posible asistir a la reproducción de especies silvestres, especialmente aquellas que están en peligro de extinción. Estas técnicas incluyen el uso de Inseminación Artificial, Transferencia embrionaria, Fertilización in Vitro, Inyección intracitoplasmática de espermatozoides y Transferencia de núcleos somáticos (Holt et al, 2004; Venegas et al, 2006).

Actualmente se está poniendo a punto la asistencia reproductiva en ciervos. El Proyecto Arca de Argentina, trabaja con el ciervo del padre David (*Elaphurus davidianus*); su objetivo es devolver esta especie a su país de origen, es una especie extinta en China, y además desarrollar una metodología de trabajo que pueda ser aplicada a cérvidos autóctonos. Algunos zoológicos han logrado mantener al Pudú en cautiverio (figura 3), a diferencia de lo que ocurre con otros cérvidos sudamericanos en riesgo de extinción, como la Taruca (*Hippocamelus antisense*) y el huemul del Sur, los cuales no sobreviven en cautiverio. Del gato guiña también se ha logrado mantener un ejemplar en el zoológico Buin-Zoo (figura 2).

En Zoológicos de Sudamérica se conservan bancos con pajuelas de espermatozoides de pudúes, para la fecundación artificial de estas especies (Zoológico Metropolitano Santiago de Chile y Buenos Aires Argentina). En la Universidad de Chile se mantienen, en Nitrógeno líquido, células congeladas de pudú y gato guiña para desarrollar transferencia nuclear somática. El Criozoológico de San Diego posee líneas celulares basadas en fibroblastos y dispone de análisis cromosómicos de cada una de estas especies. En Chile y Argentina se han



Figura 2: Único gato guiña adaptado a condiciones de cautiverio en el Buin Zoo



Figura 3: Pudú del Buin Zoo donante de células

formado bancos de material genético de distintos animales, esperando que el progreso tecnológico permita reproducir a estos animales amenazados. No se ha reportado avances en la obtención de embriones procedentes de material guardado en nitrógeno líquido con la excepción del trabajo realizado en pudú (Venegas et al, 2006).

La conservación de los animales y plantas se puede realizar mediante dos

métodos: "ex situ" o "in situ". La conservación "ex situ" es aquella que se desarrolla fuera del hábitat natural de una especie, y su rol fundamental es trabajar en la recuperación y rehabilitación de especies amenazadas, para introducir las nuevamente en su hábitat natural. Los centros de conservación "ex situ" contienen reservorios genéticos de gran importancia, los "bancos de recursos genéticos" (bancos de espermatozoides,

espermatozoides, óvulos o semillas suero). Entre estos destacan Zoológicos, Jardines Botánicos, Universidades, incluso librerías de ADN. Este material, está disponible para ser usado en inseminación artificial o transferencia de embriones y corresponde a una interfase entre programas de reproducción en cautiverio (conservación ex situ) y los programas de conservación en el hábitat (conservación in situ) (Holt y Pickard, 1999).

Los “bancos de células somáticas y tejidos almacenados” están disponibles sólo como un recurso de investigación genética. Las células tales como fibroblastos de la dermis, pueden ser útiles para análisis de DNA y de proteínas, como también para realizar transferencia nuclear somática (Rojas et al, 2005 y Venegas et al, 2006). En principio el banco de células puede ser fácilmente implementado, pero se debe considerar el riesgo de transmitir enfermedades, además se debe analizar para cada especie las técnicas de criopreservación (vitrificación) con el fin de evitar “un cementerio de células congeladas”.

En Chile se han generado proyectos para la conservación de animales como el huemul (Aldridge, 1998) y diversas investigaciones ecológicas (Saucedo y Gill 2004), pero no se ha revertido la situación sino que cada vez parece mas comprometida, por otra parte, no se han generado nuevos conocimientos sobre la morfofisiología reproductiva ni sobre el desarrollo embrionario del animal. En el caso del pudú, los estudios de Reyes (1991) en la Universidad de Concepción, han sido un gran aporte, sin embargo el animal continúa siendo vulnerable y el plan nacional de protección no resultó como se esperaba. Sobre el gato guiña existen estudios (Acosta 2001) que indican que está en riesgo de extinción, lamentablemente no existe el interés de la población por su conservación, ni se han realizado planes nacionales



Figura 4
Se agrega el medio de cultivo posterior a la fragmentación de la biopsia, en campana de flujo laminar.

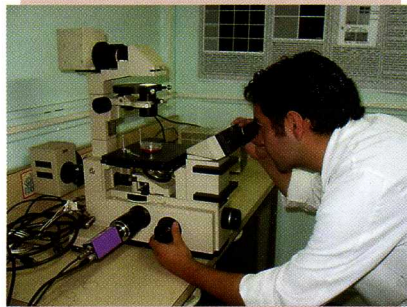


Figura 5:
Observación del cultivo celular en microscopio invertido

que involucren estudios destinados a favorecer su sobrevivencia como especie, todo lo cuál indica que terminará por desaparecer.

Saucedo ha observado, que en la naturaleza los huemules hembras no presentan problemas de fertilidad y sus crías nacen normalmente, su hipótesis es que al contar con núcleos reproductivos in-situ, tales como áreas protegidas y hábitat y centros de reproducción ex-situ, la conservación debiera ser favorable. Sin embargo, factores externos como la gran presencia de perros, turistas y ganado que se introducen en las reservas hacen retroceder cualquier avance logrado. En cuanto a los centros de reproducción, se requieren conocimientos de la biología reproductiva del huemul, que en la literatura no existen. ¿Cuánto es el volumen del semen eyaculado en

la etapa de actividad reproductiva? ¿Cuál es la concentración normal de espermatozoides? Tampoco sabemos sobre la forma normal de los espermatozoides en el eyaculado. En la literatura no hay información sobre las primeras etapas del desarrollo embrionario, ni sobre la implantación, ni el número de carúnculas uterinas, sólo se asume que es parecida a la de otros rumiantes. No obstante, esta vía de conservación del huemul sería la más importante, pero no debe ser la única, porque podría ocurrir lo mismo que con el Bucardo (*Capra pyrenaica pyrenaica*) especie española desaparecida el 5 de Enero del año 2000, extinta por políticas de conservación erradas. Por otra parte, Locatelly y Mermillod en el año 2005 al estudiar otros ciervos que están en riesgo, indicaron que las técnicas clásicas de reproducción basados en superovulación, inseminación artificial y transferencia embrionaria ha resultado muy dificultosa en los cérvidos.

Se ha considerado la restitución de especies en peligro de extinción, mediante la transferencia de un núcleo de célula somática dentro de un oocito previamente enucleado, obteniendo el desarrollo de un embrión capaz de continuar con las etapas posteriores del desarrollo, de esta manera se han logrado crías de la raza bovina Enderby Island, adaptada a condiciones climáticas extremas, utilizando la transferencia de núcleos de células foliculares de la granulosa a oocitos enucleados, de vacas domésticas, con la posterior transferencia embrionaria al útero de una vaca doméstica receptora.

Desde el año 1997, cuando Wilmut y Campbell realizaron la clonación de la oveja Dolly hasta hoy; técnicamente se ha avanzado mucho. Hay reportes de 10 especies de animales que se han clonado y su descendencia vivió normalmente, entre ellos: terneros Holstein, ratones como Cumulina, que murió a los dos años y siete meses de

edad (muy longeva para su especie), cabras, cerdos, conejo, incluso se ha clonado un gato doméstico que vive, una mula y un potro.

Las aplicaciones de la transferencia nuclear, se extienden también a la conservación de especies y razas en peligro de extinción. Existen en la literatura varios ejemplos, entre ellos: *Bos gaurus*, (Lanza et al, 2000) *Bos javanicus* y el Bucardo que es una especie desaparecida. Lo especial de estos ejemplos es que ellos han debido recurrir a una clonación interespecífica. En estos casos el citoplasma del oocito utilizado para formar el embrión deriva de especies domésticas comunes *Bos taurus* (vaca) y *Capra hircus* (cabra) mientras que el núcleo proviene de las especies en riesgo. El único problema de este tipo de clonación interespecífica estaría representado por el destino de las mitocondrias del ovocito receptor ya que podría ocurrir, que el embrión así reconstruido contenga mitocondrias de ambas especies (Holt et al, 2004).

También se han realizado algunos avances en la clonación del oso panda gigante (*Ailuropoda melanoleuca*), la clonación intraespecífica en este animal es prácticamente imposible porque hay insuficientes oocitos (la hembra ovula sólo uno o dos oocitos por año). La clonación interespecífica que involucra transferencia de núcleos de oso panda gigante en oocitos enucleados de otra especie de oso, estableciendo la gestación en una especie distinta a la donadora del núcleo puede ser la única posibilidad para clonar estos animales.

En los dos casos analizados, se debe recurrir a una clonación interespecífica, cuyo principal problema ocurre en la primera generación debido a las mitocondrias, pero es útil recordar que si el núcleo donante proviene del macho de la especie de interés, el embrión reconstruido y más aún la primera generación puede presentar mitocondrias de ambas especies. Este

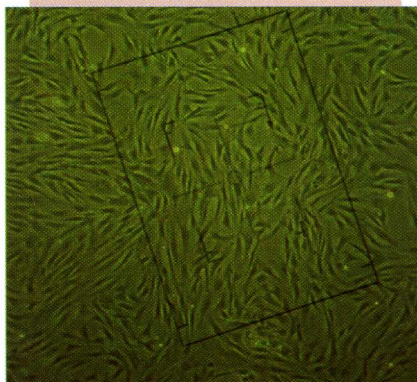


Figura 6:
microfotografía de cultivo
de células de pudú.



Figura 7
transferencia de núcleos mediante
un micromanipulador Olympus.

problema puede ser eliminado si el macho clonado se cruza naturalmente con una hembra de la especie de interés, porque las mitocondrias paternas no son transmitidas a la siguiente generación. Este argumento no se puede aplicar a la hembra porque las mitocondrias son heredadas a través del citoplasma materno (Holt et al, 2004).

¿Debemos empezar a considerar la aplicación de tecnologías de transferencia nuclear y embrionaria, como una herramienta potencial, para la conservación del Huemul del sur, del Pudú y Gato guiña?

Si, porque la clonación reproductiva, podría ayudar a aumentar el número de individuos dentro de la población, pero no se trata de clonar muchas veces a un mismo

animal, como en ciencia-ficción, sino todo lo contrario, se clona a muchos animales solo una vez o dos veces, esto permite que la descendencia crezca madure y se reproduzca naturalmente. La probabilidad de pérdida de la diversidad genética se puede reducir, especialmente si cada padre da lugar a dos copias idénticas de si mismo. Este es un interesante modelo teórico en conservación animal que fue aportado por Holt et al (2004).

¿Cuáles han sido los objetivos de este estudio?

El establecimiento de un banco genético y de células somáticas de tres especies endémicas del país: el huemul, el pudú, y uno de los felinos más pequeños y de menor distribución geográfica del mundo que es la guiña.

Otro objetivo es producir embriones de pudú, obtenidos por la transferencia de núcleos de fibroblastos de la oreja en los oocitos enucleados de un rumiante doméstico, como también generar embriones de gato guiña utilizando como oocito receptor el de un felino doméstico.

La investigación desde el punto de vista ético.

Se debe enfatizar que el objetivo es ayudar a los programas de conservación, optimizando la clonación reproductiva que ha sido exitosa en otros animales. Las técnicas que se utilizan no dañan a los animales ni generan aflicción, dolor ni sufrimiento de ellos, se obtiene la pequeña biopsia dérmica de la oreja y se dejan libres. Por otra parte, se conserva su genoma y no se introducen otros genes, ni se hace manipulación génica. En cada caso se obtiene una muestra de sangre para realiza un cariotograma al iniciar y terminar los cultivos celulares para verificar la normalidad de las células. Por lo tanto las técnicas utilizadas tampoco inciden en una alteración del ecosistema. Si se lograra en el futuro, llegar a la

transferencia a un ciervo receptor se cuidarán todos los aspectos, para evitar el sufrimiento de la hembra nodriza y de la cría.

¿Cómo se realiza la transferencia nuclear somática?

Una biopsia de dermis de la oreja se deposita, en una placa de cultivo, donde se secciona en microfragmentos y se agrega el medio de cultivo (figura 4), se incuban a 37°C y 5% de CO₂, y se hace repicaje. Las células fibroblásticas obtenidas son controladas al microscopio de contraste de fase (figuras 5 y 6). Paralelamente se realiza la recuperación de oocitos receptores desde ovarios de vacas recuperados del matadero y son madurados in vitro. Posteriormente se procede a la microinyección de los fibroblastos de pudú, en el ovocito receptor. Después de las 22 horas de cultivo de los oocitos se retira el polocito mediante un micromanipulador Olympus. (figuras 7 y 8) Para confirmar el retiro del corpúsculo polar y observar la placa metafásica en el citoplasma ovocitario se realiza la técnica de luciferasa (figura 9). Luego se realiza la microinyección de los fibroblastos completos mediante el micromanipulador Olympus en el espacio perivitelino de los ovocitos (figura 10). La fusión de membranas celulares es obtenida por choques eléctricos. Los embriones así reconstituidos son cultivados en presencia de células nutricias (Vero) durante 7 días. Un resumen de la técnica se muestra en la figura 11.

Resultados obtenidos

Se ha logrado desarrollar embriones de dos pudús hasta el estado de blastocisto, los cuáles han iniciado la fase de eclosión. En cuanto a la cronología, observamos que al segundo día se forma una etapa de dos blastómeras, al tercer día mórulas de 8 a 16 células, y desde el cuarto día se

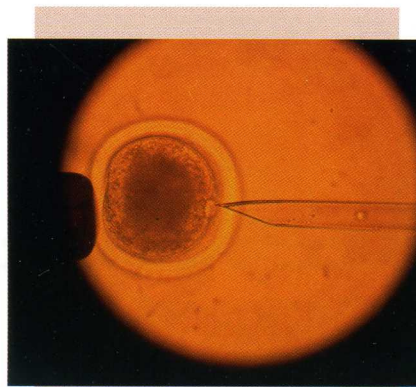


Figura 8:
se retira el polocito del ovocito seleccionado.



Figura 9.
Técnica de luciferasa para confirmar el retiro del corpúsculo polar (punto brillante) y observar la placa metafásica en el citoplasma ovocitario.

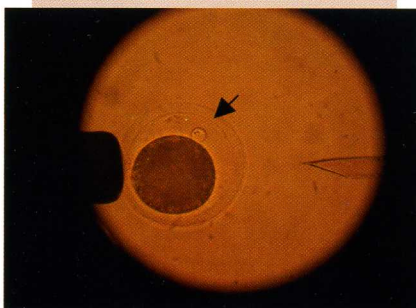


Figura 10:
Se observa el fibroblasto de pudú en el espacio perivitelino antes del golpe eléctrico

ha diferenciado como blastocisto, el cuál al séptimo día termina por eclosionar de la zona pelúcida.

Desde el punto de vista morfológico y del análisis del cariotipo son normales, sin embargo, no se sabe si

la cronología del desarrollo es normal debido a que no existen trabajos donde se establezca la cronología de las primeras etapas del desarrollo embrionario en el ciervo pudú. Si se compara con otro ciervo el *Cervus elaphus bactrianus* quien alcanza el estado de blastocisto eclosionado a los ocho días, se podría concluir que en el pudú, el desarrollo de las primeras etapas resulta ser muy acelerado. Lo mismo sucede si comparamos con el bovino donde el estado de blastocisto es observado al 7° día

La producción de embriones y descendencia depende del conocimiento de la fisiología reproductiva de cada especie en particular, en este caso se sabe muy poco sobre la fisiología y la cronología de las primeras etapas del desarrollo en huemul y pudú. La utilización del oocito de bovino ha resultado adecuado para la transferencia de núcleos, de acuerdo con lo informado por quien ha demostrado que el citoplasma del ovocito del bovino puede servir como un receptor para las células somáticas de diferentes especies de mamíferos.

El porcentaje de éxito del 4% parece ser relativamente bajo, sin embargo, es bastante adecuado, considerando que se trata de ciervos donde las tasas de desarrollo hasta el estado de blastocistos son inferiores al 10% en embriones producidos in vitro (Locatelly & Mermillod (2005). Por otra parte en el ciervo sika nunca se ha observado un blastocisto después de la fecundación in vitro. Considerando estos antecedentes y también que los trabajos de fecundación "in vitro", más exitosos han sido los realizados por Locatelly et al (2005) en *Cervus elaphus*, con un 13% de éxito de huevos clivados hasta el estado de blastocisto, se puede considerar que éstos resultados son buenos

La aplicación de biotecnologías reproductivas para la preservación de especies mamíferas en riesgo de

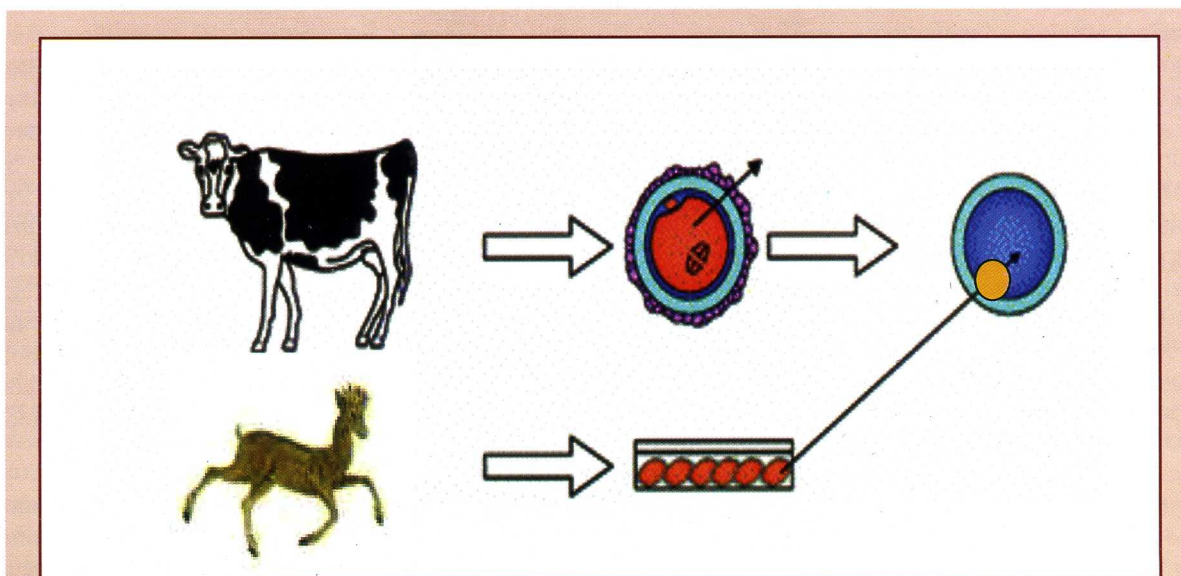


Figura 11:

De una hembra bovina se obtiene un ovocito al cuál se le extrae el polocito, con un micromanipulador Olympus. Paralelamente desde un pudú, se obtienen fibroblastos de la dermis de la oreja, los cuales se cultivan por varias generaciones. A continuación el fibroblasto completo se introduce en el espacio perivitelino del ovocito por debajo de la zona pelúcida para construir un embrión, La fusión de las membranas celulares es obtenida por choques eléctricos.

extinción y vulnerables esta limitada por varios factores: Las especies silvestres son más sensibles al estrés en comparación con las domésticas. Un sistema de manejo óptimo genético puede consistir en una población cautiva y un banco de recursos genéticos criopreservados en constante y dinámica interacción. En este caso se ha utilizado ciervos pudú de un zoológico, sometidos a un mínimo de estrés, los cuales no evidenciaron ningún problema.

Resultados obtenidos por nuestro grupo en el gato guiña

Se estableció el cariotipo de la Guiña hembra, que no estaba descrito en la literatura. Se encontró que el $2n$ de esta es 36, siendo sus cromosomas de morfología metacéntrica y subtelocéntrica, estos resultados estarían dentro del rango de variación descrito para pequeños felinos de sudamérica, cuyo rango varía entre los 36 y 38 cromosomas, no obstante esto, se necesita realizar el cariotipo de un

macho para identificar los cromosomas sexuales y determinar el cariotipo de la especie. Se evidenció además que es posible obtener líneas celulares fibroblásticas desde la dermis de la oreja y del abdomen con la misma probabilidad de éxito.

Otros grupos han logrado obtener embriones del gato africano silvestre, *Felis silvestris libica*, a partir de la fusión de uno de sus fibroblastos con un oocito enucleado de gata doméstica. Estos informes sientan las bases a seguir en las especies felinas presagiando un futuro auspicioso para el establecimiento de un banco genético

y de células somáticas del *Oncifelis guigna*, una especie muy poco estudiada, cuya información disponible es, en gran medida, anecdótica o poco actualizada. Este trabajo es importante para fortalecer los programas de conservación de la especie y asegurar así la mantención de la biodiversidad nacional.

Los bancos de líneas celulares y tejidos son recursos útiles para estudios moleculares de evolución y filogenia. Las bajas tasas de concepción, no pueden ser el argumento para oponerse a la transferencia nuclear somática porque en los últimos años se han logrado vertiginosos avances en esta tecnología. En Chile, la Universidad de Chile, Universidad de Concepción y Universidad Austral de Valdivia, han logrado avances en la capacitación científica y tecnológica de sus investigadores, En la Universidad de La Frontera se trabaja en mejorar los métodos de criopreservación por vitrificación. Los zoológicos de Santiago (Jardín Zoológico



Huemul en la reserva nacional Tamango CONAF

Metropolitano y Buin Zoo) están generando bancos de recursos genéticos de especies importantes para el país, En conclusión, los distintos grupos de expertos y en forma multidisciplinaria, trabajan para la conservación de nuestras especies autóctonas, de acuerdo a su experiencia y conocimientos. Aún esto ocurre en forma fraccionada, pero cada día parece ser más claro que “La conservación de las especies autoctonas es tarea de todos los Chilenos”

Referencias

1. Acosta, G. Efecto de la fragmentación del bosque nativo en la conservación de *Oncifelis guigna* y *Pseudalopex culpaeus* en Chile central. Tesis Magíster en Ciencias Biológicas, mención Ecología. Santiago de Chile. Universidad de Chile, Facultad de Ciencias. p 68. 2001.
2. Aldridge, D. Proyecto conservación del huemul (*Hippocamelus bisulcus*) en Chile. Medio Ambiente (Chile) 9: 109-116.1988.
3. Glade, A (ed). Libro rojo de los vertebrados terrestres de Chile. Segunda edición. Santiago, Conaf. Impresiones comerciales. 65pp. 1993.
4. Holt, W; Pickard, A and Prather R. Wildlife conservation and reproductive cloning. Reproduction. 127 317-324. 2004.
5. Lanza F, Cibelli J, Diaz F, Moraes C, Farin P, Farin C, Hammer C, West M, Damiani P. Cloning of an endangered species (*Bos gaurus*) using interspecies nuclear transfer. Cloning. 2: 79-90, 2000.
6. Locatelli Y, Mermillod P. Caracteristiques et maitrise de la fonction de reproduction chez les cervidés. INRA Prod Anim 18(1), 23-25, 2005.



Huemules hembras y machos en la reserva nacional Tamango CONAF

7. Reyes E. Programa para la conservación del ciervo chileno *Pudu pudu* (Molina). Revista del Instituto de Ecología de Chile 10: 18-21,1991
8. Rojas M, Venegas F, Montiel E, Servely JL, Vignon X & Guillomot M. Attempts at Applying Cloning to the Conservation of Species in Danger of Extinction. Int. J. Morphol., 23 (4):329-336, 2005.,
9. Saucedo C & Gill R The Endangered Huemul or South Andean deer *Hippocamelus bisulcus*. The International Journal of Conservation. Conservation News. Oryx 38(2):132-133, 2004.
10. Venegas F, Guillomot M, Vignon X, Servely JL, Audouard C, Montiel E, le bourhis D, Perón S, Soto P & Rojas M. Obtainment of Pudu (*Pudu pudu*) deer Embryos by the Somatic Nuclear Transfer Technique. Int. J. Morphol. 24, (2).285-292, 2006

Dra. Mariana Rojas (M.V.)
Rodrigo Castro (Lic.Cs. Vet.)
Dr. Felipe Venegas (M.V.)
Laboratorio de Embriología Comparada,
Programa de Anatomía
y Biología del Desarrollo,
Facultad de Medicina,
Universidad de Chile.

Rodrigo Alvarez (B.Q.)
Zoológico: Buin-Zoo

Michel Guillomot (Ph.D.)
Biologie du Développement
et Reproduction. INRA.
Jouy en Josas. France.