

## CAPÍTULO 4.11.

# TRANSFERENCIA NUCLEAR DE CÉLULAS SOMÁTICAS EN EL GANADO Y LOS CABALLOS DE CRÍA

### Artículo 4.11.1.

#### **Prefacio**

Después de la primera reunión del Grupo *ad hoc* de la OIE sobre Biotecnología, que se celebró del 3 al 5 de abril del 2006, la Comisión de Normas Biológicas sugirió limitar el mandato “a elaborar recomendaciones sobre los riesgos que entraña para la salud animal la clonación por transferencia nuclear de células somáticas (TNCS) de los animales de cría, que incluyan los criterios para evaluar la salud de los embriones y de los animales derivados de este tipo de clonación.” Las siguientes recomendaciones son un punto de partida para identificar y caracterizar los *riesgos* para la salud animal asociados a la tecnología de clonación por TNCS, y para proporcionar una base para una discusión sobre este tema.

### Artículo 4.11.2.

#### **Visión general**

En la primera reunión del Grupo *ad hoc* sobre Biotecnología se recomendó que el Subgrupo sobre las Biotecnologías Reproductivas Animales elaborase un proyecto de recomendaciones sobre el *análisis del riesgo* basado en el ciclo de la vida, para los animales derivados de la biotecnología. Se propuso como definición del término “Biotecnología Reproductiva Animal” “la generación de animales mediante el uso de tecnologías reproductivas asistidas, que abarcan desde la inseminación artificial hasta las tecnologías que implican un componente *in vitro* importante, como, por ejemplo, la fecundación *in vitro*, la transferencia de embriones, la escisión de embriones y la reproducción asexual, tal como la transferencia nuclear”. Las siguientes recomendaciones se limitan a la TNCS y se basan en un enfoque del *análisis del riesgo* asociado a los animales derivados de la biotecnología clasificados según el enfoque del ciclo de la vida que consiste en: i) embriones, ii) receptores, iii) descendencia, y iv) progenie de los clones animales.

### Artículo 4.11.3.

#### **Ámbito de aplicación**

Estas recomendaciones tratan los aspectos zoonosarios de los animales de cría derivados de algunas biotecnologías reproductivas.

Teniendo en cuenta el mandato de la OIE y la sugerencia de la Comisión de Normas Biológicas, el Grupo *ad hoc* sobre Biotecnología recomienda que se determinen los parámetros del *análisis de los riesgos* para la salud animal y su consecuencia para la seguridad del medio ambiente y de los alimentos y piensos. Estas recomendaciones se centrarán inicialmente en la base científica para los aspectos relativos a la evaluación de los *riesgos*, las medidas de prevención y los consejos para el ganado y los caballos de cría obtenidos mediante clonación por TNCS. Esto, sin perjuicio de añadir ulteriormente cualquier cuestión pertinente. Actualmente, estas recomendaciones incluyen lo siguiente:

- determinación de los *riesgos* sanitarios para los animales y recomendaciones para la *gestión de dichos riesgos* en los embriones, receptores, clones animales y progenie de los clones;

- *riesgos* y medidas de prevención relacionados con la tecnología de clonación por TNCS;
- algunas cuestiones de *bienestar* relacionadas con la sanidad animal.

Al reconocer también que otros organismos o instrumentos han examinado o podrían tratar las siguientes cuestiones, o que la OIE podría examinarlas ulteriormente, el documento no trata:

- la seguridad y los aspectos nutritivos de los alimentos derivados de tecnologías reproductivas asistidas, por ejemplo los transgénicos (tratados por el Códex);
- los *riesgos* relacionados con la puesta en circulación en el medio ambiente de clones animales;
- los *riesgos* relacionados con los animales transgénicos que no han implicado la TNCS u otra tecnología de clonación;
- las biotecnologías animales no reproductivas;
- los *riesgos* relacionados con los animales producidos para el xenotransplante o los donantes de órganos;
- las tecnologías relacionadas con las células madre;
- los *riesgos* relacionados con la salud de los animales acuáticos, incluidos los clones de peces;
- los *riesgos* relacionados con otros *animales* terrestres, tales como los mamíferos y otros *animales silvestres*, incluidos los insectos y las aves.

#### Artículo 4.11.4.

### Antecedentes : Análisis del riesgo – principios generales

1. En general, el *análisis del riesgo* incluye la *identificación de los peligros*, y la *evaluación*, la *gestión* y la *información sobre los riesgos*. La *evaluación del riesgo* es el componente del análisis que estima los *riesgos* asociados a un *peligro* (Capítulo 2.1.). Los reguladores usan de modo rutinario estos principios cuando se toman decisiones sobre la puesta en circulación experimental o comercial. Estos análisis pueden usarse para determinar si los resultados necesitan una gestión o reglamentación. La *gestión del riesgo* es el proceso mediante el que los encargados de dicha *gestión del riesgo* evalúan las acciones o las políticas alternativas en respuesta al(a los) resultado(s) de la *evaluación de los riesgos*, tomando en consideración los diversos factores sociales, económicos y legales que constituyen el medio en que se desarrollan este tipo de actividades.
2. Para las *enfermedades* de los *animales*, en particular las que figuran en la lista del *Código Terrestre*, existe un amplio acuerdo respecto a los *riesgos* probables, que pueden ser cualitativos o cuantitativos (Capítulo 2.1.). En las situaciones hipotéticas de *enfermedad*, es más probable que sólo se necesite una *evaluación cualitativa del riesgo*. Dicha *evaluación cualitativa del riesgo* no necesita modelos matemáticos para llevar a cabo una toma de decisión rutinaria. Las *evaluaciones cuantitativas* o semi-cuantitativas de los *riesgos* atribuyen magnitudes a los *riesgos* en términos numéricos (por ejemplo 1/1.000.000) o descriptivos (elevada/media/baja).
3. En el marco de la clonación de animales, se consideran dos grandes categorías de *evaluaciones de los riesgos*: la *evaluación del riesgo* absoluto y la *evaluación del riesgo* relativo. Las *evaluaciones de los riesgos* absolutos caracterizan el *riesgo* independientemente de un comparador (por ejemplo, la probabilidad de que un animal transmita una determinada *enfermedad* del ganado). Una *evaluación del riesgo* comparativo (o *evaluación del riesgo* relativo) sitúa el *riesgo* en el contexto de un comparador. Por ejemplo, el grado en que un *animal*, producido por una tecnología reproductiva, pueda transmitir una determinada *enfermedad* a otro *animal* de la misma especie, en comparación con el grado en que un *animal* similar, producido por medio de otra tecnología reproductiva, transmita la misma *enfermedad* a otro *animal* de la misma especie.

4. Independientemente de la metodología empleada, la *identificación de los peligros* es una primera etapa en todas las *evaluaciones de los riesgos* basadas en la ciencia. En el marco de la *evaluación de los riesgos* asociados con la clonación de animales (TNCS), empezando con el embrión y siguiendo a través del desarrollo del clon animal y la posterior progenie, es importante que quede claro en esta coyuntura que sólo puede completarse una evaluación semi-cuantitativa del *riesgo* relativo. Una evaluación sistemática, absoluta y cuantitativa de los posibles *riesgos* es difícil, debido al carácter relativamente novedoso de la tecnología y a la variabilidad de los resultados entre laboratorios y especies clonadas. Además, con la tecnología de la TNCS no hay *peligro* introducido con la inserción de nuevos genes (lo que sí podría ocurrir con la transgénesis). Por lo tanto, para analizar qué factores contribuyen a los *riesgos* sanitarios para los animales, debe analizarse la referencia existente.
5. En resumen, deben determinarse los puntos específicos en los que hay que centrar la *evaluación de los riesgos*. Según se ilustra en el diagrama adjunto, se trata de examinar las etapas básicas para crear un embrión, usando terminología corriente, empezando por la selección del donante del ovocito y las células, hasta llegar a la creación de un embrión mediante la metodología de clonación. La segunda fase se centrará en el receptor del clon de embrión y los factores de sanidad y cuidado de los animales. El clon de embrión real que nace como descendencia es la tercera parte del paradigma que necesita recomendaciones claras para la evaluación, y la próxima generación, bien sea la progenie del clon animal (que es el resultado de una reproducción sexual normal) o los animales producidos por reclonación (clones de clones) es la cuarta y última etapa.

#### Artículo 4.11.5.

### Gestión de los riesgos zoonos sanitarios asociados a los embriones

La producción de embriones por técnicas *in vitro* se viene aplicando desde hace muchos años. Aunque las etapas adicionales implicadas en la clonación añadan una nueva dimensión a este procedimiento, muchos de los riesgos asociados con la TNCS se han determinado anteriormente para las tecnologías reproductivas asistidas establecidas (Capítulo 4.8.). Un análisis de la metodología TNCS permite clasificar los detalles de procedimiento en las siguientes categorías:

- a) Ovocitos (obtenidos directamente del matadero, recuperados mediante procedimientos trans-vaginales guiados por ultrasonidos o por procedimientos de laparotomía)

Los ovarios recolectados en un *matadero* serán recolectados, transportados y manipulados según las recomendaciones establecidas en el Capítulo 4.8.

Los principales *riesgos* están asociados con el estado sanitario del animal del que se extraen los ovarios y la calidad de los ovocitos.

- b) Células donantes (células obtenidas de animales elegidos para ser clonados, por biopsia, extracción en el momento del sacrificio o después de la muerte)

Actualmente, no existen *riesgos* nuevos específicos identificados en relación con la TNCS. Se ha sugerido la existencia de un *riesgo* relacionado con la activación de los retrovirus endógenos durante los procedimientos de transferencia de células; sin embargo, esto podría ser más teórico que práctico. En algunos procedimientos experimentales actuales, la célula donante podría tratarse con productos químicos para modificar su composición, por ejemplo inhibidores del ciclo celular o modificadores de la cromatina.

- c) Cultivo *in vitro* de embriones reconstruidos (procedimiento usado para fusionar el material del donante y del receptor, y para cultivar el embrión reconstruido)
- d) Riesgos asociados con el método empleado para fusionar las células donantes con los ovocitos receptores enucleados y con las condiciones de cultivo.

Además, el veterinario deberá asegurarse de que la preñez del clon es compatible con la raza, anatomía y fisiología de la madre de alquiler.

### 1. Ovocitos

El laboratorio o el productor deberá establecer un historial detallado de los ovarios: su origen, salud del animal del que se obtuvieron, detalles de cualquier lesión sistémica del animal y datos adecuados del *rebaño*. Esto es particularmente útil cuando el hecho de unir varios ovarios puede causar contaminación cruzada del tejido ovárico.

Los fluidos foliculares pueden contener varios agentes infecciosos como, por ejemplo, el virus de la diarrea viral bovina, y puede contaminar la mezcla de fluido folicular procedente de diferentes animales sanos. Además, la técnica para recuperar los ovocitos, tal como la aspiración, o el corte de los folículos ováricos, determina el nivel de contaminación de la sangre o de material externo. Para cada lote reunido, deberá usarse una muestra representativa para demostrar la ausencia de material biológico infeccioso.

Los ovocitos se maduran como complejos cumulus ovocito (COCs) y luego se maduran, en la mayoría de los casos, en el medio de cultivo/maduración. Deberá tenerse cuidado y esforzarse por seleccionar y madurar cuidadosamente los ovocitos de los grupos que son buenos desde el punto de vista morfológico; también deberá analizarse la calidad de los medios usados. Deberá evitarse usar sueros o componentes protéicos provenientes de una fuente no definida o que no se haya analizado. Deberá fomentarse la incorporación de antibióticos adecuados y seguros en los medios de cultivo para luchar contra las bacterias oportunistas.

Es de suma importancia usar procedimientos sanitarios y de *desinfección* adecuados, y esto deberá subrayarse en todos los laboratorios de fecundación *in vitro* (FIV). Deberá fomentarse la manipulación adecuada y el respeto de los protocolos sanitarios durante la maduración y el posterior cultivo de los embriones.

### 2. Células donantes

Con el fin de minimizar los *riesgos*:

- Las células donantes deberán recuperarse correctamente del animal y cultivarse en condiciones sanitarias adecuadas, mediante el uso de buenas prácticas de laboratorio.
- Cuando proceda, el paso de las células usadas para el procedimiento de clonación deberá documentarse y, en diferentes etapas, podría justificarse la realización de un muestreo para examinar el componente cromosómico de las líneas celulares. De ser posible, deberán estar en funcionamiento procedimientos para el muestreo regular de las células, a fin de examinar las características morfológicas y demás.
- Las líneas celulares maestras (que se usarán para la clonación en una etapa posterior) deberán almacenarse en condiciones que sean óptimas para mantener la viabilidad. Deberá determinarse si están libres de agentes externos mediante análisis para detectar la presencia de bacterias, hongos, micoplasmas o virus, usando pruebas apropiadas (Manual de la Sociedad Internacional de Transferencia de Embriones).

### 3. Procedimientos de clonación/reconstrucción

El procedimiento de clonación que emplea el uso de productos químicos u otros reactivos deberá evaluarse con cuidado, en términos de calidad de los embriones y de eficacia total.

Durante la fusión del material del receptor y del donante por medios químicos o físicos se deberá tener cuidado y asegurar un control. La optimización del procedimiento basada en los protocolos de laboratorio o en informes publicados deberá determinarse para evitar muertes embrionarias precoces.

Si se usa el co-cultivo de la célula para el procedimiento de cultivo después de la reconstrucción de los embriones, deberán controlarse las células del co-cultivo. Podrá analizarse una muestra de cada lote para detectar la presencia de componentes bacterianos, micoplásmicos, virales o de hongos.

Los embriones deberán cultivarse y recolectarse durante un tiempo y hasta una etapa apropiados, antes de transferirlos o criopreservarlos para un uso ulterior. Deberán seguirse los procedimientos apropiados basados en las normas internacionales (Códigos de práctica de la IETS) para lavar y preservar los embriones.

Se deberá tener cuidado al clasificar los embriones antes de la transferencia (Capítulos 4.7. y 4.8.).

Artículo 4.11.6.

### Gestión de los riesgos zoonosarios relacionados con los receptores (madres de alquiler)

#### 1. Riesgos para la salud de las madres de alquiler

Actualmente, cuando se compara con los embriones producidos *in vitro*, la TNCS tiene una tasa superior de fracaso de la preñez y, en algunas especies, de anomalías placentarias. La pérdida debida a defectos del embrión o al fracaso del implante en el útero de la madre de alquiler no plantea un peligro para la madre. La madre de alquiler simplemente reabsorbe todos los tejidos embrionarios y vuelve a sus ciclos. Los abortos espontáneos a mitad o final de la preñez pueden ser peligrosos para las madres de alquiler, si éstas son incapaces de expulsar el feto y las membranas asociadas. La mayoría de los abortos en las preñeces por servicio natural e inseminación artificial (IA) en los bovinos siguen sin diagnosticarse, debido al coste del trabajo de laboratorio y al bajo margen de beneficios tanto en la industria de carne vacuna como en la lechera. Los productores y veterinarios se preocupan cuando la tasa de abortos es superior al 3–5% en un rebaño. El mismo posible impacto de las influencias externas deberá tenerse en cuenta al evaluar las preñeces por TNCS y otras tecnologías reproductivas. La *enfermedad*, la falta de nutrición y las condiciones medioambientales difíciles son factores de estrés que interfieren con la fertilidad de los animales y la supervivencia de los embriones. En estas circunstancias, el *riesgo* para la preñez está directamente relacionado con los factores de estrés y no con la tecnología empleada.

Hasta la fecha, se ha observado un efecto específico de la especie. Las anomalías de los clones podrían deberse a una reprogramación incompleta del núcleo del donante. La reprogramación epigenética ocurre en diferentes momentos en los embriones de diferentes especies. Muchas de las anomalías detectadas en las preñeces de los bovinos y las ovejas no se han observado en cabras o en suidos con clones TNCS. La cantidad de manipulación *in vitro* de un embrión está inversamente relacionada con la probabilidad de que la preñez tenga resultados exitosos. Esto se ha observado tanto en los embriones TNCS como en los embriones fecundados producidos *in vitro*. A diferencia de otras formas de tecnologías reproductivas, las pérdidas de preñeces con TNCS aparecen en todas las etapas de la gestación en los bovinos. Se han perdido preñeces de clones durante el segundo y tercer trimestre, y estas pérdidas se han acompañado de informes de hidropesía, aumento de volumen del ombligo, y placentación anormal.

#### 2. Riesgos que representa la madre de alquiler para la salud de los embriones clonados

No se han identificado nuevos *riesgos zoonosarios* para el feto de clon en desarrollo procedentes de la madre de alquiler en comparación con las preñeces convencionales. Estas últimas incluyen las *enfermedades* transmitidas verticalmente y las anomalías debidas a un estrés metabólico o fisiológico.

Con respecto a los *riesgos zoonosarios* asociados con la madre de alquiler, es difícil documentar la frecuencia relativa de las pérdidas en las etapas precoces de los embriones TNCS en comparación con las pérdidas en las etapas precoces de otras preñeces, ya que estos abortos no suelen diagnosticarse con otras tecnologías reproductivas. Además, los factores de estrés externos repercutirán de modo similar en las preñeces TNCS.

Los veterinarios deberán controlar el progreso de la preñez, dado que las anomalías de gestación comunes observadas con otras tecnologías reproductivas asistidas podrían manifestarse y diagnosticarse durante el examen físico. Una base de datos de los problemas que se dan comúnmente en las preñeces de clones podría ser útil si se pusiera a disposición de los expertos en sanidad animal.

- Deberá tenerse cuidado de evaluar la salud general de la madre receptora antes de la selección para llevar embriones clones. El estado general de salud de la receptora deberá determinarse en términos de ausencia de *infección y enfermedad*, vacunación y seguimiento adecuados y, si procede, pruebas de preñeces anteriores sin incidentes, ausencia de problemas de parto y recuperación post-preñez apropiada.
  - La pérdida de la preñez es mayor con los embriones TNCS antes de 60 días de gestación en los bovinos. Esto es similar a lo observado con otras tecnologías reproductivas. Sin embargo, en los clones, muchas pérdidas de la preñez durante este período de formación placentaria (entre 45 y 60 días) sugieren que la muerte embrionaria podría ser consecuencia de una placentación defectuosa. Una placentación anormal podría conducir a una acumulación de residuos en el feto y las membranas asociadas, o a una transferencia insuficiente de las sustancias nutritivas y del oxígeno de la madre al feto. Se deberá velar por controlar a la madre receptora durante la preñez. Una vez que la preñez esté establecida y confirmada, sería deseable llevar a cabo evaluaciones veterinarias regulares y un monitoreo del estado sanitario del animal hasta el nacimiento de la descendencia.
  - Para asegurarse de que el receptor está preñado y garantizar un monitoreo de su salud durante el primer trimestre, es útil realizar evaluaciones ultrasonográficas, determinar los perfiles hormonales y evaluar los parámetros fisiológicos generales. Basándose en estos perfiles, deberá prestarse la atención adecuada para ayudar al establecimiento correcto de la preñez, proporcionando condiciones de cría y una nutrición apropiadas.
  - Los animales deberán observarse minuciosamente para detectar los signos de parto cuando se acerque el momento del nacimiento. En algunas especies, uno de los problemas más comunes es la inercia uterina y la ausencia de contracciones. La ausencia de contracciones puede provocar preñeces prolongadas, con las correspondientes secuelas, que pueden requerir ayuda durante los partos.
  - Para un animal próximo al término de la preñez, deberá ser factible la eventualidad de intervención quirúrgica, y deberá tomarse la decisión de recurrir a ella si la situación lo justifica. Habrá que emplear los procedimientos apropiados para precisar la manipulación adecuada de la descendencia y de la madre de alquiler.
  - Pueden plantearse preocupaciones sanitarias a raíz de las intervenciones quirúrgicas, de una tracción excesiva, u otras complicaciones, tales como la retención de membranas fetales. En estos casos podría ser necesario un cuidado posparto.
3. Gestión de los riesgos para la salud de los clones animales

Los problemas de salud de los diferentes clones pueden observarse *in utero* y en el período posparto. Parecen ser los mismos que los observados con otras tecnologías reproductivas asistidas, pero podrían ser más frecuentes en los clones. Es importante determinar si las anomalías son de origen genético o epigenético. El síndrome de la cría grande (LOS= siglas en inglés de “large offspring syndrome”), probablemente más relacionado con las anomalías placentarias que con anomalías fetales, se observan particularmente en las ovejas y los bovinos clonados después de manipulaciones *in vitro* que no reunían condiciones óptimas.

- Las prácticas de cría apropiadas son importantes para la salud de los clones animales. Se deberá velar por proporcionar calostro y un ambiente limpio e higiénico, y deberá establecerse una vigilancia durante las primeras semanas después del nacimiento.
- Los clones animales deberán examinarse de manera rutinaria para detectar la eventual presencia de las anomalías fenotípicas más comunes, como, por ejemplo, la atresia anal, la hernia umbilical, las contracciones del músculo flexor, la insuficiencia respiratoria o cardíaca y la imposibilidad de mamar. Esto permitirá el tratamiento y cuidado apropiados del recién nacido, y aumentará la supervivencia del animal joven.

- Para consolidar los conocimientos actuales respecto al estado de salud de los clones animales, deberá efectuarse un examen veterinario completo para controlar el progreso del clon, ya que se han declarado muertes inexplicadas o debidas a complicaciones sistémicas. Se alienta a seguir el perfil sanitario de los animales hasta, por lo menos, la etapa de madurez reproductiva, y a registrar la capacidad de reproducción (índice de fertilidad).
- Las preocupaciones relativas al bienestar animal, que van del LOS a las anomalías serias, se destacan en los debates sobre la tecnología de clonación. Deberán generarse datos procedentes de una investigación apropiada y examinados por pares. Los clones animales deberán someterse a evaluaciones básicas del *bienestar*, específicas de las diferentes especies. Si se detectan preocupaciones relativas al *bienestar* en el examen inicial, se realizará una caracterización más exhaustiva de ese fenotipo para documentar las preocupaciones relativas al bienestar animal.
- Para tratar y validar el potencial genómico de los clones animales, es indispensable realizar un monitoreo apropiado de la población animal en diferentes etapas de la vida, desde el nacimiento hasta la pubertad, y documentar dicho monitoreo.

#### 4. Gestión de los riesgos sanitarios relacionados con la progenie de clones reproducida sexualmente

Actualmente no existen pruebas de que exista un riesgo sanitario superior si se usa la reproducción sexual para obtener progenie. Algunos datos indican que los errores de reprogramación durante el proceso de clonación podrían ser corregidos durante el apareamiento natural y el proceso de reproducción.

- a) La caracterización del perfil sanitario, incluidos el estado sanitario y datos sobre el *bienestar animal*, consolidarían los conocimientos sobre la progenie reproducida sexualmente.
- b) El monitoreo del rendimiento reproductor de la progenie de clones reproducida sexualmente sería útil para evaluar su capacidad reproductora en comparación con sus homólogos convencionales.

#### 5. Gestión de los riesgos sanitarios asociados a la reclonación/clones de clones

La información sobre la reclonación está sólo empezando a aparecer. Por lo tanto, es necesario seguir el siguiente enfoque:

- a) El perfil sanitario (estado sanitario y datos sobre el *bienestar de los animales*) deberá caracterizarse para consolidar los conocimientos.
- b) El rendimiento reproductor de los clones de clones deberá ser controlado, para evaluar la capacidad para reproducirse de estos animales, en comparación con sus homólogos convencionales.

Artículo 4.11.7.

### **Examen**

El propósito de estas recomendaciones es proporcionar una base científica y recomendaciones respecto a los *riesgos* para la salud y el *bienestar de los animales* implicados en la clonación por TNCS en comparación con otras tecnologías reproductivas asistidas. Estas recomendaciones se centrarán inicialmente en la base científica de los aspectos relativos a la *evaluación de los riesgos*, de las medidas de prevención y de los consejos para el ganado y los caballos de cría obtenidos mediante clonación por TNCS, y deberá revisarse a la luz de la nueva información científica.

