

Clones en el contexto de la investigación con células madre embrionarias.

Por Natalia López Moratalla
Catedrática de Bioquímica

1. ¿Cómo se reconoce la existencia de un nuevo individuo de nuestra especie? El carácter de “pre-individuo”.

El progreso espectacular en el campo de la biotecnología y biomedicina regenerativa, como en los grandes conocimientos científicos, puede conducirnos a que no se vea más allá de lo fáctico y las posibilidades que se ofrecen a la intervención técnica en los procesos vitales. El deseo de aliviar el sufrimiento y curar una enfermedad constituyen un deber de los científicos, que obviamente merece el apoyo de la sociedad. Sin embargo, este deber no es absoluto e incondicional; por bueno que sea el fin no puede justificar cualquier medio. El debate ético actual en torno a la práctica de la fecundación in vitro, los embriones humanos excedentes y las promesas de la utilidad terapéutica de las células madre embrionarias exige, como punto de partida, el respeto por todo lo que debe seguir siendo intocable: la vida de todo ser humano, sea cual sea su “calidad” biológica.

Un debate racional tiene que estar basado sobre unos mismos presupuestos mínimos. Y el núcleo de ese mínimo ha de ser, al menos, el imperativo de que ningún ser humano puede ser instrumentalizado, ni menos aún generado y programado, en función de algo que no sea él mismo. Ésta es, por decirlo así, la ley fundamental de cualquier actuación humana. Y la actividad investigadora es actividad humana de gran valor por el servicio que supone, tanto en lo que se refiere a obtener nuevos conocimientos, como en mejorar las condiciones de vida y la salud. El posible acostumbramiento a manipular, y a poner al servicio de la investigación biomédica y la tecnología derivada de ella, los materiales biológicos que son la base misma de los procesos vitales, no debería nublar nunca el hecho indiscutible de que el ser humano no puede ni debe estar sometido a planes de montaje y desmontaje.

No se trata, como a veces se pretende, que algunos “fundamentalistas” tengan la crueldad de oponerse a un tratamiento médico más o menos novedoso. Es un argumento falaz atribuir falta de racionalidad -basándose en que se trata de un planteamiento religioso o confesional- el defender y exigir un mínimo, al menos, de principios inamovibles para un debate bioético. Lo contrario no es racionalidad, buen sentido, tolerancia y exclusión del dogmatismo; es simplemente imposibilidad de debate. Los términos extremos no se reducen simplemente a posturas ilustradas, racionales, modernas y progresistas frente a posturas conservadoras religiosas. Se trata de poder analizar y enfocar, con las perspectivas que ofrece el desarrollo del conocimiento científico actual, qué propuestas técnicas son más favorables a la dignidad de la vida y de la persona. Analizar con objetividad si una propuesta es un avance en cuanto al respeto a la vida y a la persona, o por el contrario es un retroceso en lo humano por novedoso que sea técnicamente. Para ello se necesita conocer al valor objetivo de la propuesta técnica en sí misma. Pero, la decisión de rechazar las propuestas de investigar con los embriones humanos y la decisión de establecer para ellos las mismas exigencias que para los nacidos es un pre-requisito para un debate racional.

El rigor que debe presidir las decisiones legales y de política científica ha de tener en cuenta que los argumentos a favor o en contra de una determinada propuesta de manipulación de material humano deben ser científicos. Desde la exigencia de que la vida del ser humano tiene que seguir siendo intocable, y cada ser humano respetado como un valor por sí mismo, los límites a nuestra experimentación son y deben seguir siendo cuestiones a resolver en y desde el rigor y el método propio de las ciencias biomédicas. El conocimiento de la realidad permite moderar nuestro afán de poder, basado en ir montando y desmontando vida y alcanzar el reto para un progreso científico

capaz de “montar” células madre embrionarias, en el caso que nos ocupa, sin “desmontar” embriones humanos.

1.1. Individuo de la especie humana

La cuestión del estatuto del embrión humano no se plantea con relación a la pertenencia a la especie. En efecto, cada viviente es necesariamente individuo de la especie, que forman quienes comparten el mismo patrimonio genético. Cada nuevo ciclo de transmisión de vida humana se inicia a partir de una célula única –denominada cigoto– formada por un proceso en varias etapas que comienza en la fecundación del gameto materno, el óvulo, por un gameto paterno, el espermatozoide. La célula formada por tal fusión ha de adquirir el fenotipo cigoto: una célula única polarizada y asimétrica capaz de dividirse en dos blastómeras desiguales entre sí y diferentes al cigoto. Sólo así, el cigoto puede dar paso a la nueva etapa vital de embrión bicelular, en que las multiplicaciones celulares precisas le permitirán pasar por la fase tricelular, tetracelular, etc. La prole de las dos primeras blastómeras es diferente desde esa primera división celular y tienen diferente destino en el embrión. El cigoto es el estado primordial de un nuevo individuo..

Ahora bien, ¿puede afirmarse que toda célula procedente de la fusión de gametos femeninos y masculinos (o por activación partenogénica de un óvulo o por transferencia de un núcleo somático a un óvulo) es un cigoto? Y, por tanto, al conjunto de células que se deriven de ella, ¿se puede considerar, siempre y propiamente, un embrión? La respuesta no es simple y exige conocimientos científicos, algunos de los cuales están siendo investigados todavía. Pero esa respuesta no puede darla más que la ciencia.

En principio, y atendiendo sólo a las características morfológicas, de un conjunto de células con fenotipo embrionario, y que están creciendo en un medio adecuado, se podría afirmar tanto que son células humanas vivas en multiplicación, como que son un embrión precoz (o temprano, en fase previa a la implantación). La ambigüedad de las respuestas a la pregunta acerca de qué es realidad embrionaria y qué no es, ni ha sido nunca, un embrión no es ambigüedad de la realidad viva. El criterio morfológico resulta insuficiente para definir con precisión de qué realidad se trata. Además, las manipulaciones técnicas, que el progreso científico ha hecho posible, provocan cambios intencionados en los procesos de transmisión de la vida, de acuerdo con los intereses que se persiguen, y por todo esto se necesita un notable esfuerzo de clarificación. Se requiere un criterio biológico nítido, que no deje lugar a dudas acerca de la diferencia real entre materia viva más o menos organizada y viviente individual.

Más aún, algunos han negado a cualquier embrión temprano el carácter de individuo, ya que consideran que no es más que un conjunto celular pre-embriionario, ordenado de tal modo que puede dar lugar tanto a uno como a dos individuos gemelos, o a ninguno. En el sentido de este “pre” hay que hacer notar que el término embrión temprano se ha aplicado también a realidades bien distintas: el mal llamado embrión partenogénico, porque no es un embrión (al menos en la mayoría de las especies de mamíferos y desde luego en primates) y al conjunto celular proveniente de una transferencia de núcleos sin reprogramación porque no es un cigoto que pueda desarrollarse por tanto como embrión. De modo natural, o provocado en el laboratorio como mostró el equipo de la empresa ACT en 2001, la activación de un óvulo sin fecundar (partenogénesis), lo que siempre se definió como huevo huero, se multiplica y las células se organizan en un conjunto, una esfera, la mola, que nunca será un embrión porque nunca un simple óvulo activado fue un cigoto. De forma siempre y necesariamente artificial la transferencia de un núcleo a un oocito al que se le ha quitado el suyo no es más que un ovonúcleo, que requeriría toda una reprogramación del mensaje genético para adquirir el carácter de cigoto. Proceso que al menos en primates está, al menos por ahora, lejos de lograrse.

En el caso del hombre esta cuestión es esencial, ya que todo ser humano, y sólo el viviente de la especie homo sapiens, es persona que reclama respeto. Por el contrario carece de realidad personal cualquier material celular con genotipo humano capaz de multiplicarse, tener alguna actividad biológica, pero que no constituye una realidad orgánica, unitaria; sencillamente no es un todo orgánico, no es un individuo. Ciertamente el proceso de desarrollo es continuo con etapas que se suceden en el tiempo y en el espacio (en las diversas zonas del organismo en formación); y además, y de forma gradual, van emergiendo en momentos precisos propiedades nuevas, cualitativamente diferentes a las existentes en un momento anterior. Pues bien, como es propio de lo vivo, el todo unitario, el organismo, no es igual, sino que es más, que la suma de las partes. Es un individuo, un hombre. Y ese avance continuado hacia una progresiva y cada vez mayor complejidad requiere el medio intracelular, el medio que suponen las otras células del mismo organismo y el medio materno en que se desarrolla la vida intra-uterina. Esto significa que la viabilidad real de un embrión precoz es plenamente dependiente de las circunstancias, de las condiciones del medio, en que se le sitúa. La viabilidad es dependiente del medio pero no la realidad.

Con la aparición de un viviente con fenotipo cigoto humano, una persona humana, se constituye una realidad con capacidades potenciadas al nivel específico del hombre. Cada individuo de nuestra especie es persona: el ser del hombre es ser personal. Y es el ser lo que refuerza, eleva, indetermina la emisión del mensaje genético humano (recibido en la dotación genética aportado por los padres) penetrándole de libertad. Es el carácter de persona lo que libera a cada hombre del sometimiento de lo biológico, del automatismo de los procesos biológicos. La emisión del programa genético del hombre está indeterminado en tanto que está abierto a incorporar la información que procede de su capacidad de relación, su relacionabilidad constitutiva, a la emisión del programa. Y a su vez se determina, se decide respecto a sí mismo. La vida humana no es sólo biología sino, para cada hombre, tarea a realizar. Por tanto, aquello que es específico del ser humano (la apertura) ha de estar intrínsecamente insertado en la dinámica de la génesis misma de cada individuo. O, dicho de otro modo en cuanto hay viviente humano existe un ser personal.

Sin pretensión de dar nomenclatura nueva a las etapas biológicas de un individuo en constitución y sólo como aclaración terminológica, podemos decir que el prefijo “pre” no puede darse al embrión. El conjunto celular derivado del desarrollo embrionario de un cigoto -sea cual sea la forma en que se ha formado- no es un preembrión, será en embrión preimplantatorio -esto es, en fase previa al inicio de la implantación en el útero materno. La única realidad preembrionaria es el cigoto en constitución durante la fecundación: la realidad célula mixta proveniente de la fusión de los gametos o la célula mixta formada artificialmente por la transferencia de un núcleo a un oocito desnucleado, el ovonúcleo. Sólo estos precigotos -tampoco los gametos sin fusionar- son realidades preembrionarias. Ambos tipos de precigotos requieren una programación intrínseca en el primer caso e inducida artificialmente en el segundo para constituirse en individuo en estado unicelular o cigoto.

2. La realidad cigoto y las realidades biológicas “ovonúcleo” y “óvulo activado” de mamíferos y primates.

Es necesario establecer con rigor las bases genéticas moleculares y celulares que permitan definir si ha concluido una fecundación verdadera, y, por tanto, la realidad celular producida tiene las propiedades (el fenotipo) propias de un cigoto hombre, y que es por tanto capaz de comenzar el desarrollo embrionario. Cuando esto ocurre, ha comenzado realmente la vida de un ser humano; y si no continuara y muriera pronto es propiamente un embrión vivo, pero inviable. Tal inviabilidad puede ser “per se” -porque tenga defectos genéticos o de los componentes intracelulares-, o puede ser por falta de las condiciones del medio extraembrionario -materno o del laboratorio- necesarias para su supervivencia. Si fue realmente un individuo humano de pocos días han ocurrido dos cosas

muy diferentes: en el primer caso, que ha muerto de forma natural; en el otro, que se le ha dejado morir, al ponerle en unas condiciones en las que no le era posible vivir.

Ahora bien, no toda célula producto de la fusión de los gametos (o por transferencia de núcleos somáticos a óvulos, etc.) alcanza el fenotipo de cigoto y, por tanto, no ha sido un ser humano, no ha existido, aunque esa célula se multiplique y el conjunto se organice en estructuras “embrioides”, con morfología similar al embrión de pocos días. Por el contrario, un cigoto real, que comienza un desarrollo verdadero, es un embrión humano; y si ha sido engendrado, o producido, lo es con independencia del modo de su generación y del destino que otros hombres le deparen.

2.1. Patrimonio e información genéticos, y emisión del programa de desarrollo

En la actualidad se conocen detalles profundos de los procesos de autoorganización biológica y del funcionamiento de los sistemas vivos, que permiten explicar no sólo su complejidad, debida a su modo de organización, sino también la dinámica misma de la vida, como autoorganización de la materia. El logro más importante ha sido la comprensión de que el material genético, el DNA, es necesario. Pero el DNA no es todo. La idea de que en los genes heredados “está todo” (los caracteres propios de la especie, los propios del individuo concreto, las instrucciones para el programa de desarrollo) no es del todo correcta. El proceso está recibiendo continuamente nuevos datos, sin los cuales la vida no puede continuar. Los organismos vivos tienen historia –guardan memoria de situaciones por las que han pasado previamente–, y por ello su proceso vital no viene definido exclusivamente por los genes. No bastan ni sólo las peculiaridades propias del mensaje genético heredado, ni sólo el entorno interno o externo. Ambos factores son necesarios.

No todo está al principio, sino que la vida de cada individuo consiste en la emisión de la información genética que crece con la propia emisión, que se retroalimenta a medida que pasa el tiempo de vida. Cada parte del organismo (órganos, tejidos, sistemas) se constituye con la información del grupo de genes que sólo se expresan, en momentos concretos, y sólo en las células que ocupan un lugar concreto del organismo. Por ello, la formación de cada una de las partes es dependiente de las condiciones de su medio propio, que es diferente en las diversas áreas del organismo y en cada etapa temporal.

Esto es muy importante, porque un conjunto de células diferenciadas, y más o menos ordenadas, no es un organismo; no constituye una unidad funcional y vital. Hay un segundo nivel de información que no está sin más en el DNA, sino que es un programa, que permite la regulación o coordinación de la emisión en cada célula armonizando toda la información. Esta información es el programa de desarrollo que se emite etapa a etapa; programa que no está “previamente” en el genoma. Que el programa comience a emitirse es una propiedad que emerge del proceso temporal de la fecundación de los gametos. Ése es el comienzo de la vida de un nuevo individuo.

En el patrimonio genético de cada uno, desde el momento en el que se constituye a partir de esa dotación genética particular heredada de sus progenitores –y presente en todas y cada una de sus células–, está, y escrita en los genes la identidad de cada viviente. Ese primer nivel de información es su identidad biológica. Es innegable la referencia del viviente neonato, joven, maduro o envejecido, con el feto, embrión o cigoto que apareció con la fecundación de los gametos de sus progenitores. Y es igualmente innegable la diferencia de realidad, o de capacidad de operaciones, de un embrión de una, o de cien células, respecto de un feto o de un joven viviente o un anciano. Compaginar estos dos aspectos exige comprender que la vida, la existencia de cada uno, es la emisión del mensaje, escrito en la secuencia de bases del DNA. Algo semejante ocurre cuando se emite o canta una canción o se actualiza la representación de una obra. La letra y las notas de la partitura son el punto de partida, pero no es todo. Sólo en un momento preciso voces e instrumentos

empieza a pronunciar y emitir música, en tono adecuado la primera palabra y la primera nota, y luego la segunda; y así sucesiva y armónicamente, con pausas y entonaciones, el mensaje completo, y hasta el final, y en un tiempo adecuado. Entonces se ha dado vida, se ha revivido con peculiaridades únicas, la misma canción, la misma opera: una nueva y única versión en un lugar y un tiempo necesariamente irrepetible.

Los datos de la ciencia actual permiten distinguir la simple presencia de una dotación genética completa en la célula óvulo del proceso de preparación y armonización de todos los componentes celulares (y no sólo de los cromosomas), para que empiece a vivir un nuevo individuo; esto es, para que comience la emisión del mensaje que le constituye y le pertenece.

2.2. La fecundación es más que la fusión de los gametos

La afirmación de que cada viviente se origina en la fecundación de los gametos de los progenitores con la constitución del patrimonio genético aportado por ellos, siendo cierta, requiere matización. En efecto, no basta la fusión del material genético de los padres. Es preciso que ese material heredado esté en el interior de una célula con unas características muy precisas y se ordene en una conformación material muy concreta: aquella con la que el mensaje puede empezar a emitirse palabra a palabra y además empezando por la primera. En las horas que dura una fecundación se dan cita procesos perfectamente coordinados de tal forma que la célula con fenotipo cigoto difiere de cualquier otra célula, pues posee polaridad y asimetría, lo que demuestra que se ha constituido mediante un proceso de autoorganización, que es mucho más que una simple fusión celular. Es más al menos en estos aspectos:

a) El cigoto hereda la polaridad del óvulo maduro y la amplía con la fecundación. Los componentes celulares se reorganizan y dejan al final del proceso de fecundación al cigoto como célula capaz de dar una peculiar división asimétrica.

b) La activación mutua del óvulo y del espermio inicia una serie de cambios del material genético materno y el paterno. Este ha de rejuvenecerse perdiendo todos los elementos que había adquirido como tal gameto en el organismo de los progenitores y también como cuenta del paso del tiempo de la vida del organismo del que procede. Estos cambios se dan tanto a nivel del empaquetamiento estructural como una modificación química (metilación y desmetilación) que mantenía el mensaje genético en silencio: es un proceso de eliminación de la impronta molecular del DNA heredado para convertirse en DNA con información para iniciar un nuevo ciclo vital. El material de reserva guardado en el óvulo se reactiva, aparecen señales que permiten programar desde el inicio la expresión de los genes.

c) Los diversos cambios están perfectamente sincronizados por los iones calcio, que la llegada del espermio permite que se eleve justamente en la zona por la que penetra en el interior del óvulo.

Sólo el cigoto es una realidad nueva con la capacidad de iniciar la emisión de un programa y crecer como organismo y no como un simple conglomerado de células. A diferencia de lo que ocurre con cualquier otra célula, la primera y las sucesivas divisiones del cigoto son asimétricas; esto es, se acompañan de diferenciación celular, estructural y funcional. Es una realidad biológica propia y peculiar.

El carácter de individuo que posee el cigoto no se alcanza en cualquier fusión de gametos; ni se alcanza, sin más, en el mero proceso de transferencia del núcleo de una célula somática a un óvulo (un ovonúcleo): para que llegue ser un individuo (clónico) es necesario reprogramar la información del núcleo de una forma tan precisa que rejuvenezca y pueda empezar a emitir el mensaje por la

primera palabra. De igual forma un huevo huero no es sin más un individuo formado por partenogénesis del óvulo: requeriría para fuera un hombre embrión que el núcleo presente en ese gameto, todo él femenino, pudiera ser convertido en mitad masculino y mitad femenino y todo él rejuvenecido.

Todo proceso de generar un individuo requiere la actualización de la información genética, de manera que comience el programa de constitución y desarrollo. Y esto requiere generar como punto de partida una realidad muy concreta y exigente desde el punto de vista de su biología. Por ello afirmamos que no toda manipulación de gametos da origen a un nuevo individuo. Lo decisivo para la calificación de individuo en fase de embrión es, por tanto, la idoneidad para emitir comenzando por el principio el mensaje genético, y comenzar a desarrollarse como miembro de la especie. No es decisivo, para su realidad biológica como tal, que la procedencia de su herencia genética sea el pronúcleo haploide de una célula germinal femenina y otra masculina, o del núcleo diploide de una células somática de un solo individuo; ni es decisivo el modo concreto en que se origine: fecundación o fusión de núcleo y citoplasma. De hecho los términos embrión gamético -para el que procede de la fecundación-, o somático -para el que procede de un ovonúcleo- apuntan al hecho de que pudieran ser embriones en ambos casos y a la duda suscitada desde el principio de estas investigaciones de que el ovonúcleo de primate pudiera reprogramarse para iniciar desde el comienzo la emisión del mensaje genético que la dotación genética de una células somática tiene ya silenciado en gran medida.

Est reprogramación del mensaje genético del ovonúcleo no es una mera “manipulación posterior” del individuo. Es constitutiva y sin ella el ovonúcleo nunca será cigoto. El hecho biológico es muy claro; y tiene fuerza de evidencia aunque se de la situación de falta de conocimiento del mismo. La reprogramación es proceso constituyente de su existencia misma, y no simple manipulación del entorno vital para que sea adecuado a sus necesidades y subsistencia.

Mientras no comience la emisión del mensaje no hay un principio de vida, capaz de regir como tal principio de unidad, o alma, el crecimiento unitario armónico y orgánico que separa un organismo en desarrollo de un simple crecimiento celular más o menos “embriode”. En el estadio temprano es una unidad de vida de crecimiento y de nutrición, que incluye la diferenciación porque cada una de las células que forman ese conjunto orgánico sabe donde tiene que ir durante el desarrollo y esto a medida que avanza el desarrollo. Están siguiendo un programa -están programadas- que esta gobernado por el principio de unidad vital.

Los cromosomas y genes que determinan muchas de las características del ser humano, no le hacen ser un ser humano. Eso no es más -ni tampoco menos- que lo que determina las características de un ser. Lo que le constituye en viviente, en individuo de la especie, es el arranque del programa, el inicio de la emisión de tal programa.

3. Clonación de individuos y transferencia de núcleos

Conceptualmente, la clonación es el proceso de obtención de un clon, siendo éste el conjunto de elementos genéticos (molécula de DNA, célula, tejido, órgano u organismo) idénticos entre sí y a su precursor; de ahí que la clonación pueda ser considerada como obtención de replicas de un material genético y con ello del mensaje genético que contiene.

La clonación de un individuo mamífero, bien adulto o embrión, se realiza por transferencia del núcleo de una de sus células a un oocito desnucleado. El desarrollo produciría un clónico del individuo donante del núcleo. También podría producirse una clonación por separación física de las células (blastómeras) de un embrión preimplantatorio temprano. Esta última realmente es un

gemelación múltiple, impropriamente llamada también clonación. Es decir, aunque cuando se hace referencia a la clonación se incluyen habitualmente las dos técnicas, en realidad, merecen una consideración diferente, aún cuando ambos métodos conduzcan a la generación de individuos idénticos entre sí. La transferencia de núcleos provenientes de células embrionarias, fetales, o de individuos ya nacidos, produce una progenie idéntica al progenitor; por el contrario, la partición de embriones preimplantatorios genera individuos clónicos, iguales entre sí pero diferentes a los progenitores; es decir, hermanos gemelos.

En el contexto de la aplicación de la clonación a la clínica se distingue la clonación en seres humanos con fines reproductivos que estaría relacionada con el tratamiento de algunos casos extremos de infertilidad. En este contexto, la clonación puede entenderse una tecnología de reproducción asistida en que la dotación genética del hijo provendría exclusivamente de uno sólo de sus progenitores. Esta técnica no ha sido aplicada (al menos no se ha publicado) por no haberse logrado aún técnicamente con eficacia en animales. Algunas investigaciones se dirigen no a una verdadera clonación, sino a una transferencia de los núcleos de células precursoras de los gametos de ambos progenitores a óvulos a los que se le quita el núcleo previamente. No se trata por tanto de técnicas de clonación, ya que el núcleo del posible cigoto es el resultado de la dotación paterna y materna de las células precursora de gametos y no de una única célula somática. Estas llamadas impropriamente clonaciones, son en realidad fecundaciones sin fusión de gametos. Se plantean, en teoría, dos vías posibles para llevarlo a cabo; en una de ellas se induce en cada una de las células donantes de núcleos una división meiotica (que reduce la dotación genética a la mitad) antes de la transferencia a un óvulo maduro. En el segundo tipo se realiza primero la transferencia de los dos núcleos diploides a un óvulo inmaduro y se activa después su maduración para que le elimine la dotación genética en exceso, como dos corpúsculos polares[1].

Otro tipo de investigación que se está desarrollando, y que no se puede confundir con una clonación, es la transferencia citoplásmica. Consiste en la transferencia del núcleo de un cigoto al citoplasma de un óvulo desnucleado. Se busca evitarle al hijo las enfermedades que pueda heredar de la madre por alteraciones en las mitocondrias. Sería una terapia prenatal precoz en el embrión preimplantatorio

Por último, se ha llamado “clonación terapéutica” a la obtención de un embrión temprano clónico de un paciente con la finalidad de no implantarlo en útero, sino convertirlo en fuente de células madre embrionarias con fines terapéuticos.

3.1. Transferencia de núcleos

Los primeros pasos de transferencia de núcleos en mamíferos se realizaron con conejos[2] y ratones[3] y se comenzó por la paraclonación (transferencia de núcleos de los blastómeros de un embrión precoz a oocitos desnucleados). Se transfirieron núcleos provenientes de células de la masa celular interna de blastocistos a cigotos a los que se les eliminaba los pronúcleos materno y paterno; estos cigotos manipulados se desarrollaron aunque los resultados no pudieron ser confirmados. El paso siguiente fue transferencia de núcleo de blastómeros de embriones tempranos de unas 8 o 16 células y se consiguió el desarrollo a término en ovejas y vacas[4]. Cuando las células donantes del núcleo proceden de embriones más avanzados, o si los núcleos provienen de células poco diferenciadas fetales o de células poco diferenciadas adultas[5], antes de realizar la transferencia de núcleos, es necesario llevar las células a un estado aquiescente (la fase G₀, o de parada del ciclo celular) con la idea de favorecer la reprogramación genética del núcleo[6]. Además de la oveja se ha confirmado que es posible obtener clonación a partir de núcleos de células adultas el ratón[7], y otros mamíferos a partir de una variedad de células adultas[8].

Un primer experimento de transferencia de núcleos procedentes de fibroblastos de la piel o de células del cumulus oophorus a oocitos humanos[9] no ha tenido eficacia: ninguna de las células obtenidas mostró capacidad de desarrollo embrionario. De hecho el resultado de la transferencia fue más que verdaderos embriones precoces un simple conjunto de células resultado de divisiones celulares degenerativas[10]. El experimento no “ha salido” ya que no han logrado ni un solo blastocisto, embrión de 5 días que tiene ya formadas las células madre embrionarias que eran las buscadas. Consiguieron 71 óvulos de 7 mujeres jóvenes, que tuvieran al menos un hijo biológico y de ellos usaron 57 que eran maduros. Con la mitad se indujo químicamente una transformación que convirtió a cada óvulo en una célula (que ellos llaman “embrión pronuclear”) capaz de dividirse. Ninguno de los 6 “falsos embriones”, que consiguieron mantener 7 días en cultivo, tenía células madre. Era evidente que ninguno era un embrión: la partenogénesis o multiplicación, sin más reprogramación del material genético con la impronta paterna y materna, sólo genera un puñado de células más o menos organizadas, y no un embrión. A otros 19 óvulos consiguieron quitarles su núcleo y transferirles el núcleo de células humanas de adulto (parecido al método que se usó para producir la oveja Dolly), aunque sin conseguir una buena reprogramación. Once no se dividieron, ni siquiera a dos células y otros seis se dividieron hasta 4 o hasta 6 células y nada más. No eran realmente “embriones tempranos”, sino un grumo de células.

Posteriormente, Zavos[11] ha intentado de nuevo la clonación humana sin que el nucleóvulo de lugar más que a un conjunto de 8 a 10 células.

La transferencia de núcleo se realiza preferentemente a los oocitos, a los que previamente se les ha extraído el suyo, mediante aspiración con una micropipeta. La transferencia puede realizarse mediante electrofusión (el llamado “método Roslin”), depositando el núcleo en el espacio perivitelino, debajo de la zona pelúcida y procediendo a la fusión con el oocito desnucleado mediante choque eléctrico o mediante microinyección (el llamado “método Honolulu”) introduciendo el núcleo directamente en el citoplasma del oocito desnucleado. El estado de la célula receptora, respecto a situación de reposo o de división activa[12] no es esencial, a pesar de que en los primeros trabajos se supuso que debía estar en reposo. Sea cual sea el estado de la célula donadora, tras la microinyección se requiere una activación del oocito unas 2-6 horas más tarde[13]. Se estimula el nucleóvulo en cultivo con pulsos de calcio para que inicie su división y para lograr que se desarrolle. Se da de este modo la formación, in vitro, de la célula precursora, llamada nucleóvulo, combinación por tanto de la donante y la receptora a partir de la cual se podrá obtener luego el clon. En el citoplasma existen factores responsables de la reprogramación, proteínas citoplasmáticas que son capaces de interactuar con los genes y devolverlos al patrón de expresión típico del embrión inicial o cigoto.

Sólo cuando se consigue que el nucleóvulo esté reprogramado (es decir, la dotación genética, que estaba en el estado propio de una célula somática, se reconvierte al estado en que se sitúa la dotación genética tras la fecundación) para dar comienzo al desarrollo embrionario el resultado es un cigoto. Sólo entonces se ha producido un nuevo individuo clónico del donante de la célula cuyo núcleo ha sido transferido; si se transfiere a útero y continua la gestación llegaría a nacer un clónico.

Estos mecanismos de modificación química están catalizados por enzimas, que aparecen de modo preciso y perfectamente regulados. Llevan a cabo procesos esenciales en la transmisión de la vida y construcción del organismo: a) en una fecundación cambian la impronta de gameto paterno y materno para dar la impronta propia de cigoto; en la vida embrionaria del individuo macho o hembra imprimen la impronta propia de espermio o de óvulo respectivamente[14]; en el desarrollo la impronta parental es regulada por un grupo de factores específicos, que se van conociendo con precisión[15]. b) en una transferencia de núcleos se requiere un proceso de reprogramación que

haga perder la impronta propia de célula somática y la lleve hacia la de cigoto.

3.2. La actual falta de eficacia de la clonación de mamíferos: la dificultad de intervenir en la estructura y en el patrón de metilación del DNA a fin de reprogramar el genoma.

En la actualidad, solo un 0.2 - 5% de los oocitos a los que se ha realizado una transferencia de núcleo han continuado su desarrollo hasta el nacimiento. Se sabe que existen múltiples factores que afectan a la eficacia de la técnica: el tipo de célula utilizada como donante de núcleo[16], la fase del ciclo celular de la célula donante[17], la técnica empleada para la transferencia del núcleo y el método de activación de los oocitos[18]. Es posible obtener clones tanto de hembras como de machos y no parece haber diferencias en la eficiencia de la técnica según el sexo del núcleo empleado[19]. Se ha utilizado con éxito una variedad de tipos celulares como fuentes de núcleo, entre los que se encuentran células del cumulus oophorus, fibroblastos, células musculares, linfocitos, y células de Sertoli. También es posible utilizar células madre embrionarias,[20] incluso modificadas genéticamente,[21] originando clones genéticamente modificados. La baja tasa de éxitos logrados con la transferencia de núcleo es el resultado de pérdidas que se producen en las etapas tempranas de desarrollo, aunque también existen pérdidas considerables en los estadios pre- y perinatal, debidas a anomalías en la placenta, y problemas inmunológicos, respiratorios o renales[22].

También el DNA de diferentes tejidos de fetos de ratones clónicos presenta un patrón aberrante de metilación en comparación al observado con animales normales[23]. Los bovinos clónicos que han llegado a nacer y crecer muestran características normales, así como un comportamiento reproductivo y fertilidad similares a los animales no clonados[24], pero se han planteado también dudas acerca del envejecimiento prematuro de los animales clones; aunque no hay acuerdo en la causa, si está claro que la clonación influye negativamente en el complejo control del envejecimiento.

La principal razón de razón tanto de la baja eficiencia en el desarrollo, y la presencia de anomalías, es la expresión alterada de una serie de genes por fallo del proceso de metilación del DNA[25] que da lugar a una incompleta reprogramación del DNA del núcleo donante; esto es, la transferencia de un núcleo a un oocito no logra en muchos casos la reprogramación del mensaje genético, o dicho de otra forma, la activación de un nucléulo no siempre acaba en un cigoto.

Es bien conocido que la emisión del programa de desarrollo, desde su inicio a la constitución y maduración del organismo, es un proceso ordenado y regulado por señales que van apareciendo también de una forma ordenada tanto en el tiempo como en las diferentes células según el sitio que ocupan. Es decir cada una de las células guarda su historia como célula de tal organismo. Así va dándose una ampliación y determinación programada de la información genética heredada o recibida. El control del crecimiento, diferenciación y maduración celular es un equilibrio delicado, que depende del estado de la célula según el tiempo de desarrollo y del sitio que ocupa en el organismo en desarrollo: en efecto, cada tipo celular recibe diferentes señales de las células vecinas, y las interpreta e integra según su historia previa como parte de un organismo. Esta integración de señales externas según su situación y estado, permite que cada célula –según su historia- controle de forma precisa si le corresponde multiplicarse, o madurar o inducir la muerte programadamente. Los principales mecanismos de regulación de este equilibrio son:

a) nivel de expresión del gen Oct-4 que frena la diferenciación manteniendo el estado pluripotencial que corresponde a determinadas células como las células madre embrionarias y las pluripotenciales de la médula ósea.

b) el nivel de la enzima telomerasa que elimina el freno de la proliferación celular permitiendo un estado "inmortalizado". Existen altos niveles de la enzima en las células troncales embrionarias, en algunas tumorales y en niveles más bajos en las pluripotenciales de la médula ósea .

c) el control de la expresión de genes cuyos productos bloquean y desbloquean el estado de inmadurez de la célula: para el ciclo de diferenciación celular y permiten su diferenciación.

Este proceso de control del crecimiento, diferenciación y maduración celular, en la constitución del organismo y en la vida adulta, tiene como base común el cambio progresivo en la estructura del DNA y en la metilación de la base citosina. Precisamente por ello, la principal razón de la baja eficiencia en el desarrollo, y la presencia de anomalías, es la expresión alterada de una serie de genes por fallo del proceso de metilación del DNA[26] que da lugar a una incompleta reprogramación del DNA del núcleo donante; esto es, la transferencia de un núcleo a un oocito no logra en muchos casos la reprogramación del mensaje genético, o dicho de otra forma, la activación de un nucléulo no siempre acaba en un cigoto.

La modificación del DNA por metilación está asociada a la represión de los genes y también la metilación de histonas confiere una estructura compacta al DNA, por lo que la represión de los genes es muy estable. Por el contrario la expresión de genes está asociada a la acetilación de las histonas. En el embrión temprano pueden permanecer las modificaciones de la cromatina características de los gametos femenino y masculino desde los que se ha formado[27]. La reactivación de los genes silenciados requiere enzimas desmetilasas[28] que eliminen los grupos metilo tanto de las histonas como del DNA. Por tanto, todo intento de clonar un individuo, sea adulto o feto o embrión, por medio de la transferencia del núcleo de una de sus células a un oocito pasa necesariamente por una reprogramación (mayor cuanto mayor es la edad del donante) que permita al clon iniciar un verdadero desarrollo embrionario. Este es un mecanismo que la técnica no ha logrado dominar y por ello no sólo se consigue una tasa muy baja, sino que la genética del individuo clónico mantiene algunas alteraciones.

En resumen, un nucléulo (célula resultante de la transferencia de un núcleo de célula somática a un oocito) es potencialmente un "cigoto artificial", que puede dar lugar por multiplicación y diferenciación a un organismo completo. Sin embargo, el nucléulo se diferencia de un cigoto en que no contiene el genoma de dos gametos, sino que contiene los $2n$ cromosomas del núcleo somático y el citoplasma del oocito. El cigoto, por el contrario, posee n cromosomas del óvulo, n cromosomas del espermatozoide y el citoplasma del oocito estimulado por la interacción con el espermio. Por ello el nucléulo si solamente inicia la división por mitosis, en un medio de cultivo adecuado, da lugar a un cúmulo creciente de células, un clon celular, en el que todas las células son muy similares entre sí y, sobre todo, que no tiene información para convertirse en un "embrión generado artificialmente".

4. Barreras naturales a la obtención de un individuo primate clónico.

La clonación de un individuo -hasta la fase de blastocisto o hasta su total gestación- por transferencia del núcleo de una de sus células somáticas a un óvulo requiere las dos condiciones que provee la fecundación. Una total y muy precisa reprogramación de la información contenida en el núcleo de la célula del donante, de modo que ponga en marcha el mensaje inicial del programa de desarrollo; y armonizar esta reprogramación con la situación del citoplasma del nucléulo de forma que la célula resultante tenga todas las características (el fenotipo) cigoto.

Hay al menos tres barreras biológicas. La primera es la reprogramación, ya comentada, de la información genética, para eliminar la impronta de DNA propia de una célula especializada de

adulto. A medida que el organismo es más complejo la especialización requiere una mayor modificación química y estructural del DNA por lo que la reversibilidad del estado adulto al estado inicial del desarrollo es más intensa. Esta capacidad de revertir es factible en determinados tipos de células tumorales, como comentaremos más adelante. Las otras dos barreras biológicas son:

- La expresión de genes (genes de la pluripotencialidad) propia del estado de cigoto hacia blastocisto, se perdió en la diferenciación de la célula donante en lo que se refiere a la estructura y metilación del DNA propia de cigoto de la célula donante del núcleo. Este proceso no es fácilmente reversible de modo correcto.

- El núcleo de una célula adulta carece de las proteínas que median la formación del huso mitótico de la primera división celular por la que el cigoto se convierte en embrión bicelular.

4. 1. Expresión y silenciamiento de los genes de la pluripotencialidad

Se conoce cómo se inicia el programa de desarrollo que conduce al proceso de embriogénesis normal, que ordena las células según los ejes embrionarios al tiempo que diferencia las células resultantes de la división del cigoto, precisamente en función del sitio que ocupan. Para ello deben funcionar una importante categoría de genes –los llamados genes pluripotenciales o de la pluripotencialidad– que se activan en el embrión temprano pero se silencian en células especializadas. Estos genes permiten que al comienzo del desarrollo las células que los expresan puedan contribuir a una variedad de tipos de tejidos. Después las células se comprometen hacia funciones específicas cuando estos genes son silenciados. Este silenciamiento dificulta la reprogramación hacia atrás de los embriones clonados[29].

a) Oct-4 pertenece a este grupo y es uno de los mejor conocidos. Se sabe que el gen Oct-4 es importante en el desarrollo temprano; es un factor de transcripción relacionado con el mantenimiento de totipotencia en las células embrionarias y germinales[30] y existe una estrecha relación entre la expresión del gen Oct-4 y el grado de indiferenciación de las células. Las células de los primeros estadios del desarrollo embrionario expresan el gen Oct-4 y su regulación permite que se diferencien hacia uno u otro de los primeros tejidos del embrión.

La mayor parte de los embriones clónicos de ratón el gen Oct4 se expresa erróneamente, bien respecto al tiempo o bien respecto al sitio que ocupa la célula no permitiendo un desarrollo embrionario[31]. Como afirma Richard Schultz de la Universidad de Pensilvania “si usted no puede reprogramar correctamente Oct4 usted no es capaz de obtener un desarrollo embrionario”. Como muestra Bolani[32], la reactivación de un gen somáticamente silenciado para ser difícil. Por esto, si los diferentes niveles de expresión de Oct-4 permiten predecir el desarrollo hacia masa celular interna (niveles elevados de Oct-4) o hacia trofotodermo (niveles bajos de Oct-4) en embriones humanos[33], se puede identificar si un conjunto de blastómeros poseen organización embriogénica (es decir, son un embrión), o un simple amasijo de células.

Otro gen clave en el comienzo del desarrollo es Nanog; es un factor crítico en mantener la pluripotencialidad de las células de la masa interna del blastocisto[34]. Así los productos de ambos genes controlan la organización y diferenciación celular en el embrión temprano.

Los trabajos de Bortvin[35] han mostrado que existen unos diez genes relacionados con Oct-4, en el sentido de tener un patrón de expresión similar. No se conoce aún la función de las proteínas codificadas por ellos, pero se requieren para la formación de un embrión clónico

¿Que pasa con estos genes normalmente expresados en células somáticas y silenciados en el

embrión temprano? Posiblemente la respuesta es que el silenciamiento es más eficiente que la reactivación; no obstante[36] los embriones clónicos retienen alguna memoria de las células diferenciadas de los que derivan y de la especificidad del tejido. En las células somáticas al igual que en las de los primeros estadios del desarrollo, los genes específicos de tejido reprimen la expresión de los pluripotenciales. Como se muestra en el esquema siguiente:

4.2. La falta de proteínas nucleares del ovonúcleo de primate

La ausencia de proteínas claves (NuMA y HSET) para el control de la división celular, y el reparto de los cromosomas en la mitosis por formación del huso que les alinea y separa, indican que la clonación de un adulto primate no es posible con las técnicas actuales. Calvin Simerly y Gerald P. Schatten y sus colaboradores de la Universidad de Pittsburgh[37] han realizado 724 intentos de crear embriones clónicos por transferencia nuclear a óvulos de hembras de sin éxito. Con el uso de anticuerpos han distinguido células con un alto número de cromosomas y otras con bajo por carencia de las proteínas nucleares específicas; este tipo de proteínas no falta en las células derivadas de la transferencia nuclear de ratones, ovejas etc.

5. Células madre y manipulaciones de gametos sin clonación del individuo

Los datos, expuestos en el apartado anterior, sugieren una alternativa a la clonación terapéutica como medio para obtener células madre embrionarias. La investigación en modelos animales puede conseguir, mediante el control de la reprogramación y expresión del gen Oct-4, que la transferencia del núcleo de una célula somática a un oocito no se convierta en cigoto y por tanto no llegue a ser un embrión; y sin embargo al mismo tiempo las células derivadas de la multiplicación del nucleóvulo permita obtener y multiplicar (clonar) células madre del tipo embrionario. No se clona al paciente; esto es no se obtendría un embrión clónico, sino una organización celular “embrioide” en la que podrían estar presentes células ES.

Los embriones humanos no son esenciales para investigar con células madre[38]. Investigaciones con animales deberían llevarse a cabo para conseguir reprogramar células humanas hacia los primeros estadios de desarrollo sin crear ni destruir embriones.

2. Se ha demostrado la posibilidad de reprogramar, y modificar así la función de una célula somática, usando el material citoplásmico extraído de otra célula somática de diferente tipo, lo que abre la posibilidad de obtener células diferenciadas para uso terapéutico del mismo paciente sin necesidad de clonación. Los investigadores noruegos[39] han reprogramado fibroblastos humanos con citosol de linfocitos T y las células reprogramadas responden y funcionan como linfocitos T.

3. Sin embargo, los intentos de obtener un embrión clónico del paciente siguen presentes. La técnica de transferencia del núcleo a un óvulo pierde, como se acaba de comentar, componentes del nucleóvulo imprescindibles para su constitución en cigoto; por ello el equipo de Schatten plantea la posibilidad de hacer la transferencia del núcleo del paciente a un óvulo ya fecundado a fin de que contenga los componentes citoplásmicos necesarios. Pero esto no sería una clonación del paciente sino la destrucción de un individuo cigoto para usarle como material biológico.

Por otra parte, se busca también la obtención de embriones a partir de óvulos producidos in vitro. En mayo de 2003 la revista Science[40] publica la obtención de un partenote de mamífero a partir de oocitos obtenidos por cultivo de células madre embrionarias, que se dividen originando una mola. Se pretende comprobar si estos gametos así obtenidos son capaces de ser fecundados y originar un cigoto.

4. Trabajos incipientes con animales muestran la posibilidad de reprogramación hacia atrás de una célula tumoral. Se ha descrito[41] el desarrollo embrionario de un ovonúcleo de ratón producido por la transferencia a oocito desnucleado del núcleo de una célula de tumor cerebral. Es conocido que las células cancerosas escapan del control del crecimiento por acumular cambios genéticos y epigenéticos. Estos últimos raramente son los únicos; pero los cambios epigenéticos de modificación de la metilación de citosinas son reversibles y pueden convertir las células tumorales en células muy indiferenciadas. Estos datos sugieren que la transferencia del núcleo de la célula tumoral a un oocito permite el proceso de reprogramación hacia célula totipotente del ovonúcleo. Este proceso de reprogramación de la información genética de una célula tumoral de un individuo soslaya uno de los tres procesos que dificultan, hoy por hoy, la clonación de un adulto. Ahora bien, si no se soslayan los otros procesos, que hacen actualmente imposible la clonación de un mamífero primate, la transferencia de núcleos de células de determinados tumores humanos podrían permitir la obtención directa de líneas celulares del tipo embrionario, para estudios de interés, partiendo de una célula tumoral, lo que supondría un mecanismo sin clonación de un individuo. Esta alternativa requiere el estudio previo en primates que asegure que no este tipo de ovonúcleo no se reprograma a cigoto.

6. Partenote de primate: una simple mola capaz de producir células del tipo de las madre embrionarias.

La partenogénesis es, en general, el tipo de reproducción unisexual en el que las hembras originan descendencia sin fecundación por los machos. En animales, y por tanto aplicable a la especie humana, consiste en la producción de una estructura celular tipo embrión a partir de un gameto femenino no fecundado. Los óvulos de mamíferos pueden activarse artificialmente empleando una variedad de estímulos. Puede originar células haploides con sólo tiene un juego de cromosomas (n) porque el gameto femenino de que deriva era de constitución cromosómica normal. O diploide ($2n$) si deriva de un gameto femenino “no reducido”, es decir, de constitución cromosómica diploide ($2n$). Este puede darse también artificialmente mediante activación en presencia de compuestos que inhiben la extracción del segundo cuerpo polar. En ratón se ha estudiado la producción de un partenote diploide induciendo la entrada del segundo corpúsculo polar después de su expulsión.

En la mayoría de las especies, los óvulos no fecundados que envejecen in vivo o in vitro no se activan espontáneamente; en el hamster dorado se activa espontáneamente una elevada proporción de óvulos durante el envejecimiento; se forman pronúcleos y puede o no emitirse el segundo cuerpo polar y algunos óvulos segmentan y llegan al estadio de 2 células. Hay evidencia confirmada de que los óvulos partenogénicos no llegan a desarrollarse a término como un embrión: no lo son de hecho. La activación de un óvulo se distingue de la realidad cigoto principalmente en que carece de la impronta paterna del genoma. Sin embargo, las células partenogénicas son capaces de diferenciarse hacia células normales si se les sitúa en el entorno adecuado: formando parte de una quimera al agregarlas a un blastocito en desarrollo.

La división de oocitos activados ofrece una vía de obtención de células madre embrionarias. Michael West de la Advanced Cell Technology (ACT) de Massachusetts han activado, en el año 2002[42], oocitos de Macaco y los han inducido a división. Las células así obtenidas se immortalizaron y las líneas celulares se convirtieron en neuronas, células musculares o grasas.

La técnica de partenogénesis[43], como alternativa a la llamada clonación terapéutica, podría proporcionar células madre embrionarias sólo de mujeres pre-menopáusicas; ahora bien, el hecho de tener dotación genética de dos set de cromosomas iguales hace que la variabilidad en las proteínas de membrana sea escasa y por tanto el posible rechazo inmune menor. Se plantea ya la creación de un banco de células madre embrionarias con este origen lo cual además es mucho más

económico que un banco de células madre embrionarias individuales y específicas para cada paciente a tratar.

[1] Kubiak J, Johnson Z Human infertility, reproductive cloning and nuclear transfer: a confusion of meanings (2001) *BioEssays* 23,359-364.

[2] Bromhall JD (1975) Nuclear transplantation in the rabbit egg. *Nature* 258, 719-721.

[3] McGrath J, Solter D (1983) Nuclear transplantation in the mouse embryo by microsurgery and cell fusion. *Science* 220, 1300-1302; McGrath J, Solter D (1984) Inability of mouse blastomere nuclei transferred to enucleated zygotes to support development in vitro. *Science* 226, 1317-1318.

[4] Willadsen SM (1986) Nuclear transplantation in sheep embryos. *Nature* 320, 63-65; Prather RS, Barnes FL, Sims ML, Robl JM, Eyestone WH, First NL (1987) Nuclear transplantation in the bovine embryo: Assessment of donor nuclei and recipient oocyte. *Biology of Reproduction* 37, 859-866.

[5] Wilmut I, Schnieke E, McWhir J, Kind AJ, Campbell KHS (1997) Viable offspring derived from fetal and adult mammalian cells. *Nature* 385, 810-813.

[6] Di Berardino MA (1997) *Genomic Potential of Differentiated Cells*. Columbia University Press, New York.; Ashworth D, Bishop M, Campbell K, Colman A, Kind A, Schnieke A, Blott S, Griffin H, Haley C, McWhir J, Wilmut I (1998) DNA microsatellite analysis of Dolly. *Nature* 394, 329; Signer EN, Dubrova YE, Jeffreys AJ, Wilde C, Finch LMB, Wells M, Peaker M (1998) DNA fingerprinting Dolly. *Nature* 394, 330

[7] Wakayama T, Perry AC, Zuccotti M, Johnson KR, Yanagimachi R (1998) Full-term development of mice from enucleated oocytes injected with cumulus cell nuclei. *Nature* 394, 369-374.

[8] Kato Y., Tani T., Sotomaru Y., Kurokawa K., Kato J., Doguchi H., Yasue H., Tsunoda Y. (1998) Eight calves cloned from somatic cells of a single adult. *Science* 282, 2095-2098; Shiga K., Fujita T., Hirose K., Sasae Y., Sato K., Nagai T. (1998) Development of bovine embryos reconstructed with nuclei from muscle cells. En: *Gametes: Development and Function*, A. Lauria, F. Gandolfi, G. Enne, L. Gianaroli (eds), p. 598, Serono Symposia, Roma; Takahashi S., Kubota C., Nakahara H., Shimizu M., Tokunaga T., Yamaguchi M., Imai. H. (1998) Importance of cytoplasmic factor after oocyte activation on development of somatic cell-nuclear transferred bovine embryos. En: *Gametes: Development and Function*, A. Lauria, F. Gandolfi, G. Enne, L. Gianaroli (eds), p. 607, Serono Symposia, Roma; Baguisi A, Behboodi E, Melican DT, Pollock JS, Destrempes MM, Cammuso C, Williams JL, Nims SD, Porter CA, Midura P, Palacios MJ, Ayres SL, Denniston RS, Hayes ML, Ziomek CA, Meade HM, Godke RA, Gavin WG, Overstrom EW, Echelard Y (1999) Production of goats by somatic cell nuclear transfer. *Nature Biotechnology* 17, 456-46; Polejaeva IA, Chen SH, Vaught TD, Page RL, Mullins J, Ball S, Dai Y, Boone J, Walker S, Ayares DL, Colman A, Campbell KH. (2000) Cloned pigs produced by nuclear transfer from adult somatic cells. *Nature* 407, 505-509; Onishi A, Iwamoto M, Akita T, Mikawa S, Takeda K, Awata T, Hanada H, Perry AC (2000) Pig cloning by microinjection of fetal fibroblast nuclei. *Science* 289, 1188-1190; Betthausen J, Forsberg E, Augenstein M, Childs L, Eilertsen K, Enos J, Forsythe T, Golueke P, Jurgella G, Koppang R, Lesmeister T, Mallon K, Mel G, Misica P, Pace M, Pfister-Genskow M, Strelchenko N, Voelker G, Watt S, Thompson S, Bishop M (2000) Production of

cloned pigs from in vitro systems. *Nature Biotechnology* 18, 1055-1059; Shin T, Kraemer D, Pryor J, Liu L, Rugila J, Howe L, Buck S, Murphy K, Lyons L, Westhusin M (2002) A cat cloned by nuclear transplantation. *Nature* 415, 859; Chesné P, Adenot PG, Viglietta C, Baratte M, Boulanger L, Renard JP (2002) Cloned rabbits produced by nuclear transfer from adult somatic cells. *Nature Biotechnology* 20, 366-369; Willadsen SM (1986) Nuclear transplantation in sheep embryos. *Nature* 320, 63-65; Meng L, Ely J.J., Stouffer R.L., Wolf, DP (1997) Rhesus monkeys produced by nuclear transfer. *Biology of Reproduction* 57, 454-459.

[9] Cibelli JB, Kiessling AA, Cunniff K, Richards C, Lanza RP, West MD (2001) Somatic cell nuclear transfer in humans: Pronuclear and early embryonic development. *Journal of Regenerative Medicine* 2, 25-32.

[10] Adam D (2001) First human clones get a cool response. *Nature* 414, 477.

[11] Zavos PM (2003) Human reproductive cloning: the time es near. *Reproductive BioMedicine* : <http://rbmonline.com/Article/924>.

[12] Cibelli J.B., Stice S.L., Golueke P.J., Kane J.J., Jerry J., Blackwell C., Ponce de Leon F.A., Robl J.M. (1998a) Cloned transgenic calves produced from nonquiescent fetal fibroblasts. *Science* 280, 1256-1258; Wakayama T, Yanagimachi R (1999) Cloning of male mice from adult tail-tip cells. *Nature Genetics* 22, 127-128; Wakayama T, Rodriguez I, Perry AC, Yanagimachi R, Mombaerts P (1999) Mice cloned from embryonic stem cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA* 96, 14984-14989

[13] Wakayama T, Perry AC, Zuccotti M, Johnson KR, Yanagimachi R (1998) Full-term development of mice from enucleated oocytes injected with cumulus cell nuclei. *Nature* 394, 369-374.; Wakayama T, Yanagimachi R (1999) Cloning the laboratory mouse. *Seminars in Cell and Developmental Biology* 10, 253-258; Wakayama T, Rodriguez I, Perry AC, Yanagimachi R, Mombaerts P (1999) Mice cloned from embryonic stem cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA* 96, 14984-14989; Wakayama T, Yanagimachi R (2001) Effect of cytokinesis inhibitors, DMSO and the timing of oocyte activation on mouse cloning using cumulus cell nuclei. *Reproduction* 122, 49-60.

[14] Lee J. (2002) Erasing genomic imprinting memory in mouse clone embryos produced fom day 11.5 primordial germ cells. *Development* 129, 1807-1817.

[15] Mager J. Montgomery ND, Pardo-Manuel de Villena F Magnuson T (2003) Genome imprinting regulated by the mouse Polycomb group protein Eed. *Nature Genetics* 33, 502-507.

[16] Wakayama T, Yanagimachi R (2001) Mouse cloning with nucleus donor cells of different age and type. *Molecular Reproduction and Development* 58, 376-383

[17] Kasinathan P, Knott JG, Moreira PN, Burnside AS, Jerry DJ, Robl JM (2001) Effect of fibroblast donor cell age and cell cycle on development of bovine nuclear transfer embryos in vitro. *Biology of Reproduction* 64, 1487-1493

[18] Ogura A, Inoue K, Takano K, Wakayama T, Yanagimachi R (2000) Birth of mice after nuclear transfer by electrofusion using tail tip cells. *Molecular Reproduction and Development* 57, 55-59; Galli C, Lagutina I, Lazzari G (2001) Comparison of microinjection (piezo-electric) and cell fusion for nuclear transfer success with different cell types inc attle. *Proceedings of the International Workshop on Current Status and Perspectives in Cloning and Related Studies*,

Tsukuba, pp. 6.; Wakayama T, Yanagimachi R (2001) Effect of cytokinesis inhibitors, DMSO and the timing of oocyte activation on mouse cloning using cumulus cell nuclei. *Reproduction* 122, 49-60.

[19] Wakayama T, Yanagimachi R. (1999) Cloning of male mice from adult tail-tip cells. *Nature Genetics* 22, 127-128.

[20] Wakayama T, Rodriguez I, Perry AC, Yanagimachi R, Mombaerts P (1999) Mice cloned from embryonic stem cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA* 96, 14984-14989.

[21] Rideout WM 3rd, Wakayama T, Wutz A, Eggan K, Jackson-Grusby L, Dausman J, Yanagimachi R, Jaenisch R (2000) Generation of mice from wild-type and targeted ES cells by nuclear cloning. *Nature Genetics* 24, 109-110.

[22] Renard JP, Chastant S, Chesne P, Richard C, Marchal J, Cordonnier N, Chavatte P, Vignon X (1999) Lymphoid hypoplasia and somatic cloning. *Lancet* 353, 1489-1491; Hill JR, Burghardt RC, Jones K, Long CR, Looney CR, Shin T, Spencer TE, Thompson JA, Winger QA, Westhusin ME (2000) Evidence for placental abnormality as the major cause of mortality in first-trimester somatic cell cloned bovine fetuses. *Biology of Reproduction* 63, 1787-1794; Kubo M (2001) Pathology of diseases in calves cloned by nuclear transfer. *Proceedings of the International Workshop on Current Status and Perspectives in Cloning and Related Studies, Tsukuba*, pp. 8; Tanaka S, Oda M, Toyoshima Y, Wakayama T, Tanaka M, Yoshida N, Hattori N, Ohgane J, Yanagimachi R, Shiota K (2001) Placentomegaly in cloned mouse concepti caused by expansion of the spongiotrophoblast layer. *Biology of Reproduction* 65, 1813-1821.

[23] Ohgane J, Wakayama T, Kogo Y, Senda S, Hattori N, Tanaka S, Yanagimachi R, Shiota K (2001) DNA methylation variation in cloned mice. *Genesis* 30, 45-50.

[24] Lanza RP, Cibelli JB, Faber D, Sweeney RW, Henderson B, Nevala W, West MD, Wettstein PJ (2001) Cloned cattle can be healthy and normal. *Science* 294, 1893-1894.

[25] Rideout WM 3rd, Eggan K, Jaenisch R (2001) Nuclear cloning and epigenetic reprogramming of the genome. *Science* 293, 1093-1098.

[26] Rideout WM 3rd, Eggan K, Jaenisch R (2001) Nuclear cloning and epigenetic reprogramming of the genome. *Science* 293, 1093-1098.

[27] Santos F, Hendrich B, Reik W, Dean W (2002) *Dev.biol.* 241, 172-183..

[28] Bird A (2003) *Nature Immunol* 4, 208-209.

[29] Reik W, DEAN W, (2003) Gene expression: Silent clones speak up. *Nature*, 423, 390.

[30] Palmieri S, Peter W, Hess H et al. (1994) Oct-4 transcription factor is differentially expressed in the mouse during establishment of the first two extraembryonic cell lineages involved in implantation. *Developmental Biology* 166, 259-267.

[31] Bolani M, Eckardt S, Scholer HR, McLaughlin KJ (2002) Oct4 distribution and level in mouse

clones: consequences for pluripotency. *Genes and Development* 16. 1209-1219.

[32] Bolani M, Eckardt S, Schöler HR and McLaughlin KJ (2002) *Genes Dev*, 16, 1209-1219.

[33] Hansis C, Tang YX, Grifo JA, Krey LC (2001) Analysis of Oct-4 expression and ploidy in individual human blastomeres. *Molecular Human Reproduction* 7, 155-161.

[34] Mitsui K et al. (2003) The homeoprotein nanog is required for maintenance of pluripotency in mouse epiblast and ES cells. *Cell* 113, 631-642.

[35] Bortvin A et al Incomplete reactivation of Oct-4-related genes in mouse embryos cloned from somatic nuclei (2003) *Development* 130, 1673-1680; Reik W And Dean W (2003) Silent clones speak up. *Nature* 423, 290-291,

[36] Gao S et al (2003) *Biol Reprod*.doi 10.1095/bioreprod. 102.014522.

[37] Simerly C et al. (2003) Molecular correlates of primate nuclear transfer failures *Science*, 300,297.

[38] Sherley JL (2003) Embryos aren't essential to stem cell research. *Nature* 423, 381. Se suele da por supuesto que sólo los embriones humanos clonados pueden ser fuente de células para investigación de enfermedades. Hay disponibles líneas celulares derivadas de una amplia variedad de tejidos humanos de sanos y de enfermos. Y sobre todo, no se expresa con claridad la práctica que conduce a producir células maduras desde embriones humanos: para conseguir que las células madre embrionarias pasen a las adultas o tejidos es preciso pasarlas primero a células madre de adulto.

[39] Hakelien AN, Landsverk HB, Robl JM, Skalhegg BS, Collas P (2002) Reprogramming fibroblasts to express T-cell functions using cell extracts. *Nature biotechnology* 20, 460-466.

[40] Schöler H.R. (2003) *Science*. DOI: 10.1126/science.1083452.

[41] Li L, Connelly C, Wetmore C, Curran T and Morgan JL (2003) Mouse embryos cloned from brain tumors. *Cancer Research* 55, 2733-2736.

[42] *Science* 295, 819, 2002.

[43] Para el inicio de los trabajos con células humanas:
<http://www.theage.com.au/articles/2003/04/24/1050777361411.html>