CLONACIÓN DE MAMÍFEROS ADULTOS. EL CAMINO INICIADO

Fidel O Castro

División de Genética de Células de Mamíferos. Centro de Ingeniería Genética y Biotecnología. Apartado postal 6162. La Habana, Cuba.

El ancestral mito de la irreversibilidad de la diferenciación celular en animales ha sido al parecer roto con la aparición del primer mamífero obtenido por clonación a partir de tejido somático de un individuo adulto (1). Dolly, la oveja así nombrada por los científicos escoceses del Instituto Roslin, que la generaron en julio del pasado año, ha devenido motivo de polémica de científicos, políticos, religiosos y de la sociedad en general.

Clonación

La clonación es la confección de copias idénticas de algún elemento biológico. Así tenemos clonación de genes en plásmidos u otros vectores, que permiten la multiplicación de copias exactas de dicho gen dentro del vector. En el campo de la inmunología, la perpetuación de una especificidad antigénica reflejada en anticuerpos únicos contra ésta y descendientes de una estirpe única, es también clonación.

Desde el punto de vista de organismos enteros, la clonación se refiere a la obtención de seres genéticamente idénticos. En plantas, por ejemplo, la clonación somática permite propagar en miles de copias a una especie determinada. En mamíferos, los gemelos monocigóticos son clones que surgen de forma espontánea al producirse una duplicación aberrada (generalmente por bipartición) de un embrión preimplantatorio. Experimentalmente se han generado mamíferos clónicos mediante el aislamiento de blastómeras totipotentes a partir de embriones de entre 8 y 16 células, una blastómera es fundida con un ovocito maduro, previamente enucleado. De este modo se logra, aunque con una eficiencia muy baja, que el núcleo de la blastómera gobierne los eventos subsiguientes de desarrollo embrionario. Este control nuclear es a su vez condicionado, al menos en las primeras etapas, por factores citoplasmáticos aún no identificados.

La clonación somática (Figura 1) cuyo único exponente hasta el presente es Dolly, es en principio similar a aquella de blastómeras, pero fundiendo con el ovocito maduro y enucleado una célula de origen no embrionario (somática) que debe en principio adquirir la capacidad de retornar a un estado no diferenciado para poder asumir el control del desarrollo embrionario subsiguiente.

Antecedentes de la clonación

La clonación en animales data de la década del 50 cuando Briggs y King lograron a partir de células de

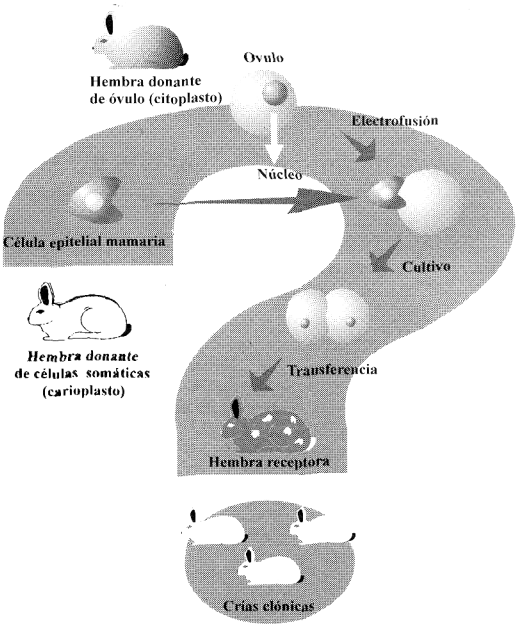

Figura 1. Esquema simplificado del proceso de clonación de mamíferos a partir de células somáticas. Este esquema es válido también en principio para la clonación de blastómeras, si se sustituye la fuente donante de células somáticas por otra donante de blastómeras embrionarias. Ver texto para detalles de las metodologías.

blástula de Rana pipiens fundidas con ovocitos de la misma especie, obtener animales idénticos (2). Sin embargo la clonación de mamíferos sobrevino casi 30 años más tarde y fue lograda por Illmensee y Hope (3) en Bar Harbor Maine, en Estados Unidos, como material genético de partida estos científicos emplearon células del macizo intracelular obtenidas de blastocistos de ratón las cuales fueron fundidas mediante virus Sendai inactivado, con cigotos unicelulares recién fecundados y enucleados. En la segunda mitad de los 80, se lograron clonaciones exitosas en la mayoría de las especies de importancia económica (2-7; Tabla 1) Partiendo en casi todos los casos de blastómeras totipotentes aisladas de embriones de entre 8 y 32 células y fundiéndolas con pulsos eléctricos a ovocitos maduros y enucleados.

Los primeros avances de importancia fueron publicados por Willadsen en 1986 trabajando con embriones y ovocitos de ovejas. La evaluación de la capacidad de reprogramación nuclear de blastómeras en diferentes estados de desarrollo fue el objetivo de estudio principal en los trabajos pioneros de finales de la década de los 80. De este modo se pudo demostrar que si bien puede variar el potencial de desarrollo de las blastómeras aisladas en dependencia de la especie, los estadios entre 8 y 16 células son los óptimos para realizar la clonación a partir de blastómeras, siendo los límites inferiores el estado de

1. Wilmut I, Schnieke AE, McWhir J, Kind AJ, Campbell KHS. Viable offspring derived from fetal and adult mammalian cells. Nature 1997;385:810-813.

2. Briggs R, King T. Transplantation of living nuclei from blastula cells into enucleated frog eggs. Proc Natl Acad Sci USA 1952;38:455.

3. Illmensee K, Hope PC. Nuclear transplantation in Mus musculus: Developmental potential of nuclei from preimplantation embryos. Cell 1981;23: 9-18.

4. Willadsen SM. Nuclear transplantation in sheep embryos. Nature 1986; 320:63-65.

5. Prather RS, Barnes FL, Simms MM, Robl JM, Eyestone WH, First NL. Nuclear transplantation in the bovine embryo assessment of donor nuclei and recipient oocyte. Biol Reprod 1987;37:859-866.

6. Stice SL, Robl JM. Nuclear reprogramming in nuclear transplantant rabbit embryos. Biol Reprod 1988;39: 657-664.

7. Prather RS, Simms MM, First NL. Nuclear transplantation in early pig embryos. Biol Reprod 1989;41:414-418.

Tabla 1. Antecedentes de la clonación en animales a partir de blastómeras.

Especie	Año	Origen celular*	Recipiente	Resultado**	Referencia
Rana	1952	Blástula	Ovocitos***	Ranas clónicas	2
Ratón	1981	ICM	Cigotos enucleados	3/16 = 18,8 % ratones clónicos	3
Ovejas	1986	Blastómeras (8-16)	Ovocitos maduros	3/4 = 75 % ovejas clónicas	4
Bovino	1987	Blastómeras (9-15)	Ovocitos maduros	2/19 = 10,5 % terneros clónicos	5
Conejos	1988	Blastómeras (8-32)	Ovocitos maduros	6/64 = 3,7 % conejos clónicos	6
Cerdos	1989	Pronúcleos	Cigotos enucleados ovocitos maduros	7/56 = 12,5 % cerdos clónicos 1/88 = 1,1 3 % cerdos clónicos	7

*Las cifras en paréntesis indican el estadio en que se encontraban los embriones donantes de núcleo. Por ejemplo, entre 8 y 16 células para ovejas; **las cifras indican la cantidad de individuos clónicos obtenidos a partir del total de embriones transferidos, así como el porciento de eficiencia de la técnica para cada especie. Los detalles de las eficiencias de cada paso del proceso de clonación pueden ser hallados en las referencias respectivas; ***no se estudió el estado de maduración del ovocito.

pronúcleos en el embrión unicelular y superiores el de 32 células para conejas o macizo intracelular de blastocistos para ratones.

Resalta por su originalidad el reporte de Prather y colaboradores en cerdos (7). Estos investigadores llevaron a cabo un intercambio de pronúcleos entre el carioplasto y el citoplasto. Los cigotos recién fecundados fueron enucleados y en su lugar recibieron pronúcleos de los embriones donantes de núcleo. La eficiencia del proceso fue relativamente alta (12,5%) sin embargo cuando emplearon ovocitos maduros enucleados para recibir núcleos pronucleares la eficiencia disminuyó considerablemente. Esto puede haber estado relacionado con la presencia de factores citoplasmáticos activos en el cigoto inmediatamente después de la fertilización y que son requeridos por los pronúcleos para su ulterior división.

El éxito alcanzado con la clonación convencional o de blastómeras no conllevó a avances fundamentales en la clonación a partir de células somáticas. Aunque los estudios realizados en ese sentido no aparecieron publicados debido a sus resultados negativos, no hay duda de que sí se estuvieron llevando a cabo en ciertos laboratorios del mundo. Una vez más los antecedentes de este nuevo sistema de clonación surgieron en anfibios, gracias a los trabajos de Gurdon y colaboradores (8), quienes obtuvieron renacuajos (pero no ranas adultas) a partir de queratinocitos de *Xenopus laevi* trasplantados a óvulos cuyo material genético había sido eliminado.

Los primeros avances de importancia hacia la clonación somática en mamíferos fueron precisamente del grupo escocés del Instituto Roslin en Edimburgo (1, 10, 11; Tabla 2).

Este grupo logró obtener ovejas clónicas a partir de células del disco embrionario de embriones de oveja en el día 9 de cultivo (10) y posteriormente a partir de fibroblastos de fetos de la misma especie en el día 26 del desarrollo (11). En ambos casos, es cierto que si bien no se trataba de células totipotentes, sí eran células pluripotentes. Los discos embrionarios del día 9 de cultivo son capaces de dar lugar a múltiples estructuras celulares y de tejido en el embrión en formación. Los fibroblastos fetales darán lugar a distintas estirpes de células tales como osteoblastos y mioblastos.

Tabla 2. Antecedentes de la clonación en animales a partir de otras estirpes celulares.

Especie	Año	Origen celular	Recipiente	Resultado*	Referencia
Xenopus	1975	Keratinocitos	Ovocitos**	Renacuajos	8
Ratón	1993	Células totipotentes embrionarias	Embriones tetraploides***	2/34 = 6 % ratones clónicos	9
Ovejas	1994	Disco embrionario día 9 de cultivo	Ovocitos maduros	3/20 = 15 % ovejas clónicas	10
Ovejas	1996	Fibroblastos embrionarios día 26	Ovocitos maduros	8/32 = 25 % ovejas clónicas	11
Ovejas	1997	Glándula mamaria	Ovocitos maduros	1/29 = 3,4 % ovejas clónicas	1

*Las cifras indican la cantidad de individuos clónicos obtenidos a partir del total de embriones transferidos, así como el porciento de eficiencia de la técnica para cada especie. Los detalles de las eficiencias de cada paso del proceso de clonación pueden ser hallados en las referencias respectivas; **se desconocía el estado de maduración del citoplasma del ovocito; ***las células embrionarias totipotentes fueron fundidas con embriones de 4 células tetraploidizados mediante fusión eléctrica. Ver texto para detalles.

De especial interés fue el reporte de Nagy y colaboradores en 1993 (9) en el cual se obtuvieron ratones a partir de células embrionarias totipotentes (CET). Estas células que son aisladas a partir de blastocistos, son como la palabra lo dice totipotentes, cuando son agregadas con mórulas o microinyectadas a blastocistos. En otras palabras, ellas necesitan la cooperación de células embrionarias para colonizarlas y contribuir a la formación de ciertas estirpes celulares. Es este el principio empleado para obtener animales transgénicos con deleción de genes o con recombinación homóloga.

Sin embargo en el artículo en discusión, los autores fundieron CET con embriones cuatricelulares tetraploides. El objetivo de esta manipulación es el de preparar un recipiente "inerte" (los embriones tetraploides no son viables y por tanto no contribuyen a la formación de estirpes celulares) sobre el cual se fundieron las CET y éstas por sí solas dieron lugar a ratones viables. No cabían dudas ya respecto a que no eran estrictamente necesarias poblaciones de células totipotentes (blastoméricas) para lograr la clonación, comenzaba a abrirse la esperanza pues, de clonar a un individuo adulto. El resto de la historia es ya conocida, Dolly se convirtió en el primer mamífero nacido a partir de una célula adulta.

Dolly, un fenómeno trascendental

Desde el punto de vista experimental es indudable que el fenómeno del nacimiento de Dolly significa un avance trascendental en la biología moderna. En esencia se han roto dos paradigmas hasta ahora inamovibles de la biología de los mamíferos, a saber; la necesidad de los dos parentales para la obtención de una nueva progenie y la irreversibilidad de la diferenciación celular.

¿Ginogénesis?

Con respecto al primer punto, estudios que datan de la década de los 70 demostraron firmemente que los embriones requerían de la participación de ambos gametos en su concepción durante la fertilización para poder generar un feto y consecuentemente un nuevo individuo. Los experimentos clásicos de producción de embriones monoparentales a través de la androgénesis y ginogénesis en ratones (Figura 2) demostraron que los embriones androgenéticos cuando eran trasplantados a madres receptoras producían sólo tejidos derivados del trofoblasto embrionario (membranas fetales), mientras que aquellos embriones producidos por ginogénesis daban lugar sólo a tejido embrioblástico (12-15). Ambos fenómenos eran incompatibles con la formación de un nuevo individuo. Era obvio que se necesitaba la conjugación de las dos dotaciones genéticas para completar la embriogénesis. Al parecer, la metilación diferencial a la que es sometida el genoma paterno

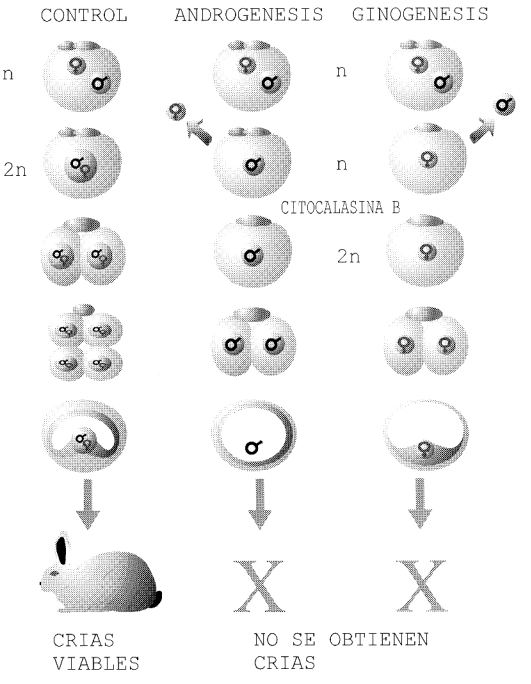

Figura 2. Representación gráfica de la partenogénesis experimental. Ginogénesis es la obtención de embriones dipoides monoparentales a partir de un gameto recién fecundado al cual se le ha retirado el pronúcleo masculino. Androgénesis es el proceso inverso, o sea, la extracción del pronúcleo femenino. En ambos casos, la dotación genética haploide remanente es diploidizada mediante la droga citocalasina B que es un inhibidor de la división celular pero no de la replicación del AND. Después de la eliminación de la droga los embriones se dividirán, pero no dan lugar a crías, sino a macizo intracelular en el caso de la ginogénesis o a membranas fetales en el de la androgénesis. A la izquierda y a manera de comparación se muestra el desarrollo preimplantatorio de embriones controles. Nótese la ligera asincronía en el desarrollo entre éstos y los partenotes.

influye decisivamente sobre el futuro de la actividad transcripcional y mitótica del embrión recién formado (15). Por otra parte la ausencia del cromosoma X en los androgenones producidos a partir de espermatozoides Y es tóxica y letal para la célula (14, 15).

El caso de Dolly constituye la primera ocasión en la cual se obtiene una progenie a partir de la clonación de una célula somática insertada en un ovocito enucleado; por tanto desde el punto de vista de la biología reproductiva y estrictamente hablando, Dolly no tuvo padre, pues se derivó de las células de la glándula mamaria de su madre, sin que mediara un espermatozoide u otra forma más primitiva de gametos masculinos en dicha concepción. Pero resulta muy difícil adjudicarle el nombre de ginogenético al embrión reconstituido a partir del cual se formó Dolly, puesto que en la formación del tejido de la madre de Dolly sí participó un padre y por tanto hubo intercambio de material genético en todas y cada una de las células somáticas de la madre genética. Por ello, cuando el embrión en cuestión se dividió por primera vez, estaba dividiéndose un embrión femenino, pero no estricta-

8. Gurdon JB, Laskey RA, Reeves OR. The developmental capacity of nudei transplanted from keratinized skin cells of adult frogs. J. Embryol. Exp. Morph 1975;34:93-112.

9. Campbell KHS, McWhir J, Ritchie B Wilmut I. Production of live lambs following nuclear transfer of cultured embryonic disc cells. Theriogenology 1994;43:181.

10. Campbell KHS, McWhir J, Ritchie WA, Wilmut I. Sheep cloned by nuclear transfer from a cultured cell line. Nature 1996;380:64-66.

11. Nagy A, Rossant J, Nagy R, Abramow-Newerly W, Roder JC. Derivation of completely cell culture-derived mice from early-passage embryonic stem cells. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 1993;90:8424-8428.

12. McGrath J, Solter D. Completion of mouse embryogenesis requires both the maternal and paternal genomes. Cell 1984;37:179-183.

13. Surani, MAH, Barton SC. Development of gynogenetic eggs in the mouse: implications for parthenogentic embryos. Science 1983;222:1034-1036.

14. Surani MAH, Barton SC, Norris, ML. Development of reconstituted mouse eggs suggests imprinting of the genome during gametogenesis. Nature 1984; 308:548-550.

15. Tarkowski A. *In vitro* development of haploid mouse embryos produced by bisection of one cell fertilized eggs. J. Embryol Exp Morph 1977;38:187-202.

mente ginogenético, ya que no se duplicó el material genético haploide de un gameto femenino.
Este suceso echa por tierra lo discutido anteriormente sobre la necesidad de ambos parentales para la formación de un nuevo individuo, aunque no niega que la ginogénesis y la androgénesis sean, al menos por el momento, eventos celulares incompatibles con la reproducción a término y la obtención de crías viables. No es fácil hallar una explicación conciliadora entre lo clásico y Dolly y, probablemente el fenómeno sea mucho más complejo de lo que se piensa y la respuesta hay que buscarla en el segundo paradigma roto por el nacimiento de Dolly, la irreversibilidad de la diferenciación celular en mamíferos.

Reversión de lo irreversible

Las células de la glándula mamaria constituyen probablemente uno de los mejores ejemplos de organización secretora en el organismo, el ciclo de dichas células es en extremo complejo y atípico. Desde el nacimiento y hasta la pubertad las células están sujetas primero a un crecimiento isométrico proporcional al corporal y después a un crecimiento alométrico durante el cual se sientan las bases de la diferenciación secretora. El crecimiento alométrico se lleva a cabo durante la pubertad. Más adelante, durante la gestación, las células de la glándula mamaria terminan su diferenciación morfológica y secretora bajo el control de los genes específicos y de la matriz extracelular. Una vez concluida la lactación, involucionan mediante un proceso apoptótico para comenzar de nuevo el ciclo, con la próxima gestación (16). A medida que las células epiteliales de la glándula mamaria transitan por los eventos morfológicos y diferenciativos anteriormente mencionados, cambia también la naturaleza de las proteínas y los factores liberados por ellas.

La célula madre de Dolly provino de una hembra en el último tercio de la gestación, en donde la actividad proliferativa debe de haber estado finalizando y las células se encontrarían en un estado diferenciado, secretor y cuasi quiescente desde el punto de vista mitótico. La pregunta es: ¿de qué estirpe celular exactamente? Es sabido que en un cultivo primario obtenido a partir de la glándula mamaria se encuentran presentes poblaciones de células epiteliales, mioepiteliales, fibroblastos entre otros. Si bien es irrelevante a los efectos de la clonación cuál de las poblaciones existentes en un cultivo primario dio lugar a Dolly, ya que en cualquier caso implica la reprogramación de la diferenciación, no lo es la posibilidad de que en este coctel primario de células mamarias existan poblaciones de tipo pluripotencial que sean desconocidas aún para la comunidad científica y que a su vez estén involucradas en la regeneración del tejido mamario después del primer destete y durante las subsiguientes gestaciones.

¿Qué factores están involucrados en la reprogramación nuclear de una célula somática fusionada a un ovocito enucleado? Esta pregunta no tiene respuesta aún, pero dado el carácter universal del factor promotor de la maduración (MPF) como elemento controlador de la entrada y salida del ciclo celular en eucariotas, su presencia y actividad en los eventos de formación de embriones reconstituidos mediante clonación es motivo de amplios estudios. Actualmente se ha logrado establecer un vínculo entre los niveles de MPF y la activación del complejo célula/ovocito. Cuando en el ovocito maduro ocurre el evento de fertilización, los niveles de MPF son altos, pero estos decrecen drásticamente con la activación del ovocito condicionada por la entrada del nemaspermo. En experimentos precedentes, Wilmut y colegas (17) demostraron que cuando los niveles de MPF en los ovocitos eran elevados, la célula donante de ADN (carioplasto) era reprogramada y el embrión reconstituido resultante se dividía independientemente del estado de interfase del ciclo celular en que se encontraba el carioplasto; sin embargo en ningún caso se obtuvieron crías a partir de los embriones así reconstituidos.

Dos causas fundamentales parecen ser las responsables de este fenómeno: 1) la condensación prematura de los cromosomas y 2) la ruptura de la envoltura nuclear. Estos dos eventos son detrimentales para la correcta ploidía y la replicación del ADN respectivamente, si son llevados a cabo durante la interfase y no durante la mitosis. Estos hallazgos indican que algunos factores transactivadores u otros componentes citoplasmáticos del ovocito fuerzan al núcleo interfásico a llevar a cabo eventos meramente mitóticos.

Cuando los niveles de MPF eran bajos en los ovocitos, después de la activación artificial con pulsos eléctricos, entonces éstos eran receptivos sólo a aquellos carioplastos provenientes de etapas G1 o S del ciclo celular, los embriones reconstituidos se dividían (y como se demostró, nació Dolly a partir de uno de ellos). Cuando, en lugar de ovocitos se emplearon zigotos pronucleares enucleados, no se obtenían resultados adecuados. La conclusión parece clara, al menos MPF está involucrado en la reprogramación nuclear y es reclutado por los pronúcleos del ovocito recién fertilizado. La importancia de este hallazgo fue trascendental para el establecimiento de las condiciones necesarias para el nacimiento de Dolly. Quizá otros grupos hayan subestimado el papel del estado de sincronía entre el citoplasto (ovocito receptor) y el carioplasto o célula donante del ADN.

Es obvio que las células donantes de ADN deben de encontrarse en estadios diploides, para: 1) estar en sincronía con el ovocito metafásico y por ende diploide y 2) para mantener la ploidía correcta en el nuevo embrión resultante de la fusión. Por tanto las fases del ciclo celular S, G2 y M no son adecuadas para los experimentos de clonación somática, mientras que G1 es la etapa óptima. Bajo ciertas condi-

16. Akers M. Lactation. Encyclopedia of Agricultural Science 1994;2:635-643.

17. Campbell KHS, Loi P, Cappai P, Wilmut I. Improved development to blastocysts of ovine nuclear transfer embryos reconstructed during the presumptive S-phase of enucleated activated oocytes. Biol Reprod 1994;50: 1385-1393.

ciones la célula sale del ciclo celular durante la fase G1 y se queda detenida en un estado quiescente, de no crecimiento y no división, denominado G0. Muchas células en el organismo adulto, tales como las células nerviosas, del lente del ojo y de músculo estriado no se dividen nunca, otras como los fibroblastos que participan en la regeneración de heridas crecen y se dividen al ser solicitado esto por el organismo, de otro modo permanecen en estado quiescente justo antes de la síntesis del ADN. Es probable que las células en este estado presenten una cierta relajación de la cromatina que la hace más asequible a factores de citoplasmáticos de reprogramación, así como a factores de transcripción (18). En cultivo, las células son llevadas a G0 mediante la deprivación de factores nutricionales especialmente el suero, esto conlleva a la suspensión de la transcripción de los genes codificantes para las ciclinas dependientes de quinasas, así como para las ciclinas G1 (grupos D y E) y a la caída brusca de los niveles de las proteínas correspondientes. Como consecuencia, la célula queda desprovista de los factores auxiliadores para traspasar los puntos de restricción del ciclo celular y quedan detenidas en G0.

Existen varias formas de saber si una célula se encuentra en la interfase o en mitosis dentro del ciclo celular, siendo la separación activada por fluorescencia (FACS) la más usada, ya que permite cuantificar la cantidad de ADN presente en una célula, a saber: x; para la fase G1, x-2x para la fase S, 2x para G2 y M. Sin embargo resulta difícil conocer exactamente si una célula detenida en G1 se halla fuera del ciclo o en G0. Entre los marcadores más utilizados para ello, se encuentra el antígeno celular nuclear de proliferación (PCNA). Este antígeno es un cofactor para la polimerasa delta y es absolutamente necesario para la replicación del ADN; por lo tanto las células que se encuentren progresando a través del ciclo celular necesitan de la síntesis de PCNA, mientras que aquellas detenidas en G0 no lo tendrán.

En los experimentos del grupo del Instituto Roslin en Edimburgo se emplearon como carioplasto células quiescentes o en G0. Dicho estado fue determinado por ensayo inmunoenzimático empleando anticuerpos anti PCNA/ciclina revelados con un segundo anticuerpo rodaminado. La validez del ensayo reside en los controles de células en división, ya que PCNA es muy difícil de detectar mediante anticuerpos; de ahí que es imprescindible dejar claro que su ausencia no es un artefacto experimental. Como citoplasto fueron utilizados ovocitos previamente enucleados y activados por pulsos eléctricos en los cuales los niveles de MPF eran bajos. El grupo escocés ha propuesto para estos citoplastos el nombre de "recipiente universal" para la clonación. Es muy probable que estos meticulosos estudios de sincronización de los ciclos entre el cario y citoplastos hayan sido los responsables de la exitosa clonación de Dolly y constituye sin lugar a dudas el mayor mérito de las investigaciones realizadas.

Surgen sin embargo interrogantes tales como: ¿fue suficiente sólo esa exacta sincronía para lograr que los factores citoplasmáticos reprogramaran un núcleo de una célula ya diferenciada, o existirán otros factores aún desconocidos que gobiernan la interacción entre el núcleo donante y el ooplasma receptor? Esto por supuesto no se conoce aún y será objeto de múltiples estudios en un futuro inmediato.

Una mirada al futuro

Si realmente la célula madre de Dolly no procedió de alguna estirpe pluripotente o totipotente desconocida, entonces no se puede negar que los estudios de este grupo han comenzado a desbrozar el complejo camino de la comprensión de la diferenciación celular y su posible reversión a un nivel antes no imaginado. El futuro también nos deparará la confirmación o la negación de la factibilidad para replicar los experimentos que dieron lugar a Dolly.

Es indudable que otras líneas celulares han de ser probadas, incluyendo no sólo cultivos primarios sino líneas bien establecidas y caracterizadas como carentes de actividad pluri o totipotencial y por qué no, aquellas con sabido potencial pluripotente. El uso de líneas celulares conservadas en congelación será motivo de estudios en futuros experimentos de clonación. También se deben repetir los experimentos en otras especies, incluyendo roedores en donde el ciclo celular es mucho más rápido, lo que permitirá evaluar el efecto del tiempo de activación del genoma cigótico en la reprogramación nuclear.

El estudio del ADN mitocondrial heredado básicamente a partir del citoplasto ofrecerá luz sobre la viabilidad a largo plazo de animales clonados a partir de individuos adultos, ya que algunas enfermedades relacionadas con desórdenes metabólicos tienen su origen en el envejecimiento de las mitocondrias.

Las biotecnologías aplicadas, como la transgénesis, se enriquecerán notablemente si se logra demostrar la repetibilidad de la clonación somática, pues permitirán en principio modificar en el laboratorio células de la estirpe deseada, evaluar el comportamiento de la proteína secretada por el transgén de interés y sólo entonces y con esas células ya estudiadas, se llevaría a cabo la clonación entendiéndose por ello la generación de un individuo clónico y transgénico. Esto es especialmente válido e importante para la transgénesis en animales de granja y sus aplicaciones fundamentales actuales, la expresión de proteínas recombinantes en la leche y el xenotrasplante de órganos.

Por otra parte se podrían multiplicar de forma casi indefinida animales de alto valor genético (transgénicos incluidos) o superproductores en el caso de la

18. Stewart C. An udder way of making lambs. Nature 1997;385:769-770.

ganadería; si se establece la universalidad de la tecnología, se podrían quizá preservar células de especies en peligro de extinción para restaurar en un futuro las mismas. Como riesgo fundamental, se vislumbra al parecer la clonación de la susceptibilidad a enfermedades al llevarse a cabo la clonación de hatos de animales de alta productividad.

No queda duda alguna que la clonación de un individuo adulto a partir de una célula diferenciada ha trascendido las meras fronteras de la procreación y del nacimiento de una ovejita de raza Finn Dorset de abundante producción lanar, y llamada Dolly, pues con ella se han roto paradigmas de la biología que sitúan a esta ciencia unos milímetros más adelante en el camino hacia el entendimiento de su propia esencia.

Agradecimientos

Quiero expresar mi gratitud a Boris Ramos por su apoyo en todo momento, a los doctores Ian Wilmut (Roslin Institute, AFRC, Edimburgo, Reino Unido) y David Wittingham (Medical Research Council, Londres, Reino Unido) por sus comentarios sobre la ginogénesis en el caso de Dolly y Dr. Bill Jefery de la Pennsylvania State University por los comentarios sobre PCNA.

Nota añadida *a posteriori*

Posteriormente a la entrega de este trabajo para su revisión y edición, se hizo pública por parte de científicos del Instituto Roslin y la compañía patrocinadora PPL Therapeutics de Edimburgo, Escocia la noticia del nacimiento de otra oveja clonada a partir de células somáticas. En este caso Polly (por ser de la raza Poll Dorset) fue obtenida a partir de células de piel fetal. Previamente las células fueron transfectadas con un gen codificante para una proteína humana no revelada, que ha de ser secretada en la leche de las ovejas clonadas y transgénicas. Este es un importante paso de avance hacia la simplificación del proceso de transgénesis y, además, constituye la primera comprobación de la veracidad de los resultados publicados por el propio grupo en febrero del presente año.

REDBIO'98

III ENCUENTRO LATINOAMERICANO DE BIOTECNOLOGÍA VEGETAL
3RD. LATIN-AMERICAN MEETING ON PLANT BIOTECHNOLOGY

La Habana, Cuba, del 2 al 5 de junio de 1998
Havana, Cuba, on June 2-5, 1998

"Seguridad Alimentaria y Biotecnología en América Latina y el Caribe"

Incluye conferencias plenarias, simposios, talleres, mesas redondas y sesiones de posters. Sesionará una feria comercial, se promoverán encuentros para la promoción de negocios y alianzas estratégicas y se celebrarán cursos y tours pre y post encuentro.

Para más información dirigirse a:

Secretaria Técnica
Dra. María Cristina Pérez
Agencia de Ciencia y Tecnología
CITMA, La Habana, Cuba
Teléfono: (53-7) 81 6245
Fax: (53-7) 33 9460
E-mail: redbio98@bioca.cigb.edu.cu