



Resultados y Lecciones en Creación de un Banco de Recursos Genéticos

Proyecto de Innovación en
Región del Biobío



Fundación para la Innovación Agraria
MINISTERIO DE AGRICULTURA



Resultados y Lecciones en Creación de un Banco de Recursos Genéticos Criopreservados



**Proyecto de Innovación en
Región del Biobío**

Valorización a julio de 2010



SERIE **EXPERIENCIAS DE INNOVACIÓN PARA EL EMPRENDIMIENTO AGRARIO**

Agradecimientos

En la realización de este trabajo agradecemos sinceramente la colaboración de los productores, técnicos y profesionales vinculados al proyecto de Conservación de Genofondos de Especies Animales Silvestres en Peligro de Extinción, a los participantes en el Taller Bancos de Recursos Genéticos Aplicados a la Conservación, y en especial a los doctores Fidel Ovidio Castro y Lleretny Rodríguez de la Universidad de Concepción, por su valioso aporte en el análisis de esta experiencia.

**Resultados y Lecciones en
Creación de un Banco de Recursos Genéticos Criopreservados**
Proyecto de Innovación en la Región del Biobío

Serie **Experiencias de Innovación para el Emprendimiento Agrario**
FUNDACIÓN PARA LA INNOVACIÓN AGRARIA

Registro de Propiedad Intelectual N° 205.016
ISBN N° 978-956-328-095-1

ELABORACIÓN TÉCNICA DEL DOCUMENTO

Francoise Barbé, Gabriela Casanova y Rodrigo Navarro - BTA Consultores S.A.

REVISIÓN DEL DOCUMENTO Y APORTES TÉCNICOS

M. Francisca Fresno R. - Fundación para la Innovación Agraria (FIA)

EDICIÓN DE TEXTOS

Norberto Parra

DISEÑO GRÁFICO

Guillermo Feuerhake

IMPRESIÓN

Ograma Ltda.

Se autoriza la reproducción parcial de la información aquí contenida, siempre y cuando se cite esta publicación como fuente.

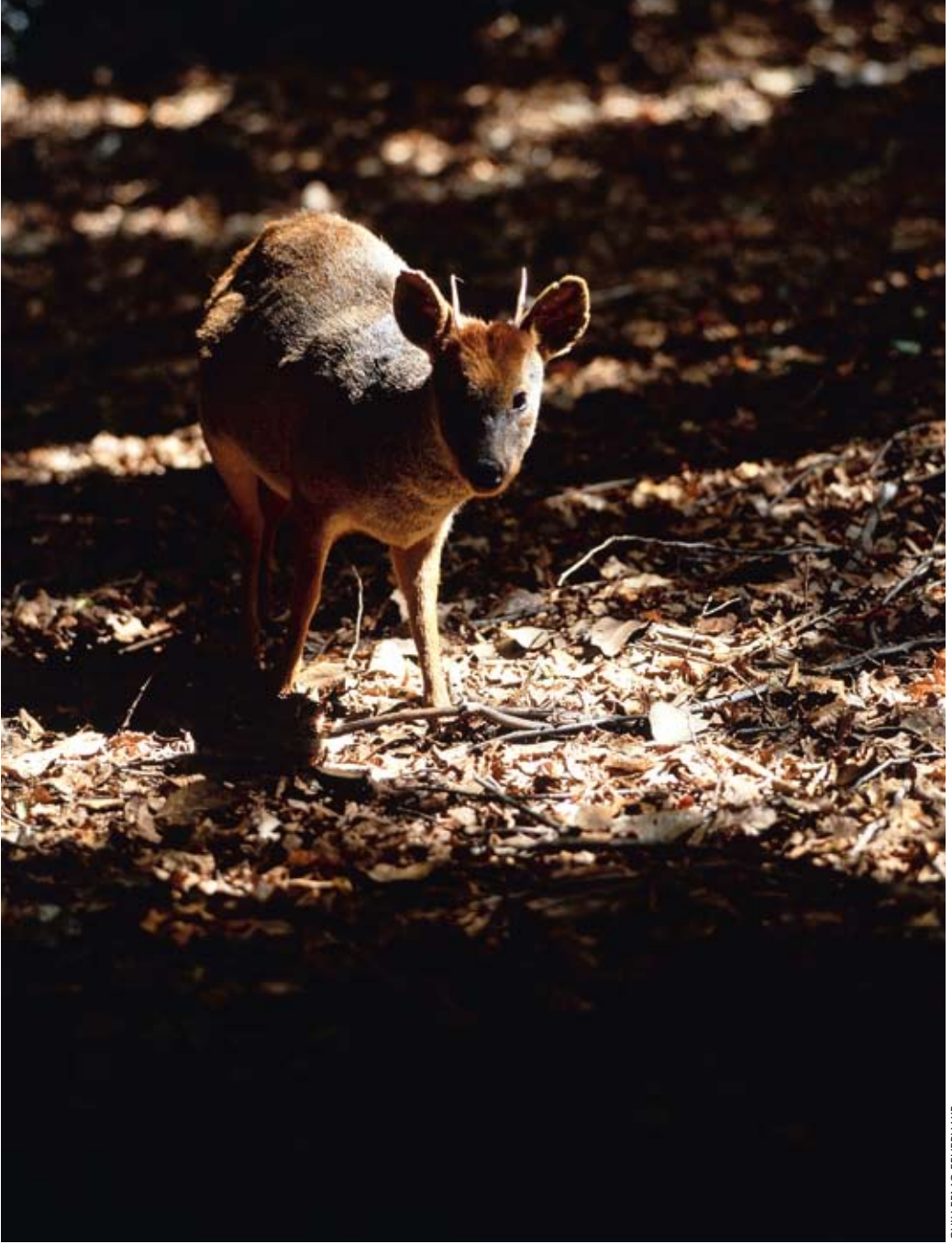
Contenidos

Sección 1. Resultados y lecciones aprendidas	5
1. Antecedentes	5
2. Base conceptual de la tecnología.....	6
3. El valor de la herramienta desarrollada	8
4. La innovación tecnológica	10
5. La conveniencia económica para el productor	11
6. Claves de viabilidad de la innovación	13
7. Asuntos por resolver.....	13
8. Situación actual.....	14

Sección 2. El proyecto precursor	17
1. Entorno.....	17
2. El proyecto.....	18
2.1 Aspectos metodológicos	18
2.2 Resultados	23
3. Desarrollos posteriores	24

Sección 3. El valor del proyecto	27
---	----

ANEXOS	
1. Características de las especies incluidas en el BRG de la Universidad de Concepción	31
2. Resumen de la existencia en el BRG de líneas celulares para cada especie....	33
3. Publicaciones científicas en revistas ISI.....	34
4. Literatura consultada.....	35
5. Documentación disponible y contactos.....	36



CUILLERMO FEUERHAKE

SECCIÓN 1

Resultados y lecciones aprendidas

El presente libro tiene el propósito de compartir con los actores del sector los resultados, experiencias y lecciones aprendidas sobre la creación de un banco de recursos genéticos criopreservados para la conservación y caracterización del patrimonio genético nacional, a partir de un proyecto financiado por la Fundación para la Innovación Agraria (FIA).

Se espera que esta información, que se ha sistematizado en la forma de una innovación aprendida,¹ aporte a los interesados una nueva herramienta tecnológica que les permita adoptar decisiones y, potencialmente, desarrollar iniciativas relacionadas con este tema.

► 1. Antecedentes

El análisis y los resultados que se presentan en este documento han sido desarrollados sobre la base de las experiencias y lecciones aprendidas de la ejecución del proyecto financiado por FIA (proyecto precursor),² denominado “Conservación de genofondos de especies animales silvestres nativas y endémicas en peligro de extinción”. Este proyecto fue desarrollado por la Facultad de Ciencias Veterinarias de la Universidad de Concepción, Campus Chillán, entre diciembre de 2005 y marzo de 2009.

La herramienta tecnológica desarrollada consiste en la creación de un Banco de Recursos Genéticos (BRG) criopreservados como una forma de salvaguardar el material genético animal mediante un reservorio de muestras colectadas sistemáticamente, ya sean gametos, productos sanguíneos, tejidos o DNA con fines de conservación. En este proyecto se hizo a través de cultivos celulares obtenidos a partir de biopsias de oreja o de tejido muscular. El objetivo fundamental del BRG es proveer a la comunidad científica nacional e internacional de material genético vivo, en forma de cultivos celu-

¹ **“Innovación aprendida”**: análisis de los resultados de proyectos orientados a generar un nuevo servicio o herramienta tecnológica. Este análisis incorpora la información validada del proyecto precursor, las lecciones aprendidas durante su desarrollo, los aspectos que quedan por resolver y una evaluación de los beneficios económicos de su utilización en el sector.

² **“Proyecto precursor”**: proyecto de innovación financiado e impulsado por FIA, cuyos resultados fueron evaluados a través de la metodología de valorización de resultados desarrollada por la Fundación, análisis que permite configurar el modelo o innovación aprendida que se da a conocer en el presente documento. Los antecedentes del proyecto precursor se detallan en la sección 2 de este documento.

lares congelados, a partir de animales endémicos de Chile y que además se encuentran en distintos niveles de amenaza de extinción.

Mediante la combinación de los avances en las técnicas de cultivo celular, biotecnología reproductiva e ingeniería genética y biología molecular, se pueden desarrollar programas multidisciplinarios que permitan perpetuar el potencial genético nativo de un país o de distintas zonas geográficas para las futuras generaciones, así como la conservación y el aseguramiento de las mejores razas de la agricultura doméstica con vistas a su empleo comercial.

► 2. Base conceptual de la tecnología

Desde hace años, una de las estrategias esenciales para la salvaguarda y protección de distintas especies ha sido la creación de Bancos de Recursos Genéticos (BRG). Los BRG pueden mitigar los efectos de la presión selectiva artificialmente ejercida por el hombre sobre los animales, la deriva génica y la consanguinidad, mediante la oferta de nuevas fuentes de germoplasma, es decir, de nuevos genes que pueden ser introducidos en poblaciones pequeñas o fragmentadas (Wildt *et al*, 1997).

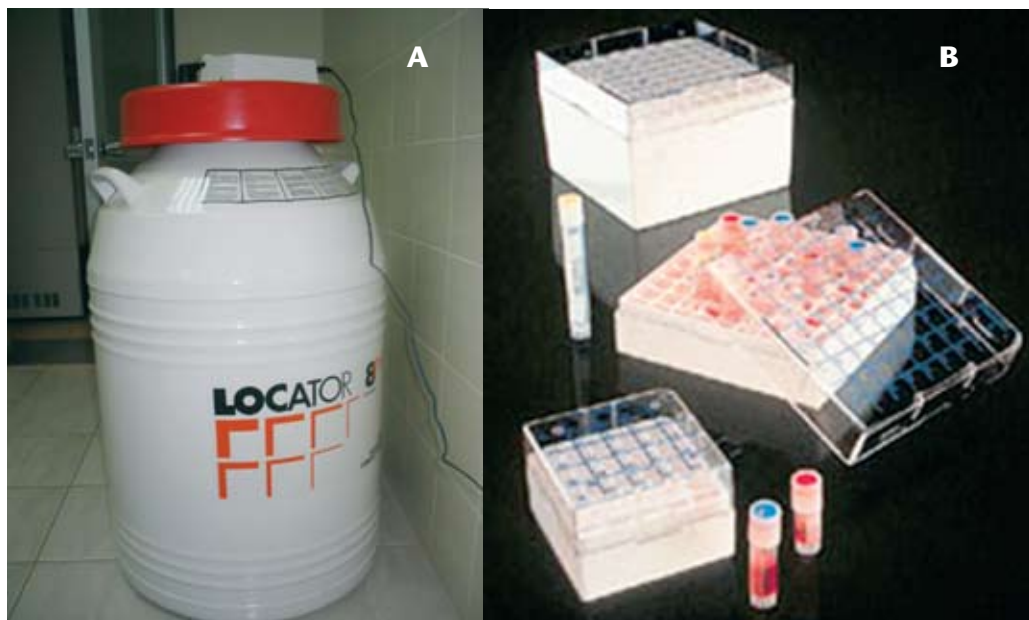
A nivel internacional, en algunos Estados y pactos regionales se ha creado clara conciencia de la importancia de la conservación de las especies en peligro de extinción y se han tomado importantes iniciativas destinadas a salvaguardar el patrimonio genético. Este tipo de actividad es impensable sin la participación decisiva de fondos del Estado y del trazado de políticas coherentes en materia de conservación. Uno de los elementos críticos lo constituye la creación de bancos de material biológico criopreservado. Numerosos países iniciaron colecciones congeladas de múltiples especies, tanto de importancia económica como zoológica (Castro y Rodríguez, 2009).

Destacan los esfuerzos de la Unión Europea, Australia y Estados Unidos. El *European Regional Focal Point* (ERFP) es reconocido oficialmente por el programa de la FAO como el coordinador de una red global de recursos genéticos animales. Entre sus actividades destaca la creación de las guías para la criopreservación de recursos genéticos animales en Europa y actúa como entidad coordinadora de los numerosos BRG que existen en los países miembros de la Unión Europea. La crioconservación es entendida en la Unión Europea como herramienta fundamental para conservar la variabilidad genética de especies de uso ganadero y para el uso en programas de conservación de especies en peligro de extinción. En otros países, como Australia y Estados Unidos, también existen BRG asociados a zoológicos, museos o centros de investigaciones y universidades.

Chile ratificó en 1994 el Convenio sobre la Diversidad Biológica (CDB) adoptado y abierto a la firma en Río de Janeiro en 1992. En Chile el CDB tiene rango de Ley de la República desde 1998. Entre los objetivos de ese convenio, destacan la conservación de la diversidad biológica, la utilización sostenible de sus componentes y la participación justa y equitativa en los beneficios que se deriven de la utilización de los recursos genéticos. En su artículo 9, se refiere a la implementación de medidas para la conservación *ex situ* de componentes de la diversidad biológica, sugiriendo la creación y mantenimiento de instalaciones para la conservación *ex situ* y la investigación en plantas, animales y microorganismos. A pesar de la voluntad política y el marco legal para la implementación de un BRG en Chile, estos no existían hasta ahora sino en forma de reservorios de distinta magnitud de especímenes biológicos, principalmente en instituciones universitarias.

Los BRG tienen forma física en un tanque de nitrógeno líquido equipado para recibir los viales³ que contienen las células congeladas y conservarlas a -196°C por tiempo indefinido. Los termos o tanques de nitrógeno deben ser de proveedores fiables y con controles de calidad establecidos. Se requiere de un tanque de almacenamiento para albergar el BRG, el cual debe ser usado solamente para ese propósito y abrirse el mínimo de veces y por el menor tiempo necesario. Debe existir un suministro confiable y constante de nitrógeno líquido e, idealmente, debe contar con un sistema de alarma que indique los niveles de nitrógeno líquido.

Para guardar los viales en el interior del tanque, se prefieren aquellos contenedores que puedan guardar cajas en gavetas o cajones. Cada caja posee una tapa cuadrículada en la cual se muestran coordenadas. Se debe anotar meticulosamente en qué receptáculo y en qué posición se encuentra cada muestra.



Componentes estructurales de un BRG. Tanque de almacenamiento con sistema de alarma para el nivel de nitrógeno líquido (A); cajas con cuadrículas para guardar viales en nitrógeno líquido (B).

Históricamente, la colecta inicial y preservación de recursos genéticos se limitaba a la colecta de semen a partir de animales vivos. No obstante, con el desarrollo de las técnicas de reproducción asistida, ahora es posible la producción de crías viables a partir de los testículos o los ovarios de animales fallecidos y a partir de los cuales se logra obtener el tejido u órgano en un plazo razonablemente corto después de la muerte. Avances más recientes, permiten incluso el uso de muestras de tejidos con fines de criopreservación y posterior recuperación mediante transferencia nuclear somática o clonación.

Base de Datos. El valor real de todo material biológico único o exclusivo de un animal o planta viva, radica no sólo en las muestras colectadas, sino en la calidad y confiabilidad de los datos recopilados. Particularmente, son importantes los datos sobre el tipo de espécimen, estatus zoo-sanitario, calidad de la muestra, procedencia, *pedigree*, forma de congelación, abundancia, etc.

³ Frasco pequeño, o ampolla, destinado a contener distintos tipos de sustancias.

Estrategia general para la conservación del BRG

El plan de acción es un documento que contiene información explícita sobre un BRG, lo que incluye información relevante de las especies, número de animales en vida salvaje y en cautiverio y la accesibilidad de estos para donar material biológico. De modo estratégico, cada banco debe existir en triplicado. Un primer banco, intocable o perpetuo, debe garantizar la conservación a largo plazo de las muestras de valor. Este banco sólo podrá utilizarse cuando la especie se encuentre en evidente peligro de desaparecer o en caso de contingencia mayor, como puede ser la destrucción de los otros bancos, y se conservarán sus células en pasajes o subcultivos lo más cercanos posible al tejido original o “pase cero”. El segundo banco o banco de rescate, permite las labores de rutina con animales vivos, tanto *in situ* como *ex situ*, y un tercer banco que contenga material biológico viable disponible para investigaciones, es decir, para propósitos no relacionados con la propagación.



► 3. El valor de la herramienta desarrollada

Usualmente el concepto de BRG ha estado asociado a la conservación de semen y embriones, pero la colecta de sangre y de tejidos es tan importante como la de material reproductivo. Estos materiales tienen una amplia gama de usos en programas de conservación, tales como estudios de variación genética, filogenia, paternidad y de los procesos que subyacen la diversidad, como el flujo de genes, la selección y el apareo, lo que permite instaurar manejos específicos para preservar en el tiempo distintas especies, tanto de interés zoológico como productivo.

La salvaguarda de material genético animal conlleva la aplicación de otras biotecnologías relacionadas, tales como la reproducción asistida, incluyendo la clonación somática, la fecundación *in vitro*, la inseminación artificial, la transferencia de embriones, etc., lo que puede aportar significantes beneficios para la conservación y futuro uso comercial de distintas especies animales.

El hecho que la transferencia nuclear somática o clonación somática no constituya aún una tecnología que ofrezca resultados repetibles de modo eficiente, no implica que esos argumentos sean



MAYILDA SEK

empleados en contra del establecimiento de colecciones de células y tejidos de animales en peligro de extinción, ya que indudablemente las tecnologías actuales se volverán eficientes y podrán ser usadas en el rescate de especies.

Hoy se cuenta con la capacidad tecnológica para preservar tejidos y células, mañana, es casi seguro que esta se complementará con herramientas que permitan exitosamente crear nuevas descendencias a partir de estos recursos. Incluso, en el peor de los casos, la pérdida total de una especie, será posible volver a crearla con el uso de especies relacionadas que pudieran actuar como incubadoras.

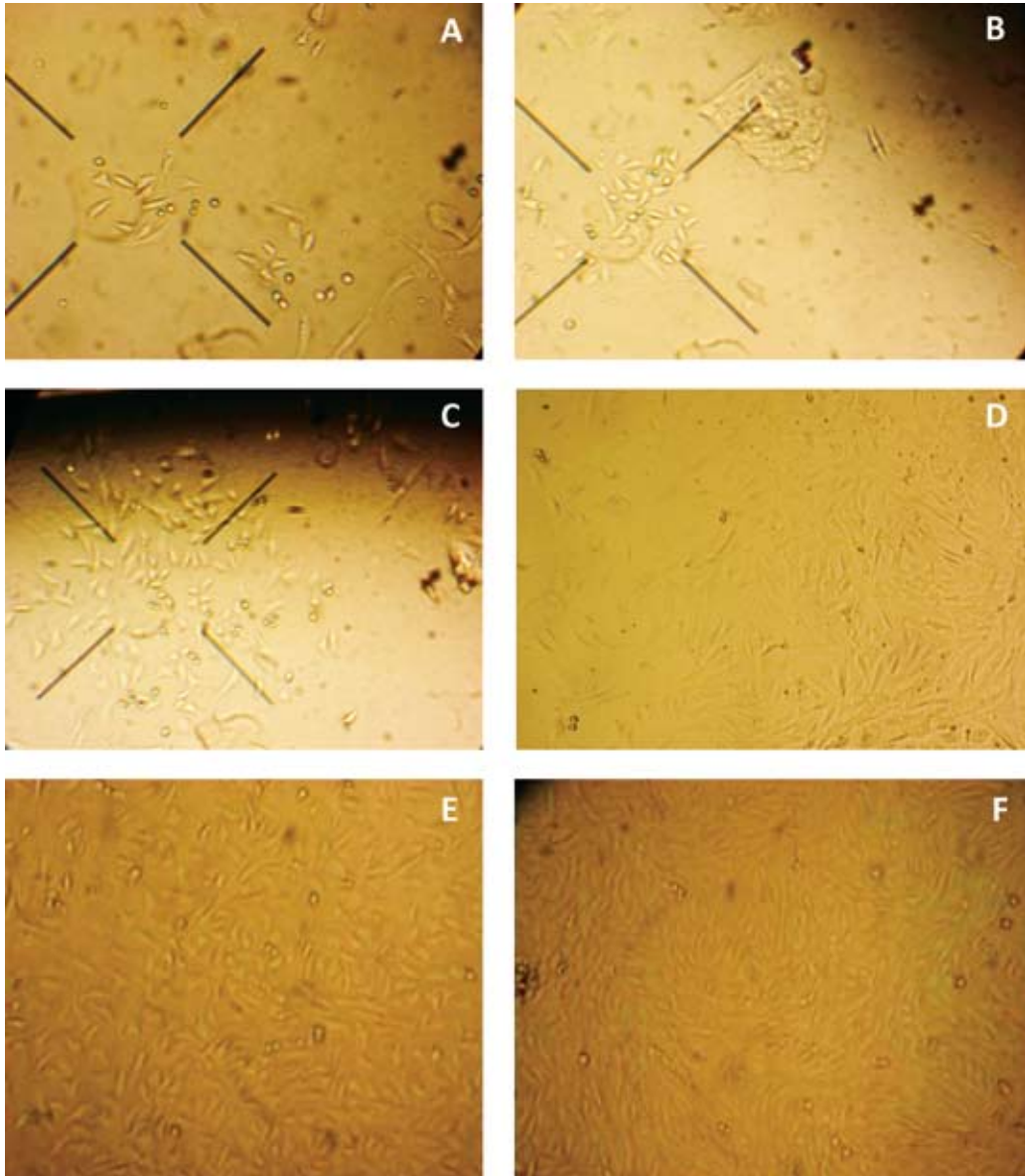
Estos avances tecnológicos aplican tanto a la conservación de especies animales silvestres como a la de reproductores de alto valor genético y comercial, por lo que la creación y mantención de un BRG y sus posibles aplicaciones son de interés para el sector público y el privado.

Por otra parte, si bien el hecho de crear un banco de recursos genéticos no impacta positivamente de modo directo sobre el medio ambiente a mediano o corto plazos, sí lo hace positivamente en el largo plazo, ya que preserva para futuras generaciones la diversidad biológica de Chile y facilita el rescate de especies al borde de la desaparición por efectos adversos sobre el medio ambiente ejercidos por el hombre. De este modo, un BRG actúa contrarrestando los efectos antrópicos sobre el medio ambiente, generando una modesta pero palpable contribución a la restauración de ecosistemas altamente dañados.

► 4. La innovación tecnológica

La creación de un BRG por parte del proyecto precursor no es una herramienta nueva en sí, puesto que ya existen numerosos alrededor del mundo. Sin embargo, es el primero en Chile y el segundo en Latinoamérica, después de Argentina, lo que posiciona a Chile muy favorablemente dentro de la comunidad conservacionista.

La *American Tissue Culture Collection* (ATCC) es un modelo a seguir para la conservación segura *ex situ* de una enorme gama de diferentes organismos. Sus muestras son guardadas en 57 reservorios de nitrógeno líquido, con una capacidad de más de 2 millones de viales cada uno, 37 refrigera-



Cultivos celulares primarios de huemul en diferentes estados de confluencia. Células de aproximadamente 24 horas de cultivo (A); cultivo completamente confluyente (F). El tiempo para llenar la superficie de cultivo varía según especie y en promedio toma de 10 a 15 días.

dores de ultra baja temperatura que guardan más de 150 mil viales a -80°C o en cámaras frías de 900 pies de área a 4°C. Todas las unidades son monitoreadas de modo electrónico continuamente para detectar variaciones de temperatura. Todo el funcionamiento del BRG tiene que cumplir con los más altos estándares de calidad y están duplicados en dos lugares diferentes para minimizar las pérdidas en casos de catástrofe. Además, implementan de modo obligatorio programas de cuarentena para evitar la introducción de enfermedades e introducen nuevos métodos de diagnóstico molecular para prevenir las enfermedades contagiosas a tejido animal o humano.

La creación de un BRG dota al país con un conjunto de herramientas modernas capaces de hacer frente a retos impensables hasta hace algunos años en materia de conservación de la diversidad biológica. Además, instaura el inicio de una nueva forma de conservación de especies animales en nuestro país, de manera *ex situ*, y marca la pauta para nuevos proyectos enfocados en las biotecnologías asociadas al BRG, como son la clonación somática heteroespecífica.

► 5. La conveniencia económica para el productor

El impacto económico de la conservación de especies es difícil de medir. Para ello se utilizan tres criterios fundamentales: valores de no consumo, valor de opción y valor de existencia (Daily, 1997).

Los múltiples beneficios que proveen los ecosistemas y la diversidad biológica no constituyen bienes o servicios en el sentido económico clásico, por lo tanto no aparecen en las estadísticas de la economía nacional. Sin embargo, la economía en muchos casos depende de estos “servicios ecológicos”. Por ejemplo, los bosques montañosos previenen la erosión del suelo y las inundaciones que podrían dañar asentamientos humanos y tierras de cultivo que se encuentren en zonas bajas y los estuarios costeros, sin embargo, no se valoran estos daños en los cálculos económicos de rentabilidad de un predio. Debido a esto, grupos de ecólogos, economistas y otros profesionales han intentado estimaciones en términos monetarios de estos servicios claves, tanto para el bienestar social como para la protección del ambiente.

Los servicios ambientales que no derivan del consumo de productos se denominan también valores de no consumo. Por otra parte, algunas especies que no tienen un valor económico o un beneficio evidente en el presente podrían tenerlo en el futuro. El valor de opción refleja el deseo de la sociedad o los individuos de conservar una especie por su eventual beneficio futuro. Y, aunque a la mayoría de las especies no se les ha asignado un valor económico directo o indirecto, muchas personas desean fervientemente que estas continúen existiendo, independientemente de su uso. A este aprecio o respeto por la vida de otros seres vivos se le denomina valor de existencia. Este valor adquiere una expresión económica a través de las donaciones realizadas por personas o instituciones para contribuir a la protección de especies particulares.

El almacenamiento congelado de material genético alcanzado en un BRG, provee las bases para una política de seguro para futuras pérdidas de la biodiversidad o la posible extinción de una especie determinada. Desde el punto de vista estrictamente económico, lo ideal sería poder asignarle algún valor de seguro a la preservación de las especies que se pretenden proteger, sin embargo, dada la diversidad de animales que se pretende cuidar y su escaso valor comercial, esta tarea se convierte en algo menos que imposible y por ello es el impacto del valor de existencia o social el que debe primar.

Derivado del incremento de la actividad de protección descrita, se puede prever una mayor atención de organismos gubernamentales y privados hacia la conservación de especies en peligro de

extinción o a la salvaguarda de recursos genéticos valiosos en las distintas ramas de la ganadería, lo que tendrá un impacto social importante, fundamentalmente por la creación de nuevos empleos directos, así como aquellos creados por el desarrollo de actividades derivadas de la introducción de estas especies en el ámbito eco-turístico.

Indiscutiblemente, la posible ejecución de negocios ganaderos vinculados a las tecnologías derivadas de un BRG, como es la clonación somática, es otro impacto directo.

Los avances recientes en la tecnología de transferencia nuclear somática permitirán aumentar el potencial de multiplicación de animales de alto valor, a través del uso de líneas de cultivos celulares como donantes de núcleos. Esta nueva herramienta posibilitará en un futuro a mediano plazo, el uso relativamente rentable de esta tecnología en producción animal, y así lograr un aumento de la productividad.

La eficiencia de la clonación en ganado bovino ha aumentado en los últimos años, lográndose tasas de desarrollo *in vitro* y de gestación similares a las que se obtienen en la producción *in vitro* de embriones. No obstante, la eficiencia global del proceso es aún baja y no se dominan a plenitud todos los factores involucrados en la misma. De especial relevancia son el desarrollo fetal de los clones, así como el denominado síndrome de la cría grande (LOS: *large off spring syndrome*), que implica una alta tasa de mortalidad embrionaria y de desarrollo posnatal anormal. La estandarización de una metodología experimental, práctica y económicamente factible, dará a esta técnica los fundamentos para hacerla confiable y repetible.

El sector privado puede generar un modelo de negocio basado en el trabajo científico-técnico realizado en esta innovación tecnológica, a fin de crear bancos similares con embriones conservados y de semen de especies de importancia pecuaria.

Alternativamente, se podría valorizar la posibilidad de ofrecer un servicio de clonación para rescatar animales de alto valor genético y multiplicarlos como donadores de semen para programas de mejora genética mediante inseminación artificial u otros usos. No obstante, en la actualidad, la producción de animales clonados con fines productivos no es un negocio lucrativo a corto plazo, debido a la ineficiencia de la tecnología en su estado actual para generar animales clonados de manera efectiva. Se prevé que en un plazo de un año, a partir del momento de la colecta de la biopsia del animal a clonar, se produzcan en promedio 4 clones de un animal determinado.

La evaluación económica de este servicio reviste cierta complejidad debido a que el principal impacto de la tecnología a desarrollar se refleja en un gasto significativo que sería necesario para iniciar el servicio con un adecuado nivel de eficiencia desde el principio. Por lo tanto, el productor individual que desee la multiplicación de un animal élite, preferentemente un toro macho, dado el nivel de desarrollo de la clonación en dicha especie y para poder propagar su valor mediante inseminación artificial, deberá estar consciente del nivel de egresos que presupone el inicio del servicio. En este sentido, conviene recalcar el gran impacto que el logro de los objetivos del proyecto tendrá al permitir la existencia de varias copias del animal élite, de alto nivel productivo, lo cual actualmente aún no ha sido realizado en Chile.

► 6. Claves de viabilidad de la innovación

Si bien coleccionar y guardar material biológico de diversas especies es un reto, su uso juicioso es uno aún mayor. El más común de los problemas es el desarrollo de colecciones contaminadas y desorganizadas que no ayudan a la conservación de las especies, sino que se convierten en morgues genéticas o en almacenes de biodiversidad compuestos de material muerto e inviable (Goodman, 1990). Por ello es de vital importancia contar con un plan de acción que contemple la mayor cantidad posible de variables que puedan influir sobre la calidad y uso del banco.

Para ello, es importante hacer visible el BRG a todas las instituciones, académicas o no, involucradas en la conservación de especies en peligro de extinción, transmitiendo a los distintos interesados que esta tecnología ya se encuentra disponible. A su vez, se debe informar al poder ejecutivo y a las autoridades competentes de la existencia de este BRG para su involucramiento en el tema, fomentando una política de conservación coherente entre las instituciones involucradas y generando las instancias para un uso apropiado del banco.

Se debe ampliar en lo posible el BRG con más muestras de las especies ya incluidas, expandirlo a otras especies en peligro de extinción y a especies de interés económico y ganadero, en especial a razas autóctonas o introducidas de alto valor agregado.

También es de gran importancia presentar proyectos de investigación asociados a otras instituciones, empleando las líneas celulares existentes en aras de explotar el valor de uso del banco en investigaciones avanzadas en conservación. Para ello, es necesario contar con fondos públicos y privados que avalen estas iniciativas y que continúen con la mantención y crecimiento del BRG ya creado.

► 7. Asuntos por resolver

Esta herramienta tecnológica se encuentra en un nivel de desarrollo que permite su utilización inmediata por parte de los distintos interesados en conservar tejidos celulares a partir de las muestras que se envíen al BRG. Sin embargo, hay ciertas dificultades que aún deben ser superadas:

Financiamiento para sustentabilidad del banco. En la actualidad, el BRG se sostiene a partir de una subvención otorgada por la Facultad de Ciencias Veterinarias de la Universidad de Concepción. Esto contempla la compra de nitrógeno líquido para la mantención del banco, así como de los insumos mínimos de trabajo con células. Se requieren más recursos y/o de la implementación de un sistema de cobro por depósito a los usuarios del banco.

Ausencia de réplicas del BRG. Muy ligado al punto anterior, el BRG es único, no sólo por su valor, sino físicamente, lo que lo hace muy vulnerable a catástrofes naturales, incendios, devastaciones, actos delictivos o malintencionados. Se requiere al menos duplicar este BRG en otra locación física.

Nula interacción con el entorno científico nacional. A pesar del taller realizado en el año 2008, en el cual participaron los principales líderes de la conservación en Chile, no se reciben solicitudes para cobijar muestras. Curiosamente, se han recibido ofertas de envío de muestras desde el extranjero. Se requiere ampliar la difusión del tema, incorporando el BRG, por ejemplo, a los servicios ofrecidos por la Facultad de Ciencias Veterinarias de la Universidad de Concepción en su sitio web.

Ausencia de mecanismos operantes para el funcionamiento del BRG. Hasta 2010 no se habían recibido solicitudes de envío de muestras y no se contaba con claridad sobre el funcionamiento legal de un eventual servicio de envío de muestras. En la actualidad, se han recibido dos pedidos y se está trabajando en cómo enfrentarlos desde el punto de vista legal.

Los aspectos legales relacionados con los BRG son, por lo general, subestimados. La introducción de material al banco, su uso, conservación y acceso al mismo generan aspectos legales que deben ser tomados en cuenta para garantizar la conservación exitosa a largo plazo de un BRG. Los diferentes niveles de implementación legal relevantes a la propiedad y el uso de los recursos genéticos tienen que estar en coincidencia con los intereses a nivel nacional, con los acuerdos y convenciones internacionales que el país haya firmado, con la legislación nacional que cubre los recursos genéticos y con las regulaciones para transferencia de material biológico entre usuarios.

La ratificación por parte de Chile del Convenio sobre la Diversidad Biológica no implica la pérdida del control de sus recursos genéticos. Por el contrario, en el artículo 15 de este documento se explicita que el acceso a los recursos genéticos es derecho soberano del Estado y es este el encargado de regular el acceso a los recursos genéticos, sometidos a legislación nacional.

A pesar de que no existe una situación de propiedad intelectual en animales similar a la existente con las variedades de plantas, es de vital importancia mantener una clara política de propiedad sobre los tejidos animales que se conserven. En Chile no se patentan animales en su estado natural, pero sí se pueden presentar patentes sobre células, DNA, y su uso en procesos específicos.

► 8. Situación actual

Actualmente, el banco se encuentra operando y al servicio de los investigadores que necesiten de los cultivos celulares contenidos en él para realizar sus estudios en las especies animales muestreadas. También se encuentra disponible para recibir muestras de animales ya sea de zoológicos, predios privados, proyectos de investigación, etc. El BRG, a su vez, se mantiene con controles de calidad anuales, en los cuales se descongelan algunas líneas celulares, se verifica su viabilidad, se expanden y congelan de nuevo.

Posterior al término del proyecto precursor se han añadido muestras de animales amenazados de extinción y de razas autóctonas o de gran valor genético de animales domésticos, con vistas a expandir la potencialidad de este valioso reservorio. De este modo, se han añadido muestras de:

- Puma (1 animal).
- “Caballo chilote” (raza de equinos chilena).
- Raza de ovinos Latxa del País Vasco, existente en Chiloé (2 animales).
- Razas de bovinos de origen europeo de gran valor genético (Bazadais, Charolais, Gascon).
- Equino de enduro de alto valor competitivo (1 animal).

También se establecieron distintas líneas de trabajo relacionadas con el BRG, con respecto a las cuales cabe mencionar las acciones que se realizan o se realizarán:

Establecer mecanismos y medios de transferencia de material genético entre el BRG y sus potenciales usuarios. Chile, como signatario de la Convención internacional para el Comercio de Especies en Peligro de Extinción de Flora y Fauna Silvestres (CITES), y la Universidad de Concepción, como entidad registrada, tienen que regirse por estas normas para el envío y recepción de especímenes, todo esto bajo la supervisión del SAG. En concreto, se solicita el permiso CITES a la

autoridad administrativa, en este caso, al Museo Nacional de Historia Natural en Santiago; dicho museo pedirá al SAG regional el pronunciamiento, una vez emitido, se otorga el permiso. El SAG pide al BRG todos los datos de qué, para qué y a quién se envían las muestras.

En adición, la Universidad de Concepción exige la firma de un MTA (*Material Transfer Agreement*) para legalmente obligar a los solicitantes a no pasar a terceros, ni usar con fines comerciales el material recibido. Esto es similar a los permisos COSE (*Certificate of Scientific Exchange*) que rigen en CITES.

Para el uso dentro de Chile se exige sólo el MTA y los permisos correspondientes del SAG. Para ambos casos se precisa de la adquisición de termos de nitrógeno seco, que son permitidos en los aviones y son los aceptados en CITES.

Establecer mecanismos financieros de sustentabilidad del BRG, comprometiendo al Estado, como dueño del patrimonio genético. Se trabaja en la elaboración de una ficha de costo, que incluye a las distintas actividades que implican el envío de muestras, desde la descongelación, cultivo, expansión, recongelación, envío, hasta un cargo por la manutención pretérita, todo esto sin fines de lucro.

Crear grupos de trabajo y proyectos de investigación que den uso real al banco. Este es un punto de trabajo permanente y pasa por una buena visibilidad del BRG y porque se tengan implementados todos los mecanismos de funcionamiento anteriormente mencionados. En el ámbito de estas colaboraciones, en la actualidad se han recibido dos solicitudes de materiales. La primera, de la Universidad de Chile, solicitando muestras de las güiñas y los zorros existentes en el banco, y la segunda, del Laboratorio de Diversidad Genómica del *National Cancer Institute* del NIH (*National Institutes of Health*), Estados Unidos, solicitando muestras de los gatos güiñas a cambio del envío en termos propios de nitrógeno seco de muestras de puma (*Puma concolor*), gato de Geoffroy (*Leopardus geoffroyi*) y colocolo (*Leopardus colocolo*) capturados en Chile.

La idea final es establecer una colaboración fluida que permita el envío y recepción de muestras, como se realiza entre los BRG del mundo desarrollado, otorgándole al banco un nivel cuantitativamente superior, y acceso y visibilidad internacional.

SECCIÓN 2

El proyecto precursor

Los resultados y lecciones aprendidas en este libro surgen de la ejecución del proyecto “Conservación de genofondos de especies animales silvestres nativas y endémicas en peligro de extinción”, ejecutado por la Facultad de Ciencias Veterinarias de la Universidad de Concepción, campus Chillán, ubicada en la Región del Bío Bío, entre diciembre de 2005 y marzo de 2009.

► 1. Entorno

La diversidad biológica es vital para mantener la vida del modo que la entendemos. Sin embargo, el rápido crecimiento de la población del planeta ha puesto una extraordinaria presión sobre los ecosistemas, tales como destrucción ambiental a gran escala, la conversión, reducción y destrucción de hábitat, y la polución. Una de las reacciones a este problema, ha sido el surgimiento de la biología de la conservación, una mezcla de disciplinas científicas que se enfocan en la biodiversidad a través de la cooperación de ideas, informaciones y aproximaciones a la realidad actual de la flora y fauna del planeta.

Chile es hogar para una diversidad única de hermosos ejemplares de peces, aves y mamíferos, cuya función no es meramente decorativa, sino que cumplen un importante papel en el funcionamiento del ecosistema. En el país se han iniciado esfuerzos por entender la magnitud del problema de conservación de la fauna autóctona, con vistas a trazar estrategias de salvamento y protección. No obstante, es poco lo que se ha hecho y la evolución de la temática ha sido relativamente corta. Como resultado de las investigaciones más recientes se han identificado 49 de 82 (60%) especies



de mamíferos en Chile que deben ser priorizadas en programas de conservación. Del total de especies en algún grado de peligro, 16 son consideradas en equilibrio frágil, 12 como vulnerables, 11 en peligro y 3 críticas. Igualmente, 8 especies de aves fueron consideradas como críticas (Cofré y Marquet, 1999).

El proyecto, pese a que tiene su base en la Región del Bío Bío, se inserta en la Estrategia Nacional de Biodiversidad, que atañe a todas las regiones, aunque con especial énfasis en la zona centro-sur del país, por encontrarse en este importante ecosistema que alberga a muchas de las especies sujetas a programas de protección en Chile y las cuales se encuentran entre las categorías de críticas o en peligro de extinción.

Dentro de este marco, la ciencia y la tecnología, en especial la biotecnología y la biología de la conservación, proveen de herramientas que permiten aumentar las posibilidades de rescate de especies al borde de la extinción, como es el caso de la creación de un banco de recursos genéticos, propuesto en este proyecto, que no tendría similares en el país.

Por otra parte, el desarrollo de la transferencia nuclear somática inter específica con métodos simplificados, permitiría ensayar la posibilidad real de rescate de genofondos casi extintos por vías biotecnológicas modernas, con reales posibilidades de expansión a otras áreas.

► 2. El proyecto

El objetivo general del proyecto fue establecer un banco de recursos genéticos criopreservados a partir de líneas celulares cultivadas *in vitro*, derivadas de especies animales silvestres nativas y endémicas de Chile en peligro de extinción, que permita dotar al país de una salvaguarda de estos recursos para su uso en programas de rescate de especies y conservación.

El proyecto comprendió estandarizar, primero, los procedimientos de colecta de biopsias de cada una de las especies incluidas en el proyecto, sin que afectara la viabilidad de los animales donantes de las mismas; y luego, los procedimientos de cultivo que permitieran derivar cultivos primarios viables *in vitro*. Para ello, antes del inicio del proyecto, se utilizaron especies modelo para estandarizar los distintos procedimientos a realizar (bovino, pudú, llaca y perdiz). Posteriormente, se desarrolló una metodología para la crioconservación efectiva, validada y segura de los cultivos primarios obtenidos, se implementó una base de datos que permita el seguimiento y la documentación minuciosa de cada espécimen colectado y congelado, para finalmente evaluar la factibilidad de producir embriones de animales clonados a partir de células congeladas, empleando como receptores ovocitos de bovinos.

2.1 Aspectos metodológicos

Para la selección de aquellas especies de las cuales el proyecto se proponía conservar tejidos y derivar líneas celulares, se consideraron las necesidades de conservación que se hayan definidas para las especies involucradas, tanto a nivel de la investigación científica nacional chilena, como de las políticas nacionales enmarcadas dentro de la Estrategia Nacional de Biodiversidad y su plan de acción. Por ello, se utilizó como fuente definitiva el trabajo de Cofré y Marquet de 1999, en el cual se ofrece una calificación multifactorial y se cuantifica el peligro de extinción de distintas especies de mamíferos de Chile, definiéndose finalmente las siguientes especies animales a conservar: taruca, huemul, huillín, chinchilla chilena, comadreja trompuda, güiña, zorro chilote y picaflor de Juan Fernández.

El desarrollo metodológico del proyecto contempló la ejecución de las siguientes actividades:

La captura de especies. Para el éxito de este proyecto fue preciso diseñar o adaptar instrumentos de captura y de trabajo, ya que estos no se encuentran disponibles comercialmente, e incluso en los casos que se pueden conseguir, las dimensiones tan variadas de las especies que se pretendía capturar en este proyecto hacía necesario el diseño de herramientas especiales.

Se obtuvieron muestras de 6 de las 8 especies planificadas, pues no se obtuvieron muestras de huillín ni de taruca. De manera adicional, se obtuvieron muestras de dos especies que no estaban contempladas en el proyecto: pudú y llaca. En ambos casos, son especies en peligro de extinción y las muestras se obtuvieron de animales que estaban en el centro de rescate de la Universidad de Concepción (ver anexo 1).



Ejemplar macho de güiña capturado en predio privado en Santa Juana, Región del Bío Bío.

Toma de muestras y conservación de estas. A manera de resumen de la captura y muestreo de animales contemplados en el proyecto, que constituyen la médula del mismo, se realizaron 14 campañas de muestreo y 2 capturas en el centro de rescate. En aquellas especies en que no se logró biopsia, se avanzó en determinar las causas y las posibles soluciones a futuro. En términos generales, el proyecto fue exitoso en lo referente a las capturas, teniendo en cuenta que estas complicaciones son inherentes al sistema de muestreo y a la poca disponibilidad de las especies.

La toma de muestras se realizó en mamíferos mediante la obtención de muescas de oreja o por dardos especializados a distancia, en el caso de animales de difícil captura, y en aves mediante la extracción de plumas de sangre. Para poder llegar a conclusiones sobre la viabilidad de las biopsias tomadas por ponche o por dardos, se desarrolló un ensayo con vacas, a las cuales se les tomó muestras de las orejas o se les proyectaron dardos. Posteriormente, las biopsias fueron mantenidas en refrigeración y congeladas. Las muestras obtenidas a partir de biopsias de pabellón auricular pueden ser conservadas a temperatura de refrigeración (4°C) por espacio de una semana, manteniendo una viabilidad de un 76% si se los compara con las muestras procesadas en fresco. Esto es de un gran valor en la implementación de las estrategias de muestreo, ya que se puede con confianza depositar las muestras en los viales adecuados y continuar con las capturas al menos por 7 días más, sin detrimento del rendimiento de cultivos.

De igual modo, las biopsias pasadas a nitrógeno líquido una vez transcurridos varios días en refrigeración, pierden de manera más abrupta su viabilidad, llegando a tener sólo el 59% del valor de viabilidad comparado con las congeladas al momento de la toma de la biopsia. No obstante, este

hallazgo es también de gran utilidad, ya que la viabilidad obtenida en el peor de los casos (59,92%) implica que es posible obtener cultivos celulares viables a partir de biopsias que estuvieron primero refrigeradas durante una semana y después congeladas en nitrógeno líquido. Esta variante se propone sólo para casos en que no sea posible llegar al laboratorio de manera más expedita.

Las plumas de sangre, por otro lado, no es necesario refrigerarlas, basta con sacarlas y mantenerlas en una bolsa del tipo Ziploc hasta el momento de extraerles la pulpa para realizar el cultivo celular.



Toma de muestra con muescadora en condiciones de campo (izquierda); toma de muestras utilizando dardo de biopsia (derecha).

Obtención de líneas celulares. El trabajo de toma de muestras es sólo la base para el desarrollo y aislamiento de líneas celulares, las cuales deberían ser congeladas y descongeladas para evaluar su viabilidad. Se obtuvieron líneas celulares de todas las especies muestreadas, obteniendo al menos 4 líneas por especie (ver Anexo 2).

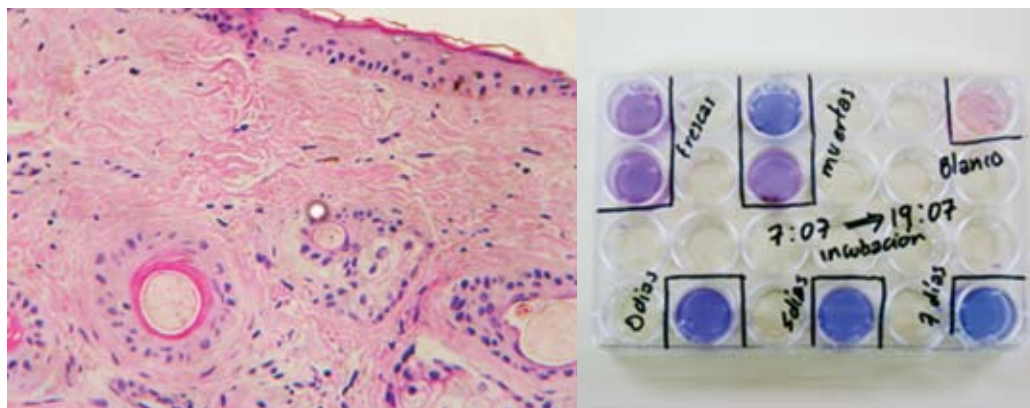
Las biopsias no congeladas soportan mejor los tratamientos y rinden células viables con mayor eficiencia que aquellas congeladas, por lo que se recomienda congelar las muestras sólo en casos extremos. Con respecto a las biopsias obtenidas por dardo, la viabilidad general es inferior a la de los pabellones auriculares cuando se les refrigera (79,19%) y similar cuando se les congela inmediatamente, sin embargo, si se les congela después de refrigeradas, su viabilidad disminuye ostensiblemente.

De modo general, las biopsias de dardos rinden células viables con similar calidad y velocidad que las de oreja sólo cuando se procesan de manera inmediata, lo que contrasta con las posibilidades reales al momento de la toma de muestras con dardos en las condiciones cordilleranas y de difícil acceso como las de Putre en la Región de Arica y Parinacota o Torres del Paine en la Región de Magallanes.

Los cultivos celulares generados a partir de muestras tomadas de aves y marsupiales deben ser incubados a distinta temperatura que los demás para rendir células viables con la misma velocidad y calidad.

Evaluación de líneas celulares, congelación y evaluación de viabilidad celular. No todas las células demostraron la misma capacidad de desarrollo *in vitro*, siendo las de picaflor y comadreja las de menor velocidad de crecimiento. No obstante, todas las células congeladas son viables, se descongeló al menos un vial por cada línea existente y se determinó su sobrevida a la congelación. El porcentaje de células viables después de la descongelación se evalúa por la adhesión al fondo de la placa, la morfología de las células y por el test de exclusión de células muertas de tripan azul. Se obtuvo un 100% de sobrevida a la congelación, expresada en términos de líneas celulares viables. El porcentaje de sobrevida de las células dentro de cada línea estuvo dentro de los márgenes reportados para células en cultivo y fue siempre superior al 75%, expresado en el número de células vivas después de la descongelación con respecto al número de células originalmente congeladas.

El análisis histo-morfológico de las muestras fue realizado para observar la arquitectura histológica de las biopsias. Se observó que las muestras criopreservadas a -80°C y en nitrógeno líquido no mostraban diferencias con las muestras control de tejido frescas. Para tener una observación más rápida, y a su vez cuantitativa, de la viabilidad de los procesos de conservación hipotérmica de las muestras se empleó el ensayo de Alamar Blue.



Evaluación de las muestras mediante análisis histo-morfológico (izquierda) y ensayo de Alamar Blue en placas de cultivo (derecha).

Caracterización molecular y celular de las líneas obtenidas. A partir de cuatro líneas celulares de huemules que mostraban una adecuada velocidad de crecimiento y morfología típica de células de fibroblastos, se seleccionó la línea H-4 (femenina) por presentar los mejores indicadores de crecimiento. La línea H-4 fue sometida a exámenes moleculares de la expresión de ciertos genes importantes para el desarrollo y el ciclo celular, así como a estudios de cariotipo.

Los estudios de expresión génica revelaron interesantes datos no existentes en la literatura sobre la expresión de ciertos marcadores de desarrollo que pueden ser de gran utilidad para la predicción del desarrollo *in vitro* de los embriones clonados. Los genes estudiados correlacionaron positivamente con aquellos encontrados en bovinos, lo cual puede ser indicativo de que estas células posean una adecuada capacidad de desarrollo *in vitro* e *in vivo*.

Obtención de ovocitos de especies receptoras de núcleos. Se desarrollaron los procedimientos para la maduración de ovocitos bovinos con vistas a su uso en clonación de bovinos y de otras especies. No se establecieron los procedimientos para ciervo rojo, pues no se contó con hembras sacrificadas para donantes de ovarios. Este es un cambio de estrategia que fue necesario implementar para poder llevar a cabo las tareas de clonación somática.



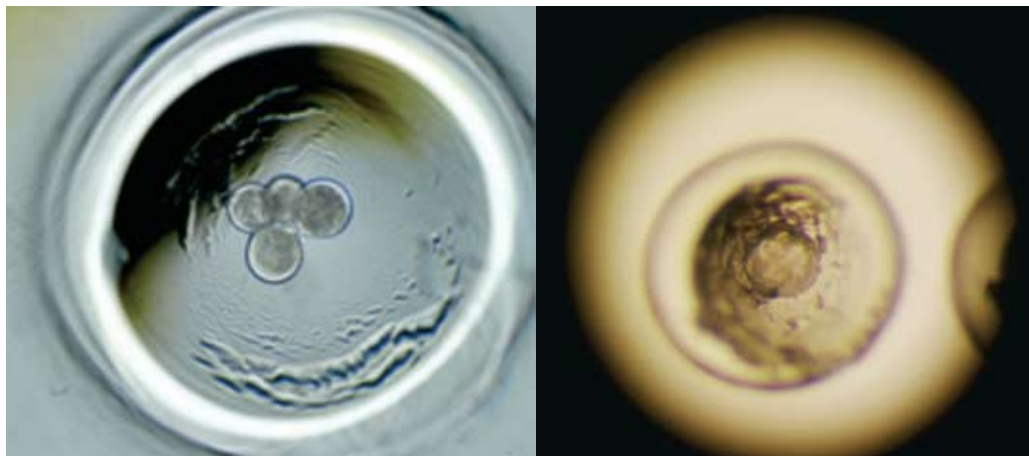
Ovario de vaca con folículos en la superficie (izquierda); punción de los folículos para obtener los ovocitos inmaduros (derecha).

Transferencia nuclear para la creación de embriones clonados. En primer lugar, se establecieron las metodologías de clonación de células de vaca en ovocitos de vacas, como herramienta metodológica esencial para la clonación de embriones de huemul. En este punto se logró un resultado trascendental que fue el nacimiento de los primeros clones bovinos en Chile. En segundo término, se realizó la clonación de embriones de huemul utilizando células de dicha especie en ovocitos bovinos. Los resultados fueron halagadores y merecen continuidad en otros proyectos, como fuente de clonación.

Clonación heteroespecífica. Este objetivo fue sin duda de gran complejidad técnica. Esto se logró de forma parcial, pues se obtuvieron embriones clonados de huemul en estadio de mórulas en distintos niveles de desarrollo, pero no de blastocistos. Estos embriones eran híbridos de células de huemul con ovocitos de vaca; no se pudieron realizar transferencias de núcleos de embriones de huemul a ciervas por no poder obtener ovocitos de esta especie. No obstante no obtener blastocistos, el hecho de obtener mórulas es un hito a nivel internacional y abre el camino a nuevas investigaciones, no sólo para huemul, pues también se lograron embriones clonados de pudú y güiña.



Lola (izquierda) y Victoria (derecha), primeros clones bovinos nacidos en Chile.



Embrión de 4 células en sistema de cultivo WOW (*well on hewell*) (izquierda); microfotografía estereoscópica de una mórula quimérica pudú-bovino en estadio de aproximadamente 16 células dentro del WOW de cultivo (derecha).

Caracterización molecular de embriones clonados. En el marco del proyecto, se obtuvieron embriones clonados de huemul en estado de mórula, no así de blastocistos. Esto es un logro de relevancia, pues implica que se puede reprogramar una célula de una especie en peligro de extinción en un ovocito de una especie doméstica. No obstante, no es suficiente para poder tener un patrón caracterizado de expresión génica; se requiere llegar al estado de blastocistos, el cual no fue alcanzado en estas condiciones.

2.2 Resultados

Como resultado de este proyecto, se estableció el primer banco de recursos genéticos de especies chilenas en peligro de extinción, pionero de su tipo en América Latina. Así, se dispone de líneas celulares viables, en estado congelado y de viabilidad comprobada mediante ensayos biológicos de 8 especies endémicas de Chile en grave riesgo de extinción, como son el huemul, la güiña, el picaflor de Juan Fernández, la comadreja trompuda, la chinchilla chilena, el zorro chilote, el pudú y la llaca.

Por otra parte, se establecieron por primera vez en el país las metodologías y tecnologías de clonación somática para mamíferos, obteniéndose los primeros animales clonados en Chile: dos terneras de raza Wagyu llamadas Lola y Victoria, que aunque no lograron pasar la barrera de los tres meses de vida indicados como el umbral de sobrevivencia de un clon, sí abrieron las puertas para futuras aplicaciones de esta biotecnología. Además, se creó una metodología que permitió generar embriones clonados de especies en peligro de extinción (huemul, pudú y güiña) hasta el estado de mórula.

Se logró una amplia difusión de los resultados del proyecto en la sociedad, mediante charlas, talleres, entrevistas y publicaciones, tanto de origen científico como en la prensa. Los resultados del proyecto fueron expuestos en un taller de carácter internacional, que contó con la presencia de destacados conservacionistas y científicos de universidades nacionales y de México, y mediante la publicación de un manual que entrega la metodología necesaria para la creación y mantenimiento de un BRG.

En conclusión, el país ha sido dotado con una serie de herramientas, infraestructura y conocimientos que lo sitúa en un estado de avance destacado en la región en materia de conservación *ex situ*. A excepción de las especies que no pudieron ser capturadas (huillín y taruca), el proyecto logró los objetivos propuestos en lo que respecta a la creación de un banco de material genético vivo de especies animales silvestres en vías de extinción y la de desarrollar con éxito la clonación somática de especies comerciales.

► 3. Desarrollos posteriores

Como ya se ha mencionado, el BRG surge también para garantizar el stock de células que permitan en un futuro clonar a animales en peligro de extinción, bajo el razonamiento que primero hay que contar con el material a clonar y después con las tecnologías. De este modo, mientras se crea un BRG amplio, se pusieron a punto las metodologías de clonación, utilizando ganado bovino como modelo. En la actualidad, en lo referente a la clonación y al BRG, se han obtenido los siguientes avances:

- Se demostró a nivel experimental la posibilidad de clonar gatos güiñas y huemules utilizando receptoras de ovocitos de especies distintas (gato doméstico y bovino, respectivamente).
- Se cuenta con una propuesta de la Universidad de Auburn, Estados Unidos, para desarrollar un proyecto conjunto que contempla la clonación de gato güiña, utilizando gata doméstica como especie receptora.
- Se obtuvo financiamiento para la divulgación científica en ambas comunidades a través del proyecto EXPLORA-CONICYT “*Descubriendo la clonación*”, código ED13015, EXPLORA-CONICYT, 2009.
- Se obtuvo financiamiento para establecer la clonación en ganado como tecnología escalable a nivel productivo, mediante el proyecto Innova Bío Bío “*Optimización de un proceso para la producción de bovinos clonados con vistas al desarrollo de tecnologías empresarizables*”, código Innova Bío Bío N°08-PC S5-352 F10.

En resumen, el proyecto precursor ha generado:

- 6 publicaciones científicas en revistas ISI con arbitraje (ver Anexo 3).
- 6 presentaciones en congresos internacionales con revisión por pares.
- 1 tesis de doctorado finalizada y defendida exitosamente.
- 2 tesis de doctorado en distintos grados de ejecución.
- 2 proyectos de investigación basados en los resultados del BRG.

Con posterioridad al término del proyecto (marzo 2009) y durante su realización, además de los proyectos listados, fueron adjudicados los siguientes proyectos, directamente resultantes del proyecto precursor:

- Proyecto DIUC (Dirección Investigación Universidad de Concepción) 209.153.020-1.0, “*Influencia de la línea celular utilizada como donante de núcleo sobre la capacidad de desarrollo de*

embriones bovinos clonados". Mediante este proyecto se establecerán parámetros cuantificables de las líneas celulares para determinar su posible uso en clonación bovina.

- Proyecto FONDECYT Posdoctorado N°3100058, "*Estudio de la expresión de marcadores de pluripotencia en el endometrio uterino de vacas en presencia de un embrión elongado*". En este proyecto se estudian las interacciones entre un embrión clonado y el útero de las madres receptoras y permitirá identificar los factores que afectan dicha interacción.
- Proyecto de colaboración entre el *Bundesministerium fur Bildungund Forschung* (BMBF), Alemania, y la Universidad de Concepción, Chile, N°CHL/035, "*Estudio del patrón de miRNA en ovocitos y embriones clonados bovinos*". Este proyecto, ya finalizado, permitió por primera vez caracterizar los patrones de micro RNA en embriones clonados, lo que significó una publicación internacional en revista ISI, dos presentaciones a eventos y un premio al mejor trabajo de investigación en la XXII Reunión Anual de la Sociedad Brasileña de Tecnología de Embriones, celebrada en Sao Paulo, Brasil, en agosto de 2008.
- Proyecto de colaboración Universidad Libre de Berlín-DAAD, Alemania (2007-2008), "*Estudio del estatus de metilación y expresión de Oct4 y otros genes importantes durante el desarrollo pre y periimplantarios de embriones bovinos producidos por Hand Made Cloning*", agencia financiadora DAAD (Alemania), código A-07-93565. Este proyecto, ya finalizado, permitió por primera vez caracterizar los patrones de micro RNA en embriones clonados, lo que significó una publicación internacional en revista ISI y dos presentaciones a eventos.
- Proyecto de Colaboración Internacional financiado por CNPq y PROSUL (Brasil), "*Desenvolvimento das técnicas de clonagem e transgênese em pequenos e grandes ruminantes criados na América do Sul*". Este proyecto, ya finalizado, fue un éxito en el sentido que permitió por primera vez unir los esfuerzos en tecnologías reproductivas de punta y crear una red internacional entre universidades y centros de investigación de Brasil, Argentina y Chile, en este último caso, representado por el grupo de trabajo del proyecto precursor. Se ha presentado una segunda versión de este proyecto para mantener activa la red.

En adición a los proyectos adjudicados, mediante instrumentos complementarios de FIA se financió la participación en un encuentro técnico en Brasil, en agosto de 2007 (XXI Reunión de la Sociedad Brasileña de Tecnología de Embriones, Costa do Sauipe, 2007). En este encuentro se presentaron los principales avances del proyecto precursor y de la clonación en Chile.

Adicionalmente, se han presentado dos proyectos FONDECYT, uno al concurso regular de investigación del año 2011 y otro al concurso de iniciación en investigación, titulados "*Identification of pluripotence and inflammatory markers in theuterine endometrium of healthy and endometritis diagnosedcows and their role in endometrial function*" (FONDECYT Regular N°1110642) y "*Analysis of the expression of pluripotence markers in bovine Day-7 blastocystsproduced in vivo, in vitro and by SCNT and its influence on furtherem bryonic development to the elongation stage*" (FONDECYT de Iniciación N°11100082).

Finalmente, se tiene una colaboración con la Universidad del Bío Bío, sede Chillán, con la que se mantiene un fluido intercambio de información, visitas de profesores, muestras, entre otros.

SECCIÓN 3

El valor del proyecto

Es indudable que cualquier valoración de competitividad de este proyecto con respecto a otros que tengan un retorno cuantificable, la ausencia de marcadores de valorización objetiva de las especies, lo pone en desventaja. De ahí la importancia de entender el impacto científico, social y también económico de esta herramienta.

El proyecto precursor ha permitido que se conozca la existencia del banco de recursos genéticos para su uso por otros investigadores, sin que estos tengan que capturar las especies, con el consiguiente daño que esto implica para las mismas.

Indudablemente, en el plano nacional e internacional, la credibilidad de Chile y de sus propósitos conservacionistas se vio realzada por este proyecto, lo que constituye un valor intangible pero altamente apreciado. Ha colocado al país en la vanguardia de tecnologías conservacionistas entre



los países en desarrollo, a la par de sus homólogos en el mundo industrializado. Chile se convirtió en el tercer país de América Latina, después de Brasil y Argentina, en contar con la tecnología de clonación somática y el segundo en contar con un BRG.

No se pueden cuantificar valores a futuro, pero es muy probable que se logren financiamientos importantes para otros proyectos de conservación, con entidades internacionales, basados en los resultados de este proyecto.

Considerando la infraestructura que se obtuvo y se puso en funcionamiento con el proyecto, otros ramos de la agricultura, la silvicultura y la ganadería se verán beneficiados, pues podrán mediante convenios acceder tanto a los recursos genéticos conservados, como a programas para proteger otros recursos genéticos no contemplados en este proyecto, mediante la utilización del Manual de Uso de un Banco de Recursos Genéticos.

Finalmente, la posible realización de negocios en el rubro ganadero vinculados a la tecnología de clonación somática que se introdujo al país, es otro impacto directo de este proyecto, al permitir la multiplicación de ejemplares de alto valor genético.

Anexos

Anexo 1. Características de las especies incluidas en el BRG de la Universidad de Concepción

Anexo 2. Resumen de la existencia en el BRG de líneas celulares para cada especie

Anexo 3. Publicaciones científicas en revistas ISI

Anexo 4. Literatura consultada

Anexo 5. Documentación disponible y contactos

ANEXO 1. Características de las especies incluidas en el BRG de la Universidad de Concepción

Huemul

Nombre común: Huemul

Nombre científico: *Hippocamelus bisulcus*

Clase: Mammalia

Familia: Cervidae



Zorro

Nombre común: Zorro chilote

Nombre científico: *Lycalopex fulvipes*

Clase: Mammalia

Familia: Canidae



Gato Güiña

Nombre común: Güiña

Nombre científico: *Leopardus guigna*

Clase: Mammalia

Familia: Felidae



Comadreja trompuda

Nombre común: Comadreja trompuda

Nombre científico: *Rhyncholestes raphanurus*

Clase: Mammalia

Familia: Caenolestidae

**Chinchilla**

Nombre común: Chinchilla chilena

Nombre científico: *Chinchilla lanigera*

Clase: Mammalia

Familia: Chinchillidae

**Picaflor de Juan Fernández**

Nombre común: Picaflor de Juan Fernández

Nombre científico: *Sephanoides fernandensis*

Clase: Aves

Familia: Trochilidae

**Llaca**

Nombre común: Llaca

Nombre científico: *Thylamis elegans*

Clase: Mammalia

Familia: Didelphidae

**Pudú**

Nombre común: Pudú

Nombre científico: *Pudu puda*

Clase: Mammalia

Familia: Cervidae



ANEXO 2. Resumen de la existencia en el BRG de líneas celulares para cada especie

Especie	N° de biopsias	N° de líneas celulares	Porcentaje promedio de sobrevida a la descongelación	N° de viales disponibles
Huemul	9	12	90	19
Zorro	4	8	90	31
Güiña	2	4	88	25
Comadreja	4	8	72	10
Chinchilla	8	16	85	25
Picaflor	8	6	75	8
Pudú	4	8	85	41
Llaca	1	2	76	3

ANEXO 3. **Publicaciones científicas en revistas ISI**

- Castro, F.O.; Sharbati, S.; Rodríguez, Ll.; Cox, J.; Hultschig, C. y Einspanier, R.** 2010. MicroRNA Expression Profiling of Elongated Cloned and In Vitro-Fertilized Bovine Embryos. *Theriogenology* 73(1):71-85.
- Rodríguez, Ll.; Navarrete, F.; Tovar, H.; Cox, J. y Castro, F.O.** 2008. High Developmental Potential In Vitro and In Vivo of Cattle Embryos Cloned Without Micromanipulators. *Journal of Assisted Reproduction and Genetics* 25:13-16.
- Rodríguez, Ll.; Cox, J.; Navarrete, F.; Valdés, C.; Zamorano, T.; Einspanier, R. y Castro, F.O.** 2009. Elongation and Gene Expression in Bovine Cloned Embryos Transferred to Temporary Recipients. *Zygote* 17(4):353-365.
- Rodríguez, Ll.; Cox, J.; Tovar, H.; Einspanier, R. y Castro, F.O.** 2010. Changes in the Expression of Pluripotency-Associated Genes During Preimplantation and Peri-implantation Stages in Bovine Cloned and In Vitro Produced Embryos. *Zygote* 18(3):269-279.
- Rodríguez, Ll.; Sharbati, J.; Sharbati, S.; Cox, J.; Einspanier, R. y Castro, F.O.** 2010. Differential Gene Expression in Bovine Elongated (Day 17) Embryos Produced by Somatic Cell Nucleus Transfer and In Vitro Fertilization. *Theriogenology* 74(1):45-59.
- Tovar, H.; Navarrete, F.; Rodríguez, Ll.; Skewes, O. y Castro, F.O.** 2008. Cold Storage of Biopsies from Wild Endangered Native Chilean Species in Field Conditions and Subsequent Isolation of Primary Culture Cell Lines. *In Vitro Cellular & Developmental Biology – Animal* 44:309-320.

ANEXO 4. **Literatura consultada**

Castro, F.O. y Rodríguez, LI. 2009. Manual de Uso de un Banco de Recursos Genéticos. Proyecto FIA, Código FIA-PI-C-2005-1-P-097.

Chile Potencia Alimentaria. 2008. A los Tres Meses Fallece “Victoria” Ternera Clonada en la U de Concepción. [en línea]. <<http://www.chilepotenciaalimentaria.cl/content/view/318035/A-los-tres-meses-fallece-Victoria-ternera-clonada-en-la-UdeC.html>> [Consulta: junio, 2010].

Cofré, H. y Marquet, P.A. 1999. Conservation Status, Rarity, and Geographic Priorities for Conservation of Chilean Mammals: An Assessment. *Biological Conservation* 88:53-68.

Daily, G.C. 1997. Nature’s Services: Societal Dependence on Natural Ecosystems. [en línea]. Island Press, Washington, DC, USA.<<http://books.google.cl/books?id=JyxZbqO3xq0C&pg=PP1&ots=z0liLAJWPj&dq=Societal%20Dependence%20on%20Ecosystem%20Services%20daily%201997&pg=PA31#v=onepage&q&f=false>> [Consulta: junio, 2010].

Goodman, M.M. 1990. Genetic and Germ Plasm Stocks Worth Conserving. *The Journal of Heredity* 81(1):11-16.

Wildt, D.E.; Rall, W.F.; Critser, J.K.; Monfort, S.L. y Seal, U.S. 1997. Genome Resource Banks: Living Collections for Biodiversity Conservation. *BioScience* Volume 47, Number 10.

Además, se utilizó la información obtenida de las entrevistas realizadas a las siguientes personas:

Fidel Ovidio Castro, ingeniero zootecnista, M.Sc. Ph.D, académico Universidad de Concepción, Facultad de Ciencias Veterinarias, Campus Chillán, Región del Bío Bío. Fono 42-207524, e-mail: fidcastro@udec.cl

Lleretny Rodríguez Álvarez, microbióloga, Ph.D, académica Universidad de Concepción, Facultad de Ciencias Veterinarias, campus Chillán, Región del Bío Bío. Fono 42-208835, e-mail: llrodriguez@udec.cl

ANEXO 5. **Documentación disponible y contactos**

El presente documento, su ficha correspondiente y los informes finales del proyecto precursor se encuentran disponibles como PDF, en el sitio Web de FIA “Experiencias de Innovación para el Emprendimiento Agrario” (<<http://experiencias.innovacionagraria.cl>>), al cual también puede ingresar desde la página de inicio del sitio Web institucional, desde la opción “Experiencias de Innovación de FIA” (<www.fia.gob.cl>).

Contacto: fia@fia.cl