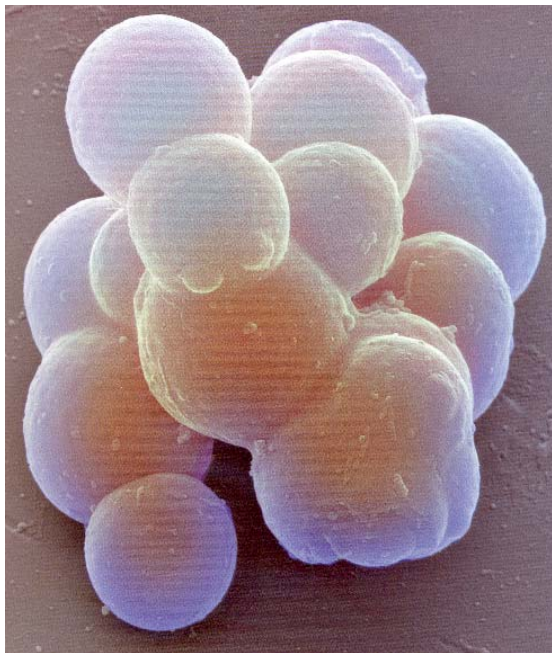


Biotecnoloxía animal e clonación

LLUÍS MONTOLIU

Passaron xa máis de dez anos desde que coñecemos a existencia da ovella máis famosa de todos os tempos, *Dolly*. En efecto, *Dolly* foi o primeiro mamífero que se obtivo por clonación, mediante transferencia nuclear, empregando o núcleo dunha célula adulta doutra ovella e utilizándoo para reconstruír con el un embrión a partir dun ovocito doutra ovella ao que previamente lle fora extraído e eliminado o seu propio núcleo e, con el, toda a información xenética nuclear que contiña. Con todo iso, o animal resultante, clónico, parecíase moito ao que fornecera o núcleo celular e moi pouco ao que fornecera o ovocito para a reconstrución embrionaria.

Todo en *Dolly* é único e irrepetíbel. Naceu o 5 de xullo de 1996, froito das investigacións en transferencia nuclear e reconstrución embrionaria que realizaba Ian Wilmut, embriólogo escocés que traballaba daquela no Instituto Roslin, de Edimburgo, en Escocia (Reino Unido). O seu nome débémollo á fina ironía escocesa, pois provén da cantante folk norteamericana Dolly Parton, cuxas “calidades” chamaron poderosamente a atención de Wilmut e colaboradores, ao teren en conta que o núcleo que se empregara para a obtención de *Dolly* proviña dunha célula de glándula mamaria doutra ovella. *Dolly* tivo unha existencia relativamente tranquila, tivo descendencia e finalmente morreu o 14 de febreiro de 2003. Foi sacrificada polos veterinarios do Instituto Roslin ao diagnosticárselle un encharcamento dos pulmóns causado por un cancro pul-



Célula troncal do cordón umbilical

monar, provocado por unha infección viral. Moi probablemente, os seus creadores, no seu afán protector, potenciaron o contacto de *Dolly* con outras ovellas, ao retela na corte máis tempo do recomendábel e iso comportou unha meirande probabilidade de contaxio co virus que rematou causándolle un cancro incurábel e recomendando o seu sacrificio, para evitarlle sufrimentos innecesarios.

O certo é que *Dolly* non foi máis que o primeiro animal clonado de toda unha saga que coñecemos en anos posteriores. A vaca e o rato

clonáronse en 1998; a cabra en 1999; o porco no ano 2000; o gato, o coello e o peixe cebra no ano 2002; a mula e o cabalo (a egua), en 2003, xunto coa rata e, finalmente, os últimos membros deste selecto club de animais clonados ou obtidos por clonación foron o can, en 2005, e o furón, en 2006. Unha observación atenta das especies clonadas permítenos constatar os diferentes métodos que tiveron que ir sendo descubertos e aplicados para adaptar o protocolo inicial, desenvolvido en ovellas, ao aparato reprodutor e á bioloxía de cada especie, con maior ou menor grao de acerto e eficacia. As innovacións tecnolóxicas foron permitindo superar barreiras que semellaban insuperábeis.

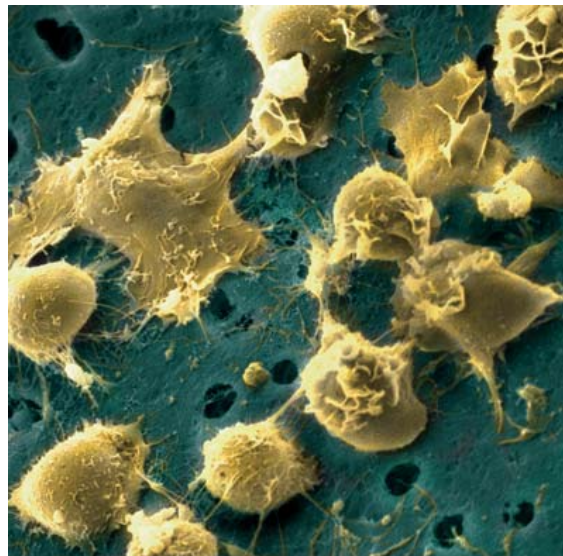
Para que serve a clonación, para que serven os animais clonados? Os embriólogos escoceses obtiveron financiamento e realizaron as súas investigacións en transferencia nuclear e clonación co obxectivo de incrementar a eficacia na xeración de animais transxénicos. A obtención de vacas trans-

xénicas mediante microinxección, isto é, portadoras no seu xenoma dun segmento xenético adicional, o transxene, ten unha eficiencia de arredor do 0,5 por cento. É dicir, fai falta microinfectar 200 embrións para obter unha vaca finalmente transxénica. A consecución deste número tan elevado de embrións fai necesario o uso de moitos animais, que fornecen embrións, e outras vacas que leven adiante a xestación até o nacemento. Actualmente, no gando vacún, que é o que máis evolucionou tecnoloxicamente, mediante transferencia nuclear poden obterse vacas transxénicas e clónicas cunha eficiencia corenta veces superior, do 20 por cento ou máis.

Adicionalmente, até hai pouco non era posíbel inactivar xenes de xeito específico en moitos xenomas de animais domésticos, seguindo protocolos semellantes aos desenvolvidos no rato, a partir do descubrimento de células troncais pluripotentes embrionarias¹ en 1981. A razón era, é, ben sinxela. Non se coñecen nin se obtiveron, con fiabilidade, esas células noutras especies distintas do rato (e recentemente da rata, a finais de 2008). Mediante transferencia nuclear podía obviarse a necesidade de usar estas células troncais, pois pode usarse unha célula somática² para inactivar especificamente un xene e, despois, o seu núcleo ser utilizado nun experimento de transferencia nuclear, para reconstruír un embrión previamente enucleado, dando lugar a un individuo que portará, en todas as súas células, a inactivación específica do xene en cuestión. É dicir, a utilización de técnicas de transferencia nuclear, de clonación, para a obtención de animais transxénicos e mutantes, tanto para estudos biolóxicos, biomédicos ou para aplicacións biotecnolóxicas, como biorreactores, é unha realidade. Estas son as aplicacións máis estendidas da clonación, da transferencia nuclear, na actualidade. Outras aplicacións, extensamente discutidas, pero, na práctica, moito menos empregadas, son as de utilizar a transferencia nuclear para conservación de biodiversidade, de razas e especies en perigo de extinción ou para realizar estudos de envellecemento ou de correlación entre muta-

Lluís Montoliu é doutor en Ciencias Biolóxicas pola Universidade de Barcelona. De 2004 a 2006 foi director do Departamento de Bioloxía Molecular e Celular do Centro Nacional de Biotecnoloxía (CNB), onde actualmente dirixe o seu grupo de investigación. É presidente da International Society for Transgenic Technologies (ISTT) e membro do Comité de Bioética do CSIC.

Tradución **Daniel Soutullo**



Célula troncal da pel

¹ As células troncais pluripotentes embrionarias, máis coñecidas nos medios de comunicación co pouco preciso termo de “células nai”, son células indiferenciadas (non especializadas), extraídas da masa celular interna dun blastociste (embrión preimplantatorio de varios días), que teñen a capacidade de manter o estado indiferenciado de xeito permanente ou ben, debidamente estimuladas, diferenciarse para transformarse en células de calquera dos tecidos do organismo (*Nota do tradutor*).

² As células somáticas son as células do corpo. O termo procede de *soma*, que en grego significa ‘corpo’ (*N. do t.*).

ción e cancro. O rescate de especies non sempre é posíbel senón existe outra especie, moi semellante e compatíbel, que poida xerar os embrións reconstruídos. Intentouse, con éxito, no ano 2001, obténdose, por vez primeira, un muflón xerado por unha ovella.

Porén, máis aló do éxito indubidábel que foi, o nacemento de *Dolly* representou un fito incomparable. Wilmut e colaboradores, en realidade, estaban a validar unha idea proposta por outro embriólogo, o alemán Hans Spemann, 60 anos antes, en 1938. Spemann propuxo a seguinte teoría para intentar explicar como podían obterse células tan distintas como unha célula muscular e unha neurona a partir dun embrión dunha soa célula. Por aquela época predominaba a teoría que postulaba que a diferenciación celular, a diversificación en moitos tipos celulares, progresaba mediante perda de factores (non podían falar de material xenético, pois aínda non fora descuberto). Spemann, pola contra, pensou que as células, na súa especificación, non perdían factores senón que empregaban un conxunto deles distinto en cada caso. Spemann estaba no certo. El non puido probalo mais deixou o experimento proposto, que validaría Wilmut en 1997. Spemann concluíu que se el estaba no certo, ao non se “perder” factores, debería poder utilizarse o núcleo de calquera célula adulta, xa especificada e, dado que contería todo o conxunto de factores necesario para o desenvolvemento, ser usado para reconstruír un embrión e volver a recapitular todo o desenvolvemento embrionario.

En realidade, a historia da clonación animal durante o século XX foi unha colección de éxitos e fracasos e algún fraude. Avanzouse moito na década dos 50 e dos 60 en anfibios, mais en todos os casos se empregaron núcleos de células embrionarias (non adultas, xa diferenciadas) para reconstruír os embrións clonados polo que, de novo, *Dolly* foi quen *sensu stricto* confirmou experimentalmente que o núcleo de calquera célula do corpo contiña toda a información necesaria para volver a sustentar o desenvolvemento dun novo embrión e, se este era implantado, dar lugar a un novo individuo xeneticamente moi semellante ao doador nuclear.

Tamén houbo fraudes, tristemente os primeiros experimentos presuntamente levados a cabo en mamíferos, en ratos, en 1981, por Illmensee en Xenebra, Suíza. A súa aparente clonación de ratos nunca puido ser comprobada e rematou concluíndose que se tratou dunha fraude á comunidade científica e á sociedade. Despois deste revés inicial, pasaron moitos anos nos que ficou bloqueado o progreso científico de clonación en mamíferos e foron poucos os valentes que quixeron investigar nun eido que tan malos records traía. Entre os

perseverantes estaba o grupo de Wilmut, quen levaba, cando publicou o seu seminal traballo sobre *Dolly*, máis de quince anos investigando en transferencia nuclear e reprogramación.

Despois de *Dolly* chegou *Polly*, a quen coñecemos tamén a finais do ano 1997, a primeira ovella clónica... e transxénica! É dicir, utilizárase para reconstruír o embrión un núcleo dunha célula que fora modificada xeneticamente, transferindo así o transxene dunha célula ao animal e confirmando que a transferencia nuclear era un procedemento eficiente para a produción de animais transxénicos de granxa. Uns poucos anos máis tarde, en 2000, obtívose a primeira ovella clónica... e mutante! É dicir, usouse para a súa obtención unha célula á que previamente se lle inactivara un xene de xeito específico, xa que logo, a ovella resultante carecía tamén dese xene. Tras estas ovelas seguiron cabras, vacas e porcos clónicos, e transxénicos ou mutantes, provocando unha verdadeira revolución biotecnolóxica no sector, lastrado polas baixas eficiencias e os enormes custos de produción de animais transxénicos por métodos tradicionais.

Nos últimos anos asistimos a toda unha exploración de métodos específicos para trasladar a técnica de transferencia nuclear, inicialmente desenvolvida en ovelas, a outras especies de mamíferos. Como apuntaba anteriormente, cada especie require adaptacións específicas. Por exemplo, o coello require unha transferencia asíncrona dos embrións reconstituídos para a súa xestación, posto que a ventá de tempo para a implantación dos embrións é moi pequena e os embrións clonados requiren algo de tempo para se adaptar, para se “reprogramar”. As ratas foron durante moito tempo un problema e non se puideron clonar até que non se atopou unha droga que inhibía a activación, o desenvolvemento espontáneo que se producía durante a obtención dos óvulos non fecundados, impedindo así a súa utilización para procedementos de clonación. Nos porcos houbo que deseñar unha estratexia de clonación seriada na que, a fin de aumentar a supervivencia dos embrións reconstituídos, os núcleos eran pasados a través de “embrións intermedios” co obxecto de aumentar a eficacia da clonación. Para os ratos foi indispensable recorrer a unha nova ferramenta, un novo microinxección, o piezoinxección, importado directamente das clínicas de infertilidade humanas, capaz de depositar os núcleos celulares nos embrións sen danalos excesivamente. Por sorprendente que poida parecer, os embrións de rato son máis fráxiles que os humanos.

De todos os experimentos de clonación animal realizados poden derivarse unha serie de conclusións xerais, que serven tamén para entender a

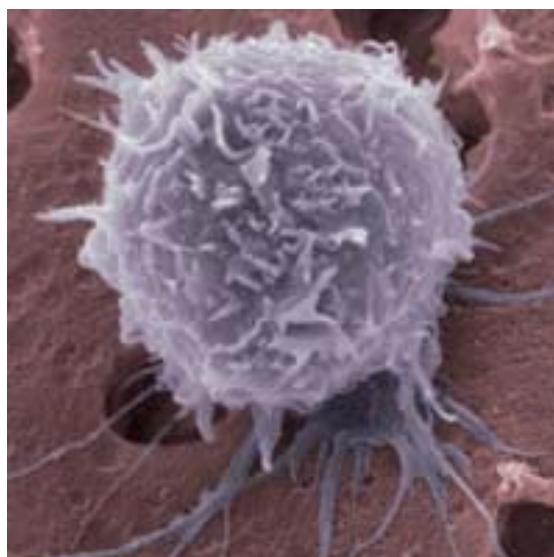
bioloxía do proceso de reconstitución embrionaria, a chamada “reprogramación” nuclear, o proceso mediante o cal o núcleo dunha célula adulta apaga os xenes que estaba usando nese momento e reactiva os xenes necesarios para o desenvolvemento embrionario. Unha constante nos experimentos de clonación é a observación de que, malia que, en teoría, de calquera célula adulta é posíbel realizar unha transferencia nuclear efectiva, canto máis diferenciada estea a célula doadora, canto máis especializada se atope, menor é a eficacia do proceso de transferencia nuclear. Por iso, ultimamente, a maioría das células doadoras que se empregan proveñen de tecidos fetais ou embrionarios.

Outra observación xeneralizada —que non semella de aplicación para *Dolly*, que probablemente foi a “excepción á regra”—, é a existencia de anomalías no desenvolvemento dos animais clónicos, alteracións fisiolóxicas que decotío son incompatíbeis coa vida do animal clonado. Unha das máis típicas son as alteracións (medres) no crecemento fetal e da placenta, o que explica por que a maioría dos animais clónicos nacen mediante cesárea. Agora ben, estas anomalías, de se produciren, son de índole epixenético, é dicir, só afectan ao individuo clonado e non se transmiten nin afectan a súa descendencia.

A clonación animal foi obxecto dun interese moito maior, en ámbitos biomédicos e clínicos, tan pronto como se deu a coñecer, en 1998, que dous equipos norteamericanos illaran células troncais embrionarias humanas con características de células pluripotentes. Rapidamente se uniron ambas innovacións tecnolóxicas e deseñouse, sobre o papel, a chamada clonación terapéutica (fronte á clonación reprodutiva, que foi a técnica usada para obter a *Dolly*), na que un suposto paciente, afecto dunha doenza conxénita ou dexenerativa incurábel, doaba unha das súas células sas para clonar un embrión a partir do cal obter as células troncais pluripotentes coa súa identidade xenética, a partir das cales derivar un grupo de células específicas, para substituír ou reparar o tecido afectado. En realidade este experimento, así descrito, nunca se levou a cabo en humanos, aínda que si en ratos, no ano 2002.

Os anos 2004 e 2005 foron dunha intensa actividade para reproducir en humanos os resultados obtidos en ratos. Quen máis preto dixo estar, en aparencia, foi o investigador surcoreano Woo Suk Hwang, quen, en realidade, foi acusado de fraude en 2006 e os seus resultados cualificados de fabricados.

No ano 2006, mentres a sociedade se recuperaba da sorpresa desagradábel e inesperada da fraude cometida por Hwang, dous investigadores xaponeses, Takahashi e Yamanaka, describiron



Célula troncal adulta

un extraordinario sistema para converter calquera célula adulta do corpo nunha célula con características de célula troncal, pluripotente, obviando así a necesidade de recorrer a embrións ou a reconstruílos para obter as desexadas células pluripotentes, a partir das cales derivar o tipo celular desexado. Dado que as células troncais se obtiñan por indución chamouse a estas células como “pluripotentes inducidas”. O proceso era posíbel coa simple adición dun reducido número de xenes, catro no seu deseño inicial, actualmente mesmo cun só xene abonda, capaces de reprogramar a célula adulta e revertela ao estadio embrionario, de célula troncal pluripotente e, xa que logo, capaz de dar lugar a calquera outro tipo de célula presente no corpo. Este descubrimento foi rapidamente replicado e confirmado por outros laboratorios, de xeito independente, referendando a súa relevancia e dando meirande credibilidade ao novo método.

Aínda fican moitos interrogantes para esclarecer no sorprendente descubrimento das células pluripotentes inducidas. Imos coñecendo máis detalles, semana a semana. Mais non cabe dúbida de que son a (pen)última revolución en medicina rexenerativa e un novo renacer, novas esperanzas terapéuticas para un número importante de persoas na nosa sociedade que foron xa desafiuzadas pola medicina tradicional ao padeceren doenzas graves conxénitas e incurábeis ■