

# La clonación: fundamentos teóricos y aplicaciones

MC. Jesús Salvador Velarde Félix <sup>1</sup>

<sup>1</sup>Facultad de Medicina UAS y Laboratorio Estatal de .

El nacimiento de la oveja Dolly, el primer mamífero resultado de la clonación artificial de un animal adulto, generó el inicio de un amplio, y todavía interminable debate ético y científico. No obstante, la clonación ha existido siempre de forma natural en muchos mamíferos, incluyendo al hombre, especie en que el nacimiento de gemelos idénticos no es más que el resultado de la clonación natural de el embrión, y a cuyas gestaciones se les llama gestaciones gemelares, y producen dos individuos genéticamente iguales provenientes de un solo cigoto.

## PERO, ¿QUÉ ES LA CLONACIÓN?

Si nos referimos al ámbito de la Biología Molecular, clonar es aislar y multiplicar un determinado gen o fragmento de éste; sin embargo en esta revisión nos hemos de referir como clonación al procedimiento que lleva a la obtención de uno o varios individuos a partir de una célula somática o de un núcleo, de modo que los individuos clonados son idénticos al original.

Existen varios tipos de clonación, según el método<sup>1</sup>:

**1. Partición de embriones;** con este método, los individuos obtenidos son muy semejantes entre sí, pero diferentes a sus padres. Es preferible usar el término “gemelación artificial”, y no debe considerarse como clonación en sentido estricto. Es análogo a la gemelación natural.

Consiste en la separación de blastómeros en embriones preimplantatorios (2-32 células). Cada mitad del embrión se introduce en una zona pelúcida de otro óvulo, o en una cubierta artificial, y se implanta, previa inducción de polimerización con sustancias químicas. Esta técnica se aplica desde hace años en la ganadería, particularmente en ovejas<sup>2,3</sup> y más recientemente en monos<sup>4</sup>.

**2. Paraclonación;** consiste en transferir núcleos procedentes de blastómeros embrionarios o de células fetales en cultivo a óvulos no fecundados enucleados y a veces, a cigotos enucleados. En este caso el “individuo progenitor” de los clones es el embrión o el feto.

En la década de los ochenta, se realizaron exitosamente transferencias nucleares en mamíferos. Éstas se lograron por medio de la disociación de blastómeros embrionarios (células embrionarias no diferenciadas). Prather y cols. lograron paraclonaciones en ovejas y vacas<sup>5</sup>, obteniendo terneros por transferencia de núcleos de embriones en fase de hasta 128 células. En 1996 Campbell y cols. consiguieron dos ovejas (Megan y Morag) por transferencia de núcleos de embriones<sup>6</sup>, Meng y cols. han producido monos Rhesus por transferencia de núcleos de blastómeros<sup>7</sup>, sin dejar de mencionar a Polly, una oveja paraclónica transgénica productora de factor IX de coagulación humano<sup>8</sup>.

Un avance reciente significativo fue la clonación de decenas de ratones empleando núcleos de células madre no quiescentes<sup>9</sup>. Con este trabajo se demuestra que se puede clonar con núcleos de células en cultivo bien caracterizadas, y no solamente con células frescas o cultivos primarios. Como las células madre de ratón se manejan bien desde el punto de vista genético, esto abre la vía a la fácil creación de ratones clónicos y transgénicos.

El resultado son individuos casi idénticos entre sí, pero diferentes a los progenitores del embrión que aportó el núcleo transferido. Se pierde una generación, ya que el embrión donante del núcleo se destruye. Los individuos nacidos así se parecerían (desde el punto de vista del genoma nuclear) al individuo que hubiera surgido del embrión destruido.

**3. Clonación verdadera;** se transfieren núcleos procedentes de células de individuos ya nacidos a

óvulos o cigotos enucleados, originando individuos idénticos entre sí y muy parecidos al donante (del que se diferencian en mutaciones somáticas y en el genoma mitocondrial, que procede del óvulo receptor).

En los primeros experimentos de transferencia de núcleos de ranas, realizado por Briggs y King en 1952, se observó que el grado de éxito de la transferencia nuclear dependía del grado de diferenciación de la célula donadora. Así, cuando la célula donadora provenía de un embrión antes de su segunda división, se obtenía un rana adulta, sin embargo, cuando, la célula donadora de una célula más diferenciada, en este caso del intestino de un renacuajo, el desarrollo se detenía antes de alcanzar el estado adulto. Sin embargo, los intentos por realizar una transferencia nuclear mediante la utilización de células más diferenciadas no fueron exitosos. Esto llevó a la conclusión de que el ADN de las células diferenciadas no podía reprogramarse, por lo tanto, surgió el dogma que el proceso de diferenciación celular era un proceso irreversible. Actualmente sabemos que, este dogma se destituyó al lograrse la clonación de Dolly a partir de una célula mamaria de un adulto.

El nacimiento de Dolly revolucionó el pensamiento científico. Sin embargo, este descubrimiento no fue fortuito, los investigadores se dieron cuenta de la importancia de la coordinación entre el ciclo celular del ovocito receptor y el de la célula donadora del núcleo. Al respecto se encontró que si se induce a las células a entrar en periodo de latencia (etapa G<sub>0</sub> del ciclo celular), se incrementa la efectividad de la reprogramación nuclear y las posibilidades de éxito de la transferencia<sup>10</sup>.

Después de este importante descubrimiento, el paso lógico fue ensayar con células diferenciadas provenientes de animales adultos, lo que finalmente llevó al nacimiento de Dolly<sup>10</sup>.

En un principio, la clonación a partir de animales adultos estuvo rodeada de gran asombro y escepticismo. Hubo incluso investigadores que, ante la imposibilidad de lograr resultados similares consideran a la clonación como algo resultado del azar. Pero hoy en la actualidad es bien sabido que es posible producir clones. Se han logrado clonaciones a partir de células diferenciadas provenientes de una gran diversidad de tejidos y en la gran mayoría de las especies domésticas<sup>11</sup>.

### **REPROGRAMACIÓN NUCLEAR**

Hay que tener presente que en los animales superiores la única forma de reproducción es la sexual,

por la que dos células germinales se unen para formar un huevo o cigoto, y de cuya división repetida y diferenciación dependerán las células somáticas, mismas que constituyen los tejidos del animal adulto, las cuales han recorrido un largo camino «sin retorno», de modo que, a diferencia de las células de las primeras fases del embrión, han perdido la capacidad de generar nuevos individuos y cada tipo se ha especializado en una función distinta (a pesar de que, salvo excepciones, contienen el mismo material genético).

La clonación no solamente derribó el dogma de la irreversibilidad de la diferenciación celular, pues el hecho de haberla logrado exitosamente a partir de células somáticas diferenciadas es, por sí mismo, un suceso asombroso que ha obligado a los científicos a revalorar los procesos de la diferenciación celular y de la reprogramación nuclear.

En las células diferenciadas, la función está regulada por factores que activa o reprimen la transcripción de los genes. Aunque el contenido y la secuencia del ADN nuclear es similar en la mayoría de las células del organismo durante el desarrollo, los genes expresados en un tipo particular de célula es limitado. A los cambios que regulan la actividad génica sin involucrar mudas en la secuencia del ADN se les conoce como cambios epigenéticos. Una vez ocurridos estos cambios, se transmiten a la descendencia. Con la clonación se demostró que las células diferenciadas pueden reprogramarse y regresar a la fase en que eran capaces de dar origen a cualquier tipo celular<sup>12</sup>.

La reprogramación nuclear es el proceso mediante el cual un núcleo proveniente de una célula especializada adquiere el potencial de desarrollo que tenía como célula indiferenciada al transferirse a un ovocito enucleado. Cuando se utiliza la técnica de transferencia nuclear, la cromatina del núcleo transferido se expone al citoplasma del ovocito enucleado, esto propicia un intercambio de componentes entre ambos, que influye en los procesos que permiten la descondensación de la cromatina y en algunos mecanismos como la metilación del ADN<sup>13</sup>.

La manera en que los cromosomas están descondensados (cambios en la estructura de la cromatina) determina en gran medida el destino de las células, y hace que los genes estén accesibles o inaccesibles al proceso de transcripción.

Por otro lado, la metilación de la citosina modifica la apariencia del ADN, lo cual provoca un cambio heredable, entre generaciones celulares, de la estructura de la cromatina que altera la interacción entre las proteínas y el ADN, ocasionando una dis-

minución del índice de transcripción génica y a veces bloqueándola<sup>14</sup>. Durante las primeras divisiones mitóticas, en el cigoto ocurre la desmetilación de las modificaciones epigenéticas presentes en el ADN de los padres. De este modo, el embrión carece casi por completo de metilaciones, por tanto, todos los genes están activados para transcribirse. Posteriormente, entre la implantación y la gastrulación, hay una nueva oleada de metilaciones en el ADN; éstas se mantendrán por el resto de la vida. Para que el núcleo proveniente de una célula diferenciada readquiera un completo potencial de desarrollo es necesario revertir los cambios bioquímicos que establecen las limitaciones del potencial genético. La eficiencia de este revertimiento probablemente determine el éxito del desarrollo subsecuente del embrión.

### **CLONACIÓN REPRODUCTIVA Y CLONACIÓN TERAPÉUTICA**

Hoy en día, la clonación tiene dos grandes vertientes: 1) la *Clonación reproductiva*, que usa los procedimientos de la clonación para producir un embrión clonal, el cual se implanta en una madre subrogada con la intención de crear un niño vivo, y 2) La *Clonación terapéutica* usada para crear un embrión clonal, pero en lugar de implantarlo en una mujer, se usa para generar células madre que permitan la generación de tejidos u órganos, que el donador clonal puede usar sin correr el riesgo de que sea rechazado por el sistema inmune.

La clonación reproductiva plantea la existencia de una nueva categoría de relación biológica, los clones; que en lo personal considero, la humanidad no está preparada para ver con vida a gente ya fallecida, así como tampoco aceptar que una misma persona se encuentre por duplicado.

La clonación reproductiva por realizarse cierta instrumentalización de unos seres humanos en beneficio de otros, se pierde la autonomía, además de que se crean seres humanos sin la participación de la naturaleza, al excluir la participación de los padres en la procreación, lo que constituye una práctica antinatural tanto desde el punto de vista biológico como filosófico<sup>15</sup>. Es imprevisible la reacción que tendrá un individuo al enterarse que fue concebido mediante clonación, sin saber cómo y para qué.

El mismo Dr. Wimult, creador de Dolly, se opone a la clonación reproductiva, y sostiene que es ilegal<sup>16</sup> e inmoral<sup>17</sup>, sin embargo apoya la clonación terapéutica<sup>18</sup>.

### **BENEFICIOS MÉDICOS POTENCIALES**

### **DE LA CLONACIÓN**

Los motivos para realizar la clonación de seres humanos pueden ser múltiples: a) Deseo de continuidad de las características de excelencia, aunque por parecido que sea un ser humano a otro siempre habrá alguna diferencia, el ser humano es único e irreplicable. b) Como fuente de órganos y tejidos de recambio. c) Como apoyo a las técnicas de reproducción asistida y d) Para facilitar el diagnóstico genético antes de la implantación, si un embrión resulta sano se implantaría el otro, lo que no es admisible desde el punto de vista científico ni ético<sup>15</sup>.

Hasta ahora no es posible contemplar, en su totalidad, los beneficios que la clonación traerá en el futuro; no obstante, ya se vislumbran algunas aplicaciones médicas de esta metodología.

### **MODIFICACIONES GENÉTICAS ESPECÍFICAS**

Actualmente existen ovejas clónicas y transgénicas que segregan en su leche la proteína que carecen los enfermos del enfisema pulmonar congénito. Hace poco han logrado expresar ese gen de forma controlada, insertándolo en un lugar predeterminado del genoma receptor, lo que si se confirma y amplía, supone un gran paso<sup>19</sup>. Existe una gran cantidad de alimentos que pueden ser modificados para hacerlos más aceptables y nutritivos para el hombre. Por ejemplo, hay personas que son alérgicas a ciertos componentes lácteos, pero por medio de la ingeniería genética y clonación se pueden crear vacas que produzcan leche apta para personas alérgicas.

### **XENOTRANSPLANTES**

Se refiere al trasplante de órganos entre especies. Actualmente, existe una gran demanda de órganos para trasplantes que no es cubierta por las donaciones altruistas. El uso de órganos provenientes de animales domésticos puede ayudar a cubrir este déficit, ya que con ayuda de la ingeniería genética se pueden modificar las moléculas del Complejo Mayor de Histocompatibilidad asociadas con la membrana celular, causantes del rechazo inmunológico.

### **MODELOS PARA INVESTIGACIÓN**

El uso de modelos animales para investigar ha ayudado a comprender la fisiopatología de muchas enfermedades. Normalmente, estos modelos son ratones, pues en ellos se pueden introducir mutaciones específicas. Gracias a la clonación será posible crear modelos de investigación con animales cuya fisiología se asemeje más a la humana. Así mismo, la clonación puede utilizarse para sustituir

los modelos consanguíneos usados en la investigación

### **TERAPIA CELULAR**

Una vez que se comprendan los mecanismos de reprogramación genética, puede pensarse en la diferenciación celular controlada, esto podría utilizarse para el tratamiento de algunas enfermedades. Actualmente, por ejemplo, para disminuir el riesgo de rechazo inmunológico en trasplantes de médula ósea en enfermos de leucemia, se buscan parientes cercanos al paciente como donadores. Al conocer los mecanismos por los cuales la célula se diferencia, será posible realizar *in vitro* la multiplicación dirigida a la línea celular de interés mediante células obtenidas del paciente mismo, las cuales pueden ser reimplantadas sin riesgo de rechazo alguno.

### **CÁNCER Y ENVEJECIMIENTO**

Durante toda la vida, debido a las repetidas divisiones celulares, se acumulan alteraciones del ADN, llamadas mutaciones somáticas. A partir de la clonación de células de animales adultos, será posible investigar si estas mutaciones están implicadas en los procesos de cáncer y envejecimiento.

### **PRODUCCIÓN DE PROTEÍNAS HUMANAS**

La obtención de proteínas humanas para el tratamiento de ciertas enfermedades se realiza actualmente a partir de suero humano, de cultivo celulares o por tecnología recombinante. Sin embargo, existen inconvenientes para estos métodos, tales como el riesgo de transmisión de enfermedades cuando la proteína deriva de suero humano, la baja eficiencia y el alto costo de los cultivos celulares, y la carencia de modificaciones postraduccionales a las proteínas recombinantes obtenidas en cultivos bacterianos. La producción de proteínas humanas en la leche de animales transgénicos podría evitar estos problemas, con costos relativamente bajos.

### **LA CLONACIÓN AUN EN ETAPAS INCIPIENTES**

A pesar de lo dicho hasta ahora, la clonación artificial es un procedimiento inexacto, impredecible e ineficaz, al tener un 0 y 3% de crías nacidas por transferencia nuclear. La gran mayoría de los individuos obtenidos por clonación se pierden en el primer tercio de la gestación, aunque también son frecuentes los abortos más tardíos. Finalmente, una gran proporción de las crías nacidas mueren a los pocos días de vida<sup>20,21</sup>. Al respecto, para la clonación de

Dolly se requirieron 277 óvulos enucleados e injertados con núcleos de células de la ubre de una oveja embarazada sólo 29 llegaron a convertirse en embriones que se implantaron en úteros de otras ovejas tratadas hormonalmente para sostener el embarazo, pero de todas ellas sólo un caso fue efectivo.

Entre las alteraciones de la gestación asociadas a clonación se encuentran principalmente deficiencias de la placenta, con poco epitelio trofoblástico y vascularización reducida<sup>22</sup>. Posteriormente, los fetos pueden mostrar una serie de anomalías congénitas (hígado agrandado, defectos cardiopulmonares, edema de placenta, hidroalantoides, y otras). Por último, los individuos que llegan a término pueden sufrir tanto cardiomiopatías como estrés respiratorio ocasionado por deficiencia de factores surfactantes, sumándose esto a hipertensión pulmonar y presión venosa elevada. En ocasiones no se logran determinar anomalías en los fetos o recién nacidos; aunque, se piensa que existen fallas en la reprogramación nuclear que podrían ser responsables de la interrupción en el desarrollo<sup>22</sup>. La comunidad científica advierte que aún los clones aparentemente sanos pueden tener pequeños cambios en la expresión génica que no sean lo suficientemente severos para ser letales, pero podrían tener efectos determinantes en la expresión de los genes en etapas posteriores.

Por último, es indudable que la clonación ha abierto nuevos horizontes para la ciencia médica. Las diferentes corrientes de estudio que se han originado redundarán en un mejor entendimiento del control de la expresión genética, trayendo sin lugar a duda, beneficios en la medicina y en la biotecnología. Las limitaciones actuales de la clonación se relacionan principalmente con el escaso conocimiento que se tienen sobre los procesos llevados a cabo en la reprogramación genética, la metilación del ADN, la impronta genómica, la estructura de la cromatina, la inactivación del cromosoma X y la longitud del telómero<sup>18</sup>. Así, esta técnica es aún ineficiente pues existe un gran porcentaje de mortalidad embrionaria y perinatal<sup>23</sup> además de que se desconocen los efectos de las mutaciones somáticas en el desarrollo posterior de los individuos clonados.

Científicamente se trata de un logro muy interesante, ya que demuestra que, al menos bajo determinadas circunstancias es posible «reprogramar» el material genético nuclear de una célula diferenciada (algo así como volver a poner a cero su reloj, de modo que se comporta como el de un cigoto). De este modo, este núcleo comienza a «dialogar» adecuadamente con el citoplasma del óvulo y desena-

dena todo el complejo proceso del desarrollo intrauterino.

En resumen, para la clonación reproductiva existen todavía incógnitas, riesgos y limitaciones del tipo científico y técnico, que hacen de la clonación algo no muy deseable. Aparte, por supuesto, de que si se trata de infertilidad pues existen otras alternativas.

Para el caso de la clonación terapéutica, existen algunas vías alternas muy promisorias. Las células troncales existen no solamente en el embrión, sino también en el feto, en el cordón umbilical, en la placenta... y en el adulto, en el cerebro, la médula ósea y otros sitios que, aunque escasas, pueden identificarse, cultivarse y purificarse. Las más nobles son las hematopoyéticas; de hecho, se utiliza desde hace tiempo el trasplante de médula ósea para el tratamiento de la leucemia. Las células troncales del adulto, si bien es cierto son escasas y no son tan productivas como las embrionarias, constituyen una esperanza ya que, para manipularlas, no se necesita destruir un embrión.

#### REFERENCIAS

1. Véase el cap. 3 de Comité de expertos sobre bioética y clonación (1999): Informe sobre la clonación (1999): Informe sobre la clonación: en las fronteras de la vida, Instituto de Bioética de la Fundación Ciencias de la Salud, Ediciones Doce Calles, Madrid.
2. Willadsen SM and Polge C. Attempts to produce monozygotic quadruplets in cattle by blastomere separation. *Vet Rec* 1981; 108:211-213.
3. Willadsen SM. The development capacity of blastomeres from 4- and 8-cell sheep embryos. *J Embryol Exp Morphol.* 1981; 65:165-72.
4. Chan AWS, T. Dominko, CM. Luetjens E. Neuber C. Martinovich L. Hewitson CR. Simerly GP. Schatten. Clonal propagation of primate offspring by embryo splitting. *Science* 2000; 287: 317-319.
5. Prather RS, Barnes FL, Sims MM, Robl JM, Eyestone WH, First NL. Nuclear transplantation in the bovine embryo: assessment of donor nuclei and recipient oocyte. *Biol Reprod* 1986; 37: 859-866.
6. Campbell KHS, McWhir J, Ritchie WA, Wilmut I. Sheep cloned by nuclear transfer from a cultured cell. *Nature* 1996; 380: 64-66.
7. Meng L, Ely JJ, Stouffer RL, Wolf DP. Rhesus monkeys produced by nuclear transfer. *Biol Reprod* 1997; 57: 454-459.
8. Schieke AE, Kind AJ, Ritchie WA, Mycock K, Scott AR, Ritchie M, Wilmut I, Colman A, Campbell KHS. Human factor IX transgenic sheep produced by transfer of nuclei from transfected fetal fibroblasts. *Science* 1997; 278: 2130-2133.
9. Wakayama T, Rodríguez I, Perry AC, Yanagimachi R, Mombaerts P. Mice cloned from embryonic stem cells. *Proc Nat Acad Sci USA* 1999; 96: 14984-14989.
10. Campbell KH, McWhir J, Ritchie WA and Wilmut I. Sheep cloned by nuclear transfer from a cultured cell line. *Nature* 1996; 380:64-66.
11. Solter D. Dolly is a clone-and no longer alone. *Nature* 1998; 394: 315-316.
12. Reik W, Dean W, Walter J. Epigenetic reprogramming in mammalian development *Science* 2001; 293:1089-1093.
13. Tada T, Tada M. Toti-/pluripotential stem cells and epigenetic modifications. *Cell Struct Funct* 2001; 26:149-160.
14. Blau HM. Differentiation requires continuous active control. *Ann Rev Biochem* 1992; 61:1213-1230.
15. Tarasco MM, Marco-Back FJ, Pastor GLM. La clonación. *Medicina y ética* 1997; 8:243.
16. Wilmut I. Human cells from cloned embryos in research and therapy. *BMJ* 2004;328:415-416.
17. Wilmut I. The moral imperative for human cloning. *New Sci* 2004;181:16-17.
18. Rhind SM, Taylor JE, De Sousa PA, King TJ, McGarry M and Wilmut I. Human cloning: can it be made safe?. *Nature Rev Gen* 2003; 4:855-864.
19. McCreath KJ, Howcroft J, Campbell KHS, Colman A, Schnieke AE, Kind AJ. Production of gene-targeted sheep by nuclear transfer from cultured somatic cells. *Nature* 2000; 405:1066-1069.
20. Hill JR, Burghardt RC, Jones K, Long CR, Looney CR, Shin T, Spencer TE, Thompson JA, Winger QA, Westhusin ME. Evidence for placental abnormality as the major cause of mortality in first-trimester somatic cell cloned bovine fetuses. *Biol Reprod* 2000; 63:1787-94.
21. De Sousa PA, King T, Harkness L, Young LE, Walker SK, Wilmut I. Evaluation of gestational deficiencies in cloned sheep fetuses and placentae. *Biol Reprod* 2001;65:23-30.
22. Hill JR, Roussel AJ, Cibelli JB, Edwards JF, Hooper NL, Miller MW, Thompson JA, Looney CR, Westhusin ME, Robl JM, Stice SL. Clinical and pathologic features of cloned transgenic calves and fetuses (13 case studies). *Theriogenology* 1999;51:1451-65.
23. Rideout WM 3rd, Eggan K, Jaenisch R. Nuclear cloning and epigenetic reprogramming of the genome. *Science* 2001;10:1093-1098. **BM**