

# LA CLONACIÓ DELS ANIMALS DOMÈSTICS: EVOLUCIÓ RECENT I APLICACIONS POTENCIALS

Yvan Heyman\*

La transferència de nuclis de cèl·lules d'un organisme en el citoplasma d'òvuls receptors sense nucli permet la producció d'animals que tenen el mateix genoma i constitueixen un clon. Des de fa una desena d'anys, les cèl·lules d'embrions joves, els nuclis de les quals són encara totipotencials, han estat afegits amb èxit als bovins, els ovins, les cabres, els conills i els porcs. Més recentment, després de l'anunci l'any 1997 del naixement de l'ovella Dolly, sortida d'un nucli de cèl·lules d'un animal adult, les recerques es duen a terme de manera activa sobre la clonació a partir de cèl·lules diferenciades o somàtiques. L'interès de la clonació recau en el fet de poder disposar de cèl·lules provinents d'un animal amb característiques conegudes.

Aquest article fa referència a l'estat actual de la clonació somàtica, en què, globalment, els rendiments, en el cas de la vaca i l'ovella, són encara molt baixos. El percentatge de nuclis trasplantats que arriben fins al naixement d'un animal jove s'estima entre el 0,3 % i el 2 %, segons els equips i el tipus de tècnica

cel·lular utilitzades. A més a més, l'eficiència de la clonació somàtica és encara limitada, a conseqüència d'una mortalitat fetal i perinatal relativament important. Malgrat això, nombroses aplicacions són possibles en selecció: per avaluar millor el valor genètic dels reproductors (bovins lleterers) i per difondre els gens interessants, i també en el sector biomèdic que associa la clonació amb la transgènesi per tal de fer produir proteïnes humanes als animals.

## INTRODUCCIÓ

Un clon pot ser definit com el conjunt de dos o més individus amb una base genètica idèntica derivada d'una reproducció asexual a partir d'un sol pare. El terme *clon* s'ha utilitzat per designar animals que s'han obtingut amb la tècnica del trasplantament de nuclis. En aquest procés, el nucli d'una cèl·lula donant (*carioplast*) es transfereix a una cèl·lula receptora (*citoplast*) de la qual s'ha extret el seu material genètic.

S'han obtingut de manera satisfactòria mamífers clonats mitjançant la transferència de nuclis originaris d'embrions en un estadi inicial de desenvolupament

\* INRA, Jouy-en-Josas. Unitat de Biologia del Desenvolupament i Biotecnologies.

a ovòcits madurs sense nucli. El primer animal de granja clonat va ser l'ovella, seguida del vaquí, el porc, el conill i la cabra. Des de fa una dècada, la clonació d'embrions ha estat desenvolupada per diferents grups d'investigadors, especialment en les espècies bovines.

Malgrat això, amb la clonació d'embrions, el nombre de potencials descendents està limitat pel nombre limitat de nuclis donants disponibles en una fase inicial de l'embrió pare. Un sistema per augmentar el nombre de blastocists disponibles a partir de l'embrió pare és reciclar la primera generació de la transferència d'embrions i utilitzar-la com a donants de la segona i la tercera generació de transferència nuclear (*reclonació*), però sembla que la tècnica està limitada solament a la tercera generació. Algunes recerques recents sobre l'ús dels cultius de cèl·lules d'embrions i, després, de cèl·lules diferenciades com a possible font de nuclis per a la clonació ha reactivat l'impacte de la clonació. El treball sobre ovelles en relació amb el naixement de tres descendents viables a partir de nuclis de cèl·lules epitelials derivades en embrions ha generat noves expectatives en la clonació, a les quals va seguir, un any després, l'anunci del naixement de l'ovella Dolly. Va ser realment el naixement d'una nova era en la clonació somàtica dels animals domèstics i, en especial, del bestiar vaquí.

## **SITUACIÓ ACTUAL DE LA CLONACIÓ SOMÀTICA EN EL VAQUÍ**

Durant els darrers dos anys, molts laboratoris d'arreu del món, especialment a Amèrica de Nord, al Japó, a Austràlia o

a Europa, han desenvolupat la tècnica de la transferència de nuclis, a fi assolir la clonació somàtica en el vaquí. Des del primer cas, de dues vedelles nascudes d'una transferència de nuclis provinents de fibroblasts fetals el 1988, se n'han obtingut diferents tipus de cèl·lules procedents de teixits postnatsals, com ara pell, múscul, ovari i, fins i tot, sang. A causa del feble nombre de descendents vius obtinguts fins ara, la relació entre l'èxit o el fracàs i l'origen de les cèl·lules donants no pot ser establert encara. Els resultats suggereixen que, en la major part dels teixits, com a mínim algunes cèl·lules poden multiplicar-se *in vitro* i poden ser reprogramades totalment després de la clonació. Des del moment en què en la major part dels teixits, fins i tot en la sang, hi ha cèl·lules que són capaces de dividir-se en un cultiu i que no estan en un estat de diferenciació, no és possible certificar que els descendents viables obtinguts després d'una transferència nuclear hagin derivat de cèl·lules diferenciades, de cèl·lules mare o de cèl·lules parcialment diferenciades.

*In vitro*, el nivell de desenvolupament dels embrions reconstituïts en blastocists varien del 5 % al 50 % d'acord amb les línies de cèl·lules i del protocol utilitzat. En la clonació somàtica, la possible influència de l'edat de l'animal donant sobre l'eficiència és encara objecte de debat. La compilació de la informació recent no posa de manifest cap incidència de l'edat en el potencial de desenvolupament *in vitro*. Si considerem el cas de fibroblasts originaris de biòpsies de pell com una font de cèl·lules, la proporció d'embrions transferits desenvolupats en blastocists *in vitro* és del mateix nivell tant si es tracta de

cèl·lules fetals com d'animals adults. Resultats positius de clonació s'han obtingut a partir de cèl·lules somàtiques d'un toro de la raça Brahman de vint-i-un anys i d'un toro de raça negra japonesa.

Després de la transferència dels embrions derivats de cèl·lules somàtiques clòniques en l'úter dels animals receptors, només el 10 % dels blastocists trasplantats en les vaques acaben el desenvolupament. Aquest baix nivell de gestació és degut a un baix nivell de mortalitat embrionària i fetal en diferents estadis de la gestació. S'ha constatat un elevat nivell d'avortaments. Aquestes aportacions tardanes estan freqüentment relacionades amb la hidroalantosi o a un anormal desenvolupament de la placenta. L'origen d'un elevat nivell d'avortaments i la freqüent mortalitat perinatal en els clons somàtics no s'ha establert clarament, però les observacions suggereixen que efectes epigenètics poden afectar la correcta reprogramació de l'activitat dels gens en la transferència nuclear d'embrions.

L'eficiència total de la clonació de cèl·lules somàtiques adultes és encara baixa; la mitjana dels descendents que poden esperar-se de la transferència de cent cèl·lules somàtiques en ovòcits receptors es troba entre el 0,3 % i el 5 % en les espècies bovines, i varia segons el tipus de cèl·lula i la tecnologia emprada. El nombre total de vedells nascuts a partir de cèl·lules somàtiques fins avui és encara limitat: pot ser estimat en uns dos-cents animals, la major part a Amèrica del Nord, al Japó, a Austràlia i a Nova Zelanda. Aquests animals han nascut a partir del 1998, i els més vells no són encara adults; per això no hi ha

encara gaire informació sobre la viabilitat a llarg termini dels vedells produïts mitjançant la transferència nuclear d'embrions. En el cas del vaquí un nombre limitat de toros clònics han arribat a la pubertat i estan començant a produir semen. Malgrat això, algunes patologies poden afectar part de les vaques clòniques després del naixement. La síndrome de l'elevat nombre de descendents (LOS), que esdevé després de la transferència d'embrions de cultiu en ovelles i vaques, també passa després de la clonació somàtica. Les patologies poden afectar només una funció de l'organisme, com ara les funcions de respiració o el sistema circulatori, o fins i tot el sistema immunològic, com és el cas de la hipoplàsia del tim. Per tant, els efectes a llarg termini són difícils d'estudiar en el cas de les espècies que, com el vaquí, tenen un llarg interval generacional.

## **APLICACIONS DE LA CLONACIÓ SOMÀTICA EN EL VAQUÍ**

### **Creació de nous models per a la recerca sobre biologia del desenvolupament**

La generació de descendents genèticament idèntics a partir d'un mateix pare pot ser una eina valuosa per a la recerca agronòmica. Per exemple, en el vaquí, grups de vedelles clòniques poden ser utilitzades com a models animals per a experiències sobre estudis de patologia, comportament nutricional o avaluació reproductiva. A França, a l'INRA hem desenvolupat aquest sistema per minimitzar el nombre d'animals necessaris per a un experiment.

A més a més, el treball recent relatiu a la transferència interespecífica que utilitza ovòcits de vaquí com a receptors de nuclis d'altres espècies obre una via per entendre millor les especificitats de cada espècie en el desenvolupament precoç. La transferència de nuclis entre espècies pot tenir un potencial clínic per a la medicina humana, ja que permetria la generació de línies mares d'embrions humans procedents de cèl·lules somàtiques d'un pacient. L'ús d'ovòcits bovins pot sobrepassar algunes consideracions ètiques associades amb la utilització d'embrions humans amb la finalitat de produir línies de cèl·lules per teràpies humanes.

### **Aplicacions potencials als programes de millora**

En el vacum, la major part de la millora genètica s'obté mitjançant la inseminació artificial amb toros seleccionats. Malgrat això, la difusió del potencial genètic d'un reproductor d'alt valor es pot perdre per la mort accidental del progenitor. La clonació somàtica permet superar aquest risc generant una genocòpia del toro si es comprova que és d'elevada qualitat. Un treball recent a Itàlia ha posat de manifest que és possible obtenir descendents d'un toro vell mitjançant inseminació artificial utilitzant limfòcits com a font de nuclis.

Una difusió més bona de les millors femelles pot obtenir-se també mitjançant la clonació somàtica de vaques d'alta qualitat. Un bon exemple d'aquesta aplicació és un cas recent a Nova Zelanda, en el qual, a partir d'una línia de cèl·lules primàries procedents de cèl·lules granuloses obtingudes per l'aspira-

ció dels fol·licles d'una vaca frisona d'alt nivell genètic utilitzant una sonda vaginal dirigida per ultrasons, s'han generat, com a mínim, deu vaques clòniques genèticament idèntiques a la vaca donant adulta.

La clonació somàtica de femelles pot ser també molt útil per millorar el progrés genètic en els programes convencionals de millora en els quals s'utilitza un sistema regular de transferència embrionària. Alguns càlculs posen de manifest que la utilització de la clonació somàtica de vaques d'alta qualitat pot fer augmentar d'un 20 % el progrés genètic anual quan es poden obtenir de tres a cinc vedelles clòniques de cada vaca donant.

En les races de vacum de carn, la clonació pot ser aplicada a la multiplicació de genotips molt valuosos. Aquest és el cas de races del Japó, on hi ha un petit nombre d'animals amb un nivell molt alt de greix infiltrat en el múscul. Atès que la qualitat de la carn és un paràmetre molt variable, la clonació dels millors animals adults pot permetre l'estandardització de la qualitat d'alt nivell. Hi ha diferents grups d'investigadors que estan desenvolupant la transferència de nuclis amb aquest objectiu.

### **Clonació somàtica per a la millora de l'eficiència de la transgènesi**

En el cas d'animals grans, com el vacum, s'ha arribat a la modificació genètica a través de la injecció de gens interessants en el pronucli d'un zigot. Aquesta tècnica té moltes limitacions: el DNA pot ser afegit, però no eliminat ni modificat;

a més a més, la inserció a l'atzar pot produir una transgènesi amb una expressió erràtica i els animals poden esdevenir de tipus mosaic. L'eficiència total de la injecció pronuclear amb l'objectiu de produir descendents és molt baixa. La transferència nuclear de cèl·lules somàtiques eliminarà aquest problema.

La major part de les cèl·lules somàtiques poden ser cultivades *in vitro* diverses vegades fins a arribar a ser un descendent viable després de la transferència nuclear. S'han produït vedelles utilitzant fibroblasts cultivats fins a quinze vegades abans de la transferència nuclear. Aquest període de cultiu permet la inserció d'un gen, per transfecció, en el nucli d'una cèl·lula somàtica i seleccionar la línia de cèl·lules modificades. En el futur, la diana de gens mitjançant la recombinació d'homòlegs serà possible en el vaquí. Els primers resultats ja s'han obtingut en ovelles. La recombinació d'homòlegs permetrà que un gen interessant pugui ser inserit en un lloc concret d'un cromosoma del genoma del boví amb l'objectiu de facilitar l'expressió, en la glàndula mamària, per exemple, i produir proteïnes nutritives o terapèutiques directament en la llet. Serà també possible reemplaçar l'albumina sèrica bovina per la forma humana, a fi d'obtenir una producció rendible d'albumina sèrica humana en la llet de vaca. Utilitzar aquestes línies de cèl·lules somàtiques com a font de nuclis per a la clonació permetrà la producció d'una primera generació de descendents d'ídents descendents tots transgènics, sense l'inconvenient del mosaicisme. A més llarg termini, la combinació d'aquesta tecnologia amb la informació del mapatge del genoma boví pot permetre la selecció de

segments de DNA que codifiquin per a caràcters específics de producció, com ara els de resistència genètica a malalties, la qualitat de la carn o el creixement.

## **Races en perill**

Si la clonació somàtica s'utilitza de manera generalitzada, es pot generar un risc potencial de pèrdua de la variabilitat genètica. Això podria passar si cents de còpies del mateix animal s'utilitzessin per a la producció animal, la qual cosa encara no es dona. Oposadament, les cèl·lules somàtiques poden ser una eina molt vàlida per mantenir i desenvolupar races en perill d'extinció (de vaques o d'altres espècies). Disposant de semen de diferents toros, un nombre molt limitat de femelles poden ser multiplicades mitjançant la clonació i després poden ser inseminades amb el semen emmagatzemat, a fi de recrear les diferents famílies i restablir un mínim de la diversitat genètica.

Recentment, a Nova Zelanda, la clonació somàtica s'ha utilitzat per preservar la darrera vaca de la raça vermella de l'illa d'Enderby, i com a mínim quatre filles s'han obtingut d'aquesta única femella supervivent.

Aquesta aplicació de la clonació s'ha de considerar des d'ara. Quan es tracta de conservar una raça d'animals domèstics en perill, no és possible esperar una dècada fins que la tecnologia de la clonació estigui suficientment desenvolupada, amb la consegüent pèrdua d'animals. El teixit més pràctic per recollir i emmagatzemar és la pell. Pot obtenir-se fàcilment o ràpidament a partir d'una biòpsia de pell, no invasiva, que té un risc mínim per a la sa-

lut de l'animal donant. Actualment hi ha una creixent experiència sobre la col·lecció, el cultiu i el crioconservació de les cèl·lules. Aquest és el cas de les cèl·lules de fibroblasts que creixen *in vitro*, procedents de biòpsies de pell d'una vaca viva. Generalment, després d'una desinfecció, una biòpsia de 5 mm a l'orella és col·locada en una solució salina isotònica a una temperatura de 4 °C. La mostra és traslladada al laboratori per a la fase de multiplicació. Un cultiu inicial es produeix en els primers 6-8 dies, a partir del qual es poden generar subcultius cada tres dies. Posteriorment, les cèl·lules són tractades amb tripsina i congelades en nitrogen líquid fins que es pugin utilitzar com a nuclis donants.

Actualment és possible emmagatzemar material genètic de races en via de desaparició a partir de petites biòpsies de pell d'animals vius, la multiplicació de les cèl·lules *in vitro* i la congelació de les cèl·lules en nitrogen líquid per a una utilització posterior, quan la transferència nuclear sigui més eficient.

## LA SITUACIÓ EN ALTRES ESPÈCIES

### Ovelles i cabres

Després del naixement de la Dolly, els petits remugants s'han utilitzat per desenvolupar clonacions somàtiques conjuntament amb modificacions genètiques, amb la finalitat de produir productes farmacèutics. En aquesta situació, la major part dels treballs s'han dut a terme en empreses biomèdiques. Un transgèn molt important, l'alfa-1-antotripsina, s'ha inserit en fibroblasts fetals d'ovelles, i la transferència nuclear d'a-

questes cèl·lules ha permès la producció de xais transgènics. Un primer estudi indica que la recombinació homòloga s'ha pogut dur a terme en l'oví, i s'ha demostrat que és possible considerar les cèl·lules somàtiques com a portadores de gens diana i combinar-les per transferència nuclear a fi de generar ovelles transgèniques que poden expressar la proteïna humana en la seva llet.

La cabra és utilitzada per una altra empresa (Genzyme Transgenic Corporation) per produir femelles que porten un transgèn que codifica per a l'expressió de l'antitrombina III humana en la seva glàndula mamària. En aquestes espècies, la transferència nuclear de cèl·lules somàtiques és més eficient que la microinjecció per generar animals transgènics, ja que més d'un 5 % dels embrions obtinguts per transferència nuclear han produït descendents sense mosaïcisme.

### Porcs

Moltes de les recerques amb aquests animals estan dirigides a la clonació somàtica. L'objectiu és obtenir òrgans de porc disponibles per al xenotrasplantament als humans. Malgrat tot, és absolutament necessari prevenir la síndrome de reacció hiperaguda (HAR) en els òrgans que s'han de trasplantar mitjançant la tècnica d'elecció gènica. Això implica la producció de porcs donants amb el gen de la  $\alpha$ -1,3-galactosiltransferasa (GT). L'eliminació de l'activitat d'aquest enzim suprimeix l'expressió de la GT i redueix molt l'aparició de l'HAR. Les cèl·lules modificades poden ser utilitzades com a font de nuclis per a la clonació, a fi de

generar garrins, els òrgans dels quals poden ser utilitzats per al xenotrasplantament. Malgrat això, hi ha nombroses dificultats que s'han de superar encara. Fins ara s'han publicat molt pocs estudis, però recentment s'ha anunciat que han nascut garrins provinents de clonacions somàtiques.

### Conills

Fins avui no s'han obtingut descendents provinents de clonacions somàtiques en conills en el nostre o en d'altres laboratoris. Mentrestant, sí que s'han obtingut *in vitro* desenvolupaments cel·lulars fins a l'estadi de blastocists, després de la transferència nuclear de cèl·lules de cúmuls adults en ovòcits enucleats, però els embrions reconstituïts no continuen després de la implantació. Malgrat això, si esdevé satisfactòria, la clonació en conills pot ser un model molt útil per estudiar algunes malalties humanes.

### CONCLUSIONS

En les espècies domèstiques, la transferència nuclear de cèl·lules somàtiques provinents de fetus o d'animals adults està millorant ràpidament, i assolirà molt ràpidament i de manera econòmica algunes de les seves potencials aplicacions, especialment en la indústria biofarmacèutica. Malgrat això, les aplicacions a gran escala en l'àmbit agrícola de la clonació somàtica tenen molts reptes per superar abans d'assolir un nivell suficientment desenvolupat.

A més de les dificultats biològiques i tècniques que s'han de resoldre per millorar l'eficiència del procés, s'hauran de tenir en consideració les qüestions ètiques. En relació amb l'acceptació d'aquestes tècniques, la situació sembla molt diferent entre països. La recerca i l'aplicació han de tenir en consideració aquest aspecte amb vista a una seguretat i un benestar màxims per als animals.

**TAULA I.** *Desenvolupament potencial de la transferència d'embrions a partir de diferents fonts de cèl·lules adultes en el vaquí.*

Tipus de cèl·lula (teixit)	Nombre d'embrions reconstituïts	Nombre de blastocists		Vedelles nascudes (%)
		Total (%)	Transferits	
cúmulus (ovari)	47	18 (49)	6	5 (83)
granulosa (ovari)	552	152 (27)	100	10 (10)
epitelial (oviducte)	94	20 (23)	4	3 (75)
epitelial (glàndula mamària)	140	25 (18)	4	1 (25)
fibroblasts (pell)	840	159 (19)	133	9 (6,8)
leucòcits	698	124 (18)	50	1 (2,0)