

Clonado de animales mediante transferencia nuclear: aplicaciones en ganadería y biomedicina

Pablo Bosch, MSc, PhD

*Department of Animal and Dairy Science,
University of Georgia, Athens, GA 30602, USA.
pbosch@uga.edu*

En los últimos años hemos sido testigos del surgimiento de biotecnologías que prometen revolucionar tanto el sector agropecuario, como también el de la salud humana. Una de estas biotecnologías nacida recientemente es el clonado de animales a partir de células provenientes de animales adultos. En 1997 el grupo de investigación liderado por Ian Wilmut con base en Escocia, Reino Unido, comunicó el nacimiento del primer animal (la oveja Dolly) generado a partir de una célula de un adulto mediante la técnica de transferencia nuclear (TN), noticia que conmocionó tanto a la comunidad científica como al público en general. Posteriormente, investigadores ubicados en diferentes puntos del mundo lograron clonar otras especies tales como ratones, conejos, gatos, cabras, cerdos y ganado bovino.

La palabra “clon” tiene diferentes significados de acuerdo al contexto en el cual es usada, pero en general implica múltiples copias idénticas de una molécula (Ej. ADN) u organismo unicelular o pluricelular. Por ejemplo, un grupo de microorganismos o células originadas a partir de un único antecesor, y por lo tanto idénticas entre sí, es considerado un clon. El clonado en animales pluricelulares implica la generación de individuos genéticamente idénticos mediante reproducción asexual.

Existen diferentes modalidades para generar animales clonados. Una de estas, la bipartición embrionaria, implica la separación de un embrión en dos mitades mediante una cuchilla microscópica. Cada una de ellas tiene el potencial de generar un nuevo individuo completo. Del mismo modo, cada una de las células de un embrión temprano retiene la capacidad potencial de originar un nuevo individuo. Por lo tanto, si se separan las células de un embrión temprano, cada una de ellas podría originar un individuo idéntico. Un fenómeno equivalente ocurre naturalmente en humanos y animales, en los cuales se originan hermanos genéticamente idénticos a partir de un

embrión de 2 células. Por causas desconocidas, cada célula se desarrolla independientemente de la otra para originar individuos gemelos.

Una de las desventajas de los métodos de clonación descritos anteriormente es el limitado número de clones que se pueden producir a partir de un determinado genotipo. Esta limitación puede ser superada mediante el uso de otra metodología denominada clonado mediante TN. La TN se basa en la incorporación del material genético contenido en el núcleo de una célula (por ejemplo una célula de la piel) proveniente del animal que se quiere clonar dentro de un ovocito (célula femenina) al cual se le ha removido previamente su material genético (este último proceso es conocido como enucleación).

Durante mucho tiempo la clonación de mamíferos a partir de una célula proveniente de un individuo adulto fue considerada imposible, dado que contradecía un principio biológico fundamental: células provenientes de un animal adulto no pueden ser desdiferenciadas para originar un nuevo individuo. Dicho dogma aceptado por tantos años ha perdido sustento luego de numerosas comunicaciones, documentando el nacimiento de animales clonados a partir de células adultas.

En este artículo se presentan los principios básicos de la clonación mediante transferencia nuclear, así como también las principales aplicaciones de esta biotecnología en ganadería y biomedicina.

CLONACIÓN POR TRANSFERENCIA NUCLEAR: ¿CÓMO SE PRODUCE UN ANIMAL CLONADO?

El primer paso es obtener células del animal que se pretende clonar. El tejido comúnmente usado como fuente de células para clonación es la piel. De una pequeña biopsia de piel es posible obtener miles de fibroblastos los cuales se pueden multiplicar fácilmente mediante cultivo *in vitro* en el laboratorio. Mediante el uso de microinstrumentos, un fibroblasto es introducido en el interior de un ovocito que ha sido previamente enucleado (esto es, se le ha extraído todo el material genético) con una micropipeta (Figura 1, B y C). La célula y el ovocito son fusionados mediante una corriente eléctrica y luego sometidos a un estímulo físico (electricidad) o químico para activar el desarrollo embrionario (Figura 1, D).

Al fusionarse los factores presentes en el ovocito, se inducen una serie de cambios morfológicos y funcionales en la cromatina o material genético del fibroblasto a través de un fenómeno conocido como *reprogramación nuclear*. Estos cambios transforman a una célula diferenciada incapaz de producir otros tipos celulares en una con la capacidad de generar un nuevo individuo. Dado que el material genético (cromatina) del ovocito es removido durante el proceso conocido como enucleación (Figura 1, B), el material genético del fibroblasto donante del núcleo es el encargado de promover el desarrollo embrionario y fetal. Por lo tanto, todos los embriones producidos serán genéticamente idénticos al animal del cual originalmente se extrajeron las células de la piel.

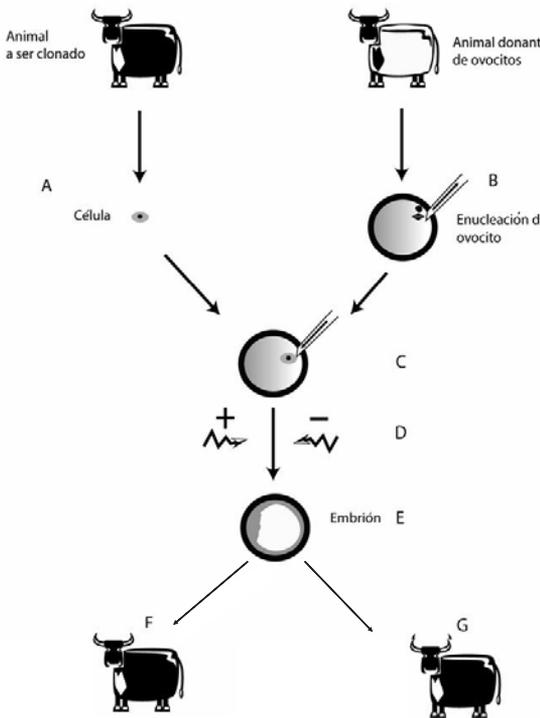
EQUIPO UTILIZADO EN LA CLONACIÓN

Los primeros estudios sobre clonación se desarrollaron en batracios debido al considerable tamaño del ovocito en estos animales, el cual alcanza 1 mm de diámetro. Por el contrario, en mamíferos el ovocito es considerablemente más pequeño ($\sim 0,12$ mm), por lo cual se requieren instrumentos de tamaño muy reducido para manipular tanto el ovocito receptor como la célula donante del material genético.

El equipamiento requerido para implementar la TN consta de un microscopio y un par de micromanipuladores. Estos últimos permiten el movimiento de los microinstrumentos en los 3 planos del espacio. Uno de los micromanipuladores es el encargado de sostener al ovocito en posición fija mediante succión a través de una pipeta de vidrio cuyo diámetro (aproximadamente 0,09 mm) es un poco menor que el del ovocito.

Figura 1

Esquema de las diferentes etapas del clonado por transferencia nuclear



El primer paso es obtener células del animal que se desea clonar (A), mientras que el ovocito se puede obtener de animales vivos o de matadero. El material genético de un ovocito maduro es aspirado completamente (enucleación) mediante una pipeta de vidrio (B). Luego la célula donante del núcleo (por ejemplo un fibroblasto de la piel) se deposita dentro del ovocito utilizando una micropipeta de vidrio (C). La célula y el ovocito se fusionan mediante la aplicación de pulsos eléctricos (D). Los embriones obtenidos (E) se cultivan o se transfieren directamente a madres sustitutas (F) para originar animales clonados (G).

El otro manipulador controla el movimiento de una pipeta de transferencia que se utiliza para enuclear el ovocito y posteriormente colocar la célula dentro del ovocito. Además de estos instrumentos específicos para realizar la TN, es necesario contar con un laboratorio completamente equipado para cultivo celular.

EFICIENCIA DEL CLONADO POR TRANSFERENCIA NUCLEAR

La eficiencia del clonado por transferencia nuclear es extremadamente baja. Menos del 1% de los embriones producidos por TN desarrollan hasta el término de la gestación y un alto porcentaje de los clones nacidos vivos mueren durante los primeros días de vida debido a complicaciones de origen diverso. Se cree que los problemas de desarrollo observados en animales clonados son el resultado de una incompleta y/o defectuosa reprogramación nuclear. Como consecuencia, la baja eficiencia sumada a los altos costos de equipamiento y la alta capacidad técnica asociados con la clonación, hacen que por el momento esta tecnología sea muy costosa y por lo tanto, con escasa transferencia al sector agropecuario. En la actualidad, existe un gran interés para descifrar los mecanismos biológicos involucrados en el proceso de clonado por TN y al mismo tiempo identificar condiciones apropiadas para incrementar la eficiencia de esta tecnología. De esto último, dependerá el uso extensivo del clonado en el área agropecuaria y en la salud humana.

APLICACIONES DEL CLONADO MEDIANTE LA TRANSFERENCIA NUCLEAR

Mejoramiento genético. La identificación de animales con alto valor genético en una población con el posterior clonado de los mismos permitiría incrementar el avance genético. Sin embargo, el clonado se suma pero no suplanta otras estrategias usadas en un programa de mejoramiento genético. La situación ideal sería la combinación del clonado con la reproducción sexual. El primero se usaría para determinar el valor genético de la línea materna mediante la evaluación de la progenie (obtenida mediante clonado). La línea materna con el mérito genético más alto es luego apareada con los mejores reproductores machos disponibles. De este modo se podrían generar individuos genéticamente superiores.

Conservación de especies silvestres en peligro de extinción. Se prevé que en el futuro el clonado será una herramienta fundamental en programas conservacionistas tendientes a preservar especies en peligro de extinción. Adelantándose a la inminente disponibilidad de esta tecnología para preservar especies en peligro, varias organizaciones han comenzado a construir bancos genéticos con tejidos de animales salvajes en peligro de extinción conservados a bajas temperaturas. Una vez que la técnica de clonado sea perfeccionada, será posible recuperar poblaciones diezgadas e incluso recuperar especies extintas a partir de estos bancos genéticos.

Producción de animales transgénicos. Actualmente esta disponible la tecnología para modificar la información genética de animales mediante la incorporación de genes foráneos. El advenimiento de la técnica de clonado mediante transferencia nuclear combinada con técnicas que posibilitan la modificación genética de células en cultivo ha abierto nuevas oportunidades para la producción de animales genética-

mente modificados. Por ejemplo, hoy es posible incorporar (o eliminar) un determinado gen en células en cultivo. Posteriormente, estas células transgénicas se utilizarán como donantes de núcleos para producir animales clonados los cuales poseerán la alteración genética deseada.

APLICACIONES DE LA TECNOLOGÍA TRANSGÉNICA

Producción de fármacos. Los genes que codifican proteínas humanas pueden ser intercalados en el genoma de células en cultivo. Animales producidos por TN, a partir de estas células expresarán la proteína humana la cual es liberada a través de la leche, la orina o la sangre. Estas proteínas producidas en grandes cantidades y a bajo costo por animales transgénicos serán utilizadas para el tratamiento de enfermedades del hombre. Ejemplos de proteínas de uso terapéutico humano producidas por animales transgénicos incluyen la alfa-lantitripsina para el tratamiento de la fibrosis quística y el factor de coagulación IX para el tratamiento de la hemofilia.

Producción de órganos de cerdos para el trasplante humano (xenotransplatación). Durante mucho tiempo ha existido una gran brecha entre la enorme demanda y la baja disponibilidad de órganos para trasplante. Por ello, existe gran interés en el desarrollo de métodos que permitan el uso de tejidos y órganos de cerdos para el trasplante humano. Si bien los órganos de cerdo se asemejan a los humanos en cuanto a tamaño y fisiología, existe el problema del rechazo inmunológico de los mismos. Ciertas proteínas en la superficie de las células de cerdo son responsables del rechazo por parte del sistema inmune humano. Varios laboratorios ya han comunicado el nacimiento de cerdos transgénicos que no expresan dichas proteínas; por lo tanto, las células de dichos animales serían mejor toleradas por el receptor humano. Estos avances constituyen un paso importante hacia la futura aplicación de esta tecnología.

Producción de animales resistentes a enfermedades. Mediante la adición o substracción de determinados genes sería posible generar líneas de animales resistentes a ciertas enfermedades. Por ejemplo, la eliminación de un gen conocido como PrP podría generar animales resistentes a la encefalopatía espongiforme de los bovinos.

PRODUCCIÓN DE CÉLULAS MADRE (STEM) CON FINES TERAPÉUTICOS

Las células madre o stem se pueden definir como células provenientes de un embrión temprano que poseen la capacidad de proliferar *in vitro* indefinidamente y generar múltiples tipos celulares (Ejm. células del hueso, nerviosas, musculares, etc.). Existen grandes expectativas de que estas células peculiares tendrán un gran impacto en el tratamiento de un sinnúmero de enfermedades humanas, tal es el caso de los padecimientos degenerativos del sistema nervioso como la enfermedad de Parkinson. En el futuro, células diferenciadas provenientes del individuo enfermo (Ejm. células de la piel) se usarían como donantes de núcleos para producir embriones (clones) a partir de los cuales se aislarían células madre. Mediante tratamientos inductores específicos estas células madre pueden originar, por ejemplo, neuronas las cuales se usarían para el tratamiento de enfermedades del sistema nervioso del paciente. Recientemente, un grupo de investigación surcoreano ha logrado producir una línea

de células madre a partir de un embrión humano clonado representando una prueba sustancial de la futura aplicabilidad de esta metodología en humanos. Dado que el objetivo del clonado en las circunstancias descritas precedentemente es el tratamiento de enfermedades, esta modalidad se denomina *clonado con fines terapéuticos*. La otra modalidad es el denominado *clonado con fines reproductivos*. Como su nombre lo indica, su objetivo es obtener uno o varios individuos genéticamente idénticos a la persona donante de la célula. Si bien existen grupos minoritarios que se expresan a favor del clonado reproductivo, hay una serie de cuestionamientos éticos que al igual que las limitaciones técnicas desalientan la clonación en humanos con este fin.

En conclusión, el clonado a partir de un animal adulto, algo inimaginable pocos años atrás, es hoy una realidad. Sin embargo, la eficiencia de esta tecnología es extremadamente baja lo que ha limitado su aplicación en la industria agropecuaria, como así también en la salud humana. Es de esperar que en los próximos años presenciemos una mejora sustancial de la eficiencia del clonado mediante la TN, lo que traerá aparejada la expansión de su uso para el mejoramiento genético. Seguramente en un futuro cercano veremos como se ponen en práctica muchas de las aplicaciones en las cuales la tecnología de la clonación promete jugar un papel preponderante.

LECTURAS RECOMENDADAS

- Bosch P, Hodges CA, Stice SL. Generation of transgenic livestock by somatic cell nuclear transfer. *Biotechnología Aplicada* 21(3):128-136. 2004.
- Campbell KHS. Nuclear transfer in farm species. *Cell and Developmental Biology* 10:245-252. 1999.
- Campbell KHS. A background to nuclear transfer and its applications in agriculture and human therapeutic medicine. *J. Anat.* 200:267-275. 2000.
- Campbell KHS, Alberio R, Lee J, Ritchie WA. Nuclear transfer in practice. *Cloning and Stem Cells* 3:201-208. 2001.