

CIENCIA

AL DÍA *Internacional*

ABRIL, 2003

NUMERO 1 VOLUMEN 5

Copyright © 2003 Ciencia al Día Internacional

Aspectos biológicos de los animales clónicos

© Pedro Esponda, 2003
esponda@cib.csic.es

RESUMEN

Los animales clónicos se pueden producir de forma natural o artificial. Entre los clónicos naturales los más cercanos a nosotros son los gemelos univitelinos. Sin embargo, en otros mamíferos, tales como el armadillo, la reproducción por clonación es la forma habitual, llegando a producirse hasta ocho clónicos en un parto. Así también, en algunos invertebrados sólo existen hembras que se reproducen por clonación. La producción artificial de animales clónicos se puede realizar mediante dos métodos: a) La división de embriones, un procedimiento que imita al método empleado por la naturaleza para producir los gemelos. b) El trasplante nuclear, por el cual se inyecta un núcleo a un óvulo. Este es el procedimiento por el cual en 1997 nació la célebre oveja Dolly y por el que muchos otros clónicos (ratones, ovejas, conejos, vacas) se han creado en los últimos años. El motivo principal para crear clónicos ha sido la reproducción de animales transgénicos (animales importantes para la biomedicina, biotecnología y farmacia). Últimamente, se ha planteado la posibilidad de utilizar también la clonación como un método para crear tejidos que serían utilizados en xenotrasplantes, lo cual evidentemente se aplicaría en la especie humana con fines terapéuticos. Esto último ha despertado serias discusiones referentes a la ética y a la legalidad de esta posibilidad. Realmente, la posibilidad de crear clónicos humanos adultos parece remota en vistas al gran número de embriones y "madres" que se necesitarían. Por último, se debe hacer notar que a pesar de que algunas especies se reproduzcan por clonación, la naturaleza siempre ha tendido a estimular la variabilidad entre los individuos como un método que establece características ventajosas y que ayuda a la especiación animal.

ABSTRACT

Clonic animals can be produced by both natural and artificial modes. Natural clonics are those naturally produced, such as univitelin twins. In other mammals, such as the armadillo, clonic reproduction is habitual and up to eight twins can be born. Furthermore, in some invertebrates, female populations are formed exclusively clonically. There are two mechanisms to produce artificial clonics: a) The embryo division, which imitates the method used by nature to create twins, b) Nuclear transplant, which consist in the injection of a nucleus in an egg, which was the procedure used to clone the sheep Dolly in 1997 and by which several clonics (mouse, rabbit, cow, sheep) have been produced so far. The principal purpose to create clonics has been to reproduce transgenic animals (important for biotechnology, biomedicine and pharmacy). Recently, the use of cloning procedures for the production of cell and tissues for xenotransplants has been pointed out. This possibility, which would obviously be applied to humans with therapeutic purposes, has created a great discussion. Actually, the creation of adult human clonics seems very difficult because of the great number of embryos and "mothers" needed. On the other hand, we must think that, despite some few species that naturally use cloning mechanisms, nature has been always inducing the variability as a way to get advantageous characteristics and that favours animal speciation.

La reproducción sexuada

El sistema de reproducción imperante en la gran mayoría de las especies animales es el sexuada. Este sistema está basado en la existencia de dos sexos que originan gametos (espermatozoides y óvulos o huevos), que están diseñados para encontrarse e interactuar durante el fenómeno de la fecundación. Gracias a la fecundación se origina un nuevo individuo que lleva las características genéticas paternas y maternas otorgadas por los dos gametos, y se logra además, que las características genéticas de las poblaciones se vayan mezclando.

Se supone que el sexo apareció durante la evolución de las especies en épocas muy remotas, cuando la tierra estaba poblada especialmente por especies unicelulares. Algunos autores han sugerido que la aparición de la reproducción sexual, de una forma más o menos similar a la que conocemos (con la presencia de gametos y fecundación), ocurrió hace alrededor de 2.000 millones de años en las algas verde azuladas. Lo cierto es que si analizamos

los gametos y el mecanismo de fecundación en diversas especies animales (tanto invertebrados como vertebrados), se descubren grandes semejanzas. Por ejemplo, observamos que los gametos masculinos son por lo general células con una gran movilidad (gracias a la presencia de un órgano móvil denominado flagelo) y con una estructura muy delicada si la comparamos con la de las células femeninas. Estas últimas poseen un mayor volumen y generalmente están rodeadas y protegidas por envolturas celulares o secreciones, y no suelen presentar movilidad. Así, los gametos masculinos son los que deben desplazarse para encontrar al femenino, el cual está más desarrollado para almacenar los materiales que permitirán el desarrollo embrionario. Es indudable que el proceso reproductivo, como todos los procesos fisiológicos, está regido por genes, y dadas las características que presenta este proceso en las diferentes especies animales, parece indudable que muchos de estos genes se habrían adquirido en etapas muy tempranas de la evolución. El porqué los animales seleccionaron este mecanismo sexuado para reproducirse constituye todavía una incógnita biológica, aunque no es difícil imaginar que si el sexo no existiera, la variación entre los individuos de una especie sería muy escasa, y los genomas serían entonces muy similares en los componentes de una población determinada. La reproducción sexual compromete así la variación que aparece en los individuos que componen una especie, y gracias a esta variación aparecen características que permiten a ciertos individuos enfrentarse a los factores ambientales adversos y prosperar en el medio que viven. La existencia de esta variación es el sustento del proceso evolutivo de los organismos. Estas son consecuencias suficientemente importantes en las que la reproducción sexual está implicada, y nos permiten sospechar por qué los sistemas vivos eligieron este tipo de proceso reproductivo.

La variación entre individuos no afecta sólo a los individuos sin parentesco, sino también a los hermanos, y esto se logra mediante el fenómeno de meiosis que tiene lugar cuando se originan los gametos. El complicado fenómeno de meiosis es el que provoca que los gametos provenientes de un individuo no sean genéticamente similares, y es otro factor que colabora con la diversidad genética existente entre los individuos de una especie.

Pero frente a estos mecanismos destinados a establecer variación entre los individuos de una especie, encontramos que en la naturaleza aparecen ocasionalmente individuos genéticamente iguales: los clónicos.

Clónicos naturales

Dos o más animales son clónicos cuando su constitución genética es exactamente igual. La palabra clon tiene origen griego y significa esqueje, y en relación con ello se debe hacer notar que cuando sembramos esquejes lo que hacemos es justamente clonar. Si de un geranio sacamos dos esquejes y los sembramos, las tres plantas, la originaria y las dos hijas, tendrán una constitución genética exacta. Si las tres crecen en una misma zona, reciben la misma luz y la misma alimentación, serán probablemente muy similares y sus flores muy semejantes. Pero si una de las hijas se desarrolla en una zona sombría o en un suelo con condiciones adversas, entonces crecerá poco y su aspecto externo será muy diferente al de su madre y al de su hermana. Este es un caso evidente en que el medio ambiente provoca diferencias en individuos que poseen un mismo genoma. Al igual que comentábamos para la reproducción sexual, vemos que nuevamente vuelven a enfrentarse las dos condiciones: constitución genética y factores ambientales. En el fenómeno de los geranios recién comentado, se muestra que los clónicos pueden ser muy desiguales, y es un ejemplo que se repite en numerosas especies de plantas; sin ir más lejos, en las patatas o en las originadas por bulbos.

Entre los animales encontramos también clónicos naturales. El ejemplo más habitual es el de los gemelos univitelinos o monozigóticos. Estos gemelos aparecen cuando el embrión temprano se divide originando dos individuos independientes cuya constitución genética es lógicamente igual. Los mecanismos biológicos implicados en la división del embrión no están claramente establecidos, y entre los mamíferos ocurren casos asombrosos como el del armadillo, un mamífero edentado, en el que la especie denominada de nueve bandas origina 4 gemelos univitelinos, mientras que la de doce bandas produce ocho. Los factores que provocan este fenómeno en el armadillo nunca han sido completamente aclarados.

Los gemelos univitelinos de la especie humana son verdaderos clónicos y han sido bastante estudiados respecto a sus similitudes (homologías) y diferencias. Estos análisis, desarrollados inicialmente por Galton en el siglo XIX, han mostrado que a pesar de su similitud genética, los gemelos no muestran un grado alto de homología. En los estudios realizados se han considerado innumerables características (grupos sanguíneos, características faciales, predisposición a enfermedades, etc.) y se ha demostrado que el grado de homología entre gemelos univitelinos es del 50 %,

mientras que en hermanos es sólo del 10 %. A lo largo de su vida, los gemelos van siendo cada vez más diferentes, y al igual que ocurría con los gemelos los factores ambientales van modificando la expresión de su genoma.

Clónicos artificiales

Los clónicos artificiales son aquellos creados experimentalmente. Existen dos métodos para crear estos animales: uno es la división del embrión y el otro el trasplante nuclear. El primero desarrolla experimentalmente lo que ocurre naturalmente cuando se originan los gemelos univitelinos, es decir se divide un embrión experimentalmente y los productos de esta división se introducen en el útero donde se desarrollan los gemelos. Así, se han obtenido dos, cuatro y hasta ocho individuos clónicos (gemelos) al dividir embriones de diferentes especies de mamíferos. En la década de los años 70-80 se desarrollaron de esta forma vacas, caballos y ovejas clónicas (Willadsen, 1979), y en 1997 se crearon los primeros primates (monos) clónicos (Meng et al, 1997). Mediante este procedimiento el número de clónicos que se puede obtener está limitado por el número de células en que se puede dividir el embrión.

Tabla I. Casos más destacados de clónicos artificiales obtenidos mediante un trasplante de núcleo.

Animal	Origen del Núcleo	Autor	Año
Anfibio	Embrión	Briggs y King	1952
Anfibio	Piel	Gurdon	1974
Ratón	Embrión	McGrath y Solter	1983
Oveja	Embrión	Willadsen	1986
Ternera	Embrión	First	1987
Oveja	Glándula Mamaria	Wilmuth	1997
Ratón	Granulosas/ovario	Yanagimachi	1998
Ratón	Fibroblastos	Yanagimachi	1999
Ternera	Granulosas/ovario	Wells	1999
Cabra	Embrión	Bagnisi	1999

Pero indudablemente, el hecho más destacado en la producción de clónicos ha ocurrido cuando se ha utilizado el trasplante nuclear que permite producir un número ilimitado de clónicos. Este método ha prosperado gracias al avance en las técnicas de micromanipulación embrionaria que permiten realizar una verdadera cirugía en el interior de óvulos y embriones. Mediante este método de trasplante nuclear, el patrimonio genético (el núcleo) del óvulo es extraído y posteriormente en este mismo óvulo se inyecta un núcleo extraído de una célula corporal. Los embriones originados poseerán las características genéticas del animal que ha donado la célula corporal. Si el procedimiento se repite con muchos óvulos a los que se inyectan núcleos de un mismo animal, podemos crear innumerables animales genéticamente iguales. En un primer momento se trasplantaron núcleos embrionarios al huevo, pero en 1974 J. Gurdon empleó por primera vez núcleos somáticos y creó larvas clónicas en un anfibio (Gurdon et al., 1975). Gurdon inyectó en los huevos núcleos de piel de anfibio y desarrolló diversas estrategias para comprobar que los embriones producidos eran realmente clónicos. Pero el caso más destacado ha sido el de la oveja Dolly, creada por el grupo de Ian Wilmut en el Instituto Roslin de Edimburgo en 1997 (Wilmut et al., 1997). La oveja Dolly fue creada utilizando núcleos somáticos provenientes de células de glándula mamaria. Dolly fue el único clónico que apareció después de 277 experimentos, y cuando se la cruzó originó una descendencia normal. Poco más tarde, el grupo de Yanagimachi en Hawaii (Wakayama et al., 1998) desarrolló varios clónicos utilizando núcleos de células granulosas del ovario. Estas células se utilizaron también más tarde para crear varias terneras clónicas (ver Tabla I). Todos estos resultados demostraron que era posible crear mamíferos clónicos, y que estos podían originar una descendencia normal.

Importancia y aplicaciones de los mamíferos clónicos

Es evidente que la producción de mamíferos clónicos implica un nuevo tipo de reproducción artificial. Este nuevo tipo es independiente de la sexualidad ya que se prescinde del espermatozoide, del patrimonio genético del gameto femenino y de la fecundación. El único elemento sexual que persiste es el citoplasma del óvulo, que parece ser un factor indispensable para la consecución del desarrollo embrionario y aparece como un elemento irremplazable en este sentido. Frente a esta casi ausencia de sexualidad, curiosamente mediante la clonación se puede elegir el sexo según se usen núcleos provenientes de un macho o de una hembra. Por otra parte, los

clónicos han demostrado que un genoma diferenciado (como el perteneciente a las células de glándula mamaria en el caso de Dolly, o a las células granulosas del ovario) es capaz de transformarse en un elemento totipotente y originar la multiplicidad de células que forman un individuo.

Las posibles aplicaciones de los animales clónicos han sido extraordinariamente discutidas y criticadas. Al respecto, se puede comentar que por el momento los mamíferos clónicos poseen dos aplicaciones. La posibilidad de tener varios animales genéticamente exactos es un hecho importante para la investigación biológica. En el estudio de diversos procesos normales o patológicos, así como en la investigación con anticuerpos o fármacos, los resultados se ven muchas veces obstaculizados por las variaciones individuales que presentan los animales de experimentación. En este contexto, el empleo de animales clónicos podría originar resultados más veraces. Pero quizás el mayor éxito dentro de la escasa aplicación que los clónicos han tenido hasta ahora, ha sido su empleo para reproducir animales transgénicos. Los animales transgénicos son animales que llevan uno o varios genes extraños (por ejemplo un ratón que lleva en su genoma un gen humano o el de un insecto). En estos animales el gen extraño aparece en todas las células -incluso en los gametos-, por lo que se pueden reproducir originando hijos transgénicos. Los animales transgénicos tienen un extraordinario interés para la biología, medicina y biotecnología y se están empleando como bioreactores, es decir como superproductores de moléculas de interés industrial. Muchas veces los animales transgénicos son estériles o no se reproducen bien, y es por este motivo que se ha utilizado la clonación para reproducirlos. Esta fue la razón por la cual se creó a Dolly, y por el cual recientemente se han creado cabras clónicas a partir de células de una cabra transgénica para la Antitrombina III (Bagnisi et al., 1999). Esta molécula es de utilización farmacológica y era un producto caro por la dificultad para obtenerla. Al ser secretada en la leche, esta molécula se puede obtener de forma simple y por ello se abarata increíblemente su costo. En el caso de las cabras clónicas, éstas generan la Antitrombina III en su leche y así han pasado a ser verdaderos bioreactores.

Otra posible aplicación de los mamíferos clónicos es la posibilidad de utilizarlos para trasplantes. Por este procedimiento se podrían obtener células genéticamente iguales a las del individuo afectado para reponer un órgano determinado o bien incorporar a un órgano células modificadas genéticamente.

Por último, los clónicos también podrían utilizarse en el caso de una baja tasa de desarrollo embrionario, lo que puede ocurrir en animales de experimentación o en el caso de parejas humanas que asisten a la clínica de fecundación *in vitro*. Si se obtienen pocos embriones o embriones de mala calidad, la posibilidad de dividirlos podría aumentar el número de ellos. Asimismo, en algunos casos de esterilidad, el clonaje podría originar un hijo que por lo menos llevaría las características de uno de los padres. Aunque estas últimas posibilidades han dado origen a todo tipo de conjeturas, hasta el momento no han sido realizadas.

La creación de humanos clónicos

De lo comentado en el párrafo anterior se desprende la pregunta de si es posible crear clónicos humanos y cual sería su interés. Se debe hacer notar que existirían tres dificultades si se intentara la creación de clónicos en nuestra especie. En primer lugar están los factores éticos y en segundo los legales, que actualmente se aplican en muchos países. Aquí nos referiremos sólo al tercer factor, el biológico. La creación de clónicos humanos parece por el momento extraordinariamente difícil, sino imposible, por motivos fundamentalmente técnicos. Para realizar clónicos se requiere un gran número de embriones, de madres naturales y de alquiler. Para crear la oveja Dolly fueron necesarios 277 experimentos y se obtuvo un éxito de un 0.3 %, y en el caso de los clónicos creados por Yanagimachi utilizando células granulosas el éxito fue de un 2.8 % (Wakayama et al., 1998). Supongamos lo que se necesitaría para producir un humano clónico a partir de 100 experimentos. Por los procedimientos utilizados en las clínicas de fecundación *in vitro*, se sabe que el número de óvulos obtenidos normalmente después de un tratamiento suele ser de entre 8 y 14. Por lo tanto, para tener 420 óvulos, necesitaríamos alrededor de 35 mujeres. Se debe tomar en cuenta que en la experimentación con micromanipulación se suelen perder un cierto número de embriones. Supongamos que sólo se pierden 100. Tendríamos entonces 320 embriones disponibles después de la introducción del núcleo somático en el interior del óvulo. Estos embriones deben ser posteriormente transferidos a úteros para que ocurra la gestación. Por lo general, no se suelen transferir más de 4 embriones a una madre. Por ello, para transferir los 320 embriones, se necesitarían 80 madres de gestantes. Estas madres originarían 100 recién nacidos (ya que se debe tomar en cuenta que un porcentaje de ellas dará origen a gemelos). Con suerte, después de este procedimiento se podría obtener un humano clónico.

Parece evidente que tal como ocurre con los gemelos, en los clónicos también actuarían las condiciones ambientales y el humano obtenido podría ser bastante diferente en muchas de sus características al original. Teniendo en cuenta lo anterior nos podemos preguntar si tiene sentido desarrollar este aparatoso experimento para obtener un clónico con expectativas tan poco fiables.

Recientemente (Agosto de 2000) se ha acentuado la polémica sobre la creación de humanos clónicos, ya que en el Reino Unido se podrá trabajar con embriones humanos a fin de realizar clónicos con fines experimentales para aplicarlos a trasplantes. Esta posibilidad ha creado la polémica sobre la posible utilización de los embriones sobrantes en las clínicas de fecundación in vitro con este propósito. Al respecto se debe comentar que en tales clínicas (que se calcula son más de 1500 en el mundo) los embriones sobrantes se guardan congelados por periodos variables de tiempo. Así, la idea de la utilización de clónicos en humanos vuelve a aparecer basada en la posibilidad de usar los embriones como productores de células que tengan características genéticas conocidas y que evidentemente podrían ser la solución terapéutica para diversas alteraciones. Parece muy probable que se desarrollen investigaciones serias al respecto y que en un futuro cercano este tema sea uno de los más comentados dentro de la ciencia mundial.

Conclusiones

El desarrollo de los mamíferos clónicos es un gran logro de la biología de fin de siglo, y no cabe duda que en el futuro los animales clónicos se desarrollarán más ampliamente. Probablemente, con los clónicos ocurrirá lo mismo que con los animales transgénicos que aparecieron en 1980, y que hoy son creados y utilizados por numerosos laboratorios en todo el mundo. La producción de mamíferos clónicos se practicará fundamentalmente con el fin de reproducir líneas de animales transgénicos, que de otra forma se perderían. Esta aplicación está claramente vinculada con la obtención y multiplicación de bioreactores, los que tienen un gran interés industrial. Tampoco se puede descartar la posibilidad de una posible aplicación de los clónicos en algunos casos muy particulares de trasplantes.

Por último, vale la pena comentar que, en todos los casos en que se manipula el embrión o la fecundación, el porcentaje de éxito es escaso. Este

parece un punto por el momento difícil de superar, aunque se supone que con el desarrollo de nuevas tecnologías este porcentaje podría ser superado. Pero por otra parte, debemos pensar que mediante las tecnologías diseñadas para obtener los animales manipulados, alteramos lo que la naturaleza consiguió para cada especie en millones de años de evolución. En el caso de los animales clónicos se ha dejado de lado al fenómeno de la reproducción sexual, un hecho que, como explicábamos, parece fundamental para el progreso biológico de la mayoría de las especies que pueblan el planeta. Así, no es extraño que los sistemas biológicos, que han atravesado por tantas dificultades a lo largo de su historia evolutiva para funcionar en armonía con el ambiente, se defiendan de alguna forma de lo que podríamos denominar como “intrusismo” de los investigadores. Volviendo a la idea del principio de este artículo, si la vida en la tierra se basa en parte en la variación y diversidad, pensamos que los métodos creados para alterar estas características deberían ser utilizados bajo un estricto control y su aplicación tendría que ser realizada sólo en situaciones muy particulares.

Addendum

Desde que se escribió este artículo se han sucedido una serie de hechos en relación con la utilización de células madres clónicas para su posible aplicación en trasplantes, así como con la producción de clónicos en humanos. Respecto a lo primero se ha desarrollado un enorme interés en el tema y muchos laboratorios están trabajando en esta posibilidad. Respecto a la producción de clónicos humanos que supuestamente se han producido en USA y en Italia, la falta de una confirmación estrictamente científica de estos casos hace dudar de su autenticidad.

Referencias

- Willadsen, S.M. (1979) *Nature* 272: 298-300.
- Meng, L., J.J. Ely, R.L. Stoffer, D.Wolf (1997) *Biology of Reproduction* 57:454-459.
- Gurdon, J.B., L.A. Laskey, O.R. Reeves (1975). *J.Embryology and Experimental Morphology* 34:93-112.
- Wilmuth, I., A.Schieke, J.Mewik, A.Kind (1997) *Nature* 385:810-813.
- Wakayama, T., A.C.F.Perry, M.Zucotti, K.R.Johnson, R.Yanagimachi (1998). *Nature* 394:369-374
- Bagnisi, A. y colaboradores (1999) *Nature Biotechnology* 17: 456-461

Pedro Esponda nació en Valparaíso (Chile) donde hizo sus estudios en la Universidad de Chile. Desde 1969 trabaja como Investigador en el Consejo Superior de Investigaciones Científicas en Madrid. Ha sido Profesor en las Universidades Autónoma de Madrid y de Alcalá de Henares y durante tres años fue Research Associate en la Cornell University de Nueva York. Ha trabajado en centros de Inglaterra, Francia, Italia, Brasil y Chile. Se ha dedicado al estudio de diversos problemas relacionados con la reproducción animal y a publicado más de 100 trabajos en revistas internacionales, así como dos libros.