
¿Clones humanos?

Natalia López-Moratalla*

Resumen

El juicio ético sobre la cuestión de la clonación humana exige conocer y precisar rigurosamente desde la ciencia cuál es el hecho biológico natural que se manipula -la transmisión de la vida en mamíferos que es de suyo sexual y el proceso que se pretende artificialmente: saltar la barrera natural de los mamíferos a una reproducción asexual. Es obvia la ilicitud de su aplicación a los hombres; una manipulación de esas dimensiones del origen de una persona supone la mayor agresión planteada a la dignidad humana y al carácter procreador de la transmisión de la vida. En el momento actual, en que la clonación humana no es más que un *futurible improbable*, interesa abordar el tema desde la perspectiva de la ética del conocimiento científico que permita distinguir con rigor qué es y qué no es un cigoto y un embrión humano. Se empleará aquí el término de «cigoto clónico», o cigoto obtenido por transferencia nuclear, partiendo del hecho de que el carácter de individuo que posee el cigoto es independiente del proceso por el que se obtenga. En efecto, para hablar de un nuevo individuo no es determinante que la procedencia de su herencia genética sea de los pronúcleos haploides de una célula germinal femenina y otra masculina, o, por el contrario, el núcleo diploide de una célula somática obtenida de un solo individuo; ni es decisivo el modo concreto en que se origine: fecundación o transferencia de un núcleo al citoplasma de un óvulo. Y mucho menos del fin a que se destine el

* Departamento Interfacultativo de Bioquímica y Biología Molecular
Facultad de Medicina. Universidad de Navarra. 31080
natalialm@unav.es

individuo. Por otro lado, ni toda fusión de gametos, ni tampoco el mero proceso de transferencia del núcleo de una célula somática a un óvulo dan lugar necesariamente a un embrión. Lo decisivo para obtener un individuo en fase de embrión es la idoneidad de la célula' (o células) de partida para emitir el mensaje genético comenzando por el principio, y por ello, con la capacidad de desarrollarse como un nuevo miembro de la especie. El avance del conocimiento científico ha precisado los requerimientos biológicos de esa idoneidad. En la transferencia nuclear, para que la célula resultante del proceso, denominada por algunos autores *nuclóvulo*, pueda dar lugar a un embrión -denominado *embrión somático*, en oposición al embrión gamético obtenido por fecundación-, es necesario *reprogramar* la información del núcleo. En efecto, el núcleo que se transfiere procede de una célula somática y es preciso que se «rejuvenezca» su información genética para ser capaz de empezar a emitir el mensaje desde su inicio. Esta reprogramación es más difícil cuanto más compleja es la especie a que pertenece el individuo. Tal reprogramación no es una mera «manipulación posterior» de un cigoto ya obtenido, sino que por el contrario es constitutiva, y sin ella el *nuclóvulo* nunca será cigoto: la reprogramación es para el *nuclóvulo* parte del proceso constituyente de su *existencia* misma, y no simple manipulación del entorno vital para que sea adecuado a sus necesidades y subsistencia. Sin ella puede producirse división celular y crecimiento más o menos caótico u ordenado, pero nunca el complejo crecimiento sincronizado y armónico que da lugar a un organismo. Esto es precisamente lo que diferencia un organismo en desarrollo de un simple crecimiento celular más o menos «embrioide».

Palabras clave: cigoto clónico, *nuclóvulo*, organización embrioide, reprogramación genética.

Abstract

To establish a sound critical opinion on human cloning from an ethical point of view we should know exactly the scientific details encompassing the biological process, i.e. cloning, the transmission of life in mammals, in itself sexual, and artificially manipulating and altering the natural barrier in mammals, so that an asexual reproduction is achieved. It is obvious that this process is illicit, if applied to human beings; manipulation of a person's origin, up to that point, constitutes a most serious aggression to human dignity and to the procreating character of the transmission of life. At this moment in time, when human cloning is only a most unlikely futurism, it is better to tackle this topic from the perspective of ethics of scientific knowledge, distinguishing with scientific rigor what is, and what is not, a human

embryo. The term clonal zygote, or zygote obtained by nuclear transfer, will be used accepting the fact that the zygote is an individual, and this being not dependent on the process to obtain it. In fact, to talk about a new individual is not a deciding factor that his or her genetic heredity comes from haploid nuclei from a male and a female gamete, or from a diploid cell obtained from an individual; and it is not decisive the way in which the cells were obtained: through fertilization, or physical transfer of a nucleus to the cytoplasm of an oocyte. And even less the objective expected. It should be known that not always a fusion of gametes or the transfer of a nucleus from a somatic cell will necessarily give an embryo. What really matters, it is indeed decisive, is the suitability of the starting cell (or cells) to emit the genetic message initiated at the beginning, and therefore with the capacity to develop itself as a new member of the species. The advancement of scientific knowledge has specified the biological requirements of that suitability. In nuclear transfer, for the resulting cell (some authors call it nucleocyte) to give an embryo- a somatic embryo as opposed to an embryo generated by gametes- it is necessary to reprogram the information of the nucleus: In fact, the nucleus being transferred comes from a somatic cell and it is necessary «to rejuvenate » the genetic information, so that it will be able to emit its precise message from the very beginning. This process of reprogramming is so more difficult when more complex is the species of the individual involved. That reprogramming is not a mere «further manipulation» of a zygote previously obtained; on the contrary, it is part of the constituent process of its very existence, and not a simple manipulation of the vital environment to turn it appropriate to its needs and subsistence. Without it cell division and growth, more or less chaotic, or ordered, could take place, but never the complex synchronized and harmonic growth giving rise to an organism. This is precisely the radical difference between an individual in development and a simple cell growth more or less of an embryoid type.

Key words: Clonal zygote, nucleovule, embryoid body, genetic reprogramming.

1. El juicio ético exige conocer y precisar rigurosamente desde la ciencia cuál es el hecho biológico natural

La capacidad de intervención en el origen mismo de la vida biológica del hombre y el desarrollo de la biotecnología, conduce con frecuencia a hacer difusos, o incluso borrar, los límites de lo natural. Entonces es fácil mezclar y confundir lo que es el proceso biológico en sí mismo, con lo que se quiere hacer. Ciertamente la intención tiene calificación ética, pero no basta; antes de la mera intencionalidad está la acción en sí.

El siguiente ejemplo nos sitúa en la perspectiva desde donde mirar la clonación humana; es fácil ver que la intervención genética con la finalidad de curar una enfermedad o paliar una deficiencia es buena (habrá que ver el factor riesgo, etc.); es buena porque trata de corregir un déficit en un aspecto que a la biología de la persona humana le corresponde tener. Es una carencia de esa persona concreta. Por el contrario, una intervención, sea cual fuere la intencionalidad, que pretendiera cambiar el curso natural de un proceso, la adquisición de unas características que no le corresponden a un individuo de la especie humana, no sólo carece de justificación, sino que supondría una grave lesión a la dignidad personal, por discriminarle o poder llegar a aislarle del patrimonio genético común de toda la humanidad. En efecto, ni es igual el hecho de introducir en el patrimonio genético de un ser humano material que sustituya al que tiene afectado, que introducir un material que no corresponde al patrimonio propio de la especie humana.

En la cuestión de la clonación humana nos encontramos con el planteamiento -propio de la modernidad- que trata de aumentar la distancia entre lo naturalmente dado y lo artificialmente realizable, y siempre a favor de lo segundo. Toda la carga moral recae así en el fin de la acción, o la intención, pero no en lo que se hace. El balance ético a lo sumo se establece entre ventajas o desventajas en relación con sus consecuencias. Y por tanto cualquier criterio de «mejor» o peor» en la manipulación biotecnológica no puede ser más que un criterio arbitrario dependiente del gusto subjetivo de los manipuladores, de los padres, o de los componentes de las generaciones anteriores. Esto lleva claramente a reducir la moral a la técnica: precisamente lo característico de la racionalidad técnica frente a la praxis moral es desacoplar el medio y el fin. Como reacción ante el dominio despótico de la naturaleza, incluso el movimiento de los *verdes* aboga resueltamente por la primacía de la naturaleza sobre la razón, y por lo natural como criterio que marca los límites más allá de los cuales la razón no debería extender sus poderes. Pero son incluidos en el ámbito de los sentimentalismos irracionales.

La llamada clonación reproductiva no ha encontrado razones «razonables» que la justifiquen. Y curiosamente los gobiernos

de diferentes países e instituciones internacionales se afanan por prohibirla sin aclarar abiertamente que, hoy por hoy, es ciencia-ficción. Por el contrario, la llamada «clonación terapéutica» entra en el debate de las células madre embrionarias, capta la atención de los medios de comunicación y recientemente el Reino Unido ha dado permiso para comenzar la experimentación con células humanas en un alarde de apuesta por el progreso médico. Sin embargo, ni es clonación, ni, al menos por ahora, las células que puedan obtenerse por transferencia del núcleo de una célula somática del paciente a un óvulo de mujer desnucleado, tienen propiedades terapéuticas; y no pasan de ser curiosidades científicas caprichosas.

No es el momento de analizar las razones de tipo económico -atracción de capital a empresas biotecnológicas-, antirreligioso, o político, que llevan a orquestar debates y en torno a la obtención y uso de seres humanos clónicos. En todo caso, una experimentación de este tipo puede abrir puertas a lograr en un futuro manipular de forma tan aberrante e inhumana el origen de la vida de personas y/o usar seres humanos clónicos en su etapa de embrión como material biológico de interés biomédico. Nos limitamos aquí a exponer la situación actual desde el punto de vista técnico de la clonación de primates por transferencia del núcleo de una célula somática a un óvulo. Se trata de mostrar la irracionalidad científica de una experimentación inútil, innecesaria, y que en caso de que estuviera justificada tal investigación debería hacerse en animales y usar células de primate de partida y no óvulos de mujer. Para poder defender a los embriones humanos de su destrucción por uso en una investigación *consumidora de embriones*, es importante distinguir con rigor qué es y qué no es un cigoto y un embrión.

2. El cigoto es individuo de la especie

La cuestión del *estatuto del embrión humano* no se plantea con relación a la pertenencia a la especie, que es indudable, sino con la posesión o no del carácter personal de todo «individuo biológicamente humano». Cada viviente es necesariamente

individuo de la especie, que forman quienes comparten el mismo patrimonio genético. Cada nuevo ciclo de transmisión de vida se inicia a partir de una célula única –denominada cigoto– formada por un proceso en varias etapas que comienza en la fecundación del gameto materno, el óvulo, por un gameto paterno, el espermatozoide. La célula formada por tal fusión ha de adquirir el fenotipo cigoto: una célula única polarizada y asimétrica, capaz de dividirse en dos blastómeros desiguales entre sí y diferentes al cigoto. Sólo así, el cigoto puede dar paso a la nueva etapa vital de embrión bicelular, en que las multiplicaciones celulares precisas le permitirán pasar por la fase tricelular, tetracelular, etc. La progenie de los dos primeros blastómeros es diferente desde esa primera división celular y tienen diferente destino en el embrión. El cigoto es el estado primordial de un nuevo individuo, única realidad natural totipotencial, con el genoma capaz de expresar todas las potencialidades paso a paso y en dependencia del medio en que se encuentra.

Ahora bien, ¿puede afirmarse que toda célula procedente de la fusión de gametos femeninos y masculinos (o por activación partenogenética de un óvulo o por transferencia de un núcleo somático a un óvulo) es un cigoto? Y, por tanto, al conjunto de células que se deriven de ella, ¿se puede considerar, siempre y propiamente, un embrión? La respuesta no es simple y exige conocimientos científicos, algunos de los cuales están en plena fase de investigación. Pero esa respuesta no puede darla más que la ciencia, y los datos actuales permiten afirmar que la simple transferencia de un núcleo a un óvulo, o la mera activación de un óvulo de mamífero, no es *automáticamente* un cigoto, de la misma manera que no toda fecundación que se inicia acaba y con ello queda constituido un cigoto.

En principio, y atendiendo sólo a las características morfológicas, de un conjunto de células con fenotipo embrionario, y que están creciendo en un medio adecuado, se podría afirmar tanto que son células vivas en multiplicación, como que son un embrión precoz (o temprano, en fase previa a la implantación).

La ambigüedad de las respuestas a la pregunta acerca de qué es realidad embrionaria y qué no es, ni ha sido nunca, un embrión no es ambigüedad de la realidad viva. Sencillamente, el criterio morfológico resulta insuficiente para definir con precisión de qué realidad se trata. Además, las manipulaciones técnicas, que el progreso científico ha hecho posibles, provocan cambios intencionados en los procesos de transmisión de la vida humana, de acuerdo con los intereses que se persiguen, y por todo esto se necesita un notable esfuerzo de clarificación.

Se requiere un criterio biológico nítido, que no deje lugar a dudas acerca de la diferencia real entre materia viva más o menos organizada y viviente individual. Máxime cuando algunos han negado a cualquier embrión temprano el carácter de individuo, por considerar que no es más que un Conjunto celular *pre-embrionario*, ordenado de tal modo que puede dar lugar tanto a uno como a dos individuos gemelos, o a ninguno. En el sentido de este «pre» hay que hacer notar que el término embrión temprano se ha aplicado también a realidades bien distintas: el mal llamado «embrión partenogénico», porque no es un embrión (al menos en la mayoría de las especies de mamíferos y desde luego en primates) y al conjunto celular proveniente de una transferencia de núcleos sin reprogramación porque no es un cigoto que pueda, por tanto, desarrollarse como embrión clónico. De forma siempre y necesariamente artificial, la transferencia de un núcleo a un oocito al que se le ha quitado el suyo no es más que un *nuclóvulo*, que requeriría toda una reprogramación del mensaje genético para adquirir el carácter de cigoto. Proceso que al menos en primates está, al menos por ahora, lejos de lograrse.

En el caso del hombre esta cuestión es esencial, ya que todo ser humano, y sólo el viviente de la especie *Homo sapiens*, es persona que reclama respeto y, por tanto, no puede éticamente ni programar su identidad, ni ser usado como medio. Por el contrario, carece de realidad personal cualquier material celular con genotipo humano capaz de multiplicarse, tener alguna actividad biológica, pero que no constituye una realidad orgánica,

unitaria; sencillamente no es un todo orgánico, no es un individuo. Hay que tener en cuenta que el proceso de desarrollo es continuo, con etapas que se suceden en el tiempo y en el espacio (en las diversas zonas del organismo en formación); y, además, que de forma gradual van emergiendo en momentos precisos propiedades nuevas -ya que el individuo adquiere diversos y nuevos fenotipos- cualitativamente diferentes a las existentes en un momento anterior. Pues bien, como es propio de lo vivo, el todo unitario, el organismo, no es igual, sino que es más que la suma de las partes. Es un individuo, un hombre. Y ese avance continuado hacia una progresiva y cada vez mayor complejidad requiere el medio intracelular, el medio que suponen las otras células del mismo organismo y el medio materno en que se desarrolla la vida intrauterina. Esto significa que la viabilidad real de un embrión precoz es plenamente dependiente de las circunstancias, de las condiciones del medio en que se le sitúa, y que permite ser «todo» el individuo, teniendo en acto todas las potencialidades que corresponden a la etapa concreta de su vida por la que pasa en ese momento. La viabilidad es dependiente del medio, pero no la realidad; la realidad es el individuo concreto con la edad concreta de ese momento.

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

tarea a realizar. Por tanto, aquello que es específico del ser humano (la apertura) ha de estar intrínsecamente insertado en la dinámica de la génesis misma de cada individuo. O, dicho de otro modo, en cuanto hay viviente humano existe un ser personal. Y sólo hay viviente humano cuando existe un cigoto, o en casos extraordinarios cuando existe un conjunto celular ordenado y funcional como un todo, y proveniente de un cigoto.

Sin pretensión de dar nomenclatura nueva a las etapas biológicas de un individuo en constitución y sólo como aclaración terminológica, podemos decir que el prefijo «pre» no puede darse al embrión. El conjunto celular derivado del desarrollo embrionario de un cigoto -sea cual sea la forma en que se ha formado - no es un *preembrión*, será en embrión preimplantatorio -esto es, en fase previa al inicio de la implantación en el útero materno. La única realidad preembrionaria es el cigoto en constitución (aún no constituido en tal) durante la fecundación: la célula mixta proveniente de la fusión de los gametos o la célula mixta formada artificialmente por la transferencia de un núcleo a un oocito desnucleado, el nuclóvulo. Sólo estos precigotos -tampoco los gametos sin fusionar- son realidades preembriónicas. Cualquier precigoto requiere una programación intrínseca; en el primer caso de forma natural durante la terminación de la fecundación, o inducida artificialmente en el segundo, tras la transferencia de un núcleo, para constituirse en individuo en estado unicelular o cigoto.

Es preciso tener en cuenta que la identificación entre genoma e individuo es un error de concepto biológico: los cromosomas y genes que determinan las características de un individuo de una especie no le hacen ser un individuo; no son más -ni tampoco menos- que lo que determina las características de un ser y dirige su desarrollo; pero lo que le constituye en viviente, en individuo de la especie, es el arranque de la emisión del programa de desarrollo: palabra a palabra y comenzando por la primera. Cuando esto ocurre, ha comenzado realmente la vida de un ser humano; y si no continuara

y muriera pronto, es propiamente un embrión vivo, pero inviable. Tal inviabilidad puede ser «per se» -porque tenga defectos genéticos o de los componentes intracelulares-, o puede ser por falta de las condiciones del medio extraembrionario - materno o del laboratorio- necesarias para su supervivencia. Si fue realmente un individuo humano de pocos días, han ocurrido dos cosas muy diferentes: en el primer caso, que ha muerto de forma natural; en el otro, que se le ha dejado voluntariamente morir, al ponerle en unas condiciones en las que no le era posible vivir.

2.1. Información genética y constitución de un cigoto

En la actualidad se conocen con detalle y profundidad los procesos de autoorganización biológica y del funcionamiento de los sistemas vivos. El logro más importante ha sido la comprensión de que el material genético, el DNA, es necesario, pero no suficiente; no es todo. La idea de que en los genes heredados «está todo» (los caracteres propios de la especie, los propios del individuo concreto, las instrucciones para el programa de desarrollo) no es del todo correcta. El proceso está recibiendo continuamente nuevos datos, sin los cuales la vida no puede continuar. Los organismos vivos tienen historia -guardan memoria de situaciones por las que han pasado previamente-, y por ello su proceso vital no viene definido exclusivamente por los genes. No bastan ni sólo las peculiaridades propias del mensaje genético heredado, ni sólo el entorno interno o externo. Ambos factores son necesarios.

En el patrimonio genético de cada uno, desde el momento en el que se constituye a partir de esa dotación genética particular heredada de sus progenitores -y presente en todas y cada una de sus células-, radica la identidad de cada viviente. *Ese primer nivel de información* (la secuencia de los nucleótidos del DNA de los cromosomas) es su identidad biológica. Por ello, es innegable la referencia del viviente neonato, joven, maduro o envejecido, con el feto, embrión o cigoto que apareció con la fecundación de los gametos de sus progenitores. Y

es igualmente innegable la diferencia de realidad, o de capacidad de operaciones, de un embrión de una o de cien células, respecto de un feto o de un joven viviente o un anciano. Algo semejante ocurre cuando se emite o canta una canción o se actualiza la representación de una obra. La letra y las notas de la partitura son el punto de partida, pero no es todo. Sólo en un momento preciso voces e instrumentos empiezan a pronunciar y emitir música, en tono adecuado la primera palabra y la primera nota, y luego la segunda; y así sucesiva y armónicamente, con pausas y entonaciones, el mensaje completo, y hasta el final, y en un tiempo adecuado. Entonces se ha dado vida, se ha revivido con peculiaridades únicas la misma canción, la misma obra: una nueva y única versión en un lugar y un tiempo necesariamente irrepetible.

No todo está al principio, sino que la información genética crece con la propia expresión de los genes (o emisión del programa) que se retroalimenta a medida que pasa el tiempo de vida. Cada parte del organismo (órganos, tejidos, sistemas) se constituye con la información del grupo de genes que sólo se expresan, en momentos concretos, y sólo en las células que ocupan un lugar concreto del organismo. Por ello, la formación de cada una de las partes es dependiente de las condiciones de su medio propio, que es diferente en las diversas áreas del organismo y en cada etapa temporal. Esto es importante, porque un conjunto de células diferenciadas, y más o menos ordenadas, no es un organismo si no constituye una unidad funcional y vital. Hay un segundo nivel de información que no está sin más en el DNA, sino que es un programa, que permite la regulación o coordinación de la emisión en cada célula armonizando toda la información. Esta información es el programa de desarrollo que se emite etapa a etapa; programa que no está «previamente» en el genoma: se actualiza paso a paso. El que el programa comience a emitirse es una propiedad que emerge del proceso temporal de la fecundación de los gametos. Ése es el comienzo de la vida de un nuevo individuo.

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

El cigoto es pues una realidad biológica peculiar y única y perfectamente definida: a) El cigoto hereda la *polaridad* del óvulo maduro y la amplía con la fecundación; b) La activación mutua del óvulo y del espermio inicia una serie de cambios del material genético materno y el paterno, ya que ha de rejuvenecerse perdiendo todos los elementos que había adquirido como tal gameto en el organismo de los progenitores y también como cuenta del paso del tiempo de la vida del organismo del que procede. Estos cambios se dan tanto a nivel del empaquetamiento estructural como una modificación química (metilación y desmetilación) que mantenía el mensaje genético en silencio: es un proceso de eliminación de la impronta molecular del DNA heredado para convertirse en DNA con información para iniciar un nuevo ciclo vital. El material de reserva guardado en el óvulo se reactiva, aparecen señales que permiten programar desde el inicio la expresión de los genes; c) Los diversos cambios están perfectamente *sincronizados* por los iones calcio, que la llegada del espermio permite que se eleve justamente en la zona por la que penetra en el interior del óvulo.

Lo decisivo para la calificación de individuo en fase de embrión es, por tanto, la idoneidad para emitir comenzando por el principio el mensaje genético, y comenzar a desarrollarse como miembro de la especie. No es decisivo, para su realidad biológica como tal, que la procedencia de su herencia genética sea el pronúcleo haploide de una célula germinal femenina y otra masculina, o del núcleo diploide de una célula somática de un solo individuo; ni es decisivo el modo concreto en que se origine: fecundación o fusión de núcleo y citoplasma. De hecho, los términos *embrión gamético* -para el que

procede de la fecundación-, o somático -para el que procede de un nuclóvulo- apuntan al hecho de que pudieran ser embriones en ambos casos y a la duda suscitada desde el principio de estas investigaciones de que el nuclóvulo de primate pudiera reprogramarse para iniciar desde el comienzo la emisión del mensaje genético que la dotación genética de una célula somática tiene ya silenciado en gran medida.

Esta reprogramación del mensaje genético del nuclóvulo no es una mera «manipulación posterior» del individuo. Es constitutiva y sin ella el nuclóvulo nunca será cigoto. El hecho biológico es muy claro; y tiene fuerza de evidencia, aunque se dé la situación de falta de conocimiento del mismo. La reprogramación es proceso constituyente de su existencia misma, y no simple manipulación del entorno vital para que sea adecuado a sus necesidades y subsistencia. Mientras no comience la emisión del mensaje, no hay un principio de vida capaz de regir como tal principio de unidad, o alma, el crecimiento unitario armónico y orgánico que separa un organismo en desarrollo de un simple crecimiento celular más o menos «embriode». En el estadio temprano es una unidad de vida de crecimiento y de nutrición, que incluye la diferenciación porque cada una de las células que forman ese conjunto orgánico sabe dónde tiene que ir durante el desarrollo y esto a medida que avanza el desarrollo. Están siguiendo un programa -están programadas- que está gobernado por el principio de *unidad vital*.

Así, los cromosomas y genes que determinan muchas de las características del ser humano, no le hacen ser un ser humano. Sólo determina las *características* de ese ser. Lo que le *constituye* en viviente, en individuo de la especie, es el arranque del programa, el inicio de la emisión de tal programa.

3. Clonación de individuos mamíferos por transferencia de núcleos

De forma genérica, la clonación es el proceso de obtención de un clon, siendo éste un conjunto de elementos biológicos

(molécula de DNA, célula, tejido, órgano u organismo) idénticos entre sí y a su precursor. Habitualmente el término clonación aplicado a los animales superiores, se refiere a aquellas técnicas que permiten obtener un clon, una copia idéntica, partiendo de material biológico - una célula somática- de un organismo adulto, ya desarrollado. En efecto, la clonación de animales responde a un interés por copiar organismos de características conocidas, y por tanto adultos.

Si la célula de partida de la que se obtiene el núcleo no pertenece a un adulto, sino a un embrión en fase más o menos avanzada (generalmente de blastocisto), se habla de paraclonación. Y la obtención de dos individuos idénticos entre sí, por división de un embrión temprano, no es propiamente clonación sino *gemelación inducida artificialmente*. Es decir, aunque cuando se hace referencia a la clonación se incluyen habitualmente las dos técnicas, en realidad, merecen una consideración diferente, aun cuando ambos métodos conduzcan a la generación de individuos idénticos entre sí. La transferencia de núcleos provenientes de células embrionarias, fetales, o de individuos ya nacidos, produce una progenie idéntica al progenitor; por el contrario, la partición de embriones preimplantatorios genera individuos clónicos, iguales entre sí, pero diferentes a los progenitores; es decir, hermanos gemelos.

La clonación de un *individuo mamífero* se realiza por transferencia del núcleo de una de sus células a un oocito desnucleado y posterior *reprogramación* del material genético a fin de que éste, que se encuentra en el estado propio de una célula somática, se reconvierta al estado en que se sitúa la dotación genética tras la fecundación. El desarrollo embrionario y su gestación completa producirían un clónico del individuo donante del núcleo.

La transferencia de núcleo se realiza preferentemente a los oocitos, a los que previamente se les ha extraído el suyo, mediante aspiración con una micropipeta. La transferencia puede realizarse mediante electrofusión (el llamado «método

Roslin»), depositando el núcleo en el espacio perivitelino, debajo de la zona pelúcida y procediendo a la fusión con el oocito desnucleado mediante choque eléctrico o mediante microinyección (el llamado «método Honolulu») introduciendo el núcleo directamente en el citoplasma del oocito desnucleado. El estado de la célula receptora, respecto a situación de reposo o de división activa¹ no es esencial, a pesar de que en los primeros trabajos se supuso que debía estar en reposo. Sea cual sea el estado de la célula donadora, tras la microinyección se requiere una activación del oocito unas 2-6 horas más tarde². Se estimula el *nuclóvulo* en cultivo con pulsos de calcio para que inicie su división y para lograr que se desarrolle. Se da de este modo la formación, *in vitro*, de la célula precursora, llamada *nuclóvulo*, combinación por tanto de la donante y la receptora a partir de la cual se podrá obtener luego el clon. En el citoplasma existen factores responsables de la *reprogramación*, proteínas citoplasmáticas que son capaces de interaccionar con los genes y devolverlos al patrón de expresión típico del embrión inicial o cigoto, haciendo que pierdan la impronta propia de célula somática.

4. Breve historia de la situación de los experimentos de clonación de mamíferos

Los primeros experimentos de transferencia de núcleos en mamíferos se realizaron con conejos (Bromhall, J.D. (1975) Nuclear transplantation in the rabbit egg. *Nature* 258,719-721) y ratones (McGrath J., Solter D. (1983) Nuclear transplantation in the mouse embryo by microsurgery and cell fusion. *Science* 220, 1300-1302; McGrath J., Solter D. (1984) Inability of mouse blastomere nuclei transferred to enucleated zygotes to support development in vitro. *Science* 226, 1317-1318) por transferencia de núcleos de los blastómeros de un embrión precoz a oocitos desnucleados (*paraclonación*).

La transferencia de núcleos de blastómeros de embriones tempranos de unas 8 o 16 células permitió el desarrollo a término de ovejas y vacas (Willadsen S.M. (1986) Nuclear transplantation

in sheep embryos. *Nature* 320, 63-65; Prather RS, Barnes F.L., Sims M.L., Robl J.M., Eyestone W.H., First N.L. (1987) Nuclear transplantation in the bovine embryo: Assessment of donor nuclei and recipient oocyte. *Biology of Reproduction* 37, 859-866).

Cuando las células donantes del núcleo proceden de embriones más avanzados, o si los núcleos provienen de células fetales o adultas poco diferenciadas (Wilmut I., Schnieke E., McWhir J., Kind A.J., Campbell K.H.S. (1997) Viable offspring derived from fetal and adult mammalian cells. *Nature* 385, 810-813), antes de realizar la transferencia de núcleos, es necesario llevar las células a un estado quiescente, la fase G₀, o de parada del ciclo celular, con el fin de favorecer la *reprogramación* genética del núcleo (Di Berardino M.A. (1997) *Genomic Potential of Differentiated Cells*. Columbia University Press, New York.; Ashworth D., Bishop M., Campbell K., Colman A., Kind A, Schnieke A., Blott S., Griffin H., Haley C., McWhir J., Wilmut I. (1998) DNA microsatellite analysis of Dolly. *Nature* 394, 329; Signer E.N., Dubrova Y.E., Jeffreys A.J., Wilde C., Finch L. M. B., Wells M., Peaker M. (1998) DNA fingerprinting Dolly. *Nature* 394, 330).

En primates se han realizado 724 intentos de crear embriones clónicos por transferencia nuclear, todos ellos sin éxito (Simerly C et al. (2003) Molecular correlates of primate nuclear transfer failures. *Science*, 300, 297). En los embrioides obtenidos se han distinguido mediante el uso de anticuerpos, células con un alto número de cromosomas y otras con bajo, una anomalía que parece estar causada por carencia de proteínas nucleares específicas de las que carecen las células somáticas y sólo portan los gametos.

Un experimento de transferencia de núcleos procedentes de fibroblastos de la piel o de células del *cumulus oophorus* a oocitos humanos (Cibelli J. B., Kiessling A. A, Cunniff K., Richards C., Lanza R. P. West M.D. (2001) Somatic cell nuclear transfer in humans: Pronuclear and early embryonic development.

Journal of Regenerative Medicine 2, 25-32) no dio lugar a verdaderos embriones precoces, sino un simple conjunto de células resultado de divisiones celulares degenerativas. La repetición en diferentes condiciones del experimento generó a g regados celulares embrioides con algunas propiedades similares a blastocistos, de los que se ha obtenido una línea celular de células madre embrionarias (Hwang, W. S. et al. (2004) Evidence of a pluripotent human embryonic stem cell line derived from a cloned blastocyst. *Sciencexpress*, doi:10.1126/ science.1094515).

En el contexto de la fecundación in vitro, Zavos (Zavos P.M. (2003) Human re p roductive cloning: the time es near. *Reproductive BioMedicine*: <http://rbmonline.com/Article/924>) ha intentado de nuevo la clonación humana sin que el nuclóvulo dé lugar más que a un conjunto de 8 a 10 células.

5. Barreras biológicas naturales a la clonación de un mamífero

5.1. El inicio y desarrollo del embrión exige un cambio sucesivo del patrón de metilación de citosinas

La emisión del programa de desarrollo, desde su inicio a la constitución y maduración del organismo, es un proceso ordenado y regulado por señales que van apareciendo también de una forma ordenada tanto en el tiempo como en las diferentes células, según el sitio que ocupan. Así va dándose una ampliación y determinación programada de la información genética heredada o recibida. El control del crecimiento, diferenciación y maduración celular es un equilibrio delicado, que depende del estado de la célula según el tiempo de desarrollo y del sitio que ocupa en el organismo en desarrollo: en efecto, cada tipo celular recibe diferentes señales de las células vecinas, y las interpreta e integra según su historia previa como parte de un organismo. Los principales mecanismos de regulación de este equilibrio en el inicio del desarrollo son:

- nivel de expresión del gen Oct-4 que frena la diferenciación manteniendo el estado pluripotencial que corresponde a determinadas células como las células madre embrionarias y las pluripotenciales de la médula ósea.
- el nivel de la enzima telomerasa que elimina el freno de la proliferación celular permitiendo un estado «inmortalizado». Existen altos niveles de la enzima en las células troncales embrionarias, en algunas tumorales y en niveles más bajos en las pluripotenciales de la médula ósea.
- el control de la expresión de genes cuyos productos bloquean y desbloquean el estado de inmadurez de la célula: paran el ciclo de diferenciación celular y permiten su diferenciación.

Este proceso de control del crecimiento, diferenciación y maduración celular, en la constitución del organismo y en la vida adulta, tiene como base común el cambio progresivo en la estructura del DNA y en la metilación de la base citosina. En el embrión temprano pueden permanecer las modificaciones de la cromatina características de los gametos femenino y masculino desde los que se ha formado³.

Estos mecanismos de modificación química del DNA están catalizados por enzimas, que aparecen de modo preciso y perfectamente reguladas. La reactivación de los genes silenciados requiere enzimas desmetilasas⁴, que eliminan los grupos metilo. Llevan a cabo procesos esenciales en la transmisión de la vida y construcción del organismo: a) en una fecundación cambian la impronta de gameto paterno y materno para dar la impronta propia de cigoto; en la vida embrionaria del individuo macho o hembra imprimen la impronta propia de espermio o de óvulo respectivamente⁵; en el desarrollo la impronta parental es regulada por un grupo de factores específicos, que se van conociendo con precisión⁶. b) en una transferencia de núcleos se requiere un proceso de reprogramación que haga

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

6. La fecundación pone en funcionamiento el reloj de arena de la vida embrionaria por metilación-desmetilación de citosinas

Durante el desarrollo embrionario tienen lugar dos momentos de reprogramación por cambio del patrón de metilación de citosinas. El primero se da en el periodo embrionario preimplantatorio, y el segundo en las células germinales primordiales que se desmetilan en el desarrollo temprano y comienzan un nuevo proceso de metilación en la línea germinal, en diferente momento en el embrión macho (etapa de pro-espermatogonia de las células germinales) que en el embrión hembra (en la maduración de los oocitos después del nacimiento). Inmediatamente después de la fusión de los gametos en la fecundación, el genoma paterno y materno cambian el patrón antes o después de que comience la replicación del DNA respectivamente. Posteriormente, en el momento de la implantación, ambos pares de cromosomas vuelven a sufrir metilación en diferente grado tanto en el linaje embrionario (masa interna del blastocisto) y como en el extraembrionario procedente del trofoblasto.

La metilación en secuencias CpG origina represión de los genes, mientras que la desmetilación, también en las islas CpG, supone expresión constitutiva de genes. La regulación de este proceso en el desarrollo embrionario temprano la lleva a cabo una proteína que se enlaza específicamente al DNA a través de elementos que contienen la secuencia CpG no metilada, y actúa como un activador de la transcripción. Por ello, la rápida reducción de la metilación de CpG que ocurre tras la fecundación permite la expresión de genes esenciales para el desarrollo. Estas proteínas que se enlazan al DNA no metilado desempeñan una función esencial para la viabilidad del embrión en el periodo peri-implantación.

En general, este mecanismo del reloj molecular es común en diferentes especies de mamíferos, pero existen diferencias en lo que se refiere al momento del desarrollo en que ocurre la remetilación. Por ejemplo, en el ratón la metilación de novo tiene lugar en las células de la MCI del blastocisto en expansión, mientras que en embriones bovinos ocurre en el estado de 8 a 16 células.

6.1. Alteraciones en el patrón de metilación del DNA en la clonación de mamíferos

Precisamente la principal razón tanto de la baja eficiencia en el desarrollo, y la presencia de anormalidades, es la expresión alterada de una serie de genes por fallo del proceso de metilación del DNA⁷ que da lugar a una incompleta reprogramación del DNA del núcleo donante; esto es, la transferencia de un núcleo a un oocito no logra en muchos casos la reprogramación del mensaje genético, o, dicho de otra forma, la activación de un nuclóvulo no siempre acaba en un cigoto.

Para clonar es necesario poder *devolver* a cada uno de los cromosomas un patrón de metilación parecido al que tienen en la fase de cigoto; devolver el patrón es *rejuvenecer*. Esto es menos difícil si el organismo es menos complejo, ya que los cambios de patrones de metilación son más sencillos, y si la célula de la que se toma el genoma es muy indiferenciada y por tanto más joven ya que de suyo es más parecida a las juveniles células del inicio del desarrollo. Hasta tal punto es así, que la obtención de un clon ha resultado más fácil cuando se ha tomado como célula donante de núcleo una célula tumoral; precisamente la célula tumoral ha perdido el control del crecimiento por convertirse en una célula indiferenciada, inmadura, sin memoria de su pertenencia unitaria a un organismo. Si este núcleo se transfiere a un óvulo que le da las instrucciones de arranque se convierte en un individuo que puede completar su desarrollo si se transfiere al útero de una hembra.

En la actualidad, solo un 0.2-5% de los oocitos a los que se ha realizado una transferencia de núcleo han continuado su desarrollo hasta el nacimiento. Se sabe que existen múltiples factores que afectan a la eficacia de la técnica: el tipo de célula utilizada como donante de núcleo⁸, la fase del ciclo celular de la célula donante⁹, la técnica empleada para la transferencia del núcleo y el método de activación de los oocitos¹⁰. Es posible obtener clones tanto de hembras como de machos y no parece haber diferencias en la eficiencia de la técnica según el sexo del núcleo empleado¹¹. Se ha utilizado con éxito una variedad de tipos celulares como fuentes de núcleo, entre los que se encuentran células del *cumulus oophorus*, fibroblastos, células musculares, linfocitos, y células de Sertoli. También es posible utilizar células madre embrionarias,¹² incluso modificadas genéticamente,¹³ originando clones genéticamente modificados. La baja tasa de éxitos logrados con la transferencia de núcleo es el resultado de pérdidas que se producen en las etapas tempranas de desarrollo, aunque también existen pérdidas considerables en los estadios prenatal y perinatal, debidas a anomalías en la placenta, y problemas inmunológicos, respiratorios o renales¹⁴.

También el DNA de diferentes tejidos de fetos de ratones clónicos presenta un patrón aberrante de metilación en comparación al observado con animales normales¹⁵. Los bovinos clónicos que han llegado a nacer y crecer muestran características normales, así como un comportamiento reproductivo y fertilidad similares a los animales no clonados¹⁶, pero se han planteado también dudas acerca del envejecimiento prematuro de los animales clones; aunque no hay acuerdo en la causa, si está claro que la clonación influye negativamente en el complejo control del envejecimiento.

6.2. *Expresión y silenciamiento de los genes de la pluripotencialidad*

Se conoce cómo se inicia el programa de desarrollo que conduce al proceso de embriogénesis normal, que ordena las células según los ejes embrionarios al tiempo que diferencia

las células resultantes de la división del cigoto, precisamente en función del sitio que ocupan. Para ello deben funcionar una importante categoría de genes -los llamados genes pluripotenciales o de la pluripotencialidad- que se activan en el embrión temprano, pero se silencian en células especializadas. Estos genes permiten que al comienzo del desarrollo las células que los expresan puedan contribuir a una variedad de tipos de tejidos. Después las células se comprometen hacia funciones específicas, cuando estos genes son silenciados.

Este silenciamiento dificulta la reprogramación hacia atrás de los embriones clonados¹⁷. *Oct-4* pertenece a este grupo y es uno de los mejor conocidos. Se sabe que el gen *Oct-4* es importante en el desarrollo temprano; es un factor de transcripción relacionado con el mantenimiento de totipotencia en las células embrionarias y germinales¹⁸ y existe una estrecha relación entre la expresión del gen *Oct-4* y el grado de indiferenciación de las células. Las células de los primeros estadios del desarrollo embrionario son el gen *Oct-4* y su regulación permite que se diferencien hacia uno u otro de los primeros tejidos del embrión. En la mayor parte de los embriones clónicos de ratón el gen *Oct-4* se expresa erróneamente, bien respecto al tiempo o bien respecto al sitio que ocupa la célula no permitiendo un desarrollo embrionario¹⁹. Como afirma Richard Schultz de la Universidad de Pensilvania «si usted no puede reprogramar correctamente *Oct-4* usted no es capaz de obtener un desarrollo embrionario». Y, como muestra Bolani²⁰, la reactivación de un gen somáticamente silenciado parece difícil. Otro gen clave en el comienzo del desarrollo es *Nanog*; es un factor crítico en mantener la pluripotencialidad de las células de la masa interna del blastocisto²¹. Así los productos de ambos genes controlan la organización y diferenciación celular en el embrión temprano.

Los trabajos de Bortvin²² han mostrado que existen unos diez genes relacionados con *Oct-4*, en el sentido de tener un patrón de expresión similar. No se conoce aún la función de las proteínas codificadas por ellos, pero se requieren para la

formación de un embrión clónico ¿Qué pasa con estos genes normalmente expresados en células somáticas y silenciados en el embrión temprano? Posiblemente la respuesta es que el silenciamiento es más eficiente que la reactivación; no obstante²³ los embriones clónicos retienen alguna memoria de las células diferenciadas de las que derivan y de la especificidad del tejido. En las células somáticas al igual que en las de los primeros estadios del desarrollo, los genes específicos de tejido reprimen la expresión de los pluripotenciales.

6.3. En los organismos clonados cambia el nivel de la enzima telomerasa, que elimina el freno natural de la proliferación celular del organismo

La enzima telomerasa, activa en el periodo embrionario, mantiene las células «jóvenes». En las células ya diferenciadas del organismo que está completando el periodo perinatal ocurre un proceso de acortamiento de los telómeros (extremos de los cromosomas) en cada ciclo de replicación del DNA debido a la estructura lineal de los cromosomas y a que la maquinaria de replicación no puede copiar eficazmente los extremos. De este modo, el acortamiento de telómeros controla el número de divisiones de cada célula, y supone un mecanismo de envejecimiento. La enzima telomerasa evita el acortamiento de los telómeros ya que es capaz de llevar a cabo su alargamiento cuando está presente. Las células inespecializadas tanto de la masa interna del blastocisto como de la médula ósea del organismo adulto, expresa el gen y mantiene un nivel alto de la actividad reparadora de los telómeros y por ello no se acortan. La célula es *joven* y tiene un gran potencial de proliferación.

6.4. La falta de proteínas nucleares del nuclóvulo de primate

La ausencia de proteínas claves (NuMA y HSET) para el control de la división celular, y el reparto de los cromosomas en la mitosis por formación del huso que les alinea y separa, indican que la clonación de un adulto primate no es posible con las técnicas actuales. Calvin Simerly y Gerald P. Schatten

y sus colaboradores de la Universidad de Pittsburg 24 han realizado 724 intentos de crear embriones clónicos por transferencia nuclear a óvulos de hembras de primate, sin éxito. Con el uso de anticuerpos han distinguido células con un alto número de cromosomas y otras con bajo por carencia de las proteínas nucleares específicas; este tipo de proteínas no falta en las células derivadas de la transferencia nuclear de ratones, ovejas, etc.

7. Otros procesos impropriamente llamados clonación

7.1. Transferencia de un núcleo de célula tumoral a un óvulo

Trabajos incipientes con animales muestran la posibilidad de *reprogramación hacia atrás de una célula tumoral*. Se ha descrito²⁵ el desarrollo embrionario de un nuclóvulo de ratón producido por la transferencia a oocito desnucleado del núcleo de una célula de tumor cerebral. Es conocido que las células cancerosas escapan del control del crecimiento por acumular cambios genéticos y epigenéticos. Estos últimos raramente son los únicos; pero los cambios epigenéticos de modificación de la metilación de citosinas son reversibles y pueden convertir las células tumorales en células muy indiferenciadas. Estos datos sugieren que la transferencia del núcleo de la célula tumoral a un oocito permite el proceso de reprogramación hacia célula totipotente del nuclóvulo. Este proceso de reprogramación de la información genética de una célula tumoral de un individuo soslaya uno de los tres procesos que dificultan, hoy por hoy, la clonación de un adulto. Ahora bien, si no se soslayan los otros procesos, que hacen actualmente imposible la clonación de un mamífero primate, la transferencia de núcleos de células de determinados tumores humanos podría permitir la obtención directa de líneas celulares del tipo embrionario, para estudios de interés, partiendo de una célula tumoral, lo que supondría un mecanismo sin clonación de un individuo. Esta alternativa requiere el estudio previo en primates que asegure que este tipo de nuclóvulo no se reprograma a cigoto.

7.2. *Transferencia de núcleo de células progenitoras de los gametos y semiclونación*

En algunas investigaciones se está tratando de llevar a cabo la transferencia de los núcleos de células precursoras de los gametos de ambos progenitores a óvulos a los que previamente se ha eliminado el núcleo. No se trataría, por tanto, si se consigue de técnicas de clonación, ya que el núcleo del posible cigoto es el resultado de la dotación paterna y materna, de las células precursoras de gametos y no de una única célula somática. Estas llamadas impropriamente clonaciones, son en realidad fecundaciones sin fusión de gametos. Se plantean diversas vías para llevarlas a cabo, que en definitiva consisten en inducir una división meiótica del núcleo o núcleos diploides transferidos, o bien en eliminar un pronúcleo de un cigoto triploide obtenido por transferencia de un núcleo diploide y una fecundación.

Transferencia de núcleo de un cigoto a otro

También de forma arbitraria se ha llamado clonación a la transferencia del núcleo de un cigoto procedente de un óvulo con alguna alteración en las mitocondrias, a un cigoto desnucleado producido también por fecundación *in vitro* a partir del óvulo de una mujer sana. Según los datos publicados, tres de los embriones desarrollados a partir de estos cigotos manipulados se transfirieron al útero de la madre biológica y se implantaron. Posteriormente se eliminó uno de los fetos para que no prosiguiera una gestación múltiple y de los dos a los que permitieron seguir desarrollándose, uno murió a las 24 semanas y el otro a las 29 semanas de gestación. Se desconoce si la causa de la muerte prematura es debida a la manipulación de los cigotos o al problema ya detectado en experimentos con animales, de incompatibilidad entre el DNA y las mitocondrias procedentes del óvulo de una hembra diferente a la que aporta el DNA nuclear.

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

Nota del Editor:

Este artículo se reproduce con autorización de la autora, Dra. Natalia López Moratalla, de la publicación *Cuad. Bioét.* 2004/3ª, págs. 385-404.

1. Cibelli J.B., Stice S.L., Golueke P.J., Kane J.J., Jerry J., Blackwell C., Ponce de León F.A., Robl. J.M. (1998a) Cloned transgenic calves produced from nonquiescent fetal fibroblasts. *Science* 280, 1256-1258; Wakayama T., Yanagimachi R. (1999) Cloning of male mice from adult tail-tip cells. *Nature Genetics* 22,127-128; Wakayama T., Rodriguez I. Perry A.C., Yanagimachi R, Mombaerts P. (1999). Mice cloned from embryonic ítem cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA* 96, 14984- 14989.
2. Wakayama T., Perry A.C., Zuccotti M., Johnson K. R, Yanagimachi R.(1998) Full-term development of mice from enucleated oocytes injected with cumulus cell nuclei. *Nature* 394, 369-374; Wakayama T., Yanagimachi R. (1999) Cloning the laboratory mouse. *Seminars in Cell and Developmental Biology* 10, 253-258; Wakayama T., Rodriguez I., Perry A.C., Yanagimachi R, Mombaerts P. (1999) Mice cloned from embryonic stem cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA* 96, 14984-14989; Wakayama T. , Yanagimachi R. (2001) Effect of cytokinesis inhibitors, DMSO and the timing of oocyte activation on mouse cloning using cumulus cell nuclei. *Reproduction* 122, 49-60.
3. Santos F., Hendrich B. Reik W. Dean W. (2002) *Dev. Biol* 241, 172-183.
4. Bird A. (2003) *Nature Immunol* 4, 208-209.

5. Lee J. (2002) Erasing genomic imprinting memory in mouse done embryos produced from day 11.5 primordial germ cells. *Development* 129, 1807-1817.
6. Mager J. Montgomery N .D. Pardo-Manuel de Villena F. Magnuson T. (2003) Genome imprinting regulated by the mouse Polycomb group protein Eed. *Nature Genetics* 33, 502- 507.
7. Rideout W. M. 3rd, Eggan K, Jaenisch R. (2001). Nuclear cloning and epigenetic reprogramming of the genome. *Science* 293, 1093-1098.
8. Wakayama T., Yanagimachi R. (2001) Mouse cloning with nucleus donor cells of different age and type. *Molecular Reproduction and Development* 58, 376-383.
9. Kasinathan P., Knott J.G., Moreira P.N., Burnside A.S., Jerry D.J., Robl J.M. (2001) Effect of fibroblast donor cell age and cell cycle on development of bovine nuclear transfer embryos in vitro. *Biology of Reproduction* 64, 1487-1493.
10. Ogura A., Inoue K., Takano K., Wakayama T., Yanagimachi R. (2000) Birth of mice after nuclear transfer by electrofusion using tail tip cells. *Molecular Reproduction and Development* 57, 55-59; Galli C., Lagutina I., Lazzari G. (2001) Comparison of microinjection (piezo-electric) and cell fusion far nuclear transfer success with different cell types inc attle. *Proceedings of the International Workshop on Current Status and Perspectives in Cloning and Related Stud Studies*, Tsukuba, pp. 6.; Wakayama T., Yanagimachi R. (2001) Effect of cytokinesis inhibitors, DMSO and the timing of oocyte activation on mouse cloning using cumulus cell nuclei. *Reproduction* 122, 49-60.
11. Wakayama T., Yanagimachi R (1999) Cloning of male mice from adult tail-tip cells. *Nature Genetics* 22, 127-128.
12. Wakayama T., Rodriguez I., Perry A.C, Yanagimachi R, Mombaerts P. (1999) Mice cloned from embryonic stem cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA* 96, 14984-14989.
13. Rideout W.M. 3rd, Wakayama T., Wutz A., Eggan K, Jackson-Grusby L., Dausman J., Yanagimachi R, Jaenisch R (2000) Generation of mice from

wild-type and targeted ES cells by nuclear cloning. *Nature Genetics* 24, 109-110.

14. Renard J.P., Chastant S., Chesne P., Richard C., Marchal J., Cordonnier N., Chavatte P. Vignon X. (1999) Lymphoid hypoplasia and somatic cloning. *Lancet* 353, 1489-1491; Hill JR, Burghardt RC, Jones K, Long CR, Looney CR, Shin T, Spencer TE, Thompson JA, Winger QA, Westhusin ME (2000) Evidence for placental abnormality as the major cause of mortality in first-trimester somatic cell cloned bovine fetuses. *Biology of Reproduction* 63, 1787-1794; Kubo M (2001) Pathology of diseases in calves cloned by nuclear transfer. *Proceedings of the International Workshop on Current Status and Perspectives in Cloning and Related Studies*, Tsukuba, pp. 8; Tanaka S, Oda M, Toyoshima Y, Wakayama T, Tanaka M, Yoshida N, Hattori N, Ohgane J, Yanagimachi R, Shiota K. (2001) Placentomegaly in cloned mouse concepti caused by expansion of the spongiotrophoblast layer. *Biology of Reproduction* 65, 1813-1821.
15. Ohgane J., Wakayama T., Kogo Y., Senda S., Hattori N., Tanaka S., Yanagimachi R, Shiota K. (2001) DNA methylation variation in cloned mice. *Genesis* 30, 45-50.
16. Lanza R.P., Cibelli J.B., Faber D., Sweeney R.W., Henderson B., Nevala W. West M.D., Wettstein P.J. (2001) Cloned cattle can be healthy and normal. *Science* 294, 1893-1894.
17. Reik W., Dean W., (2003) Gene expression: Silent clones speak up. *Nature*, 390, 423.
18. Palmieri S., Peter W., Hess H, et al. (1994) Oct-4 transcription factor is differentially, expressed in the mouse during establishment of the first two extraembryonic cell lineages involved in implantation. *Developmental Biology* 166, 259-267.
19. Bolani M. Eckardt S., Scholer H.R., McLaughlin K.J. (2002) Oct4 distribution and level in mouse clones: consequences for pluripotency. *Genes and Development* 16. 1209-1219.
20. Bolani M., Eckardt S., Schöler H.R. and McLaughlin K.J. (2002) *Genes Dev*, 16, 1209-1219.
21. Mitsui K. et al. (2003) The homeoprotein nanog is required for maintenance of pluripotency in mouse epiblast and ES cells. *Cell* 113, 631-642.
22. Bortvin A. et al. Incomplete reactivation of Oct-4-related genes in mouse embryos cloned from somatic nuclei (2003) *Development* 130, 1673-

1680; Reik W. and Dean W. (2003) Silent clones speak up. *Nature* 423, 290-291.

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

24. Simerly C. et al. (2003) Molecular correlates of primate nuclear transfer failures
Science, 300,297.

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