



**UNIVERSIDAD DE LA REPÚBLICA  
FACULTAD DE VETERINARIA**

**NACIMIENTO Y DESARROLLO DE CORDEROS MUTANTES PARA EL GEN DE  
LA MIOSTATINA GENERADOS POR CRISPR**

**por**

**Marcela ALONSO BRUSCHI  
Patricia ARMAND UGON RUSIÑOL**

TESIS DE GRADO presentada como uno de  
los requisitos para obtener el título de Doctor  
en Ciencias Veterinarias  
Orientación: Producción Animal

MODALIDAD: Ensayo Experimental

**MONTEVIDEO  
URUGUAY  
2016**

## PÁGINA DE APROBACIÓN

Tesis de grado aprobada por:

Presidente de mesa:

---

Dra. Eileen Armstrong

Segundo miembro:

---

Dr. Alejo Menchaca

Tercer miembro:

---

Dra. Yael Filipiak

Cuarto miembro:

---

Dr. Pedro C. dos Santos-Neto

Fecha:

Autores:

---

Marcela Alonso Bruschi

---

Patricia Armand Ugon Rusiñol

## **AGRADECIMIENTOS**

A nuestras familias por apoyarnos durante toda la carrera y en este momento.

A nuestros amigos tanto los que compartieron estos años con nosotras así como los que de alguna manera también estuvieron presentes.

A Diego y Sebastián que nos acompañaron en este trayecto.

A Alejo Menchaca nuestro tutor y a Pedro dos Santos-Neto nuestro co-tutor por todo el tiempo y apoyo que nos dedicaron.

A todo el equipo de la Fundación IRAUy por haber colaborado en la elaboración del trabajo.

<b>TABLA DE CONTENIDO</b>	<b>Páginas</b>
PÁGINA DE APROBACIÓN.....	2
AGRADECIMIENTOS.....	3
LISTA DE TABLAS Y FIGURAS.....	5
RESUMEN.....	6
SUMMARY.....	8
1. INTRODUCCIÓN.....	9
2. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA.....	12
3. HIPÓTESIS.....	25
4. OBJETIVOS.....	26
5. MATERIALES Y MÉTODOS.....	27
6. RESULTADOS.....	30
7. DISCUSIÓN.....	36
8. CONCLUSIONES.....	39
9. BIBLIOGRAFÍA.....	40
10. ANEXOS.....	48

## LISTA DE TABLAS Y FIGURAS

### TABLAS

**Tabla 1.** Eficiencia obtenida con el sistema CRISPR/Cas9.....Página 31

**Tabla 2.** Desarrollo de los corderos a los Días 1, 15, 30 y 60 luego del nacimiento, para los parámetros más afectados.....Página 33

### FIGURAS

**Figura 1.** Peso corporal en los corderos de los diferentes genotipos producidos por CRISPR/Cas9.....Página 34

**Figura 2.** Fenotipo de los corderos a los 30 días de nacidos.....Página 35

## RESUMEN

El objetivo de esta tesis fue evaluar el desarrollo corporal durante los primeros 60 días de vida de corderos *knock out* (KO) para miostatina (*MSTN*) generados con la técnica CRISPR. Esta proteína regula el desarrollo muscular, de tal modo que su ausencia favorecería un mayor crecimiento y peso corporal. Un total de 22 corderos fueron generados con esta tecnología, siendo 10 de ellos KO y 12 *wild type* (WT) sin haber sufrido ninguna modificación. Los corderos que presentaron mutaciones fueron caracterizados genótipicamente como KO homocigotas y KO heterocigotas. Se realizaron mediciones de parámetros clínicos al Día 1 (temperatura rectal, frecuencia cardíaca y frecuencia respiratoria) para los cuales no hubo diferencias entre los corderos KO o WT. La temperatura rectal promedio al Día 1 fue de  $40,2 \pm 0,2$  para los corderos WT,  $39,9 \pm 0,3$  para los corderos KO homocigotas y  $39,9 \pm 0,4^\circ\text{C}$  para los corderos KO heterocigotas ( $P=\text{NS}$ ). La frecuencia cardíaca fue  $189,8 \pm 3,1$  latidos por minuto para los corderos WT,  $184,0 \pm 5,7$  para los corderos KO homocigotas y  $203,0 \pm 11,8$  para los corderos KO heterocigotas ( $P=\text{NS}$ ), y la frecuencia respiratoria fue  $93,3 \pm 1,8$  respiraciones por minuto para los corderos WT,  $86,0 \pm 13,1$  para los corderos KO homocigotas y  $75,0 \pm 5,0$  para los corderos KO heterocigotas ( $P=\text{NS}$ ). También se registraron largo de gestación (DÍAS $\pm$ XX) y sexo de los corderos. Los parámetros morfológicos fueron medidos entre el Día 1 y los 60 días de vida, mostrando los corderos KO homocigotas valores superiores al Día 60 respecto a los WT, para los parámetros que describiremos a continuación. Para la variable peso corporal (kg) no hubo diferencias significativas entre los corderos KO homocigotas y los corderos WT al Día 1 ( $P=\text{NS}$ ), sin embargo si se presentó una diferencia notoria a los Días 15 y 30 ( $P<0,05$ ), presentando una tendencia a un mayor peso al Día 60 ( $P=0,08$ ) para los corderos KO homocigotas ( $15,4 \pm 1,1$  kg) respecto a los corderos WT ( $12,6 \pm 0,7$  kg). También fue observada una tendencia estadística ( $P=0,1$ ) a favor de los corderos KO homocigotas comparado a los corderos WT al Día 60, para las variables ancho de pecho ( $116,3 \pm 3,7$  mm para los corderos KO homocigotas y  $98,2 \pm 5,6$  mm para los corderos WT), ancho de grupa o cadera ( $70,0 \pm 1,5$  mm para los corderos KO homocigotas y  $64,3 \pm 2,6$  mm para el los corderos WT), altura de miembros anteriores ( $49,6 \pm 2,0$  cm para los corderos KO homocigotas y  $46,6 \pm 1,2$  cm para los corderos WT) y altura de miembros posteriores ( $49,3 \pm 0,9$  cm para los corderos KO homocigotas y  $45,6 \pm 1,2$  cm para los corderos WT). Los resultados obtenidos en las medidas de perímetro torácico, diámetro biparietal, longitud cráneo-caudal y longitud occipito-nasal, no mostraron diferencias significativas entre los tres genotipos a los Días 1, 15, 30 y 60. En conclusión, en esta tesis demostramos que los corderos mutantes homocigotas para el gen de la miostatina generados por la técnica

CRISPR tienen un mayor desarrollo y peso corporal durante los primeros dos meses de vida. Esto representa un resultado novedoso a nivel internacional con esta tecnología en ovinos, y en particular el modelo generado podría ser de utilidad para mejorar la eficiencia en la producción ovina.

## SUMMARY

The aim of this thesis was to evaluate the physical development during the first 60 days of life of myostatin (*MSTN*) in *knock out* (KO) lambs generated with CRISPR technique. This protein regulates muscle development, so that its absence would favor further growth and body weight. A total of 22 sheep were generated with this technology, being 10 of them KO and 12 *wild type* (WT). Lambs with mutations were characterized as homozygous KO and heterozygous KO. Clinical parameters were measured at birth (rectal temperature, heart rate and respiratory rate) and no differences between groups were found. The average rectal temperature at birth was  $40.2 \pm 0.2$  for WT lambs,  $39.9 \pm 0.3$  for homozygous KO lambs and  $39.9 \pm 0.4$  °C for heterozygotes KO lambs (P=NS). The average heart rate was of  $189.8 \pm 3.1$  beats per minute for WT,  $184.0 \pm 5.7$  for homozygous KO lambs and  $203.0 \pm 11.8$  for heterozygous KO lambs, and the average respiratory rate was  $93.3 \pm 1.8$  for WT,  $86.0 \pm 13.1$  for homozygous KO lambs and  $75.0 \pm 5.0$  for heterozygous KO lambs (P=NS). Also time of gestation (DAYS  $\pm$  XX) and sex of the lambs were recorded. The morphological parameters were measured between birth and 60 days of life, showing the homozygous KO lambs higher values at Day 60 compared to WT for the parameters described below. For body weight (kg) there were no significant differences between homozygous KO lambs and WT lambs at birth (P=NS), but they presented a noticeable difference on Days 15 and 30 (P <0.05), presenting a tendency to a higher weight on Day 60 (P = 0.08) for homozygous KO lambs ( $15.4 \pm 1.1$  kg) compared to WT ( $12.6 \pm 0.7$  kg) lambs. It was also observed a statistical trend (P=0.1) in favor of the homozygous KO lambs compared to WT lambs at Day 60, for the variables chest width ( $116.3 \pm 3.7$  mm for homozygous KO lambs and  $98.2 \pm 5.6$  mm for WT lambs), rump or hip width ( $70.0 \pm 1.5$  mm for homozygous KO lambs and  $64.3 \pm 2.6$  mm for WT lambs), forelimbs height ( $49.6 \pm 2.0$  cm for homozygous KO lambs and  $46.6 \pm 1.2$  cm for WT lambs) and hindlimbs height ( $49.3 \pm 0.9$  cm for homozygous KO lambs and  $45.6 \pm 1.2$  cm for WT lambs). The results obtained from the variables chest circumference (cm), biparietal diameter (mm), cranio-caudal length (cm) and occipito-nasal length (mm) showed no significant differences between the three genotypes at Days 1, 15, 30 and 60. In conclusion, we demonstrated that mutant homozygous lambs for the myostatin gene generated by the CRISPR technique had a higher development and body weight during the first two months of life. An innovative result is shown with this technology in sheep and in particular the model generated could be useful to improve efficiency in animal production.

## 1. INTRODUCCIÓN

En Uruguay, más del 70% de la producción ovina se caracteriza por biotipos de doble propósito, orientados mayoritariamente a la producción lanera. La participación futura en el mercado mundial de lana exige fibras textiles livianas, suaves y confortables, para lo que es necesaria la producción de lanas finas y superfinas, características de razas como Merino Australiano que no pueden ser obtenidas de las razas como Corriedale. Por otra parte, hay un incremento sostenido de la demanda y por ende de los precios de la carne ovina a nivel mundial, generando interés en obtener animales con alta eficiencia en la producción de carne, lo que ha llevado al crecimiento en el uso de razas exclusivamente de carne cuya producción es más destacada (Montossi y col., 2011). Lamentablemente mediante la genética clásica, es decir con el uso de los cruzamientos y la selección, no se ha logrado un tipo de animal que cumpla con ambas características con alta eficiencia, es decir que permita producir tanto lanas superfinas, así como un buen peso y calidad de carcasas similar a las razas más destacadas en producción de carne.

Las técnicas de reproducción asistida han contribuido en este sentido. Desde hace varios años se viene implementando en nuestro país la Inseminación Artificial (IA) a partir de carneros con características productivas deseables, logrando así la obtención de animales genéticamente superiores (Durán del Campo, 1970; Bentancor y González, 2015). Luego se fueron incorporando nuevas técnicas como la múltiple ovulación y transferencia de embriones (MOTE), permitiendo también introducir de manera positiva la genética materna, mejorando aún más las características de interés (Menchaca y col., 2010; Gibbons y Cueto, 2013).

Recientemente, con el avance de las biotecnologías se ha logrado la producción de embriones *in vitro* (PIV), potenciando aún más la capacidad de multiplicar hembras superiores. Esta tecnología está disponible en Uruguay a partir del nacimiento de los primeros corderos *in vitro* generados en 2011 (Menchaca y col., 2012).

La posibilidad de producir embriones *in vitro* junto con el gran avance que ha habido en los últimos años en la biología molecular y la genética, ha permitido el desarrollo de una nueva tecnología conocida como transgénesis. Esta tecnología consiste en el suministro de material genético exógeno a un célula, con el fin de que los genes contenidos en él (transgenes) se transcriban y traduzcan, es decir, se expresen (Bacci, 2007).

Además de su aplicación con fines productivos, la transgénesis en animales de producción tiene un gran impacto para aplicaciones biomédicas, como por ejemplo la

producción de proteínas recombinantes de interés humano, entre otras (Kues y Niemann, 2011). Esta tecnología se ha aplicado en animales de producción desde la década de los 80, utilizando diferentes técnicas como por ejemplo la microinyección (Hammer y col., 1985), la transferencia nuclear de células somáticas (Wilmut y col., 1997), la transgénesis mediada por vectores retrovirales (Chan y col., 1998), y la transgénesis mediada por vectores lentivirales (Hofmann y col., 2003). Aunque esta tecnología ha ido avanzando desde los años 1980s, en general su eficiencia es baja debido a la muy elevada complejidad técnica, ciertas dificultades en la integración del transgen en el genoma receptor y altos costos asociados a su puesta en marcha (Kues y Niemann, 2011).

Recientemente se ha desarrollado una nueva tecnología diferente a la transgénesis que se denomina edición génica. Esta tecnología no necesariamente incorpora material exógeno al ADN huésped, sino que lo puede modificar de manera tan precisa como nunca antes había sido logrado. Existen diferentes técnicas para la edición del genoma, siendo dos de ellas ZNFs (Nucleasas con dedos de Zinc) y TALENs (Nucleasas efectoras de tipo activador de la transcripción), las cuales son capaces de insertar genes de interés (*knock-in*), así como también de eliminarlos (*knock-out*). Aunque estas técnicas permitan obtener animales KO, presentan la desventaja de generar ciertas mutaciones fuera de los sitios de interés (Hockemeyer y col., 2011).

El reciente descubrimiento de los sistemas inmunes adaptativos bacterianos conocidos como CRISPR (en inglés: *Clustered regularly interspaced short palindromic repeats*, en español: repeticiones palindrómicas cortas agrupadas y regularmente interespaciadas), asociados a la proteína Cas9, han logrado la más reciente y prometedora herramienta para la edición genómica (Gupta y Musunuru, 2014). Este sistema funciona normalmente en bacterias y arqueas permitiéndole una defensa a los procariotas contra los virus. El sistema aplicado a células o embriones eucariotas, se caracteriza por ser una técnica eficiente y muy específica para el sitio de interés, permitiendo logros nunca antes alcanzados por lo que está evolucionando rápidamente y en constante expansión (Song y col., 2015). Luego de haber sido aplicado por primera vez en ratones en 2013, en 2015 el sistema CRISPR fue reconocido por la revista Science como el avance del año, e incluso es considerado el mayor avance biotecnológico del Siglo XXI (Regalado, 2014).

La aplicación de CRISPR/Cas9 en ovinos de raza Merino Australiano, con el fin de obtener corderos *knock-out* para el gen de la miostatina sería de gran interés. La miostatina es un factor de crecimiento perteneciente a la familia de los péptidos TGF- $\beta$  (factores de crecimiento beta 1), el cual es un regulador negativo del crecimiento

muscular (McPherron y col., 1997). Al silenciar este gen, se induciría un aumento del volumen muscular, obteniéndose así el fenotipo conocido como de doble musculatura. Esto lograría conjugar dos características importantes para el mercado ovino, como son la producción de lana fina con el biotipo carnícano. Además de esto, permitiría comprobar la eficiencia de CRISPR/Cas9, siendo que cuando se inició este proyecto y nacieron los corderos, aún no se habían reportado nacimientos en especies productivas.

## **2. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA**

### **Producción ovina en Uruguay**

La producción ovina en Uruguay representa un eslabón importante para el sector rural. Según el último censo 2014/2015, el stock ovino es de 7,4 millones de cabezas, predominando en el norte y noroeste del país. En este período se produjeron 60.000 toneladas de carne ovina, y 29.105 toneladas de lana total (MGAP, 2015).

Los sistemas de producción ovina en nuestro país se caracterizan por el predominio de razas “doble propósito”, basados mayoritariamente en la raza Corriedale (60%). Dentro del sector lanero, la raza más destacada es la Merino Australiano debido a la cantidad y calidad de su lana, aunque se mantiene el interés por mejorar su producción de carne (Salgado, 2003).

Para lograr el crecimiento de este rubro, un aspecto fundamental a considerar fue la incorporación de nuevas tecnologías para elevar tanto la eficiencia productiva como reproductiva (Montossi y col., 2005).

### **Tecnologías de reproducción en animales domésticos**

Las biotecnologías de reproducción animal, surgieron inicialmente a partir del uso de la inseminación artificial (IA) en rebaños bovinos con amplia difusión en diferentes países de todo el mundo. Esta técnica es actualmente considerada en reproducción animal como una herramienta de la primera generación. En el caso de los ovinos, su desarrollo ha sido relevante en países como Rusia, Brasil, Uruguay y Argentina y en algunos países de Europa. En nuestro país, según una publicación en el diario “El Día” el primer trabajo de IA en ovinos fue realizado por el Ing. L. Thomaset en el establecimiento “El trébol rojo” en el año 1937. El resultado fue la obtención de 31 corderos a partir de la inseminación de vientres Lincoln (Durán del Campo, 1970). A partir de ese momento, se ha trasladado la técnica desde el laboratorio al campo y se ha capacitado personal idóneo, lo que facilitó el incremento de la inseminación en años posteriores (Durán del Campo, 1970; Bentancor y González, 2015).

La IA dió paso a otras nuevas tecnologías que fueron evolucionando, y que han permitido a los ganaderos mayores resultados reproductivos y productivos. Así se desarrolló la múltiple ovulación y transferencia de embriones como la segunda

generación de estas tecnologías (Menchaca y col., 2010; Gibbons y Cueto, 2013), siendo los primeros trabajos realizados en ovinos y caprinos hace más de 80 años (Warwick y col., 1934).

La tercera generación, comprende la producción *in vitro* de embriones (PIV) que permitió acceder y avanzar en el uso de biotecnologías más complejas como la clonación y transgénesis, generando grandes avances tanto a nivel mundial como local (Bacci, 2007; dos Santos-Neto y col., 2015). En nuestro país, los primeros corderos producidos *in vitro* nacieron en el año 2011 (Menchaca y col., 2012), y al año siguiente se aplicó esta técnica para producir corderos transgénicos, los cuales fueron los primeros de Sudamérica (Crispo y col., 2014).

### **Antecedentes sobre producción de animales genéticamente modificados**

El concepto de lo que representa un animal genéticamente modificado es amplio. La genética que posee cada individuo es dinámica y se modifica todo el tiempo entre una y otra generación en forma natural o espontánea, así como también dirigida por el hombre. La modificación genética en la que el hombre ha intervenido directamente en diferentes especies, ha sido consecuencia de la domesticación y por lo tanto es practicada desde hace miles de años. Lo que ha cambiado a través de la historia han sido las herramientas con las que cuenta el hombre para modificar dicha genética.

El primer animal transgénico de la historia se reportó en la década de los 70, con el nacimiento de un ratón transgénico (Jaenisch y Mintz, 1974). Años más tarde, se inyectó ADN purificado en un cigoto de ratón y se demostró que se producía la transmisión del material genético a las generaciones siguientes (Gordon y Ruddle, 1981). A pesar de los logros, la dificultad en el desarrollo de la técnica vinculado a los bajos resultados alcanzados inicialmente, llevaron a muchos grupos a intensificar sus estudios en el desarrollo de técnicas que pudieran presentar mayor eficiencia, en especial, en animales de producción.

El primer reporte de esta tecnología en animales de producción ocurrió en la década de los 80, a partir de la microinyección del gen de la hormona del crecimiento humano en embriones de ovejas, conejos y cerdos (Hammer y col., 1985). Desde entonces, se ha aplicado esta técnica en animales de producción, tanto con fines terapéuticos como con fines productivos. Uno de los primeros reportes en ovinos, ocurrió con el nacimiento de “Tracy” en 1990, creada mediante la técnica de microinyección

pronuclear, a partir de la cual fue capaz de producir el inhibidor de una proteína humana en su leche ( $\alpha_1$  antitripsina) (Wright y col., 1991).

Esta tecnología ha mostrado también ser eficiente en caprinos, especie en la cual se obtuvieron animales transgénicos mediante microinyección pronuclear de cigotos producidos *in vitro*, con el fin de producir proteínas recombinantes en su leche (Baldassarre y col., 2002). En la especie bovina, un importante reporte fue la creación de vacas transgénicas que secretan lisostafina en su leche, lo que las hace resistentes a *Staphylococcus aureus*, principal bacteria causante de mastitis, enfermedad que genera muchas pérdidas en la producción lechera. Estos resultados indican que con la manipulación genética se puede mejorar no solo la resistencia a enfermedades, sino que también mejorar el bienestar de los animales (Wall y col., 2005).

Como hemos nombrado anteriormente, en Uruguay en el año 2014, fueron presentados los primeros ovinos transgénicos de Sudamérica, utilizando la técnica de microinyección de embriones mediada por Lentivirus. Para esto se utilizó el gen *GFP* (*Green fluorescent protein*) que en la naturaleza se encuentra en una medusa, y tiene la capacidad de expresar una proteína verde fluorescente. Por este motivo, los corderos brillan en la oscuridad en colores fluorescentes. Un total de 9 corderos fueron reportados, de los cuales el 89% (8/9) mostraron una fuerte y evidente expresión de la proteína en mucosas, ojos, y tejidos queratinizados, mostrando una alta eficiencia de la técnica (Crispo y col., 2014). La transgénesis se ha utilizado también como estrategia de marketing. En este sentido, un grupo de investigadores crearon peces ornamentales a los cuales se les insertó el gen *GFP*. Estos son capaces de emitir diferentes patrones de fluorescencia, por ejemplo fluorescencia de la piel, músculos o de todo el cuerpo. Hoy en día, estos peces tienen gran repercusión en el mercado estadounidense en donde se los conoce como “*Glofish*” (Gong y col., 2000).

Los avances referidos a esta técnica no solo llevaron a resaltar una característica deseada sino que además a reducir al mínimo los rasgos adicionales no tan deseados (Garvin y col., 1998).

### **Técnicas mayormente conocidas para transgénesis**

La introducción de una “estructura transgen” en un genoma es una técnica por medio de la cual se incorpora material genético externo en células eucariotas ya sea por

medio de plásmidos, virus u otras herramientas moleculares como la microinyección (Jolly, 1994; Gao y Huang, 1995). En las últimas décadas, nuevas técnicas para la obtención de productos derivados de la transgénesis fueron desarrolladas y si bien han alcanzado resultados destacables, la eficiencia de estas aún sigue siendo una de las grandes limitantes para su incorporación. Algunas de ellas serán descritas brevemente a continuación.

### Microinyección de pronúcleos

Uno de los métodos más utilizados para transgénesis, es la microinyección directa de fragmentos de ADN clonado en el pronúcleo de embriones de 24 horas de vida (Benavides y Guénet, 2003). Es una técnica principalmente utilizada en murinos desde los años 80 (Gordon y Ruddle, 1981), siendo la misma adaptada para animales de producción aunque su uso es limitado debido a su baja eficiencia (1-2%). Además, esta técnica tiene las limitantes de no poder ser utilizada para introducir genes en estadios más avanzados del desarrollo del embrión, de sólo poder agregar material genético (nunca sustraer o reemplazar) y la integración aleatoria en el genoma (Benavides y Guénet, 2003; Gadea y García-Vazquez, 2010).

### Transgénesis retroviral

Este tipo de transgénesis es la más utilizada dentro de los experimentos de terapia génica, ya que estos vectores son capaces de infectar un amplio margen de tipos celulares. Sin embargo, para que la forma de pro virus (ADN) se integre al genoma se requiere que las células estén en división activa, teniendo como inconveniente que su uso se restringe a éstas. A pesar de que pueden integrarse en cualquier parte del genoma, parece que existen ciertos lugares de inserción más específicos. Se ha demostrado que el mecanismo de acción de los retrovirus es por medio de la retro transcripción de su material genético de ARN a ADN de doble cadena una vez que infectan a una célula. Los vectores más utilizados para esta técnica derivan de modificaciones del virus murino de la leucemia Moloney (*Mo-MLV*), del virus del sarcoma de Rous o del virus de la inmunodeficiencia humana (*HIV*) (Legorreta y col., 2012).

Los primeros trabajos dirigidos a la producción de animales transgénicos fueron realizados con esta técnica, a través de la microinyección con *SV40* (*simian virus 40*)

en embriones murinos (Jaenisch y Mintz, 1974). Esta técnica ha sido desarrollada inicialmente e incluso hoy en día sigue siendo utilizada como herramienta para la producción de animales transgénicos. Este es el caso de un estudio reciente reportado por Kakarla y colaboradores (2013), en el cual se modificaron células T humanas, a partir de un vector retroviral que codifica para la proteína de activación fibroblástica (*FAP*), el cual posee efectos antitumorales.

### Transgénesis mediada por lentivirus

Dentro del grupo de los retrovirus, encontramos a los lentivirus. Estos difieren de los retrovirus clásicos en que pueden afectar a células que no están en división, pudiendo utilizarse para la expresión de transgenes en neuronas, lo cual ya se ha logrado exitosamente. La mayoría de los vectores lentivirales se basan en el virus de la inmunodeficiencia humana (*HIV*). Los vectores *HIV* se integran en el cromosoma, siendo su base de latencia e induciendo su expresión por mayor tiempo (Legorreta y col., 2012).

Estudios realizados demuestran que la transgénesis lentiviral tiene una alta eficiencia y a su vez logra una integración estable del transgen en un alto porcentaje de las crías nacidas (Lois y col., 2002; Hofmann y col., 2003; Whitelaw y col., 2008). Un trabajo a destacar con esta técnica, citado anteriormente, fue el nacimiento de los primeros ovinos transgénicos nacidos en Sudamérica, más específicamente en nuestro país (Crispo y col., 2014).

Sin embargo, los trabajos que se realizaron con esta herramienta en animales de producción son escasos, y además como desventaja se puede destacar la dificultad en la preparación y manipulación de los vectores, así como la inestabilidad de los mismos (Houdebine, 2005; Park, 2007; Crispo y col., 2014).

### Transgénesis por clonación

A partir de la clonación, se pueden obtener copias idénticas o casi idénticas a las células donantes que se utilizan en este proceso. Básicamente la clonación se divide en dos ramas: la clonación reproductiva y la clonación terapéutica. La primera, es aquella en la cual el embrión se transfiere a un útero, se da su implantación en el endometrio y se obtiene un nuevo individuo. Por otro lado, la clonación terapéutica implica la transferencia del embrión a un medio de cultivo, dando origen a células

madre embrionarias pudiendo estas diferenciarse hacia cualquier tipo de célula adulta (Chuaire y col., 2004).

### Métodos de clonación

1. *Partición o Gemelación artificial:* esta técnica consiste en seccionar embriones en estadio de pre implantación, que posteriormente se introducirán dentro de nuevos ovocitos o zonas pelúcidas artificiales. Luego de esto, se efectúa la implantación del producto en el útero de la madre. El embrión que sufre la partición debe de tener un máximo de 8 células, ya que a partir de este momento, se inicia la expresión del genoma. El resultado obtenido son individuos prácticamente idénticos entre sí, aunque diferentes a sus progenitores (Chuaire y col., 2004). Un ejemplo de esta técnica es el trabajo realizado por Willadsen (1979) en el cual a partir de embriones ovinos de 2 células se obtuvieron gemelos monocigóticos.

2. *Paraclonación:* implica la inyección de núcleos de células madre embrionarias en cultivo, ya sea dentro de ovocitos enucleados así como de cigotos enucleados. De esta manera, se obtienen individuos casi idénticos entre sí, pero diferentes a los progenitores del embrión que aportó el núcleo transferido. En la década de los 80, se realizaron exitosamente transferencias nucleares en animales de producción como suinos (Prather y col., 1989), ovinos (Willadsen, 1986a) y bovinos (Willadsen, 1986b). Se ha comprobado que los clones provenientes de células madres embrionarias, muestran una sobrevivencia 10 a 20 veces mayor que los derivados de células somáticas y a su vez requieren un menor grado de reprogramación. Sin embargo, presentan una alta inestabilidad genética en cultivos *in vitro* (Chuaire y col., 2004).

3. *Clonación por transferencia nuclear de células somáticas o Clonación verdadera:* este método se basa en la inyección de núcleos diploides derivados de células somáticas en ovocitos previamente enucleados. El primer trabajo fue realizado en el Instituto Roslin en Edimburgo, cuando Wilmut y col. (1997) crearon a la oveja “Dolly”, primer mamífero clonado por transferencia nuclear a partir de una célula diferenciada, que en este caso provenía de la glándula mamaria de una oveja adulta. A pesar de estos avances, la técnica aún presenta limitaciones, como la complejidad de los procedimientos y el desconocimiento de su eficiencia, impidiendo así su difusión (Chuaire y col., 2004).

## Transposones

Los transposones son segmentos de ADN que poseen la habilidad para moverse en el genoma. Esta característica les confiere la capacidad para ser utilizados como vectores de genes para la manipulación del genoma. Dependiendo de su mecanismo de transposición existen 2 tipos: de clase I y de clase II. Los de clase I o retrotransposones se mueven a través de un intermediario de ARN mediante un mecanismo de tipo copiar y pegar. Los de clase II usan un intermediario de ADN y un mecanismo de cortar y pegar (Ivics y col., 2009).

En los últimos años, se ha utilizado esta herramienta en especies tanto animales (Yusa y col., 2009), como vegetales (Gao y col., 2015) con el fin de lograr modificaciones genéticas en los mismos, aunque su aplicación como vectores no está del todo definida.

## **La edición génica**

Un aspecto importante a destacar es que las técnicas de transgénesis se basan en la incorporación de un transgen, el cual se inserta en sitios al azar del genoma. A diferencia de esto, la edición génica consiste en la manipulación directa de secuencias del genoma en sitios específicos, la cual se realiza a partir del corte del ADN de doble cadena en el sitio de interés, seguido por procesos de reparación del mismo. Esta herramienta permite generar modificaciones en el genoma de manera muy específica, y no necesariamente para incorporar genes exógenos sino que también para modificar genes propios, representando un potencial enorme para la ingeniería genética hoy en día. Las técnicas actualmente más conocidas de edición génica son las nucleasas sitio dirigidas como ZFNs, TALENs, y CRISPR (Cotter y Steinbrecher, 2016).

## Zinc Fingers Nucleases (ZFNs)

Recientemente, esta técnica está siendo ampliamente utilizada en el mundo de la investigación génica, ya sea para crear modelos animales así como para terapias humanas. Se basa en proteínas de fusión que presentan una matriz de dominios específicos de unión al ADN, adaptados a partir de dedos de zinc que contienen factores de transcripción, unidos al dominio de endonucleasa de la enzima de restricción bacteriana *FokI* (naturalmente encontrada en *Flavobacterium*

*okeanokoites*). Con cada dominio de dedo de zinc se pueden reconocer 3 a 4 pb en una secuencia de ADN, y en el caso de los dominios en tándem pueden llegar a unirse a una secuencia de nucleótidos extendida, siendo única dentro del genoma de la célula. ZFNs están diseñados como un par que reconoce dos secuencias, una en la hebra hacia adelante y otra en la hebra inversa, para así poder adherirse a un sitio específico del genoma. Luego de esta unión, el par de dominios *FokI* dimeriza y adhiere el ADN al sitio, lo que provoca una ruptura de doble cadena. Las células reparan esta ruptura, utilizando ya sea una recombinación no homóloga que se puede dar en cualquier etapa del ciclo celular pudiendo darse una reparación errónea, así como también una reparación dirigida por homología. Esta última, normalmente se produce cuando una cromátida hermana está disponible para servir como modelo de reparación. Los errores generados pueden ser aprovechados en las secuencias de codificación de un gen para introducir un cambio del marco de lectura y darse entonces la anulación del gen por una combinación de dos mecanismos: el truncamiento prematuro de la proteína y la descomposición del ARNm (Gupta y Musunuru, 2014).

Un trabajo realizado con esta técnica relacionado a esta tesis, fue la obtención de cerdos *Meishan* con mutaciones para el gen *MSTN*, observándose un fenotipo de doble musculatura notorio a partir de los ocho meses (Qian y col., 2015).

A pesar de las ventajas de esta técnica, hay varias desventajas potenciales. Una de ellas, es que no ha sido demostrada una alta afinidad al unirse a un tramo extendido de nucleótidos y que además es laborioso diseñar ZFNs. Otra desventaja, es que la selección del lugar de destino es limitada (sólo se puede utilizar para orientar los sitios de unión, cada 200 pbs en la secuencia de ADN al azar). Aunque esto pueda ser un problema para los investigadores que buscan el silenciamiento de un gen, un cambio en el marco de lectura que se introduzca tempranamente en cualquier parte de la secuencia de codificación, puede significar la obtención del resultado deseado. La dificultad que sí se podría presentar sería en el caso de requerir un sitio en particular, como por ejemplo, si se busca insertar una mutación específica (Gupta y Musunuru, 2014).

Por último, es importante destacar que en varios trabajos (Hockemeyer y col., 2009; Gabriel y col., 2011; Pattanayak y col., 2011) se demostró que con esta herramienta es posible generar mutaciones en sitios que no corresponden con los sitios diana. Por lo tanto, los investigadores deben ser conscientes de que cabe la posibilidad de que ZFNs diseñados para un propósito particular, pueden generar mutaciones no deseadas (Gupta y Musunuru, 2014).

### Transcription activator-like effectors nucleases (TALENs):

En los últimos años se ha descubierto una clase de proteínas llamadas nucleasas efectoras de tipo activador de la transcripción, exclusivo para un grupo de patógenos de plantas, que ha llevado a la caracterización de un nuevo dominio de unión a ADN, denominado repeticiones TALE. Estas son series en tándem con 10 a 30 repeticiones que se unen y reconocen secuencias de ADN extendidos. Cada repetición tiene entre 33 a 35 aminoácidos de longitud, con dos aminoácidos adyacentes (denominada la repetición di-residuo variable) que confieren especificidad para uno de los cuatro pares de bases de ADN. Por lo tanto, hay una correspondencia de uno a uno entre las repeticiones y los pares de bases en las secuencias de ADN diana. Tanto TALENs como ZFNs son capaces de generar rupturas de doble cadena en un sitio diana deseado, por lo que pueden ser utilizados tanto para inhibir como para insertar genes (Gupta y Musunuru, 2014).

El gen *MSTN* también fue modificado por esta técnica, obteniéndose corderos *Norwegian White Sheep*, en los cuales se evaluó la ganancia de peso diaria desde el nacimiento hasta el sacrificio, y a su vez el peso de la carcasa (Boman y col., 2010).

Esta herramienta presenta como ventaja que puede ser construida rápidamente y en grandes cantidades, y a su vez en comparación con ZFNs es fácil de diseñar, y puede extenderse fácilmente a la longitud deseada (Gupta y Musunuru, 2014). Aunque no hay muchos datos comparativos, un estudio encontró que orientando a TALENs y ZFNs al mismo sitio, TALENs presenta menor cantidad de mutaciones fuera del sitio específico que los ZFNs. Además, los ZFNs producen una mayor toxicidad de la célula cuando se introduce en las células en comparación con TALENs (Mussolino y col., 2011). Para ambas técnicas, los efectos fuera del sitio objetivo son de gran preocupación. Un estudio en el que se utilizó TALENs para la edición del genoma en células madre pluripotentes humanas, encontró tasas bajas pero mensurables de mutagénesis en alguno de los sitios fuera de objetivo que poseían secuencias similares a los sitios diana (Hockemeyer y col., 2011).

Como desventaja, TALENs posee un tamaño significativamente mayor en comparación con ZFNs, lo que hace que sea más difícil tanto para ser insertado como para expresarse. A su vez, no son muy prácticos para aplicaciones terapéuticas en las que se utilizan vectores virales con tamaño de carga limitada (Gupta y Musunuru, 2014).

## **Antecedentes de CRISPR/Cas9**

El primer estudio en el que se observó una serie de repeticiones de nucleótidos separados por secuencias similares cortas, no relacionadas y no repetitivas (espaciadores), se reportó en la década de los 80, cuando un grupo de investigadores clonaron y secuenciaron el gen de *IAP* (*Inhibitors of apoptosis proteins*), responsable de la conversión de la fosfatasa alcalina en *Escherichia coli* (Ishino y col., 1987). Dichas secuencias, fueron identificadas por Mojica y colaboradores (1993) en la Universidad de Alicante, España, en una arquea *Haloferax mediterranei* a principios de los años 90.

Posteriormente, se realizaron varios estudios en los que se observaron un gran número de estas secuencias repetidas en bacterias y arqueas, y propusieron el nombre de *Short Regularly Spaced Repeats* (*SRSR*), en español "Repeticiones cortas regularmente espaciadas" (Mojica y col., 2000). Seguido a esto, Mojica propuso el acrónimo CRISPR (del inglés: *Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats*), que luego fue reportado por un grupo de microbiólogos holandeses (Jansen y col., 2002) y que a partir de esto fue utilizado internacionalmente para nombrar a estas secuencias. Además, en el mismo estudio, se descubrió que existe un conjunto de genes, los cuales codifican nucleasas, asociados a CRISPR (genes *Cas*) (Jansen y col., 2002).

Por otro lado, las científicas Jennifer Doudna y Emmanuelle Charpentier, estuvieron investigando a las proteínas asociadas a CRISPR, con el fin de entender la manera en que las bacterias las utilizan. La proteína en cuestión fue la llamada *Cas9*, la cual es una nucleasa que posee la particularidad de tener un sitio de corte para cada hebra de ADN de doble hélice, que asociada a los ARNm puede cortar al genoma en lugares específicos. Llegaron a la conclusión de que al generar ARNm sintéticos asociados a esta enzima, se podrían utilizar como modelos para la edición de genes (Doudna y col., 2012).

## **Algunas aplicaciones de CRISPR/Cas9 en el mundo**

### Vegetales

En algunas plantas como tabaco y *Arabidopsis* así como en cultivares de arroz y sorgo, se logró la mutación genética para el gen *GFP* (*Green Fluorescent Protein*) no funcional, creando *GFP* funcionales. La demostración exitosa del sistema

CRISPR/Cas9 en especies vegetales, es un gran avance para la modificación genética tanto para aplicaciones científicas como agrícolas, ya que es un medio fácil y de gran alcance para su uso a corto plazo (Jiang y col., 2013).

### Parásitos

Un equipo de investigadores de China utilizaron esta técnica para editar el genoma del parásito de la malaria, *Plasmodium yoelii*, el cual es unicelular y reside dentro de los glóbulos rojos. Los métodos conocidos hasta entonces habían sido ineficientes, pero con la aplicación de esta técnica se logró tanto la supresión como la introducción de genes con gran eficiencia. Estos resultados mejoraron en gran medida la capacidad para estudiar la función de genes de parásitos de la malaria (Zhang y col., 2014).

### Animales

Uno de los primeros reportes en animales fue realizado en Japón, a partir de la modificación del genoma en peces cebra (*Danio rerio*). Múltiples genes incluyendo el golden (*gol*), y tirosinasa (*tyr*) que están vinculados al pigmento, así como genes involucrados al desarrollo cardíaco, fueron eliminados o insertados mediante la inyección de CRISPR/Cas9, obteniéndose como resultado dos fenotipos distintos, el fenotipo de dos corazones y el fenotipo con hipopigmentación de la piel y del pigmento del epitelio de la retina (Ota y col., 2014).

En el caso de especies de interés productivo, el uso de CRISPR/Cas9 se ha comenzado a aplicar desde hace muy poco tiempo por lo que son pocos los trabajos realizados hasta el momento. Cabe mencionar que cuando se inició este proyecto no se habían reportado nacimientos con esta tecnología en especies de interés productivo. Los corderos de este proyecto nacieron en la primavera de 2014 y los resultados fueron publicados en agosto de 2015 (Crispo y col., 2015). Dentro de los primeros trabajos publicados, se encuentran la producción de corderos *knock-out* para el gen *MSTN* (Han y col., 2014) y la producción de cerdos para el mismo gen (Hai y col., 2014) obteniéndose como resultado la mutación del mismo, aunque no se registraron datos de características fenotípicas. Recientemente, se obtuvieron cerdos *knock-out* para el gen *MSTN*, a partir de la transfección de fibroblastos fetales porcinos. El resultado fue la obtención de cerdos en los que se comprobó la reducción

del nivel de esta proteína, manifestándose el fenotipo de doble musculatura característico (Wang y col., 2015).

## Humanos

El primer reporte de esta técnica en humanos fue en el 2015, con la edición genómica de 86 cigotos. El objetivo del estudio era corregir el gen responsable de una enfermedad hematológica hereditaria denominada beta-talasemia. Sin embargo, esta herramienta no demostró ser tan eficiente en cigotos humanos. De los embriones modificados, 71 sobrevivieron, 28 se editaron con éxito y se logró corregir el gen únicamente en 4 de ellos. Con este trabajo se llegó a la conclusión de que era necesario mejorar la especificidad del sistema previo a sus aplicaciones clínicas (Liang y col., 2015).

## Aplicaciones para investigación de enfermedades

Esta técnica abrió espacio a una serie de estudios de enfermedades y a pesar de los progresos en esa área, aún mantienen un carácter inicial de desarrollo. Uno de estos estudios, fue el de un equipo de investigadores de Estados Unidos, quienes aplicaron CRISPR/Cas9 para restaurar la expresión del gen de la distrofina en células de ratones portadoras de mutaciones, que producen la distrofia muscular de Duchenne (DMD). En humanos, esta mutación ocasiona un debilitamiento progresivo de los músculos, reduciendo de forma drástica su esperanza de vida. Los resultados del trabajo demostraron un aumento en la producción de distrofina suficiente para recuperar el tono muscular, sobre todo en el corazón y los pulmones, órganos claves para evitar la muerte prematura relacionada a esta enfermedad (Ousterout y col., 2015).

## **Miostatina como gen de interés productivo**

La miostatina o factor de crecimiento y diferenciación 8 (*GDF8*) es un regulador negativo del crecimiento muscular perteneciente a la familia de los péptidos TGF- $\beta$  (factores de crecimiento beta 1). En base a esto, investigadores demostraron que a partir de su inactivación, mediante la técnica de “*knock out*” en ratones de laboratorio, se obtuvieron animales con un incremento significativo de volumen y masa muscular,

asociada con un aumento tanto del número de fibras musculares (hiperplasia) así como un aumento del tamaño de la fibra (hipertrofia), conocido como fenotipo de doble musculatura (McPherron y col., 1997).

La también llamada hipertrofia muscular, se presenta por modificación espontánea del gen de la miostatina, con alta frecuencia en las razas bovinas como el *Piemontese* y *Belgian Blue*, y en ovinos en la raza *Texel*. Ya hace algunas décadas que su selección en estas especies fue orientada casi exclusivamente hacia una eficiente producción de carne. A partir de la identificación del gen *MSTN* asociado a la hipertrofia muscular presente en estas razas de forma natural, se ha generado interés en el mismo por la importancia económica de esta característica (Grobet y col., 1997; Mujica, 2004; Wiener y col., 2009).

El rendimiento de la carcasa así como las altas ganancias diarias son sin duda una de las características más notables, sin embargo las dificultades asociadas al parto conducen a una selección de estos animales o su utilización en cruzamientos (Grobet y col., 1997).

Con respecto a la conformación esquelética, se comprobó que los huesos de los animales con doble musculatura están menos afectados que otros tejidos del cuerpo, no habiendo cambios en su forma ni tamaño. Esto se traduce en carcasas con mayor proporción de músculo y menor proporción de hueso y grasa (Esmailzadeh y col., 2008; Wiener y col., 2009).

En cuanto a la calidad de la carne, según Wiener y col. (2009) esta tiene niveles reducidos de grasa en general, en la que predominan los ácidos grasos poliinsaturados, logrando una carne más saludable pero menos sabrosa. Para las características terneza y jugosidad, no se encontraron diferencias entre animales mutantes y no mutantes para el gen *MSTN*.

En ovinos, el silenciamiento del gen de la Miostatina en razas como Merino Australiano, podría ser un modelo interesante para investigación. Específicamente, esta raza se caracteriza por producción de lana superfina o ultra fina, y si sumado a esto se lograra una mayor producción de carne en animales con alta calidad de lana, permitiría una mejor explotación productiva en esa raza. Debido a su tamaño pequeño y a su corto período de gestación en comparación con otras especies como los bovinos, la especie ovina es un buen modelo para la investigación. Un punto a destacar, sería la gran importancia de obtener corderos modificados para dicho gen, ya que a nivel productivo tendría un gran impacto la producción de corderos doble propósito.

### **3. HIPÓTESIS**

El desarrollo y peso corporal de corderos KO para *MSTN* producidos por la técnica CRISPR es mayor que el de corderos WT.

## **4. OBJETIVOS**

### **General**

Evaluar el desarrollo y peso corporal durante los primeros 60 días de vida de corderos KO para *MSTN* generados a partir del sistema CRISPR/Cas9 para edición génica.

### **Específicos**

Establecer los efectos provocados por el silenciamiento del gen *MSTN* en los parámetros clínicos de temperatura rectal, frecuencia cardíaca y respiratoria al Día 1 de nacidos.

Determinar los parámetros morfológicos de peso corporal, perímetro torácico, diámetro biparietal, longitud cráneo-caudal y occipito-nasal, altura de miembro anterior, altura de miembro posterior, ancho de grupa o cadera y ancho de pecho, a los Días 1, 15, 30 y 60 de vida.

## 5. MATERIALES Y MÉTODOS

### Aspectos generales

La tesis surge de un proyecto más amplio en el que primero se generó este modelo ovino en una primera etapa de laboratorio, luego se produjeron los corderos en una segunda etapa en la que se enmarca esta tesis, y por último en una tercera etapa se continuó con una caracterización más profunda. El proyecto en su totalidad fue llevado adelante por Fundación IRAUy y el Instituto Pasteur de Montevideo.

El trabajo de esta tesis fue realizado en las instalaciones de Fundación IRAUy (Camino Cruz del Sur, 2250, Montevideo, Uruguay). Los procedimientos realizados con los animales fueron aprobados por el Comité de Ética en el Uso de Animales de la Fundación IRAUy registrado en la Comisión Nacional de Experimentación Animal de Uruguay.

A continuación describiremos brevemente cómo fue el proceso de obtención de los corderos, cuya metodología está explicada en profundidad en el manuscrito en formato *research paper* de este experimento (Crispo y col., 2015). Desde el momento del parto hasta los 60 días de vida será descrito detalladamente ya que en esto consistió el objetivo de la tesis.

El sistema CRISPR/Cas9 fue generado mediante el procedimiento habitual de biología molecular diseñado para esta técnica, descrito en profundidad en el artículo antes mencionado (Crispo y col., 2015). El sistema CRISPR/Cas9 fue microinyectado en cigotos inmediatamente luego de la fertilización *in vitro*. Para esto se produjeron embriones *in vitro* bajo la rutina del laboratorio donde se desarrolló la tesis. Brevemente, se obtuvieron ovarios de frigorífico donde fueron transportados al laboratorio y los complejos cumulus ovocito (CCOs) se aspiraron en un medio de recuperación. Luego de seleccionados, los CCOs fueron cultivados en un medio de maduración por 24 horas en 5% CO<sub>2</sub> en atmósfera humificada a 39°C. Luego de lavados los ovocitos maduros (Metafase II) fueron inseminados con semen congelado-descongelado a una concentración de  $1 \times 10^6$  espermatozoides por cada gota (100µl), siendo este momento tomado como el Día 0 del experimento. Por último, fueron pasados al cultivo *in vitro* siguiendo el protocolo utilizado rutinariamente en el laboratorio (Crispo y col., 2014; dos Santos-Neto y col., 2015) hasta el Día 6 del desarrollo.

Los cigotos fueron microinyectados con la construcción que contiene CRISPR/Cas9, y transferidos a un medio de cultivo permaneciendo por 6 días. Luego de esto el ADN de los mismos fue analizado para detectar el nivel de mutación para el gen MSTN, y los cigotos fueron transferidos en estadio de mórula y blastocistos a ovejas receptoras, determinando así la eficiencia *in vivo* del sistema.

La transferencia se realizó mediante laparoscopia donde los embriones fueron transferidos a la porción craneal del cuerno uterino ipsilateral al cuerpo lúteo. Ovejas receptoras fueron sincronizadas utilizando un protocolo corto (Menchaca y Rubianes, 2004) para el control de la ovulación.

### **Monitoreo de fetos y corderos**

El diagnóstico de gestación y el monitoreo del desarrollo fetal fueron realizados a los Días 30 y 105 respectivamente, utilizando equipo de ultrasonografía con sonda de 3,5 y 5 MHz. Los siguientes parámetros fueron determinados a los 105 Días de gestación: diámetro torácico, diámetro biparietal, longitud occipito nasal y frecuencia cardíaca. A pesar de participar en gran parte de este proyecto, estos procedimientos no forman parte de los objetivos y resultados de la tesis.

Al Día 1 de nacidos, se determinaron el largo de gestación (DÍAS±XX), sexo, y parámetros clínicos como temperatura rectal (°C) utilizando termómetro de mercurio, frecuencia cardíaca (latidos/min) mediante estetoscopio y frecuencia respiratoria (movimientos respiratorios/min) observando los movimientos costo-abdominales. Además, se registraron los siguientes parámetros morfológicos: peso corporal (g), perímetro torácico (cm), diámetro biparietal (mm) tomando como referencia las protuberancias óseas del hueso parietal, longitud cráneo-caudal (cm) medida desde la base del cráneo hasta la inserción de la cola, longitud occipito nasal (mm) a partir de la nariz hasta la base del cráneo, altura de miembros anteriores (cm) tomando como referencia la espina de la escápula hasta la palma de la mano, altura de miembros posteriores (cm) desde la articulación coxo-femoral hasta la planta del pie, ancho de grupa (mm) desde una tuberosidad ilíaca a la otra y ancho de pecho (mm) entre ambas articulaciones escápulo-humerales. Los pesos se obtuvieron mediante balanza digital, las variables expresadas en centímetros se tomaron con cinta métrica, y las expresadas en milímetros fueron medidas con un calibre. A los Días 15, 30 y 60 de nacidos se midieron únicamente los parámetros morfológicos, aunque los parámetros clínicos se monitorearon durante todo el periodo en que se llevó a cabo el trabajo.

## **Identificación y genotipo de animales con edición génica**

A la semana del nacimiento, fueron tomadas muestras de músculo y piel, para identificación y caracterización de corderos KO mediante PCR, secuenciación del gen y *Western blot*.

## **Análisis estadístico**

Las variables continuas medidas durante la preñez y el desarrollo corporal después del nacimiento en corderos mutantes vs. no mutantes fueron analizadas mediante ANOVA o mediante la prueba no paramétrica de Kruskal Wallis. Las diferencias fueron consideradas significativas cuando  $P < 0.05$ .

Para tablas y gráficas, se calculó la Media ( $\bar{x}$ ) de cada una de las variables, entre los animales de cada genotipo para los distintos días de medición. A partir de esta, se calculó el Desvío Estándar ( $\sigma$ ) y el Error Estándar de la Media ( $\sigma/\sqrt{n}$ ).

## **Declaración de Ética**

Todos los procedimientos que incluyen la manipulación de animales, fueron aprobados en el protocolo # 001/2014 por la Comisión de Ética en el Uso de Animales (CEUA) de la Fundación IRAUy, certificada por la Comisión Nacional de Experimentación Animal (CNEA).

## 6. RESULTADOS

Debido a que el objetivo de esta tesis fue la caracterización fenotípica, la caracterización genotípica solo se menciona brevemente y está descrita más específicamente en el manuscrito en formato *research paper* de este experimento (Crispo y col., 2015). Haremos una breve descripción de la misma y luego nos enfocaremos en la evaluación fenotípica.

La sobrevivencia embrionaria a los 30 días luego de la transferencia de los embriones fue 41,5% (22/53), y un 65,5% (19/29) de las receptoras estaban preñadas, culminando con el nacimiento de 22 corderos (Tabla 1).

Los resultados más relevantes mostraron que de los 22 corderos nacidos, 10 eran KO para el gen *MSTN* (# 40, 43, 44, 47, 49, 50, 51, 56, 57 y 60), y que no se encontraron mutaciones en 12 de ellos (# 41, 42, 45, 46, 48, 52, 53, 54, 55, 58, 59 y 61). A partir de la secuenciación del ADN de los corderos, se encontró que dentro de los 10 animales mutados, 5 mostraron ambos alelos con mutaciones *frameshift* (con cambio de marco de lectura) (# 40, 43, 47, 57 y 60) y por lo tanto son KO homocigotas. 3 presentaron un alelo con mutación *frameshift* y un alelo con mutación *in frame* (sin cambio de marco de lectura) (# 49, 50 y 56) y 1 cordero (# 51) presentó un alelo con mutación *frameshift* y un alelo WT, perteneciendo estos al genotipo KO heterocigotas. El cordero restante (# 44) mostró un alelo con mutación *inframe* y un alelo WT, por lo que no se consideró KO. De la amplificación y secuenciación de los posibles sitios diana inespecíficos, se evaluaron siete regiones encontrándose únicamente una región no codificante mutada, con una delección de 27pb y una inserción de 1 pb en los animales # 40 y # 57.

La presencia de miostatina determinada por *Western blot* confirmó que los animales KO homocigotas no presentaron dicha proteína, siendo detectada en los KO heterocigotas y en los controles WT. La caracterización completa de los animales se encuentra descrita en la publicación del artículo completo (Crispo y col., 2015).

**Tabla 1. Eficiencia obtenida con el sistema CRISPR/Cas9.**

	<b>Embriones en el Día 30</b>	<b>Ovejas preñadas</b>	<b>Pérdidas fetales</b>	<b>Mutantes/ corderos nacidos</b>	<b>Homocigotas/ corderos mutantes</b>	<b>Otros genotipos/ corderos mutantes</b>
<b>Eficiencia CRISPR/ Cas9</b>	41,5% (22/53)	65,5% (19/29)	0,0% (0/22)	45,5% (10/22)	50,0% (5/10)	50,0% (5/10)

### **Desarrollo fetal y parto**

Para las variables analizadas en el Día 105 de gestación no se mostraron diferencias estadísticas entre los corderos WT y aquellos corderos mutantes KO homocigotas o KO heterocigotas, lo que indica que la mutación no afectó a las mediciones *in utero* aunque el gen *MSTN* ya había mutado (Crispo y col., 2015).

De los corderos mutantes, el # 43 y el # 49 murieron durante el parto y el cordero # 57 murió en el correr del primer mes de vida debido a una infección. Dentro de los corderos WT, el # 53 murió al parto y el # 58 dos semanas después del nacimiento. El resto de los corderos se desarrolló normalmente hasta culminar las mediciones.

De las variables que se midieron al Día 1 se llegó a los siguientes resultados. La temperatura rectal promedio fue de  $40,2 \pm 0,2$  para los corderos WT,  $39,9 \pm 0,3$  para los corderos mutantes KO homocigotas y  $39,9 \pm 0,4^\circ\text{C}$  para los corderos mutantes KO heterocigotas ( $P=NS$ ). La frecuencia cardíaca y la frecuencia respiratoria no mostraron diferencias entre los tres genotipos ( $189,8 \pm 3,1$  y  $93,3 \pm 1,8$  para los corderos WT,  $184,0 \pm 5,7$  y  $86,0 \pm 13,1$  para los corderos KO homocigotas y  $203,0 \pm 11,8$  y  $75,0 \pm 5,0$  para los corderos KO heterocigotas).

También se registraron al nacimiento el largo de la gestación y sexo de los corderos. El largo de gestación promedio fue de  $147,0 \pm 0,9$  días para los corderos WT,  $149,8 \pm 0,6$  días para los corderos mutantes KO homocigotas y  $149,4 \pm 1,0$  días para los corderos mutantes KO heterocigotas ( $P=NS$ ).

En cuanto al sexo de los corderos, dentro de los mutantes se registraron 7 machos (2 murieron al parto y 1 en el correr del primer mes de vida) y 3 hembras. Dentro de los

WT se registraron 2 machos (1 murió al parto) y 10 hembras (1 murió dos semanas después del nacimiento).

### **Fenotipo postnatal**

Para la variable peso corporal al Día 1 no hubo diferencias significativas ( $P=NS$ ) entre los corderos KO homocigotas ( $5,4\pm 0,4$  kg) y los WT ( $4,4\pm 0,3$  kg), sin embargo si se presentó una diferencia notoria a los 15 días ( $10,5\pm 0,6$  kg para los KO homocigotas y  $7,2\pm 0,5$  kg para los WT) ( $P<0,05$ ) y a los 30 días ( $11,3\pm 0,8$  kg para los KO homocigotas, y  $8,6\pm 0,6$  kg para los corderos WT) ( $P<0,05$ ) presentando una tendencia a un mayor peso a los 60 días ( $15,3\pm 1,1$  kg para los KO homocigotas, y  $12,6\pm 0,7$  kg para los corderos WT) ( $P=0,08$ ) (Tabla 1) (Figura 1). El peso corporal de corderos mutantes KO heterocigotas fue intermedio ( $P=NS$ ). La diferencia de peso mostrada por los corderos KO homocigotas dentro de los dos meses de edad, se manifestó con un incremento de peso entre el 20 y el 30%. Los resultados encontrados para el peso corporal postnatal están presentados en la Figura 1 y en la tabla 2.

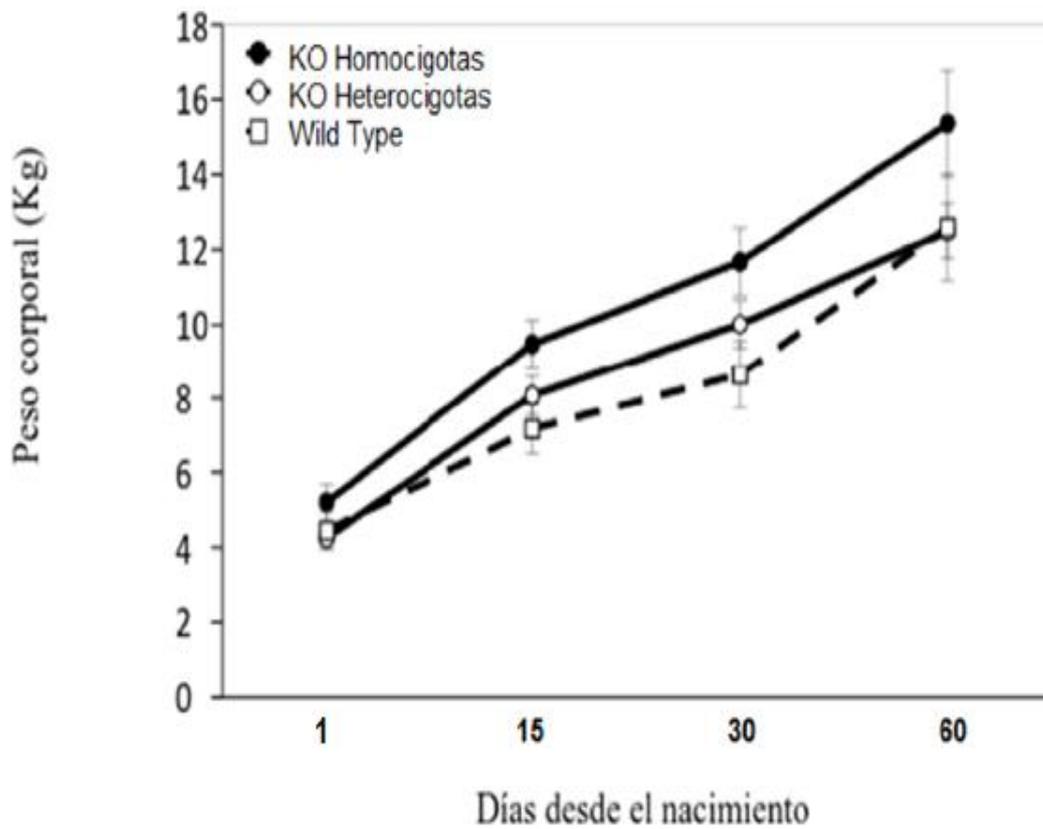
Las variables altura de miembros anteriores, altura de miembros posteriores, ancho de pecho y ancho de grupa no presentaron diferencias estadísticas entre los tres genotipos a los Días 1, 15 y 30, sin embargo fue observada una tendencia estadística ( $P<0,1$ ) a favor de los corderos KO homocigotas comparado a los corderos WT para las mismas al Día 60 (Tabla 2). Estos resultados mostraron una tendencia hacia el fenotipo hipermusculado en algunos corderos KO para *MSTN* (Figura 2).

Los resultados obtenidos a partir de las variables perímetro torácico (cm), diámetro biparietal (mm), longitud cráneo-caudal (cm) y longitud occipito nasal (mm), no mostraron diferencias significativas entre los tres genotipos a los Días 1, 15, 30 y 60 (ver Anexo 1).

**Tabla 2. Desarrollo de los corderos a los Días 1, 15, 30 y 60 luego del nacimiento, para los parámetros más afectados.**

		Altura MA (cm)	Altura MP (cm)	Ancho de pecho (mm)	Ancho de grupa (mm)	Peso corporal (kg)
<b>Día 1</b>	<b>Homocigotas</b>	38,0±0,7	37,8±1,1	66,2±4,9	41,8±1,5	5,4±0,4
	<b>Heterocigotas</b>	35,4±1,1	34,8±1,4	52,2±6,9	31,6±4,2	4,2±0,4
	<b>Wild type</b>	36,3±1,1	35,3±0,8	55,9±3,2	34,4±2,3	4,4±0,3
<b>Día 15</b>	<b>Homocigotas</b>	41,2±1,7	40,2±1,5	97,7±5,2	52,5±1,7	10,5±0,6 <sup>a</sup>
	<b>Heterocigotas</b>	40,2±1,7	37,5±2,0	87,7±5,9	50,7±4,2	7,7±0,6
	<b>Wild type</b>	40,0±0,8	37,8±0,9	81,1±3,2	47,7±2,6	7,2±0,5 <sup>b</sup>
<b>Día 30</b>	<b>Homocigotas</b>	44,6±0,7	40,0±1,5	105,6±4,4	63,6±2,0	11,3±0,8 <sup>a</sup>
	<b>Heterocigotas</b>	42,7±1,0	41,7±1,6	99,5±5,2	62,2±1,8	10,0±0,9
	<b>Wild type</b>	42,6±1,2	41,5±1,3	87,5±4,9	55,3±2,9	8,6±0,6 <sup>b</sup>
<b>Día 60</b>	<b>Homocigotas</b>	49,6±2,0 <sup>a</sup>	49,3±0,9 <sup>a</sup>	116,3±3,7 <sup>a</sup>	70,0±1,5 <sup>a</sup>	15,3±1,1 <sup>a</sup>
	<b>Heterocigotas</b>	45,0±2,0	43,3±0,9	102,6±9,0	64,0±1,0	12,5±1,4
	<b>Wild type</b>	45,8±1,0 <sup>b</sup>	44,7±0,8 <sup>b</sup>	96,7±5,3 <sup>b</sup>	64,4±2,7 <sup>b</sup>	12,6±0,7 <sup>b</sup>

Para las variables altura de miembros anteriores, altura de miembros posteriores, ancho de pecho y ancho de grupa, diferentes letras indican  $P < 0,1$ . Para la variable peso corporal, diferentes letras indican  $P < 0,05$  al Día 15 y 30, y  $P = 0,08$  al Día 60.



**Figura 1. Peso corporal en los corderos de los diferentes genotipos producidos por CRISPR/Cas9.** Diferencias significativas ( $P < 0,05$ ) entre 15 y 60 días después del nacimiento se encontraron entre los corderos *KO* homocigotas y los corderos *WT*.



**Figura 2. Fenotipo de los corderos a los 30 días de nacidos.** El cordero ubicado en la parte superior es WT (# 48), el cordero en la parte inferior es un KO homocigota (# 47). Las diferencias en la masa muscular de los miembros posteriores y del lomo del cordero # 47 se aprecian en esta imagen. Al momento de la misma, con 30 días de edad, el peso corporal era de 8,750 kg (# 48) y 11,150 kg (# 47).

## 7. DISCUSIÓN

Lo más destacable de este estudio es que fueron obtenidos corderos *knock out* de manera eficiente, mediante la modificación del gen *MSTN* por medio del sistema CRISPR/Cas9, manifestándose mediante un mayor desarrollo y peso corporal en estos corderos en comparación con los corderos WT, pudiendo así confirmar la hipótesis planteada.

Cabe destacar que la producción de animales mutantes fue alta. De 22 corderos nacidos, se obtuvieron 10 corderos con mutaciones en el gen *MSTN* (45,5%), de los cuales 5 eran KO homocigotas (50% de los mutantes). Estos resultados son similares a los obtenidos en el trabajo de Hai y col. (2014) en el que se obtuvieron cerdos mutantes para el gen *MSTN* por CRISPR/Cas9, donde el número de animales que presentaron mutaciones fue de un 63% (10/16). Sin embargo, en los resultados reportados por Han y su equipo (2014) para corderos con modificaciones del mismo gen mediante la misma técnica, de 35 corderos nacidos sólo 2 presentaron mutaciones, lo que representó una baja eficiencia, siendo de gran importancia la realización de nuevos estudios sobre el uso de esta técnica en ovinos como se logró en este trabajo. Cabe mencionar que el trabajo de Han y col. (2014) fue presentado en formato de *Letter* o “Carta al Editor” en una revista local china y la información presentada acerca del genotipo y fenotipo es muy escasa.

Todos los corderos mutantes del estudio mostraron deficiencia de la miostatina en mayor o menor medida, lo que se manifestó con una tendencia hacia la hipermuscularidad. Estos no mostraron diferencias de tamaño y peso corporal al Día 1 en comparación con los corderos WT, lo cual es una ventaja al momento del parto ya que no aumentaría el riesgo de distocias por esta causa. Sin embargo a los 60 días de nacidos, los corderos KO mostraron un peso 20-30% superior a los corderos WT.

Por otro lado, en cerdos se realizó un estudio por el cual se obtuvieron animales mutantes para el gen *MSTN* por la técnica ZFNs, pero no hubo variaciones de peso significativas entre los mutantes y los no mutantes hasta los 6 meses. Sin embargo en los machos mutantes homocigotas fueron notorias recién a partir de los 8 meses, mostrando un incremento en este momento de 14,6% de peso corporal respecto a los WT, y un peso promedio de carcasa 23,7% superior a los WT (Qian y col., 2015).

Por medio de la técnica TALENs también se obtuvieron corderos KO para el gen *MSTN* pero con dos mutaciones distintas. A pesar de que obtuvieron un aumento en la masa muscular, el peso de la carcasa se vió levemente afectado solamente en el genotipo KO homocigota de una de las mutaciones (Boman y col., 2010).

Es interesante comparar este estudio con un trabajo de características similares reportado por Wang y col. (2015), en el que se obtuvo el nacimiento de cerdos KO para el gen *MSTN* por medio de CRISPR/Cas9. En este caso, se obtuvieron 12 lechones nacidos de los cuales 8 eran mutantes (66,6%), en los que resaltaba su fenotipo de doble músculo. Se observó que los lechones mutantes exhibieron un aumento de un 15% de peso al nacer en comparación con el grupo control, pero no se pudo realizar un seguimiento debido a que todos murieron en la primera semana de vida. Aunque es una técnica revolucionaria y prometedora, es muy reciente y todavía no hay suficientes trabajos reportados que nos permitan comparar las variables fenotípicas post-natales medidas en este estudio.

Las diferencias de pesos obtenidas con este trabajo representan una característica de interés para la industria ganadera ya que se lograría una mayor producción de carne y un mejor rendimiento de la canal. En estudios previos, se comprobó que los animales con el fenotipo “doble músculo” además poseen menor contenido de grasa intramuscular lo que se traduce en carne más saludable para los consumidores (Boman y col., 2010), lo que también se demostró en estudios más recientes (Qian y col., 2015). Dentro de los bajos niveles de grasa predominan los ácidos grasos poliinsaturados, los que a pesar de ser más saludables, afectan el sabor de la misma. Para las características terneza y jugosidad, no se encontraron diferencias entre animales mutantes y no mutantes para el gen *MSTN* (Wiener y col., 2009).

El cuestionado consumo de esta carne, no sería un problema ya que no hay introducción de genes exógenos, lo que llevaría a un consumo seguro de la misma. Más aún considerando que esta mutación ya existe en forma espontánea en razas bovinas como la *Belgian blue* o la Piemontesa, y en razas ovinas como la *Texel*. Todos los individuos de estas razas tiene una mutación en el gen de la miostatina, y la carne siempre se ha consumido sin evidencias de que su consumo genere algún problema. Sumado a estas ventajas, al lograr esta mutación en Merino superfino se obtendrían animales doble o múltiple-propósito los cuales además de producir más carne, podrían mantener la alta calidad de su lana, dos características de gran valor para el mercado internacional.

Todas estas virtudes hacen que esta herramienta tenga un futuro muy prometedor para la industria animal, aplicándose en animales de producción ya sea para genes de interés productivo o biomédico, de acuerdo a las características que deseemos modificar. A su vez, representa un gran avance para la medicina humana, ya que se ha comprobado su eficiencia para corregir errores genéticos de ciertas enfermedades

como HIV-1 (Liao y col., 2015), enfermedades neurodegenerativas (Tu y col., 2015), entre otras.

A pesar de estas ventajas, hay gran preocupación por el uso de CRISPR/Cas9 en embriones humanos, ya que por medio de esta podrían realizarse modificaciones sin fines terapéuticos, como por ejemplo cambiar el color de ojos de una persona (Lanphier y col., 2015). La mala aplicación de esta técnica, podría traer consecuencias negativas como la generación de protestas públicas, que podrían dificultar el uso de la edición de genes para la medicina humana. Aunque puede ser utilizada con fines beneficiosos, también está la posibilidad de que su utilización no sea la adecuada, como es el caso de la creación de armas biológicas, por lo que es prioritario la creación de una legislación mundial al respecto, ya que la técnica está al alcance de cualquier laboratorio (Cotter y Steinbrecher, 2016). Una vez que esta sea establecida, el uso seguro de la misma va a repercutir favorablemente, tanto en el ámbito productivo como en el terapéutico (Ferrer, 2016).

Debido a los resultados positivos obtenidos en este trabajo, podemos esperar un gran impacto de las futuras aplicaciones del sistema CRISPR/Cas9 para modificar diversos genes de interés productivo. Esto representa un gran avance para nuestro país, ya que mediante ésta técnica se podrían obtener de manera eficiente, animales que conjuguen características deseadas por el mercado internacional.

## 8. CONCLUSIONES

Se demostró que el sistema CRISPR/Cas9 permite la producción de corderos KO para *MSTN* saludables, que a su vez tiene una gran eficiencia respecto a otras técnicas y que a partir de esto se podría obtener el fenotipo de doble musculatura esperado.

El silenciamiento del gen *MSTN* no provocó diferencias en los parámetros clínicos al Día 1 entre los diferentes tipos genéticos de corderos.

La mutación del gen *MSTN* afectó principalmente el peso corporal, seguramente por el aumento de la masa muscular.

La obtención de corderos KO para el gen *MSTN* en corderos Merino superfino permitiría generar animales que conjugan dos características de gran impacto económico, como son la producción de carne y de lana fina, representando un gran potencial para el sector ovino.

## 9. BIBLIOGRAFÍA

1. Bacci ML, 2007. A brief overview of transgenic farm animals. *Vet Res Com*; 31:9-14.
2. Baldassarre H, Wang B, Kafidi N, Gauthier M, Neveu N, Lapointe J, Sneek L, Leduc M, Duguay F, Zhou JF, Lazaris A, Karatzas CN (2002). Production of transgenic goats by pronuclear microinjection of in vitro produced zygotes derived from oocytes recovered by laparoscopy. *Theriogenology*; 59:831-839.
3. Benavides FJ, Guénet JL (2003). La transgénesis y la clonación en los roedores de laboratorio. En: Benavides FJ, Guénet JL. *Manual de Genética de roedores de laboratorio*. Disponible en: <http://secal.es/wp-content/uploads/2014/10/08-GENETICA-Pba-2.pdf> Fecha de consulta: 29 de marzo de 2016.
4. Bentancor E, González V (2015). Comparación reproductiva de diferentes protocolos de IATF vía cervical en ovinos en base a Prostaglandina o Progesterona y eCG. Tesis de Grado. Facultad de Veterinaria, UdelaR 58 p.
5. Boman IA, Klemetsdal G, Nafstad O, Blichfeldt T, Våge DI (2010). Impact of two myostatin (MSTN) mutations on weight gain and lamb carcass classification in Norwegian White Sheep (*Ovis aries*). *Genet Sel Evol*; 42 (4):1-7.
6. Chan AW, Homan EJ, Ballou LU, Burns JC, Bremel RD (1998). Transgenic cattle produced by reverse-transcribed gene transfer in oocytes. *P Natl Acad Sci USA*; 95:14028–14033.
7. Chuaire L, Sánchez MC, Franco ML (2004). Clonación animal: avances y perspectivas. *Colombia Med*; 35:101-111.
8. Cotter J, Steinbrecher R (2016). Gene-editing' produces GMOs that must be regulated as GMOs. Disponible en: [http://www.theecologist.org/News/news\\_analysis/2986839/gm\\_20\\_geneediting\\_produces\\_gmos\\_that\\_must\\_be\\_regulated\\_as\\_gmos.html](http://www.theecologist.org/News/news_analysis/2986839/gm_20_geneediting_produces_gmos_that_must_be_regulated_as_gmos.html). Fecha de consulta: 29 de Julio de 2016.
9. Crispo M, Mulet AP, Tesson L, Barrera N, Cuadro F, Dos Santos-Neto PC, Nguyen TH, Crénéguy A, Brusselle L, Anegón I, Menchaca A (2015). Efficient generation of myostatin Knock-Out sheep using CRISPR/Cas9 Technology and Microinjection into Zygotes. *PlosOne*; 10 (8): e0136690.

10. Crispo M, Vilariño M, Dos Santos-Neto PC, Nuñez-Olivera R, Cuadro F, Mulet AP, Nguyen TH, Anegón I, Menchaca A, Barrera N (2014). Embryo development, fetal growth and postnatal phenotype of eGFP lambs generated by lentiviral transgenesis. *Transgenic Res*; (1):31-41.
11. Dos Santos-Neto PC, Vilariño M, Barrera N, Cuadro F, Crispo M, Menchaca A (2015). Cryotolerance of Day 2 or Day 6 in vitro produced ovine embryos after vitrification by Cryotop or Spatula methods. *Cryobiology*; 70 (1):17-22.
12. Doudna JA, Charpentier E, Jinek M, Chylinski K, Fonfara I, Hauer M (2012). A Programmable Dual-RNA–Guided DNA Endonuclease in Adaptive Bacterial Immunity. *Science*; 337:816-821.
13. Duran del Campo A (1970). Anatomía, Fisiología de la Reproducción e Inseminación Artificial en Ovinos. Montevideo, Hemisferio Sur, 264 p.
14. Esmailizadeh AK, Bottema CDK, Sellick GS, Verbyla AP, Morris CA, Cullen NG, Pitchford WS (2008). Effects of the myostatin F94L substitution on beef traits. *J Anim Sci*; 86(5):1038.
15. Ferrer S (2016). El español olvidado que vislumbró la técnica genética más importante del siglo. Disponible en: [http://www.elconfidencial.com/tecnologia/2016-01-16/crispr-francis-mojica-charpentier-doudna-edicion-genomica\\_1136337/](http://www.elconfidencial.com/tecnologia/2016-01-16/crispr-francis-mojica-charpentier-doudna-edicion-genomica_1136337/). Fecha de consulta: 07 de abril de 2016.
16. Gabriel R, Lombardo A, Arens A, Miller JC, Genovese P, Kaepffel C, Nowrouzi A, Bartholomae CC, Wang J, Friedman G, Holmes MC, Gregory PD, Glimm H, Schmidt M, Naldini L, Von Kalle C (2011). An unbiased genome-wide analysis of zinc-finger nuclease specificity. *Nat Biotechnol*; 29 (9):816–823.
17. Gadea J, García-Vazquez FA (2010). Aplicaciones de los cerdos transgénicos en biomedicina y producción animal. *Información Técnica Económica Agraria*; 106 (1):15-30.
18. Gao X, Huang L (1995). Cationic liposome-mediated gene transfer. *Gene Ther*; 2:710-22.
19. Gao X, Zhou J, Li J, Zou X, Zhao J, Li Q, Xia R, Yang R, Wang D, Zuo Z, Tu J, Tao Y, Chen X, Xie Q, Zhu Z, Qu S (2015). Efficient generation of marker-free

transgenic rice plants using an improved transposon-mediated transgene reintegration strategy. *Plant Physiol*; 167 (1):11-24.

20. Garvin W, Harms U, Shearer E, Simonneaux L (1998). *Animales Transgénicos*. En: European Initiative for Biotechnology Education. Disponible en: <http://archiv.ipn.uni-kiel.de/eibe/Unit11ES.pdf>. Fecha de consulta: 11 de mayo de 2016.
21. Gibbons A, Cueto M (2013). *Manual de transferencia de embriones en ovinos y caprinos*. 2ª ed. Bariloche, INTA EEA Bariloche. 44 p. Disponible en: [http://www.produccion-animal.com.ar/produccion\\_ovina/inseminacion\\_ovinos/28-MANUAL.pdf](http://www.produccion-animal.com.ar/produccion_ovina/inseminacion_ovinos/28-MANUAL.pdf). Fecha de consulta: 10 de mayo de 2016.
22. Gong Z, Lam TJ, Ju B (2000). Chimeric gene constructs for generation of fluorescent transgenic ornamental fish. National University of Singapore; (49150).
23. Gordon J, Ruddle F (1981). Integration and stable germ line transmission of genes injected into mouse pronuclei. *Science*; 214 (4526):1244-1246.
24. Grobet L, Poncelet D, Royo LJ, Brouwers B, Pirottin D, Michaux C, Méissier F, Zanotti M, Dunner S, Georges M (1997). Molecular definition of an allelic series of mutations disrupting the myostatin function and causing double-muscling in cattle. *Mamm Genome*; 9:210–213.
25. Gupta R M, Musunuru K (2014). Expanding the genetic editing tool kit: ZFNs, TALENs, and CRISPR-Cas9. *J Clin Invest*; 124 (10):4154–4161.
26. Hai T, Teng F, Guo R, Li W, Zhou Q (2014). One-step generation of knockout pigs by zygote injection of CRISPR/Cas system. *Cell Res*; 24 (3):372–375.
27. Hammer R E, Pursel V G, Rexroad C E, Wall R J, Bolt D J, Ebert J M, Palmiter R D, Brinster R L (1985). Production of transgenic rabbits, sheep and pigs by microinjection. *Nature*; 315:680-683.
28. Han H, Ma Y, Wang T, Lian L, Tian X, Hu R (2014). One-step generation of myostatin gene knockout sheep via the CRISPR/Cas9 system. *Front Agr Sci Eng*; 1 (1):2–5.

29. Hockemeyer D, Soldner F, Beard C, Gao Q, Mitalipova M, DeKolver RC, Katibah GE, Amora R, Boydston EA, Zeitler B, Meng X, Miller JC, Zhang L, Rebar EJ, Gregory PD, Urnov FD, Jaenisch R (2009). Efficient targeting of expressed and silent genes in human ESCs and iPSCs using zinc-finger nucleases. *Nat Biotechnol*; 27 (9):851–857.
30. Hockemeyer D, Wang H, Kiani S, Lai CS, Gao Q, Cassady JP, Cost GJ, Zhang L, Santiago Y, Miller JC, Zeitler B, Cherone JM, Meng X, Hinkley SJ, Rebar EJ, Gregory PD, Urnov FD, Jaenisch R (2011). Genetic engineering of human pluripotent cells using TALE nucleases. *Nat Biotechnol*; 29 (8):731–734.
31. Hofmann A, Kessler B, Ewerling S, Weppert M, Vogg B, Ludwig H, Stojkovic M, Boelhaue M, Brem G, Wolf E, Pfeifer A (2003). Efficient transgenesis in farm animals by lentiviral vectors. *EMBO Rep*; 4 (11):1054–1060.
32. Houdebine LM (2005). Use of transgenic animals to improve human health and animal production. *Reprod Domest Anim*; 40 (4):269-81.
33. Ishino Y, Shinagawa H, Makino K, Amemura M, Nakata A (1987). Nucleotide sequence of the *iap* gene, responsible for alkaline phosphatase isozyme conversion in *Escherichia coli*, and identification of the gene product. *J Bacteriol*; 169 (12):5429-33.
34. Ivics Z, Li MA, Matés L, Boeke JD, Nagy A, Bradley A, Izsvák Z (2009). Transposon-mediated genome manipulation in vertebrates. *Nat Methods*; 6:415-422.
35. Jaenisch R, Mintz B (1974). Simian Virus 40 DNA Sequences in DNA of Healthy Adult Mice Derived from Preimplantation Blastocysts Injected with Viral DNA. *Proc Natl Acad Sci*; 71 (4):1250–1254.
36. Jansen R, Embden JD, Gaastra W, Schouls LM (2002). Identification of genes that are associated with DNA repeats in prokaryotes. *Mol Microbiol*; 43 (6):1565–1575.
37. Jiang WZ, Zhou HB, Bi HH, Fromm M, Yang B, Weeks DP (2013). Demonstration of CRISPR/Cas9/sgRNA-mediated targeted gene modification in *Arabidopsis*, tobacco, sorghum and rice. *Nucleic Acids Res*; 41 (20):e188.
38. Jolly D (1994). Viral vector systems for gene therapy. *Cancer Gene Ther*; 1:51-64.

39. Kakarla S, Chow K, Mata M, Shaffer DR, Song X T, Wu MF, Liu H, Wang LL, Rowley DR, Pfizenmaier K, Gottschalk S (2013). Antitumor Effects of Chimeric Receptor Engineered Human T Cells Directed to Tumor Stroma. *Mol Ther*; 21 (8):1611–1620.
40. Kues WA, Niemann H (2011). Advances in farm animal transgenesis. *Prev Vet Med*; 102 (2):146–56.
41. Lanphier E, Urnov F, Haecker SE, Werner M, Smolensk J (2015). Don't edit the human germ line. *Nature*; 519:410-411.
42. Legorreta M, Martínez F, Hernández F, Zentella A (2012). Los vectores virales y la transgénesis. *Vertientes* 15 (1):5-14.
43. Liang P, Xu Y, Zhang X, Ding C, Huang R, Zhang Z, Lv J, Xie X, Chen Y, Li Y, Sun Y, Bai Y, Songyang Z, Ma W, Zhou C, Huang J (2015). CRISPR/Cas9-mediated gene editing in human tripronuclear zygotes. *Protein Cell*; 6 (5):363-372.
44. Liao HK, Gu Y, Diaz A, Marlett J, Takahashi Y, Li m, Suzuki K, Xu R, Hishida T, Chang CJ, Rodriguez C, Young J, Izpisua JC (2015). Use of the CRISPR/Cas9 system as an intracellular defense against HIV-1 infection in human cells. *Nature*; 6 (6413):1-10.
45. Lois C, Hong EJ, Pease S, Brown EJ, Baltimore D (2002). Germ-line transmission and tissue-specific expression of transgenes delivered by lentiviral vectors. *Science*; 295 (5556):868–872.
46. McPherron AC, Lawler AM, Lee SJ (1997). Regulation of skeletal muscle mass in mice by a new TGF-beta superfamily member. *Nature*; 387: 83-90.
47. Menchaca A, Rubianes E (2004). New treatments associated with timed artificial insemination in small ruminants. *Reprod Fert Develop*; 16 (4):403–13.
48. Menchaca A, Vilariño M, Crispo M, De Castro T, Rubianes E (2010). New approaches to superovulation and embryo transfer in small ruminants. *Reprod Fert Develop*; 22:113–118.
49. Menchaca A, Vilariño M, Dos Santos-Neto PC, Wijma R, Pinczak A, de Castro T, Crispo M (2012). Producción de los primeros corderos por fertilización in vitro en Uruguay. *Facultad de Veterinaria, Montevideo*. 48:178.

50. Ministerio de Ganadería, Agricultura y Pesca (2015). Anuario Estadístico Agropecuario 2015. Montevideo, MGAP. Disponible en: <http://www.mgap.gub.uy/Dieaanterior/Anuario2015/DIEA-Anuario2015-01web.pdf> Fecha de consulta: 11 de mayo de 2016.
51. Mojica FJ, Díez-Villaseñor C, Soria E, Juez G (2000). Biological significance of a family of regularly spaced repeats in the genomes of Archaea, Bacteria and mitochondria. *Mol Microbiol*; 36 (1):244–246.
52. Mojica FJ, Juez G, Rodríguez-Valera F (1993). Transcription at different salinities of *Haloferax mediterranei* sequences adjacent to partially modified PstI sites. *Mol Microbiol*; 9 (3):613-621.
53. Montossi F, De Barbieri I, Ciappesoni G, Soares de Lima J, Luzardo S, Brito G, Vignoles C, San Julián R, Silveira C, Mederos A (2011). Merino Superfino y Merino Dohne: Innovaciones tecnológicas para mejorar la competitividad del rubro ovino en sistemas ganaderos extensivos mixtos del Uruguay. Programa Nacional de Carne y Lana. INIA Uruguay, pp 1-24. Disponible en: <http://www.ainfo.inia.uy/digital/bitstream/item/3435/1/Buiatri-2011-Montossi.pdf>. Fecha de consulta: 19 de mayo de 2016.
54. Montossi F, Ganzábal A, De Barbieri I, Nolla M, Luzardo S (2005). La mejora de la eficiencia reproductiva de la majada nacional. Un desafío posible, necesario e impostergable. Seminario de Actualización Técnica, INIA. Reproducción ovina. Recientes avances realizados por el INIA. Treinta y Tres, Tacuarembó, pp. 1-16.
55. Mujica F (2004). Razas ovinas y caprinas en el Instituto de Investigaciones Agropecuarias. *Boletín Inia (Chile)*; 127:33.
56. Mussolino C, Morbitzer R, Lutge F, Dannemann N, Lahaye T, Cathomen T (2011). A novel TALE nuclease scaffold enables high genome editing activity in combination with low toxicity. *Nucleic Acids Res*; 39 (21):9283–9293.
57. Ota S, Hisano Y, Ikawa Y, Kawahara A (2014). Multiple genome modifications by the CRISPR/Cas9 system in zebrafish. *Genes Cells*; 19 (7):555-564.
58. Ousterout DG, Kabadi AM, Thakore PI, Majoros WH, Reddy TE, Gersbach CA (2015). Multiplex CRISPR/Cas9-based genome editing for correction of dystrophin mutations that cause Duchenne muscular dystrophy. *Nat Commun*; 6 (6244):1-13.

59. Park F (2007). Lentiviral vectors: are they the future of animal transgenesis? *Physiol Genomics*; 31 (2):159-73.
60. Pattanayak V, Ramirez CL, Joung JK, Liu DR (2011). Revealing off-target cleavage specificities of zinc-finger nucleases by in vitro selection. *Nat Methods*; 8 (9):765–770.
61. Prather RS, Sims MM, First NL (1989). Nuclear transplantation in early pig embryos. *Biol Reprod*; 41:414-418.
62. Qian L, Tang M, Yang J, Wang Q, Cai C, Jiang S, Li H, Jiang K, Gao P, Ma D, Chen Y, An X, Li K, Cui W (2015). Targeted mutations in myostatin by zinc-finger nucleases result in double-muscled phenotype in Meishan pigs. *Nature*; 5 (14435):1-13.
63. Regalado A (2014). Who Owns the Biggest Biotech Discovery of the Century?. Disponible en: <https://www.technologyreview.com/s/532796/who-owns-the-biggest-biotech-discovery-of-the-century/>. Fecha de consulta: 16 de agosto de 2016.
64. Salgado, C (2003). El Cordero Pesado “tipo SUL”. Un ejemplo de desenvolvimiento integrado en la Producción de carne ovina en el Uruguay. Disponible en: <http://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/item/72177/1/AAC-Sincorte2-Carlos-Salgado.pdf>. Fecha de consulta: 01/09/2016.
65. Song G, Jia M, Chen K, Kong X, Khattak B, Xie C, Li A, Mao L (2015). CRISPR/Cas9: A powerful tool for crop genome editing. *Crop J*; 4:75–82.
66. Tu Z, Yang W, Yan S, Guo X, Li XJ (2015). CRISPR/Cas9: a powerful genetic engineering tool for establishing large animal models of neurodegenerative diseases. *Mol Neurobiol*; 10 (35):1-8.
67. Wall RJ, Powell AM, Paape MJ, Kerr DE, Bannerman DD, Pursel VG, Wells KD, Talbot N, Hawk HW (2005). Genetically enhanced cows resist intramammary *Staphylococcus aureus* infection. *Nat Biotechnol*: 23:445-451.
68. Wang K, Ouyang H, Xie Z, Yao C, Guo N, Li M, Jiao H, Pang D (2015). Efficient Generation of Myostatin Mutations in Pigs Using the CRISPR/Cas9 System. *Sci Rep*; 5 (1):16623.

69. Warwick BL, Berry RO, Horlachwer WR (1934). Results of mating rams to Angora females goats. *Amer. Soc. Anim. Prod*, 27; 225-227.
70. Whitelaw CB, Lilloco SG, King T (2008). Production of trans-genic farm animals by viral vector-mediated gene transfer. *Reprod Domest Anim*; 43 (2):355–358.
71. Wiener P, Woolliams JA, Frank-Lawale A, Ryan M, Richardson RI, Nute GR, Wood JD, Homer D, Williams JL (2009). The effects of a mutation in the myostatin gene on meat and carcass quality. *Meat Sci*; 83:127–134.
72. Willadsen SM (1979). A method for culture of micromanipulated sheep embryos and its use to produce monozygotic twins. *Nature*; 277:298-300.
73. Willadsen SM (1986a). Nuclear transplantation in sheep embryos. *Nature*; 320:63-65.
74. Willadsen SM (1986b). Nuclear transplantation in the bovine embryo: assessment of donor nuclei and recipient oocyte. *Biol Reprod*; 37:859-866.
75. Wilmut I, Schnieke AE, McWihr J, Kind A, Campbell KHS (1997). Viable offspring derived from fetal and adult mammalian cells. *Nature*; 385:810-813.
76. Wright G, Carver A, Cottom D, Reeves D, Scott A, Simons P, Wilmut I, Garner I, Colman A (1991). High level expression of active human alpha-1-antitrypsin in the milk of transgenic sheep. *Biotechnology*; 9:830-4.
77. Yusa K, Rad R, Takeda J, Bradley A (2009). Generation of transgene-free induced pluripotent mouse stem cells by the piggyBactransposon. *Nat Methods*; 6:363-369.
78. Zhang C, Xiao B, Jiang YY, Zhao YH, Li Z, Gao H, Ling Y, Wei J, Li SN, Lu M, Su XZ, Cui HT, Yuan J (2014). Efficient editing of malaria parasite genome using the CRISPR/Cas9 system. *Am Soc for Mic*; 5 (4):1414.

## 10. ANEXOS

Anexo 1. Desarrollo de los corderos a los Días 1, 15, 30 y 60 luego del nacimiento, para los parámetros menos afectados.

		Perímetro torácico (cm)	Diámetro biparietal (mm)	Longitud occipito-nasal (mm)	Longitud cráneo-caudal (cm)
Día 1	Homocigotas	40,9±0,9	43,8±2,1	106,8±2,2	43,8±2,3
	Heterocigotas	38,0±1,9	36,0±3,3	95,8±3,7	38,4±1,7
	Wild Type	39,9±0,9	42,0±1,9	100,8±2,0	41,8±1,3
Día 15	Homocigotas	50,7±2,0	50,0±1,2	115,0±2,5	48,2±1,9
	Heterocigotas	48,2±2,2	52,5±2,1	114,2±2,3	49,5±2,5
	Wild Type	47,1±1,1	50,6±1,7	112,0±2,5	48,4±1,5
Día 30	Homocigotas	52,5±3,0	54,0±1,5	124,6±2,7	55,0±1,0
	Heterocigotas	54,2±2,2	60,0±2,3	123,2±5,0	57,2±2,1
	Wild Type	51,7±1,4	55,3±1,7	119,0±2,5	53,5±1,3
Día 60	Homocigotas	62,3±0,9	64,3±2,8	132,0±1,2	64,0±1,7
	Heterocigotas	60,3±3,5	64,0±4,0	133,6±5,6	62,0±3,1
	Wild Type	59,9±1,8	62,7±1,6	136,7±4,1	63,2±2,0

P=NS.