

Lluís Montoliu José

Investigador Científico del CSIC
Centro Nacional de Biotecnología, Madrid

Sociedad Española para las Ciencias del Animal de Laboratorio (SECAL) ¿Qué opinión le merece nuestro colectivo?

No soy miembro de SECAL pero he tenido ocasión de asistir a alguna de vuestras reuniones, como invitado, y me he sentido siempre en familia, entre amigos y colegas. Sea por mis intereses en el campo de la bioética, o en el campo de la transgénesis animal, sea por haber coincidido en muchos otros foros sobre experimentación animal con miembros de SECAL, lo cierto es que sois un colectivo con el que me siento próximo. La SECAL ha hecho una excelente labor divulgando y, sobre todo, formando a personal de nuestro país que trabaja con animales de laboratorio, a través de sus diversas iniciativas educativas, propiciando además la discusión sobre temas candentes en el área, como las sucesivas reformas legislativas que nos han tenido ocupados y preocupados en los últimos años.

Para empezar, ¿en qué consiste la tecnología CRISPR y cuál es el rol del animal de experimentación en ella?

Establecidos los métodos básicos de modificación genética de animales, todos los avances substanciales posteriores han venido siempre de la mano de las bacterias. Con el gen *lacZ* pintamos de azul muchos tejidos y órganos contribuyendo a identificar los patrones de expresión de muchos genes. Con el sistema loxP/cre convertimos las mutaciones constitutivas en condicionales. Con los elementos del operón Tet aprendimos a controlar e inducir la expresión de genes y transgenes. Las CRISPR no podían ser una excepción. El sistema CRISPR-Cas9 es una de las soluciones que inventaron las bacterias y las arqueas, para defenderse de la invasión de genes extraños, provenientes de otros plásmidos o virus. Se trata pues de un rudimentario, pero muy eficaz, sistema de defensa (un prototipo de sistema inmune) de las bacterias. En nuestro país contamos con uno de los microbiólogos que primero descubrieron y estudiaron las CRISPR, desde 1993 (Francisco J. Martínez Mojica, Universidad de Alicante).



Fotografía: Inés Poveda

La tecnología CRISPR-Cas9 está basada en dos elementos, una pequeña molécula de ARN, complementaria a la secuencia que queremos modificar en el genoma de la célula o animal, y una proteína, la Cas9, que es una endonucleasa y corta las dos cadenas de ADN donde le indica ese pequeño ARN director.

Este corte en doble cadena en el material genético de la célula, probablemente una de las agresiones más peligrosas a las que tiene que enfrentarse una célula, induce una maquinaria de reparación ancestral encargada de sellar cuanto antes ese estropicio. Lo que sucede es que el sistema de restauración

comete errores en su desesperada búsqueda de microhomologías para reparar el ADN cortado, y, por ello, frecuentemente añade o quita alguna letra, siendo el resultado final la aparición de inserciones o deleciones (denominadas INDEL) que trastocan la pauta de lectura del gen y se traducen en una mutación. Es decir, dirigiendo el corte de una endonucleasa a un gen determinado fomentamos que aparezca una mutación precisamente en las cercanías de la secuencia utilizada para dirigir el corte.

Es un sistema extraordinariamente eficiente y revolucionario que, trasladado a animales, permite obtener individuos portadores de muchas mutaciones tras inyectar en embriones la combinación de la pequeña molécula de ARN y la que porta información para la nucleasa Cas9. Lo sorprendente del sistema es que, además, puede usarse para introducir o substituir secuencias de ADN a voluntad, si añadimos al cóctel de microinyección un tercer elemento, una molécula de ADN que cubra la zona afectada por el corte y que incorpore alguna alteración determinada, con la esperanza que el sistema de reparación tienda a usar esta molécula de ADN como molde, y acabe trasladando al genoma la modificación genética proyectada. En realidad se trata de un sistema de edición genómica, poderosísimo, con eficiencias de mutación dirigida nunca vistas antes en ratones (valores superiores al 60% de los individuos no son extraños) y con eficiencias de substitución menores pero en vías de mejorar con los constantes avances de la técnica.

Desde el punto de vista de la experimentación animal, las CRISPR permiten hacer el anhelado “recorta, pega y colorea” genómico con el que siempre habíamos soñado los genetistas.

Naturalmente que era posible modificar el genoma de animales de laboratorio, desde los años 80, añadiendo nuevos genes, y poco después, inactivando genes a voluntad, a través de las células pluripotentes embrionales (ES). Sin embargo, estos métodos, en especial la inactivación específica de genes, eran laboriosos y costosos, en tiempo, en dinero y en animales necesarios. Con las CRISPR el campo ha dado un vuelco espectacular, y ahora, en ratones, aquellas mutaciones específicas que necesitaban un año de trabajo para ser generadas, pueden reproducirse en apenas un par de meses, el tiempo suficiente para preparar la modificación genética en el laboratorio (menos de una semana), inyectar en embriones de ratón (menos de una semana), gestarlos en una hembra (3 semanas), y esperar a su destete (3 semanas más). No hay día que no se publiquen variaciones o nuevos ejemplos de uso de las CRISPR, a cual más sorprendente.

Todavía no somos del todo conscientes de la enorme versatilidad que nos dan estas nuevas herramientas para generar rápidamente cualquier modificación genética que deseemos investigar en animales.

Tales ventajas y altísimas eficiencias de edición vienen acompañadas, de momento, con alguna limitación a tener en cuenta, como es la posibilidad de que los cortes (y, por ende, las mutaciones asociadas) se produzcan en otras secuencias similares del genoma, distintas de las inicialmente previstas. La realidad nos dice que estas alteraciones imprevistas se han observado mayoritariamente en células en cultivo, y muy pocas veces en animales, probablemente por las diferencias en los protocolos utilizados. Estoy seguro que el método mejorará (apenas cumplimos ahora dos años desde que lo hemos empezado a aplicar universalmente) y superará o minimizará en lo posible estas y otras limitaciones que puedan aparecer.

¿Qué beneficios puede traer el desarrollo de esta técnica dentro del contexto de genes relacionados con enfermedades en los humanos?

En mi opinión, muchos y enormes. Dejando a un lado las discusiones sobre si los modelos de ratón son útiles para entender las patologías humanas (como siempre en estos casos hay ejemplos para todos los gustos, tanto de modelos que han sido de enorme utilidad como otros que nos demuestran que ratones y humanos tenemos algunas diferencias fisiológicas), lo cierto es que la gran mayoría de ratones mutantes, con inactivación de genes cuyos homólogos en humanos están asociados a enfermedades congénitas conocidas, sean de alta o baja prevalencia (raras), son portadores de mutaciones muy distintas a las observadas en humanos. Y esto es así porque, tradicionalmente, la tecnología de modificación genética en ratones permitía inactivar un gen más fácilmente eliminando una parte antes que substituir apenas una o pocas letras, que es el origen de la inmensa mayoría de mutaciones observadas en genética humana. Con las nuevas herramientas CRISPR ahora la imaginación es el único límite y es por lo tanto posible trasladar al ratón exactamente la misma alteración genética observada en una familia determinada, y compararla con otra observada en otra familia afectada por la misma enfermedad, pero con una presentación clínica distinta, algo que frecuentemente no se comprende y era muy difícil de investigar hasta ahora. Con estos nuevos modelos animales, producidos mediante CRISPR, más ajustados a lo que se observa en patología humana, será posible progresar en nuestro conocimiento de la enfermedad y llegar a

proponer terapias de una forma más eficaz.

Por otra parte, si la tecnología CRISPR permite editar genes es plausible pensar que podría usarse para modificar el genoma humano, para corregir errores congénitos. Las enormes expectativas que la terapia génica suscitó desde los inicios de los años 90, periódicamente pospuestas (con algunas pocas excepciones), pueden dar un vuelco con las CRISPR, que bien podrían emplearse para corregir genes afectados. Primero, claro está, en aproximaciones somáticas, y quizás más adelante, si logramos entender y controlar las limitaciones ya expuestas del sistema, en aproximaciones germinales, que no serían recomendables en estos momentos.

La sociedad se beneficia de la ciencia, pero no piensa de forma científica. ¿Hay aquí un “gen” por descubrir, que determine el equilibrio entre ambas partes?

La ciencia, en especial la biomedicina, había estado tradicionalmente apartada de la sociedad. Al investigador no se le percibía como alguien próximo. Creo, como mucha gente, que el cambio de percepción se produjo tras el nacimiento de la oveja *Dolly*, que todo el mundo conoce, aunque muchos ignoren lo que significó y lo que aportó a la biomedicina. Desde entonces tanto la profesión periodística como la sociedad han empezado a demandar ávidamente información y a reclamar a sus investigadores que dirijan su atención a las enfermedades que nos afectan.

Yo soy de los convencidos que los investigadores, en especial quienes trabajamos desde centros de investigación públicos, financiados por el dinero de todos los contribuyentes, debemos destinar parte de nuestro tiempo a trasladar lo que sabemos, y lo que todavía ignoramos, a la sociedad, en palabras asequibles, sin ocultar nada, compartiendo nuestros logros y nuestros fracasos. Creo sinceramente que es una responsabilidad ineludible. Frecuentemente el colectivo investigador se enfada con la sociedad cuando ésta toma partido por opciones que consideramos no son correctas. Y, en realidad, lo que deberíamos preguntarnos es qué hemos hecho mal para no haber sabido transmitir a la sociedad los elementos necesarios para que pueda entender un determinado avance científico, con sus ventajas y limitaciones. ¿Cómo vamos a preguntarle a la sociedad si está de acuerdo o no con el uso de las herramientas CRISPR para modificar el genoma humano (por referirme a una de las polémicas más recientes) si no somos capaces de explicar primero, en palabras llanas, qué supone, de posible beneficio, y qué puede suponer, también, de riesgo?.

En definitiva, no es que haya un gen por descubrir que determine el equilibrio entre ambas partes, lo que creo que tiene que pasar, en mi opinión, es que los científicos debemos cambiar, colectivamente, y pasar a explicar más frecuentemente, en palabras llanas, aprovechando las habilidades de cada uno, a qué nos dedicamos y por qué es importante que la sociedad en su conjunto, y los gobiernos sucesivos en particular, sigan invirtiendo en ciencia y apostando por ella.

Si no somos capaces de explicar a nuestra abuela o al taxista lo que hacemos, y que lo entiendan, difícilmente tendremos autoridad para trasladar a la sociedad los beneficios reales del progreso científico. Queda mucho por hacer, pero cada vez somos más los que intentamos acercar la ciencia a la sociedad. Somos nosotros, los científicos, quienes tenemos el deber de acercarnos a la sociedad, no esperar a que la sociedad entienda lo que hacemos.

La investigación biomédica es precursora de protocolos para la prevención, curación y control de las enfermedades. ¿Cómo influiría la prohibición del uso de animales de laboratorio en el desarrollo de estos protocolos?

Ni se me ocurre pensar que esto pueda llegar a suceder, pero, si ocurriera, sería una verdadera catástrofe, y un fracaso de todas aquellas personas que trabajamos o investigamos con animales de laboratorio.

Nuestro conocimiento de la fisiología y patología humanas se nutre fundamentalmente de la documentación de los casos, de la observación de personas sanas y enfermas, pero la experimentación necesaria para entender procesos biológicos relevantes, para evaluar posibles terapias paliativas o curativas no puede abordarse, por motivos obvios, en personas. Por ello sigue siendo necesario acercarnos a modelos animales que, aunque distintos a los humanos, comparten un buen número de características fisiológicas, de desarrollo embrionario, de metabolismo a partir de los que inferir lo que ocurre en los seres humanos. Y todo ello abordado desde el mayor respeto y cumplimiento de las recomendaciones en bienestar animal y las normativas de protección de animales utilizados en investigación.

Un ejemplo cercano, de la condición genética rara que investigamos en el laboratorio desde hace más de 20 años, es el albinismo, que ilustra cómo el uso de animales de laboratorio ha permitido avances científicos muy importantes para su

comprensión y posible tratamiento, algo totalmente impensable hace pocos años. Las personas con albinismo, un grupo de anomalías genéticas complejas que incluyen mutaciones en por lo menos 18 genes, pueden manifestar o no ausencia o disminución de la pigmentación, pero lo que comparten todos los tipos de albinismo son unas profundas alteraciones visuales, que son de hecho su principal discapacidad. Utilizando ratones transgénicos, en el año 2006 (1), demostramos que los problemas visuales asociados al albinismo no tenían que ver con la falta de pigmentación sino con el déficit de un metabolito de la vía de la síntesis de la melanina, la L-dihidroxifenilalanina (L-DOPA), la cual, al restaurarla en el sistema mediante un transgén, permitía que los ratones albinos recuperaran la visión, independientemente de su pigmentación. Este descubrimiento dio pie a iniciar diversos ensayos clínicos en pacientes con albinismo, en EE.UU., tratados con L-DOPA (2), para evaluar su posible utilización terapéutica. Nunca hubiéramos podido descubrir el papel tan relevante de la L-DOPA en el desarrollo del sistema visual, y su incidencia directa en albinismo, de no haber usado animales de laboratorio.

Nuestros lectores directos son los socios de SECAL. Nos gustaría hacerles llegar su mensaje en relación a la iniciativa de prohibir el uso de animales en la investigación biomédica.

Personas en contra de la experimentación animal siempre han existido, por diversas razones, como en toda sociedad humana compleja y diversa. En algunos casos sus acciones violentas les descalificaban para cualquier discusión razonable sobre estos temas, pero, recientemente, diversos colectivos, en Europa, se han unido bajo la iniciativa STOP VIVISECTION que pretende trasladar al Parlamento Europeo la necesidad de revisar la Directiva sobre protección de los animales utilizados para fines científicos (2010/63/EU) para promover su anulación, y, con ella, la prohibición de usar animales en investigación biomédica. La utilización selectiva, a conveniencia, de la literatura científica, hábilmente mezclada con postulados en defensa de los derechos de los animales, resaltando donde creen que éstos no se respetan en la Directiva Europea, ha servido para construir una propuesta con una buena dosis de argumentación, (con la que se puede estar de acuerdo o no, muy discutible en mi opinión), pero que sin embargo ha resultado atractiva para más de 1.2 millones de europeos (en su gran mayoría italianos), quienes han aprovechado una herramienta política nueva, la iniciativa europea ciudadana (ECI), para comprometer al Parlamento Europeo a discutir y posicionarse sobre esta proposición. Quienes tenemos una opinión distinta no deberíamos preocuparnos más

allá de lo razonable por este colectivo, ni atacarles por haber presentado esta moción, pues están en su derecho como ciudadanos europeos para forzar la discusión de un tema que ellos consideran relevante en el Parlamento Europeo.

Lo que sí deberíamos hacer es reaccionar, aportar nuestro conocimiento, nuestra experiencia, nuestro punto de vista, nuestros datos reales de nuestros experimentos a quienes tendrán la posibilidad de decidir si apoyan o no esta iniciativa encaminada a prohibir la experimentación animal, esto es, a los europarlamentarios, los representantes de la sociedad europea.

Por ello, desde la COSCE un grupo de personas, preocupadas por la necesidad de explicar mejor los beneficios de la experimentación animal a la sociedad, hemos escrito un documento (3), público, que hemos remitido a nuestros representantes en el Parlamento Europeo, para que dispongan de la información complementaria que necesitan antes de posicionarse, también de quienes defendemos el uso sensato y regulado de la experimentación animal, con respeto al bienestar animal y estricto cumplimiento de la legislación vigente.

Me consta que la SECAL también se ha movilizado para trasladar su opinión a los europarlamentarios, y así se está haciendo también en otros países. No hacer nada no es una opción viable en este caso. Quedarse de brazos cruzados confiando que esta iniciativa no prosperará no es la solución. De nuevo creo que estamos ante un ejemplo en el que es necesario que los diversos colectivos relacionados con la experimentación animal, también los investigadores, nos manifestemos y expliquemos al Parlamento Europeo, y a la Sociedad en general, los beneficios de la misma para la salud humana y animal.

En uno de los puntos creo yo más relevantes del informe COSCE decimos que oponerse a la experimentación animal no es una postura moralmente neutra, como podría parecer, y como se presenta ante la sociedad, dado que, según ellos, no son quienes "dañan" a los animales. Ellos son, aparentemente, sus "defensores". Sin embargo, nada dicen estos colectivos del coste que tendría para la humanidad si no pudieran usarse animales de laboratorio en biomedicina. Si ese coste implicara el aumento del sufrimiento, la imposibilidad de tratar enfermedades y, en definitiva, la pérdida de muchas vidas humanas que dejarían de poder salvarse, entonces la oposición a la experimentación animal no es, en absoluto, una postura moralmente neutra, y requeriría una argumentación de estas consecuencias, argumentación que estos colectivos no parecen estar dispuestos a ofrecer.

Solemos terminar estas entrevistas con la voz propia del entrevistado y por ello le dejamos espacio libre para una reflexión.

Mi primera experiencia con animales de laboratorio se remonta a los años 80, hace más de 30 años, cuando estudiaba Biología en la Universidad de Barcelona. Durante todos estos años he sido testigo privilegiado, en España y en otros países, de cómo hemos profesionalizado, mejorado y optimizado nuestro uso de animales de laboratorio en investigación, implementando parámetros de bienestar animal y adaptándonos sucesivamente a las diversas normativas que han ido apareciendo en respuesta a una voluntad social de mayor respeto y protección de los animales que se utilizan para fines científicos.

Durante todo este tiempo he tenido ocasión de descubrir y asumir que la experimentación animal es un proceso complejo que requiere del trabajo, en colaboración, de diversos colectivos: (1) los cuidadores y técnicos de los animalarios, que se encargan de revisar y mantener los animales en óptimas condiciones, realizando procedimientos cuando es menester; (2) los jefes de los animalarios y los responsables de bienestar animal, que supervisan a los anteriores y son los interlocutores con los investigadores; (3) los técnicos y demás personal de los laboratorios, que son nuestras manos directas en el animalario y (4) también los investigadores, quienes imaginamos y diseñamos proyectos científicos que deben abordarse con experimentación animal. Tras haber trabajado en muchos animalarios y haber coincidido con muchos responsables de animalarios, con quienes frecuentemente he estado de acuerdo, a veces he discrepado, y siempre he discutido y charlado de muchos de estos temas, mi reflexión es que no puede entenderse la experimentación animal sin la exquisita colaboración de los cuatro colectivos anteriormente indicados.

Tengo la sensación, quizás equivocada, de que a veces se ha querido trasladar una imagen de controversia entre investigadores y responsables de animalarios, como si los primeros no tuviéramos sensibilidad ni interés en los temas de bienestar animal y como si los segundos tuvieran como misión bloquear o retrasar los experimentos científicos en base a normas que resultan incomprensibles a los primeros.

Yo quisiera finiquitar con esta reflexión estas polémicas. He tenido la fortuna de trabajar con excelentes jefes y jefas de animalario, con quienes he tenido ocasión de discutir mis

experimentos, escuchando sus sugerencias e intentando encontrar la solución más adecuada a cada problema. No veo otro camino que continuar fomentando esta colaboración.

Tanto los investigadores como los trabajadores y responsables de los animalarios estamos interesados en el bienestar animal, claro que sí, y, por supuesto, todos estamos comprometidos con la experimentación animal, para abordarla de forma correcta. No nos queda otra que entendernos, escucharnos y hacer todo lo posible para potenciar esta colaboración.

Referencias citadas

1. Lavado A, Jeffery G, Tovar V, de la Villa P, and Montoliu L. *Ectopic expression of tyrosine hydroxylase in the pigmented epithelium rescues the retinal abnormalities and visual function common in albinos in the absence of melanin*. J Neurochem. 2006 Feb;96(4):1201-11.
2. <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT01176435>
3. http://www.cosce.org/pdf/Documento_COSCE_Comision_Animal_Research.pdf