

TÉCNICAS DE CLONACIÓN DE EMBRIONES

MARÍA DEL CARMEN NAVARRO MALDONADO

ADOLFO ROSADO GARCÍA

HÉCTOR FERNANDO SERRANO.

I. Introducción	36
II. Técnicas de clonación de embriones	38
1.Partición o división de embriones	39
2.Separación y cultivo de blastómeros aislados	42
3.Transferencia nuclear	44
III. Ventajas y desventajas de las técnicas de clonación.....	53
IV: Aplicaciones de la clonación de embriones	56
1.Clonación de embriones por generación múltiple	57
2.Aspectos comerciales de la clonación de embriones	59
3.Aplicación de la clonación en la conservación de especies	60

V Consideraciones éticas de la clonación	61
VI. Conclusiones	64
Referencias	66

I. Introducción

Durante la última década, la investigación y aplicación de nuevas tecnologías relacionadas con la reproducción animal ha evolucionado de manera acelerada con el desarrollo de técnicas que incrementan la capacidad reproductiva y permiten el mejoramiento genético. Las técnicas de manipulación del proceso reproductivo que mayor atención han recibido son la superovulación, transferencia embrionaria, congelación de embriones, cultivo *in vitro* de embriones, partición y clonación de embriones, así como el sexado de embriones y de fetos. La combinación de ellas y su utilización en el ámbito comercial, forman parte de un sistema para la producción y comercialización de mejores animales productores de leche, carne y lana, entre otros campos (1).

La clonación representa una de las tecnologías de gran interés mundial en la actualidad, debido a su aplicabilidad tanto en los animales de importancia económica como en los seres humanos. A pesar de que actualmente es de baja eficiencia, muestra que constituye una alternativa en la solución de los problemas reproductivos. En la medida en que se tenga mayor comprensión de sus deficiencias, en un futuro muy cercano permitirá

seleccionar y reproducir animales de interés económico y ecológico a gran escala. Actualmente se requieren grandes cantidades de material biológico de alta calidad para obtener resultados positivos 10 que incrementa el costo de la técnica (2).

El presente trabajo contiene una selección de la información concerniente a las diferentes técnicas desarrolladas durante los últimos años para obtener animales genéticamente idénticos entre sí, dando prioridad a su aplicación en animales domésticos y de laboratorio, sus aplicaciones comerciales y potencial uso ecológico. Se discuten algunas consideraciones éticas que deben tomarse en cuenta para establecer un límite a los alcances de este tipo de técnicas, entre las cuales está su aplicación en embriones humanos.

La clonación puede verse en un sentido vertical, en donde los individuos clonados por transferencia de núcleos serán semejantes al individuo del que se obtenga la célula donadora de éste, también puede enfocarse en forma horizontal, en la que 10s individuos clonados por técnicas diferentes a la transferencia de núcleos serán similares entre sí. En el primer caso se requiere de la combinación de dos células manipuladas: de una de ellas se tomara solamente el núcleo que será introducido en el citoplasma de otra (3). En el sentido horizontal, la manipulación se realiza en las edades tempranas del embrión para producir gemelos idénticos. En este caso, no se requiere de una manipulación tan elaborada como en la transferencia nuclear.

Para algunos autores, la clonación está limitada exclusivamente al conjunto de técnicas que permiten la manipulación de una célula somática para transferir posteriormente su núcleo a un citoplasma adecuado e iniciar el desarrollo de un nuevo animal como un duplicado genético exacto

al de la célula original de la cual se extrajo el núcleo (3). En consecuencia los clones representan un grupo de organismos vivos que comparten el mismo complemento de genes nucleares (4). Igualmente puede interpretarse como la reproducción asexual que da lugar a la formación de individuos genéticamente similares. En ella, la célula inicial obtiene su información genética del núcleo de una célula somática de un solo donador, en este contexto, el individuo clonado es casi idéntico a este último con variaciones menores debidas a la presencia de información genética contenida en las mitocondrias (5, 6).

Para otros autores, la clonación no está limitada a la transferencia de núcleos sino que consideran que los gemelos monocigóticos, formados por la separación de las células que produce el huevo fertilizado después de varias divisiones, dado que se originan de un mismo genoma, esencialmente contienen la misma información genética, por lo que puede considerárseles como clones (2). Este enfoque abre el campo para incluir a la clonación como la forma natural de reproducción de algunas especies animales como el armadillo (*Dasypus novemcinctus*) y su primo argentino, la mulita. El armadillo produce cuádruples monocigóticos (7) y la mulita produce nacimientos de individuos idénticos por una segregación de blastómeros poco antes de la implantación (8).

II. Técnicas de clonación de embriones

Con base en los conceptos de la clonación descritos anteriormente, se observa que existen tres técnicas que han sido utilizadas en animales de granja o de laboratorio para producir embriones genéticamente idénticos. Dos de ellas cabrían en el concepto de la clonación en un sentido horizontal: la partición o división de embriones por microcirugía, y la separación y cultivo

de blastómeros aislados por métodos enzimáticos o mecánicos (9, 10). La tercera entra en el concepto de la clonación en un sentido vertical: la transferencia nuclear a partir de células somáticas de adulto o embrionarias (3) o de blastómeros de embriones (11, 12, 13) entre otras células (Cuadro 1).

CUADRO 1
PRINCIPALES TIPOS CELULARES UTILIZADOS EN
LAS TÉCNICAS DE CLONACION

Metodología	Tipos Celulares
A) Partición de embriones	• Mórulas o blastocistos tempranos o tardíos (15,38).
B) Separación y cultivo de blastómeros aislados	• Blastómeros de embriones en diferentes etapas de la segmentación, desde 2 células hasta mórulas, cultivándose <i>in vitro</i> dentro o fuera de su zona pelúcida (65, 66, 67). • Partenogenotes (ovocitos activados químicamente para dividirse) para reagregar blastómeros (52, 68).
C) Transferencia nuclear	• Como carioplastos (células donadoras de núcleos) • Blastómeros obtenidos de embriones en diferentes etapas de la segmentación (desde 2 células hasta blastocistos) (52, 69). • Células somáticas de embriones (trofoectodermo y masa celular interna o MCI, fibroblastos fetales, células de riñón, piel, músculo, glándula mamaria y células cúmulo o espermatogonias de animales adultos) (3, 4, 15, 19, 39, 44, 54, 70, 71, 72). • Como citoplastos (células receptoras de núcleos) • Ovocitos enucleados • Cigotos • Embriones de 2 blastómeros (19, 54, 71)

1. Partición o división de embriones

En la década de los 70 se pensaba que los embriones en fases tempranas de la segmentación no sobrevivirían después de una

microcirugía. Fue en los años ochenta cuando se demostró que las mórulas y blastocistos de los animales domésticos eran capaces de desarrollarse después de una partición y producir nacimientos viables (14). Actualmente la partición de embriones permite la producción de gemelos idénticos al dividir el embrión original por métodos microquirúrgicos. Las evidencias experimentales indican que existe una relación inversa entre el número de secciones que se le hagan al embrión y el porcentaje de éxito. Las tasas de producción de gemelos monocigóticos van desde poco mas de 30% en bovinos y ovinos (4, 15, 16) siendo hasta casi 70% en bovinos, con porcentajes de gestación superiores a 60% (14) e incluso, en algunos casos, equivalentes a 100% (17).

El número de células que tenga el embrión no solo limita el número de segmentos en que pueda dividirse, sino que también tiene incidencia sobre otros aspectos. Típicamente se utilizan embriones en etapa de mórula o blastocisto (18, 19). Esta estrategia permite utilizar una de las secciones para otros fines experimentales como la determinación del sexo del embrión, mientras que el resto se cultiva o congela para después transferirse a hembras receptoras previamente sincronizadas para mantener la gestación (20, 21, 22).

Los embriones en etapa de blastocisto son seccionados de manera que se dividan en dos partes iguales tanto la masa celular interna (MCI) como el trofoectodermo. Es recomendable emplear soluciones que deshidraten ligeramente al embrión (por ejemplo, sacarosa 200 mM), con lo que se reduce el daño al trofoectodermo durante su partición. Una vez cortadas, las mórulas compactas y los blastocistos no necesariamente deben ser introducidos a zonas pelúcidas, teniendo una sobrevivencia aceptable al ser transferidas en hembras receptoras; aunque existen informes que indican tasas de supervivencia de 15% en medios embriones

(0 demi-embriones) sin zona pelúcida y de 35% cuando se transfieren con zona pelúcida. En este último caso las tasas de gestación van de 55% a 65% en bovinos (18). Willadsen y Godke (23) obtuvieron tasas de gestación de 80% en bisecciones de embriones de ovino indistintamente si tenían zona pelúcida o no. En el Cuadro 2 se muestran algunos de los factores principales que afectan las tasas de éxito con esta técnica.

CUADRO 2
FACTORES QUE AFECTAN LAS TASAS DE GESTACIÓN EN LA
PARTICIÓN DE EMBRIONES

<i>Factores</i>	<i>Consideraciones</i>
Calidad morfológica	Mejores los de grados 1 a 2 (14)
Fase de segmentación de los embriones	Mejores resultados (30) y con mayor tasa de gestación (16) en blastocistos que con mórulas
Número de secciones en las que se divide al embrión	Los medios embriones (demi-embriones) sobreviven mejor en el útero que los cuartos embriones (14). Los cuartos embriones carecen de MCI funcional, viabilidad reducida (30).
Presencia de zona pelúcida	Resultados controversiales, necesaria en algunos casos (66) o con escasa diferencia (16)
Sistema de cultivo de los embriones partidos	Mejor en oviductos ligados que <i>in vitro</i> .
Número de demi-embriones transferidos a hembras receptoras	Relación directa entre el número de demi-embriones transferidos y la tasa de gestación.
Preservación	Menor probabilidad de supervivencia de demi-embriones congelados (14, 23).
Sexo	Afectado por la manipulación y el cultivo de los embriones, mayor pérdida de embriones femeninos (20).

2. Separación y cultivo de blastómeros aislados

En algunas especies, como los equinos, se ha utilizado la separación de blastómeros de embriones previos a su implantación para efectuar estudios de diagnóstico de enfermedades genéticas. En ellos se ha determinado la viabilidad de los embriones analizados después de su transferencia en hembras receptoras, encontrándose tasas de gestación de 21% (24).

En humanos la separación y cultivo de blastómeros aislados también han sido utilizados en estudios de biopsias de embriones en diferentes etapas de segmentación con la finalidad de dar alternativas a los estudios de diagnóstico prenatal, evaluando a su vez el desarrollo embrionario *in vitro* con el propósito de que se seleccionen los mejores embriones capaces de desarrollarse en blastocistos y congelarlos mientras se evalúan sus blastómeros aislados (25, 26, 27).

La técnica de separación de los blastómeros implica la remoción de la zona pelúcida, ya sea por métodos químicos, mecánicos o enzimáticos, para posteriormente obtener los blastómeros mediante aspiración, extrusión o disminución de sus interacciones en soluciones libres de Ca^{2+} y Mg^{2+} (12, 28, 29,30). Los blastómeros de rata aislados en la etapa de dos células, son capaces de formar embriones completos (31). En el ratón se han obtenido gemelos idénticos removiendo la zona pelúcida de embriones de dos células y cultivándolos separadamente previo a su transferencia (16). En otras especies, el éxito del experimento se ha determinado como dependiente de diversos factores. Así, por ejemplo, en porcinos y ovinos la baja eficiencia en la obtención de fetos se debe a la baja sobrevivencia *in vivo*

de embriones libres de zona pelúcida en fases previas a la compactación (16). Esta tasa de nacimientos puede aumentarse si se utilizan embriones encapsulados en gel de agarosa (15,32). De manera que algunas estrategias para suplir a la zona pelúcida son el empleo de capsulas artificiales de agarosa (33) o de alginato de sodio (34, 35), o matrices extracelulares como la fibronectina y laminina (28, 36).

El número de células que forman al embrión separado constituye otro factor importante en la probabilidad de éxito. Willadsen (37) demostró que la tasa de gestación en ovinos y bovinos se reducía conforme se hacían grupos de células de números menores. La mayor tasa de gestación que obtuvo este autor fue del 66% al utilizar embriones de dos células o dos grupos de células provenientes de embriones de hasta ocho células. Cuando utilizó embriones de cuatro células o pares de células de embriones de ocho células, la tasa de gestación se redujo a 50%. Cuando se utilizaron los blastómeros individuales provenientes de embriones de ocho células, la tasa de gestación fue de sólo 5%. En todos los casos en los que se separaron las células embrionarias, el número de células formando el blastocisto se reducía linealmente con el número de "divisiones" a la que era sometido el embrión. Un dato importante de este estudio es que cuando se utilizaron las células individuales de los embriones de ocho células, el desarrollo de la MCI se veía fuertemente comprometido al extremo de formarse sólo vesículas sin la presencia de este grupo de células. Aparentemente, en los blastómeros aislados se promueve más fácilmente la apoptosis y se afecta preferentemente alas células de la MCI. Este proceso contribuye a la incidencia de abortos

debido a que la poca cantidad de células de la MCI reduce la viabilidad fetal (38).

En monos esta misma técnica ha sido aplicada a partir de embriones de ocho células, en la que se separan los blastómeros mientras son mantenidos en medio libre de Ca^{2+} y Mg^{2+} , y luego se reagrupan por pares que se introducen en zonas pelúcidas para que puedan desarrollarse hasta la fase de compactación y así transferirlos a hembras receptoras. El 8% de los embriones tratados brindaron crías vivas (38).

3. Transferencia nuclear

Una técnica que incrementa el potencial de desarrollo de los blastómeros aislados de embriones de ocho células o de etapas más tardías de la segmentación es la transferencia nuclear (37). Esta técnica permite la producción de individuos genéticamente idénticos originados a partir de un solo donador de núcleos (1). Implica la inserción por métodos químicos, físicos, biológicos o mecánicos del núcleo de una célula donadora que puede ser tomada de varios tejidos a la cual se le llama carioplasto, con un ovocito activado y carente de núcleo, o con un huevo fertilizado al que se le hayan extraído los pronúcleos (4, 37, 39, 43). Contrariamente a lo que pudiera pensarse, el desarrollo de esta metodología es más bien antiguo, si bien hasta hace poco ha acaparado el interés no sólo de la comunidad científica, sino del público en general. En el Cuadro 3 se muestra una cronología de los eventos más importantes en la obtención de organismos clonados por transferencia nuclear.

CUADRO 3
CRONOLOGIA DE LA CLONACIÓN MEDIANTE TRANSFERENCIA
NUCLEAR Y SEPARACIÓN DE BLASTÓMEROS

Año	Evento
1938	Hans Spemann divide un cigoto de salamandra con un cabello; mantiene al núcleo en una de sus mitades que continúa su segmentación. Al retirar la barrera, uno de los nuevos núcleos llega al interior de la mitad que carecía de él y se segmenta hasta convertirse en otro embrión (6).
1952	Robert Briggs y Thomas King demuestran que los núcleos de blastocistos de rana (<i>Rana pipiens</i>) son capaces de desarrollar renacuajos al ser transferidos a ovocitos enucleados (6, 48).
1967	DiBernardino observa que los núcleos aislados de embriones de rana en etapa de gástrula, desarrollan renacuajos anormales (6).
Década 70	Se efectúan algunos experimentos parcialmente exitosos de clonación con de los núcleos de células intestinales de sapos. Estos clones se desarrollan hasta alcanzar el estado de renacuajos, sin llegar a adultos (5).
1981	Primer reporte del nacimiento de ratones provenientes de la transferencia de núcleos de células somáticas en ovocitos enucleados, al intentar repetir estos experimentos otros investigadores no pudieron lograrlo (53).
1984	Clonación de ovinos utilizando núcleos de blastómeros de embriones por fusión con virus Sendai 0 campo eléctrico con ovocitos enucleados. Ovejas a término de su desarrollo (23).
1987	Nacimiento de dos terneros a partir de cigotos reconstituidos con núcleos de blastómeros de embriones electrofusionados con ovocitos enucleados. Cultivo in vivo en oviductos de oveja hasta blastocisto y transferencia a una vaca receptor a hasta que llegaron al término de su desarrollo (11).
1992	Uso del color ante Hoechst para monitorear el proceso de enucleación de ovocitos de bovino. Nacimiento de 32 terneros (54).
1993	Electrofusión de núcleos de ratón a partir de blastómeros de embriones en estado de 2, 4 y 8 células con ovocitos, con nacimiento de crías vivas (29).
1996	Nacimiento de ovejas vivas partiendo de ovocitos enucleados por transferencia núcleos de células epiteliales de embriones de 9 días de gestación mantenidas en etapa Go (3).
1997	Nacimiento de "Dolly" utilizando el núcleo de células derivadas de glándula mamaria de oveja adulta arrestada en la fase G por reducción de suero en el medio. Los núcleos fueron electrofusionados a ovocitos enucleados. La tasa de éxito es inferior al 1% (5).
1997	Nacimiento de "Neti" y "Ditto", dos monos Rhesus obtenidos por electrofusión de núcleos derivados de fertilización in vitro y ovocitos madurados in vitro, enucleados y activados con cicloheximida. Tasa de éxito de 3.77% (39).
2000	Obtención de cerdos clonados mediante electrofusión y microinyección de núcleos. Tasas de éxito inferiores al 8% (61,65).

Es importante destacar que tanto el citoplasma que recibirá al núcleo transferido como el propio núcleo deben tener características fisiológicas específicas para que se realice con éxito tanto la transferencia nuclear como el desarrollo posterior de la célula reconstituida y, eventualmente, el desarrollo del nuevo organismo. La célula que contiene al núcleo que será transferido (carioplasto) debe tener características particulares que permitan cierto porcentaje de éxito antes de ser colocado en el espacio perivitelino adyacente a la membrana del ovocito (citoplasto) y se fusione. Experimentalmente el uso de citocalacina B para bloquear la polimerización de microfilamentos, y de colchicina para la de los microtúbulos, permiten controlar los movimientos del citoesqueleto en el carioplasto, provocar una elasticidad de la membrana plasmática y favorecer así la enucleación mediante el uso de micropipetas, sin romper la membrana plasmática (4, 11, 29, 40, 41, 42).

Si se utiliza un embrión en segmentación como carioplasto, también requerirá de la micromanipulación para obtener sus blastómeros. Uno de estos últimos se transfiere dentro del ovocito en metafase II desprovisto previamente de su núcleo, y se fusiona con él. Mediante este proceso, el ovocito se activa y da inicio a su desarrollo como un nuevo embrión. En algunas especies la sola transferencia del carioplasto inicia la activación del ovocito (4, 41, 43, 44).

La primera etapa de esta metodología es la obtención del citoplasma adecuado para que sirva de aceptor del núcleo. A los ovocitos en metafase II se les retira el núcleo o, en el caso de huevos fertilizados, se les extraen los pronúcleos en microscopía de contraste de fases. Para confirmar que el material cromosómico haya sido totalmente extraído, se aplican tinciones de ADN en el citoplasma del ovocito. El colorante más utilizado

para esta etapa es el Hoechst 33258 para visualizar la ausencia de contenido nuclear en los ovocitos enucleados, bajo luz ultravioleta durante períodos de menos de diez segundos, sin efectos negativos en el desarrollo de los embriones reconstituidos (42, 45,46).

Respecto alas características del carioplasto, entre mas diferenciada esté la célula somática, menor será la probabilidad de éxito en la transferencia nuclear. Para que una célula sea totipotencial requiere que su núcleo sea capaz de desarrollarse en un nuevo embrión (47). Para ello los genes que dan lugar al desarrollo de un organismo completo deben estar presentes aún cuando no todos sean expresados (48). Algunos de los genes que deben expresar las células totipotentes son el gen Tnap, los factores de transcripción, los genes Oct 3/4, el proto-oncogen c-kit, y la ADN metiltransferasa o Mt (49).

La experiencia con múltiples tipos celulares tanto embrionarios como de tejidos diferenciados ha demostrado que el uso de núcleos de blastómeros obtenidos de embriones de dos células es mas eficiente que los de ocho células; asimismo, los núcleos de blastómeros o de las células de la MCI son mas eficientes que los de las células de la granulosa, por ende, las células embrionarias son mas efectivas que las células de individuos adultos (4). A su vez, los núcleos de las células de la MCI son más efectivos que los de las células del trofoectodermo (44). Cheong *et al* (29) encontraron que al utilizar núcleos de blastómeros de embriones de dos, cuatro y ocho células que se hallaran en la fase temprana del ciclo celular (fase G 1 de la segunda división), como donadores de núcleos para ser transferidos, los de dos células daban 78% de blastocistos y 29% de ratones nacidos vivos a partir de los embriones reconstituidos, mientras que los de cuatro células daban 71% de blastocistos y

22% de ratones nacidos vivos, y los de ocho células daban 46% y 17% respectivamente. En resumen, los núcleos obtenidos de embriones en las fases tempranas de la segmentación tienen la ventaja sobre los provenientes de células diferenciadas en que los primeros revierten con facilidad los cambios que sufren previo a su diferenciación; mientras que los últimos deben revertir los cambios que ya han sufrido durante más de 30 ciclos de divisiones celulares.

Es por ello que una transferencia nuclear eficiente, con un desarrollo a término del huevo manipulado, dependerá de la reprogramación adecuada del núcleo donador. Las macromoléculas del tipo del ARN mensajero y las proteínas almacenadas en el ovocito sólo soportan el desarrollo embrionario durante un tiempo relativamente corto. Entre más corto sea este período, se requerirá menor tiempo para la reprogramación. Conforme el embrión sufre cambios mayores y crece, sus células requerirán mayor tiempo y será probable que esta reprogramación no se lleve a cabo adecuadamente. En algunas especies, la activación de la transcripción del genoma reintroducido ocurre hasta el estado previo al blastocisto, por lo que depende de la transcripción del ARN materno. En embriones productos de una fertilización normal, este proceso se lleva a cabo a diferentes tiempos en diferentes especies: a partir del estado de dos células en ratones y caprinos; de cuatro células en porcinos; y en el paso de ocho a dieciséis células en embriones de ovinos y bovinos (11). En la transferencia nuclear, la compatibilidad entre el citoplasma recipiente y el núcleo donador, es poco entendida aún y toma parte en la reprogramación del núcleo donado (47).

Dentro de los cambios que deben revertir los núcleos de las células de adulto durante la transferencia nuclear está la

metilación del ADN que es esencial para el desarrollo embrionario. El genoma del ovocito está poco metilado, mientras que en el embrión comienza a incrementarse esta metilación. Esto ultimo afecta la expresión de los genes, la inactivación del cromosoma X, la diferenciación celular, y el *imprinting* (50). Otros cambios asociados son la activación de las histonas y modificaciones en otras proteínas nucleares. Si estos cambios no se revierten, durante el crecimiento ocurrirían modificaciones genéticas de los núcleos adultos, tales como la mutagénesis somática, los errores mitóticos, las deleciones y trisomías (4).

Con el propósito de revertir los cambios en las células diferenciadas y así incrementar las tasas de éxito en la fusión y en el desarrollo de embriones reconstituidos por medio de la transferencia nuclear, es importante la sincronización de los ciclos celulares de las células donadoras de núcleos y de los ovocitos receptores (39, 47, 51). Merchant (6) le llama a este proceso sincronización nucleocitoplásmica.

Como es ampliamente conocido, durante la vida fetal y hasta la pubertad, el ovocito de los mamíferos se encuentra detenido en la etapa de diploteno de la profase de la meiosis I y sus cromosomas se condensan poco antes de que ocurra la ovulación por acción de las gonadotropinas. Este estímulo promueve que el ovocito reasuma su programa de división formándose el ovocito secundario con su primer cuerpo polar, eliminando así la mitad de su material genético. En los mamíferos adultos, el crecimiento del ovocito es continuo y termina en la ovulación, cuando es depositado en el oviducto en donde madura e inicia su segunda división meiótica (meiosis II), en la cual se vuelve a detener, solo que esta vez 10 hace en la metafase II. El ovocito arrestado en metafase II

continuará su división únicamente si es activado por el espermatozoide durante la fertilización, en cuyo caso culminará su segunda división meiótica y formará el segundo cuerpo polar (6, 52, 53).

Durante la maduración y la activación, el citoplasma del ovocito modifica sus propiedades en la medida en que la célula es liberada del arresto en la metafase II y es activada con la fertilización mediante una serie de descargas de calcio que promueven la reacción cortical. Una vez ocurrida la fertilización, la transcripción del ARN materno comienza a controlar el desarrollo en las primeras divisiones mitóticas hasta la activación del genoma embrionario. Cuando se efectúa una transferencia nuclear, la transcripción del genoma materno del ovocito dirige al núcleo donado mientras que éste es capaz de asumir el control de las fases embrionarias tempranas por sí mismo (4).

Al igual que en las células que se dividen, el ciclo celular del ovocito se encuentra controlado mediante dos factores proteínicos: el factor promotor de la mitosis o de la maduración (MPF) formado por una ciclina y la cinasa dependiente de ciclina, y el factor citostático (CSF) que es esencialmente el mismo MPF pero asociado a una proteína que inhibe la acción de la cinasa. Cuando la proteína inhibidora de la ciclina se degrada, la célula es capaz de sintetizar ADN, si el inhibidor no se degrada, la célula primeramente es incapaz de entrar a la fase S del ciclo y, en consecuencia, puede condensar de manera prematura su material genético. Cuando las concentraciones del MPF se elevan, se inducen algunas alteraciones, tales como la desintegración o rompimiento de la envoltura nuclear (DEN), la condensación prematura de los cromosomas (CPC) y la reorganización del citoesqueleto (3, 39).

Para que los eventos ocurran apropiadamente después de la transferencia nuclear, los niveles de MPF deben descender o ser bajos. De otro modo la incidencia de daño cromosómico y aneuploidías puede ser alta (39, 42). Si la transferencia nuclear se hace cuando el ovocito tiene bajos niveles de MPF (siete a diez horas después de su activación), no sólo se presentarán menos problemas de aneuploidías, sino que además se mantendrá intacta la envoltura nuclear y los cromosomas no se condensarán prematuramente, por lo que continuarán su ciclo de replicación-condensación de manera normal, favoreciendo la sincronización nucleocitoplásmica y con ello el desarrollo del cigoto así reconstituido (6).

Si se fusionan células en G_2 con células en G_1 , el material genético de estas últimas sufre una condensación prematura como si estuviera lista a iniciar los movimientos clásicos de la división celular (mitosis). Si la fusión es entre células en etapa S y G_2 , la síntesis del material genético se completa y el contenido de cromosomas en el producto es Aberrante, pues no sólo hay más sino que incluso las células hijas sufren la falta de uno o varios de ellos, mientras que la otra presenta más de un par de copias de un cromosoma (trisomías) (51). Los núcleos donadores que se encuentren en la fase del ciclo G_1 o G_0 resultan en un *mejor* desarrollo que los que están en fases S o G_2 , ya que es más sencillo reprogramar un genoma que está abierto para sufrir una replicación, además de que los factores citoplásmicos tienen mayor acceso al genoma cuando las células donadoras están en dichas fases (54). Los núcleos se inducen a entrar en un estado de quiescencia (G_0) cultivando las células donadoras en medios con cantidades reducidas de suero. De esta manera se coordinan los ciclos celulares del carioplasto y citoplasto.

Ahora bien, para la fusión de carioplastos y citoplastos se han utilizado estímulos eléctricos, virales y químicos. La fusión eléctrica y la fusión viral se han utilizado en roedores, lepóridos y ovinos. La fusión eléctrica se ha usado además en bovinos y en monos rhesus (39, 41). La fusión inducida por el virus Sendai tiene el inconveniente de que los núcleos transferidos no sobreviven o los embriones reconstituidos no logran segmentarse. Las tasas de éxito en la fusión por virus son de 30% en ovinos, siendo de tan solo 8% en bovinos (41, 43), por lo que este tipo de estímulo ya no se utiliza. Una vez efectuada la fusión, los factores presentes en el citoplasma del ovocito enucleado y activado serán los que reprogramen al núcleo, confiriéndole la habilidad para regular el desarrollo embrionario hasta que llegue a término (4, 44). Este desarrollo embrionario puede llevarse a cabo *in vitro*, o *in vivo* en oviductos de ovino (37, 41).

Todavía existe gran variabilidad de resultados con estas técnicas, con tasas de éxito en la electrofusión de blastómeros obtenidos a partir de embriones de ocho células del 90% en ovinos, 74% en bovinos, 84% en lepóridos y 87% en porcinos (41), y tasas de gestación de 0% a 54% (1) o hasta de 78% en bovinos. En esta última especie, las tasas de segmentación de los embriones reconstituidos varían según el sexo de los mismos: 73% para embriones hembras, 63% para embriones machos (46).

Existe un informe interesante en bovinos que describe la transferencia nuclear utilizando ovocitos de vacas Holstein (*Bos taurus*) con núcleos de células aisladas de embriones Brangus (5/8 Angus, *Bos taurus* y 3/8 Brahman, *Bos indicus*). En otra etapa del estudio, utilizaron blastómeros de embriones de ocho a dieciséis células de ovino que se

fusionaron con ovocitos enucleados de caprino, desarrollándose hasta el estado de ocho células al ser cultivados *in vivo* en oviducto de ovino. Lo anterior demuestra que es factible obtener un clon a partir de dos células provenientes de diferentes especies animales y cultivarlo *in vivo* en el aparato reproductor de una especie no homóloga (37).

III. Ventajas y desventajas de las técnicas de clonación

La clonación a partir de células de animales adultos tiene algunas ventajas y desventajas dependiendo de la técnica que se trate (Cuadros 4 y 5), aunque en general todas tendrían la ventaja de que al conocerse las características del donador permitirían seleccionar a los individuos con alto valor biológico o productivo si las características seleccionadas dependen solo de factores genéticos, lo que no es tan probable por el efecto de las condiciones ambientales, de manera que se desconoce hasta qué grado es un clon realmente idéntico a su donador (5).

CUADRO 4 PRINCIPALES DESVENTAJAS DE LA PARTICIÓN O DIVISIÓN DE EMBRIONES

- Solo se obtienen de uno a cuatro embriones monocigóticos, y solo la mitad de ellos llegan al término en su desarrollo (21, 73).
- Los demi-embriones obtenidos con esta técnica no resisten la criopreservación.
- Reducción de las tasas de gestación posteriores a la transferencia en hembras receptoras (21).
- Dificultad de separar con exactitud dos mitades que sean exactamente iguales entre sí, por lo que los individuos monocigóticos no son 100% idénticos (30).

CUADRO 5
COMPARACIÓN ENTRE LA CLONACIÓN POR SEPARACIÓN DE
BLASTÓMEROS Y LA TRANSFERENCIA NUCLEAR

<i>Separación de blastómeros</i>	<i>Transferencia nuclear</i>
Ventajas	
• Obtención de individuos 100% idénticos genéticamente entre si. • Facilidad de obtención de blastómeros aislados • No requiere métodos especializados para obtener los carioplastos, citoplastos o la fusión entre ellos . • En la separación y reagregación de blastómeros los blastocistos obtenidos de quintuples y séptuples pueden utilizarse para establecer células totipotenciales.	• Obtención de copias genómicas de individuos superiores
Desventajas	
• Necesita determinarse el medio óptimo para el desarrollo embrionario <i>in vitro</i> para cada especie utilizada. • Puede requerir de la utilización de zonas pelúcidas o de sustitutos de ellas. • Bajas tasas de éxito en crías nacidas que se reducen al utilizar embriones en fases avanzadas de la segmentación. • Tasas de aborto elevadas después de transferir embriones clonados en hembras receptoras	• Los clones no son 100% idénticos genéticamente debido a la participación del ADN mitocondrial • Los clones muestran diversos grados de alteración. • Requiere de metodologías y equipos sofisticados para la obtención de carioplastos, citoplastos y su fusión. • Requiere de una adecuada sincronización nucleocitoplásmica • Bajas tasas de éxito en crías nacidas

Una de las consideraciones que deben hacerse cuando se planea la clonación por transferencia de núcleos tornados de células de adultos, es que éstos reflejan la edad biológica del donador. Esto último parece ser trivial, sin embargo tiene importancia si se analiza lo ocurrido con las regiones terminales de los cromosomas. En estas regiones se encuentra ADN de secuencia altamente repetida y en forma general, por tripletes o tétradas de nucleótidos repetidos, dichas secuencias se conocen como microsatélites. Experimentalmente se ha determinado que el número de repeticiones que debe tener es importante para la función celular. Durante el envejecimiento, cada vez que la célula se divide el número de estas repeticiones se hacen menores y permiten que se desarrollen enfermedades propias de la edad adulta aún en organismos "jóvenes" (55).

Sin embargo, Lanza *et al.* (56) observaron que en bovinos clonados por transferencia nuclear a partir de células somáticas envejecidas *in vitro*, ocurría un aumento en la duración de la vida replicativa de la célula así como en la longitud de sus telómeros. Asimismo, las células somáticas que han estado expuestas a carcinógenos químicos y radiaciones durante períodos prolongados, en este sentido, es posible que hayan acumulado mutaciones que pueden manifestarse durante la gestación, como malformaciones congénitas o predisposiciones a diversas enfermedades en los recién nacidos (5).

Con la clonación queda todavía un buen número de problemas a resolver, como son la eficiencia de la técnica de transferencia nuclear, que actualmente es muy baja y demasiado costosa para aplicarla comercialmente de manera rutinaria, ya que aún en el estudio mas conocido de esta técnica se obtuvo una eficiencia de 0.36% (54). Considerando que el patrón de desarrollo de los cigotos es muy diverso, la adaptación de las técnicas a otras

especies precisa aún de una extensa investigación para cada una de ellas (6).

IV Aplicaciones de la clonación de embriones

En el ámbito científico, la clonación ha abierto un nuevo campo de experimentación para abordar problemas fundamentales sobre los mecanismos que controlan la diferenciación celular en el inicio del desarrollo (6). También es útil en los estudios de fisiología, embriología, genética y crianza animal (15, 16).

Los individuos genéticamente idénticos pueden ser de sumo valor para los experimentos controlados en los que se evalúen los efectos ambientales, tales como nutrición, instalaciones y medicamentos. La transferencia de genomas idénticos en diferentes tipos de citoplastos permitirían evaluar las interacciones entre citoplasma y núcleo (17, 41).

Los clones transgénicos y los derivados de células primordiales pueden ser incluidos en la investigación de terapias celulares o genéticas, principalmente si se trabaja con primates no humanos, ya que esto último salvaría la distancia existente entre las especies de roedores comúnmente utilizadas en los laboratorios para desarrollo y prueba de fármacos de uso en humanos. En enero de 2001, el grupo de Gerald Schatten dio a conocer el nacimiento de un simio que tiene insertado el gene de la proteína verde fluorescente (GFP), de tal suerte que sus células pueden ser utilizadas con relativa facilidad para estudios encaminados a determinar los efectos nocivos de fármacos que puedan ser semejantes a los obtenidos en humanos, por lo que los estudios de fases terminales pueden ser mas rápidos y con un modelo mas cercano evolutivamente, en lugar del riesgo que implica hacer la extrapolación del

modelo de roedor o conejo, comúnmente usado en la investigación farmacológica.

Asimismo, los clones con fechas distintas de nacimiento (considerando que de un mismo grupo de clones unos sean transferidos directamente y otros sean congelados para transferirlos con posterioridad) tienen aplicación en el análisis fenotípico de los individuos clonados antes de que sean propagados y en la transferencia seriada de células totipotentes para dirigir la edad celular mas allá de las expectativas de vida (44). Además, los clones implantados en una misma hembra subrogada podrían probar los efectos epigenéticos que incluyan el ambiente materno (38).

1. Clonación de embriones por generación múltiple

La última meta de los proyectos de clonación de embriones es producir gran número o un número ilimitado de individuos idénticos a partir de un individuo original. Lo anterior ha sido llevado a cabo a través de la clonación por generación múltiple también conocido como reclonación, que utiliza embriones clonados por transferencia nuclear como donadores de núcleos para producir la próxima generación de embriones idénticos. De manera que si el primer ciclo de transferencia nuclear produce 10 embriones clonados viables, el siguiente ciclo posiblemente resultaría en 100 embriones clonados en la segunda generación (2, 45).

A este respecto, desde la década de los 80, se han reportado resultados exitosos en los procedimientos de reclonación, pudiéndose obtener seis generaciones de embriones (37) y terneros de tercera generación a partir de embriones en diferentes estados de segmentación, obtenidos por transferencia nuclear. Asimismo,

la multiplicación en serie de embriones mediante la clonación ha incrementado el número de progenie producida de un embrión donador determinado. Mediante ciclos repetidos de transferencia nuclear, se han obtenido gestaciones de clones de tercera generación y se han producido embriones en etapa de blastocisto de clones de quinta generación. Los límites de la clonación en serie aún no han sido definidos. Las tasa de gestación de los embriones en estado de mórula o blastocisto producidos por clonación en serie no difieren de las tasas de gestación de los clones derivados de embriones frescos (2, 45).

Se ha visto que los blastómeros provenientes de embriones clonados por transferencia nuclear en etapas mas tempranas de la segmentación, tienen mayores probabilidades de fusionarse a los citoplastos que los provenientes de embriones clonados en etapas mas tardías de la segmentación, y que esto va relacionado con el tamaño del blastómero que se va a transferir. Las tasas de éxito en la reclonación difieren con relación en el tiempo de cultivo y el número generacional del clon; por ejemplo, cuatro días de cultivo *in vivo* en oviductos de ovino da lugar a tasas de fusión de 68% en embriones reconstituídos de bovino, respecto del 57% obtenidos tras cinco días de cultivo *in vivo*. Sin embargo, los clones de cinco días de cultivo pueden producir 4.5 generaciones de clones, mientras que los de cuatro días solo 3.6. La tasa de éxito en la fusión se reduce de una generación a otra, ya que de una línea clonad se han obtenido 11 clones en la primera generación, 16 en la segunda, 20 en la tercera y solo 7 clones en la cuarta generación (45).

Yong y Yuqiang (42) lograron obtener crías de caprino de la primera a la sexta generaciones, de las cuales tres pares fueron gemelos monocigóticos, tres series fueron de triples monocigóticos, dos series de cuádruples monocigóticos, tres

series de quintuples y una serie de heptaples monocigóticos.

Los abortos y las tasas de gestación pueden diferir entre reclines y la primera generación de embriones clonados por transferencia nuclear. Willadsen (37) informa que la segunda o posteriores generaciones de bovinos y ovinos, tienen tasas de gestación mas bajas que la primera generación de embriones clonados, y que las tasas de aborto se incrementan a partir de la segunda generación.

Con el estudio profundo y el adecuado control de las deficiencias actuales de la clonación, en un futuro la clonación en serie permitirá a su vez, la clonación de animales transgénicos que contengan genes selectos. De ahí se deduce que la clonación ofrece una enorme oportunidad para la ganancia genética, el incremento en la eficiencia de la producción de alimentos de origen animal y los programas de investigación (2).

2. Aspectos comerciales de la clonación de embriones

Cuando la clonación se aplica a los embriones de alto valor, la habilidad para producir varios nacimientos por cada embrión ofrece suficiente ventaja económica para recuperar los costos involucrados, sobre todo si se utilizan procedimientos de sexado de embriones, de manera que los nacimientos de individuos clonados sean de sexo predeterminado. Esto pondría un limite en el número de embriones de sexo masculino transferidos, lo cual reduciría el número de transferencias requeridas o permitiría obtener una población de pie de cría efectiva con el mismo número total de transferencias (57). Sin embargo, la eficiencia con la que se cuenta actualmente aún no permite una producción de embriones en masa a un costo accesible para la producción de animales comerciales (2). Es necesario que se

incrementen significativamente las tasas de éxito para que el mercado de los embriones clonados pueda hacerse realidad. Actualmente en el mundo existe un laboratorio que ofrece la clonación de embriones por transferencia nuclear, a la cual los ganaderos pueden enviar sus embriones para recibir clones por 100 dólares cada uno (1).

Otra limitante es que los pesos de los individuos clonados al nacimiento son anormales. Estos procedimientos dan lugar a una mayor incidencia de distocias, aunque posterior al nacimiento las tasas de crecimiento no se afectan por este procedimiento. No se conoce explicación biológica sobre este aspecto (2). Es necesario incrementar la eficiencia de este procedimiento para eliminar el problema de gigantismo fetal que se ha encontrado en algunos becerros producidos por transferencia nuclear (1). En ovinos no se ha observado alteración en los pesos al nacimiento de los individuos clonados, pero sí un alargamiento en la duración de la gestación que es influenciado por el genotipo fetal (54).

Es clara la necesidad de investigación básica, utilizando especies de las que se tenga un conocimiento adecuado para los fines de la investigación. Este tipo de estrategias, por su accesibilidad y bajo costo, podrían ser llevadas a cabo en animales de laboratorio, explorando mas la técnica en los ámbitos celular y molecular, de manera que la solución a los problemas de las tasas de gestación y pesos al nacimiento podría obtenerse de los experimentos a partir de estas especies (2).

3. Aplicación de la clonación en la conservación de especies

La reciente demostración de la capacidad para clonar mamíferos adultos, ha propiciado una variedad de nuevas ideas de investigación

para los interesados en las especies en peligro de extinción. La clonación tiene el potencial de minimizar la pérdida de recursos genéticos, al igual que rescatar la pérdida de material genético; por lo que permitiría expandir el número de taxas incluidos en los programas de supervivencia de especies, porque haría posible la criopreservación de embriones clonados; aunque habría que pensar con cuidado, en las especies animales que podrían ser utilizadas como las receptoras de los embriones de especies en peligro de extinción que vayan a ser clonados, y considerando: que los tipos de placentación son diferentes para cada especie; que la transferencia embrionaria interespecífica sólo funciona en las especies en las que es posible crear híbridos; que hay especies silvestres que no se reproducen en cautiverio, y también que el comportamiento materno de las hembras receptoras hacia las crías nacidas a partir de embriones clonados de especies no homólogas a ellas, podría afectar la supervivencia de los clones, etcétera (8).

El grupo Lanza *et al.* (58) efectuaron la primera clonación de una especie en peligro de extinción: un gaur asiático a quien llamaron «Noé», obtenido por la transferencia de núcleos utilizando células de piel (fibroblastos) de gaur macho y ovocito enucleado de vaca doméstica, y cuyo embrión reconstituido fue transferido en una vaca doméstica. Actualmente esperan el nacimiento del gaur clonado y señalan que están en planes de ser clonadas especies tales como el antílope bongo, el tigre de Sumatra y el panda gigante. Asimismo, se cuenta con células preservadas de una especie ya extinta, la cabra bucardo de montaña, de España, en la que se está pensando aplicar la clonación.

V. Consideraciones éticas de la clonación

Hasta ahora se ha hablado sobre algunas consideraciones que deben ser cuidadosamente estudiadas con respecto a la clonación

de animales, tanto para el abasto como para la conservación de especies en peligro de extinción; queda solamente mencionar las probables consecuencias que esta técnica tendría si fuera aplicada a los seres humanos.

En 1984 McLaren (44) consideraba que la transferencia nuclear podría ser aplicada en los seres humanos; señalaba que para las parejas que tuvieran el riesgo de transmitir defectos genéticos a su progenie, si se recuperaran varios ovocitos de una mujer, se enuclearan y se les transfiriera un núcleo de la MCI de alguno de sus propios embriones; unos cuantos podrían ser congelados mientras que los remanentes genéticamente idénticos podrían ser evaluados para defectos genéticos por análisis cromosómico, análisis de ADN o por métodos bioquímicos. De esta forma se aseguraría a la pareja que cualquier embrión transferido al útero materno del stock que fuera congelado, estaría libre de defectos genéticos.

A este respecto existen opiniones tanto en favor como en contra. Por ejemplo, en 1997 el Consejo Bioético de Estados Unidos de América (59), señaló la preocupación existente acerca del posible daño físico provocado por la manipulación del ovocito, núcleo y embriones, así como del daño psicológico en cuanto al sentido de la individualidad y la autonomía personal de los individuos clonados. Mencionan la preocupación ética sobre la degradación de la calidad de la familia y el parentesco en el caso de que los padres quisieran tener un control excesivo sobre las características de sus hijos.

Lisker y Tapia (5) opinan que la clonación de embriones humanos tendría utilidad en la investigación siempre y cuando los embriones no fueran implantados en el útero de mujeres, y que tuviera la finalidad de incrementar el conocimiento en

biología celular y los mecanismos de expresión genética, ya que no deben ponerse obstáculos al avance en la investigación científica. Aunque hacen hincapié en la importancia de discutir y resolver todos los problemas éticos y legales que plantea la clonación de nuestra especie.

A finales del 2000 las autoridades inglesas aceptaron la aplicación de la clonación por transferencia nuclear en humanos, pero con una temporalidad finita de solo 2 semanas y con una idea de aplicación exclusiva para la obtención de tejidos que puedan ser utilizados para trasplante. Una alternativa en este sentido es la estrategia definida por los trabajos de Onishi *et al.* (60), y de Polajeva *et al.* (61) en los cuales se obtuvieron cerdos clonados por transferencia nuclear y cuya similitud en cuanto a tamaño de órganos y capacidades de aspecto inmunológico son muy similares a la de los humanos.

Hottois (62) considera que se le está dando mayor prioridad a las reacciones simbólicas de la clonación que al análisis de sus técnicas. Opina que no hay razón para enjuiciar la clonación, ya que desde el punto de vista de una pareja con problemas de esterilidad total, o que hayan perdido a un hijo, o de una pareja en la que ambos cargan genes letales, la clonación no implicaría la reproducción en masa de clones sino de tan solo uno o quizás dos, y que ello no afectaría la autonomía de los clones. Además, recuerda que la identidad biológica entre los clones, y entre ellos y su donador no sería total, ya que existen diferencias ligadas al ADN mitocondrial (que permanece en los ovocitos receptores) y a las interacciones entre los genes y el ambiente que genera mutaciones. De hecho, menciona que los clones son más diferentes entre sí que los gemelos monocigóticos. Sin embargo, no hay que perder de vista que en este último aspecto, los genes letales que deberían ser removidos de la población por efecto de

la selección natural, son reintegrados al juego con lo que eventualmente pueden obtenerse individuos en cuyos embarazos se manifiesten nuevamente estos genes letales.

Por otro lado, Bryan (63) trata de aproximar el que sería el sentir de los humanos como individuos clonados con el de los gemelos monocigóticos que nacen de manera natural. Explica que en virtud de que aún cuando estos últimos son idénticos genéticamente, siempre hay uno que nace primero que el otro y que, por lo tanto los medios uterino y extrauterino influyen para producir no solo apariencias sino también personalidades diferentes en cada uno. En el aspecto psicológico, señala como ventaja que los gemelos monocigóticos tienen facilidad para relacionarse y comprenderse mutuamente dada su identidad biológica; pero como desventajas, que tienen mayores riesgos de nacer prematuramente o de tener altas tasas de muerte perinatal.

Por último, Edwards y Beard (4) señalan que la bisección o separación de embriones y la transferencia nuclear actualmente aplicadas en animales, podrían considerarse para su aplicación en humanos en la próxima década.

VI. Conclusiones

Aún cuando son muchas las definiciones que se le dan a la clonación, es posible concretar que la clonación implica la utilización de técnicas que permiten la manipulación de una célula para que se desarrollen a partir de ella nuevos individuos con un duplicado genético de la célula original.

Si bien la clonación de embriones de mamíferos superiores a través de sus diversas técnicas tiene un potencial considerable

en el mejoramiento de la producción animal y en el rescate de especies animales en peligro de extinción, es necesario buscar mayores avances en dichas técnicas para obtener un sistema eficiente de clonación de embriones, que reduzca al máximo las anormalidades cromosómicas, tales como las aneuploidías o las anormalidades en los individuos clonados, tales como el gigantismo fetal, y que se incremente la tasa de éxito en la obtención de individuos clonados. En la actualidad los investigadores están regresando a la investigación básica, para tratar de superar este obstáculo (64).

Por otra parte, aún cuando la partición o división de embriones ya tiene aplicación comercial en el ganado, la separación de blastómeros y la transferencia nuclear todavía están en etapa de investigación y perfeccionamiento de las técnicas. Habría que darle mayor atención a la separación de blastómeros, pues sus ventajas son mayores a las que ofrece la transferencia nuclear en el sentido de que no requiere manipulaciones mayores que la separación y cultivo de blastómeros aislados, sin necesidad de sincronizar ciclos celulares ni de fusionar células con la pérdida de control que cada una de estas etapas implica. A pesar de que las tasas de éxito en el desarrollo a término de los individuos obtenidos de esta forma es también reducido, hasta ahora no se han descrito problemas de anormalidades en los individuos al nacimiento. Debemos dejar claro que esta técnica solo producirá individuos genéticamente similares entre sí, acorde a la definición de clonación en el sentido horizontal, más no con respecto de los individuos que intervengan para obtener la célula donadora de genes, como sucede con la transferencia nuclear. Aún así, permitiría obtener buen número de individuos clonados de genes selectos que, inclusive, podrían ser seleccionados con base en su sexo, a un menor riesgo.

Por ultimo, dados los alcances de la clonación, es necesario valorar su aplicación en embriones humanos teniendo presentes las consecuencias que podría ocasionar su mal uso. Aun está en estudio y requiere ser perfeccionada al máximo para evitar dañar física y psicológicamente a los individuos clonados. Asimismo, la legislación alrededor de esta metodología la va haciendo cada vez menos mágica y le está poniendo límites reales, por lo que es de esperarse que la utilización que de ella se tenga, sea también adecuada. Dios le ha dado ala humanidad la capacidad de utilizar a la ciencia para hacer el bien, toca a la comunidad científica velar porque así sea.

Referencias

1. Romo, S.: Biotecnología reproductiva: avances en ganado bovino.
Boletín Técnico Internacional. Schering-Plough División Veterinaria, I-8, 1994.
2. Singla, S.K., Manik, R.S., Madan, M.L.: Application and commercial aspects of embryo cloning in cattle and buffaloes-a review. *Indian J. Dairy Sci.* 50: 75-82, 1997.
3. Campbell, K.H.S., McWhir, J., Ritchie, W.A., Wilmut, I.: Sheep cloned by nuclear transfer from a cultured cell line. *Nature* 380: 64-66, 1996.
4. Edwards, R.G., Beard, H.K.: How identical would cloned children be? An understanding essential to the ethical debate. *Hum. Reprod. Update* 4:791-811, 1998.
5. Lisker, R., Tapia, R.: Clonación en humanos. *Ciencia* 48: 5-13, 1997.

6. Merchant, H.: Clonación en mamíferos: bases biológicas e implicaciones teóricas, prácticas y éticas. *Ciencia* 48:49-57, 1997.
7. Billingham, R.E., Neaves, W.: Exchange of skin grafts among monozygotic quadruplets armadillos. *J. Exp. Zool.* 213:257-260, 1980.
8. Ryder, O.A., Benirschke, K.: The potential use of "cloning" in the conservation effort. *Zoo. Biol.* 116: 295-300, 1997.
9. Agca, Y., Monson, R.L., Northey, D.L., Peschel, D.E., Schaefer, D.M., Rutledge, J.J.: Normal calves from transfer of biopsed, sexed and vitrified IVP bovine embryos. *Theriogenology* 50: 129-145, 1998.
10. Rexroad, C.E., Powell, A.M: Culture of blastomeres from in vitro-matured, fertilized, and cultured bovine embryos. *Molec. Reprod. Dev.* 48:238-245,1997.
11. Prather, R.S., Barnes, F.L., Sims, M.M., Rob, J.M., Eyestone, W.H., First, N.L.: Nuclear transplantation in the bovine embryo: assessment of donor nuclei and recipient oocyte. *Biol. Reprod.* 37:859-866, 1987.
12. Lavoie, M.C., Kelk, D., Rumph, N., Barnes, F., Betteridge, K.J., King, W.A.: Transcription and translation in bovine nuclear transfer embryos. *Biol. Reprod.* 57:204-213, 1997.
13. Tanaka, H., Kanagawa, H.: Influence of combined activation treatments on the success of bovine nuclear transfer using young and aged oocytes. *Anim. Reprod. Sci.* 49:113-123, 1997.
14. Rorie, R.W., Godke, R.A.: Bisection of bovine embryos. In: Embryotechnologies to domestic animals T. Greve, editor. *Copenhagen.* 1-9, 1987.

15. Heyman, Y., Vignon, X., Chesné, P., Le Bourhis, D., Marchal, J., Renard, J.P.: Cloning in cattle: from embryo splitting to somatic nuclear transfer. *Reprod. Nutr. Dev.* 38:595603, 1998.
16. Williams, T.J., Elsden, R.P., Seidel, G.E.: Pregnancy rates with bisected bovine embryos. *Theriogenology* 22: 521-531, 1984.
17. Williams, T.J., Elsden, R.P., Seidel, G.E.: Bisecting bovine embryos: methods, applications and success rates. *Proceedings of the Animal Conference on Artificial Insemination and Embryo Transfer in Beef Cattle*. Denver, CO, USA pp. 45-51, 1983.
18. Baker, R.D.: Commercial splitting of bovine embryos. *Theriogenology* 23: 3-12, 1985.
19. Seidel, G.E.: Production of genetically identical sets of mammals: cloning? *J. Exp. Zool.* 268:347-354, 1993.
20. King, W.A., Picard, L., Bousquet, D., Goff, A.K.: Sex-dependent loss of bisected bovine morulae after culture and freezing. *J. Reprod. Fertil.* 96:453-459, 1992.
21. Schmidt, M., Smith, S.D., Avery, B., Purwantara, B., Greve, T.: Blastomere content of cultured/frozen bovine demiembryos. *Acta Vet. Scand.* 33: 363-367, 1992.
22. Palma, G.A., Wennigerkind, H., Modi, H., Brem, G.: Biotecnologías aplicadas en la reproducción bovina estado actual y aplicaciones futuras. *Rev. Arg. Prod. Anim.* 15: 159-165, 1995.
23. Willadsen, S.M., Godke, R.A.: A simple procedure for the production of identical sheep twins. *Vet. Rec.* 114: 240-243, 1984.

24. Huhtinen, M., Peippo, J., Bredbacka, P.: Successful transfer of biopsed equine embryos. *Theriogenology* 48: 361-367, 1997.
25. Geber, S., Winston, R.M.L., Handyside, A.H.: Proliferation of blastomeres from biopsed cleavage stage human embryos *in vitro*: an alternative to blastocyst biopsy for preimplantation diagnosis. *Hum. Reprod.* 10: 1492-1496, 1995.
26. Pierce, K. .. E, Michalopoulos, J., Kiesslin, A.A., Seibel, M.M., Zilberstein, M.: Preimplantation development of mouse and human embryos biopsed at cleavage stages using a modified displacement technique. *Hum. Reprod.* 12: 351356, 1997.
27. Geber, S., Sampaio, M.: Blastomere development after embryo biopsy: a new model to predict embryo development and to select for transfer. *Hum. Reprod.* 14: 782-786, 1999.
28. Saito, S., Niemann, H.: Effects of extracellular matrices and growth factors on the development of isolated porcine blastomeres. *Biol. Reprod.* 44: 927-936, 1991.
29. Cheong, H. T., Takahashi, Y., Kanagawa, H.: Birth of mice after transplantation of early cell-cycle stage embryonic nuclei into enucleated oocytes. *Biol. Reprod.* 48: 958-963, 1993.
30. Reichelt, B., Niemann, H.: Generation of identical twin piglets following bisection of embryos at the morula and blastocyst stage. *J. Reprod. Fert.* 100: 163-172, 1994.
31. Matsumoto, K., Miyake, K., Utsumi, K., Iritani, A.: Production of identical twins by separating two-cell rat embryos. *Gamete Res.* 22: 257-263, 1989.

32. Lehn-Jensen, H., Willadsen, S.M.: Deep-freezing of cow "half" and "quarter" embryos. *Theriogenology* 19: 49-54, 1983.
33. Willadsen, S.M.: A method for culture of micromanipulated sheep embryos and its use to produce monozygotic twins. *Nature* 277: 298, 1979.
34. Eaton, N.L., Niemeyer, G.P., Doody, M.C.: The use of an alginic acid matrix to support *in vitro* development of isolated murine blastomeres. *J. In vitro Fert. Embryo Transf.* 7: 28-32, 1990.
35. Adaniya, G.K., Rawlins, R.G., Quigg, J.M., Roblero, L., Miller, I.F., Zaneveld, L.J.D.: First pregnancies and livebirths from transfer of sodium alginate encapsulated embryos in a rodent model. *Fert. Steril.* 59: 652-656, 1993.
36. Wilton, L.J., Trounson, A.O.: Biopsy of preimplantation mouse embryos: development of micromanipulated embryos and proliferation of single blastomeres *in vitro*. *Biol. Reprod.* 40: 145-152, 1989.
37. Willadsen, S.M.: Cloning of sheep and cow embryos. *Genome* 31: 956-962, 1989.
38. Chan, A.W.S., Dominko, T., Luetjens, C.M., Neuber, E., Martinovich, C., Hewitson, L., *et al.*: Clonal propagation of primate offspring by embryo splitting. *Science* 287: 317-319, 2000.
39. Meng, L., Ely, J.J., Stouffer, R.L., Wolf, D.P.: Rhesus monkeys produced by nuclear transfer. *Biol. Reprod.* 57: 454-459, 1997.
40. McGrath, J., Solter, D.: Nuclear transplantation in the mouse embryo by microsurgery and cell fusion. *Science* 220: 1300-1302, 1983.

41. Prather, R.S., First, N.L.: Cloning of embryos. *J. Reprod. Fert. Suppl.* 40: 227-234, 1990.
42. Yong, Z., Yuqiang, L.: Nuclear-cytoplasmic interaction and development of goat embryos reconstructed by nuclear transplantation: production of goats by serially cloning embryos. *Biol. Reprod.* 58: 266-269, 1998.
43. Bromhall, J.D.: Nuclear transplantation in the rabbit egg. *Nature* 258:719-721,1975.
44. McLaren, A.: Methods and success of nuclear transplantation in mammals. *Nature* 309: 671-672, 1984.
45. Stice, S.L., Keefer, C.L.: Multiple generational bovine embryo cloning. *Bioi. Reprod.* 48: 715-719,1993.
46. Le Bourhis, D., Chesne, P., Nibart, M., Marchal, J., Humblot, P., Reenard, J.P., *et al.*: Nuclear transfer from sexed parent embryos in cattle: efficiency and birth of offspring. *J. Reprod. Fert.* 113: 343-34,1998.
47. Solter, D.: Lambing by nuclear transfer. *Nature* 380: 24-25,1996.
48. Casas, E., Betancourt, M.: Clonación: una alternativa en la producción animal. En: Biología de la Reproducción J. Velásquez Moctezuma, editor. México, DF *Universidad Autónoma Metropolitana Unidad Iztapalapa*, pp. 83-499, 1998.
49. Urven, L.E., Weng, D.E., Schumaker, A.L., Gearhart, J.D., McCarrey, J.R.: Differential gene expression in fetal mouse germ cells. *Biol. Reprod.* 48: 564-574, 1993.

50. Kokalj- Vokac, N., Zagorac, A., Pristovnik, M., Bourgeois, C.A., Dutrillaux, B.: DNA methylation of the extraembryonic tissues: an *in situ* study on human metaphase chromosomes. *Chrom. Res.* 6: 161-166, 1998.
51. Serrano, H., García-Suárez, M.D.: De niños probeta y animales clonados. *Cemanáhuac* 36: 1-4, 1997.
52. Loi, P., Ledda, S., Fulka, J., Cappai, P., Moor, R.M.: Development of parthenogenetic and cloned ovine embryos: effect of activation protocols. *Biol. Reprod.* 58: 1177-1187, 1998.
53. Wassarman, P.M.: Zona pellucida glycoprotein mZP3: a versatile player during mammalian fertilization. *J. Reprod. Fert.* 116: 211-216, 1999.
54. Wilmut, I., Schnicke, A.E., McWhir, J., Kind, A.J., Campbell, K.H.S.: Viable offspring derived from fetal and adult mammalian cells. *Nature* 385: 810-813, 1997.
55. Marshall, E.: In contrast to Dolly, cloning resets telomere clock in cattle. *Science* 288: 586-587, 2000.
56. Lanza, R.P., Cibelli, J.B" Blackwell, C., Cristofalo, V.J., Francis, M.K., Baerlocher, G.M., *et al.*: Extension of cell lifespan and telomere length in animals cloned from senescent somatic cells. *Science* 288: 665-669, 2000.
57. Nicholas, F.W.: Increased rates of genetic change in dairy cattle by embryo transfer and splitting. *Anim. Prod.* 36: 341-353, 1983.
58. Lanza, R.P., Dresser, B.L., Damiani, P.: Cloning Noah's Ark. *Sci. Am.* 283: 67-71, 2000.

59. National Bioethics Advisory Commission.: Report on cloning by the US Bioethics Advisory Commission: ethical considerations. *Hum. Reprod. Update* 3: 629-641, 1997.
60. Onishi, A., Iwamoto, M., Akita, T., Mikawa, S., Takeda, K., Awata, T., Hanada, H., *et al.*: Pig cloning by microinjection of fetal fibroblast nuclei. *Science* 289: 1188-1190, 2000.
61. Polajaeva, L.A., Chen, S-H., Vaught, T.D., Page, R.L., Mullins, J., Ball, S., *et al.*: Cloned pigs produced by nuclear transfer from adult somatic cells. *Nature* 407: 86-90, 2000.
62. Hottois, G.: Is cloning the absolute evil? *Hum. Reprod. Update* 4: 87-90, 1998.
63. Bryan, E.M.: A spare or an individual? Cloning and the implications of monozygotic twinning. *Hum. Reprod. Update* 4: 812-815, 1998.
64. McLaren, A.: Cloning: pathways to a pluripotent future. *Science* 288: 1775-1780, 2000.
65. Menino, A.R., Wright, R.W.: Effect of pronase treatment, microdissection, and zona pellucida removal on the development of porcine embryos and blastomeres *in vitro*. *Biol. Reprod.* 28: 436-446, 1983.
66. Susuki, H., Togashi, M., Adachi, J., Toyoda, Y.: Developmental ability of zona free mouse embryos is influenced by cell association at the 4-cell stage. *Biol. Reprod.* 53: 78-83, 1995.
67. Tojo, H., Ogita, Z., Momose, Y.: Comparison of the *in vitro* development of mouse single blastomeres with and without the zona pellucida. *Experientia* 41: 108-109, 1985.

68. Pinyopummin, A., Takahashi, Y., Hishinuma, M., Kanagawa, H.: Development of single blastomeres from 4-cell stage embryos after aggregation with parthenogenones in mice. *Jpn. J. Vet. Res.* 423: 119-126, 1994.
69. Zhang, Y., Li, Y.Q.: Nuclear-cytoplasmic interaction and development of goat embryos reconstructed by nuclear transplantation: production of goats by serially cloning embryos. *Biol. Reprod.* 58: 266-269, 1998.
70. Tsunoda, Y., Kato, Y.: Not only inner cell mass nuclei but also trophoectoderm nuclei of mouse blastocysts have a developmental totipotency. *J. Reprod. Fert.* 113: 181-184, 1998.
71. Wakayama, T., Yanagimachi, R.: Cloning the laboratory mouse. *Seminars Cell. Dev. Biol.* 10: 253-258, 1999.
72. Wells, D.N., Misica, P.M., Day, T.A., Tervit, H.R.: Production of cloned lambs from an established embryonic cell line: a comparison between in vivo and in vitro matured cytoplasts. *Biol. Reprod.* 57: 385-393, 1997.
73. Skrzyszowska, M., Smorag, Z., Katska, L.: Demi-embryo production from hatching of zona-drilled bovine and rabbit blastocysts. *Theriogenology* 48:551-557, 1997.