

clonación de mamíferos: algo más que una simple oveja

ALEXANDER KIND Y ANGELIKA SCHNIEKE

Desde que en 1997 se hiciera público el caso de Dolly, la clonación por transferencia nuclear ha despertado un enorme interés en los medios de comunicación. Pero los comentaristas se han preocupado más de especular sobre posibles ejércitos de dictadores o deportistas clonados, y aplicaciones secundarias, como la sustitución de mascotas. En este ensayo queremos situar la transferencia nuclear en un contexto más amplio y destacar las consecuencias más sutiles y a la vez profundas del trabajo.

Así que empezamos por preguntarnos por qué surgió una forma tan complicada de producir animales. Quienes visiten Escocia pronto se darán cuenta de que no hay escasez de ovejas. De hecho, tras el experimento de Dolly se esconden dos motivos. Uno era estrictamente comercial y consistía en desarrollar una herramienta para la producción rápida de animales idénticos para la biotecnología. El segundo motivo, mucho más profundo, era la simple curiosidad científica y una oportunidad de tratar un dilema biológico muy antiguo. En su calidad de animales complejos, las ranas, los ratones, las ovejas y los seres humanos proceden de una única célula a partir de la cual se forman muchos tipos diferentes de células. ¿Cómo alcanzan sus destinos y cómo conservan o cambian de identidad?

Primeras investigaciones y principios fundamentales

Los expertos han debatido la cuestión del desarrollo animal desde la Antigüedad. En el siglo III a.C., Aristóteles reconoció la importancia de la reproducción sexual y propuso dos modelos alternativos. O la estructura del animal completo ya estaba preformada en miniatura dentro del óvulo o el embrión, o nuevas estructuras iban surgiendo poco a poco. Aristóteles se inclinó por la segunda idea, pero al carecer de la tecnología adecuada la cuestión siguió siendo durante siglos objeto de interminables debates filosóficos. El preformismo se convirtió en la doctrina más extendida en la Europa de los siglos XVII y XVIII, tal y como ilustra el grabado del siglo XVII de la figura 1. Animado por el descubrimiento de los espermatozoides, o «animáculos» como se les llamaba entonces, el físico y microscopista Nicholas Hartsoeker propuso que en su interior podía estar la estructura de un diminuto feto. Hartsoeker conjeturó que la cabeza del espermatozoide crecía hasta formar el feto y que la cola se transformaba en el cordón umbilical, mientras la función del óvulo sólo consistía en proporcionar un nido para facilitar el desarrollo del nuevo ser.

Pero hasta después de 1830 no se pudieron realizar estudios fiables. Fue entonces cuando el naturalista bri-

tánico aficionado Joseph Jackson Lister inventó el microscopio compuesto. Los instrumentos con más de una lente proporcionaban suficiente resolución para distinguir por primera vez la estructura detallada de tejido vivo. Podría decirse que la biología moderna nació en 1839, cuando Theodor Schwann y Matthias Schleiden demostraron que los seres vivos se componían de células. Poco después, Albrecht von Kölliker demostró que los espermatozoides y los ovocitos (huevos) también son células, pero la forma en que interactuaban para constituir un nuevo organismo seguía siendo un misterio. El eminente químico Justus von Liebig sugirió que el espermatozoide transmite sus cualidades masculinas al ovocito a través de la vibración energética de sus colas. En 1854, George Newport describió sus estudios de fertilización en ranas y sugirió que el espermatozoide realiza su aportación penetrando el huevo. Hacia la misma fecha, las investigaciones microscópicas revelaron que nuevas células surgían de la división del huevo fertilizado, por lo que resultaba inverosímil que el desarrollo se produjera por preformación.

A Oskar Hertwig se le atribuyen los inicios del estudio sobre fertilización y desarrollo embrionario temprano del erizo de mar, un campo muy productivo que proporcionó gran parte de la información que se aplicó posteriormente a otras especies. Los erizos de mar son idóneos para los estudios microscópicos porque sus huevos son muy claros. En 1876, Hertwig describió sus observaciones tras añadir

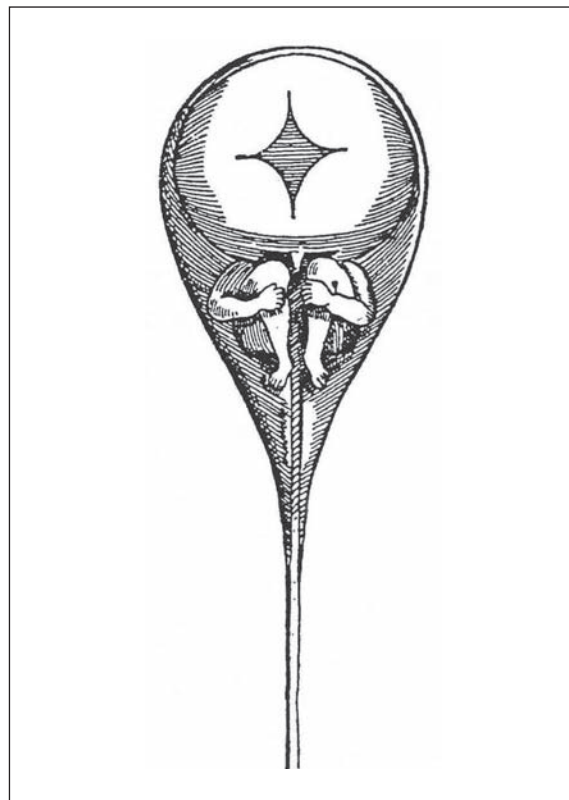


Figura 1. Feto preformado dentro de una cabeza de zvvv. N. Hartsoeker (1694). *Essai de dioptrique*, Paris.

esperma a los huevos. En particular, observó la presencia de dos núcleos dentro del huevo, uno de los cuales provenía del espermatozoide, e indicó cómo se fusionaban. Ésta fue la primera explicación del papel de los dos padres en la reproducción. También destacó la importancia del núcleo, y de los cuerpos coloreados en su interior que pudieron apreciarse al utilizar los tintes de anilina y que en la década de 1880 pasaron a llamarse «cromosomas».

Se puede decir que el biólogo alemán August Weismann va inmediatamente detrás de Charles Darwin en cuanto a aportaciones a la biología teórica. En 1892 Weismann propuso una idea atrevida: los núcleos de los ovocitos y del espermatozoide contenían una sustancia hereditaria, que además constituía la única continuidad orgánica entre generaciones (Weismann 1892). Este principio sentó los cimientos de toda la genética y la biología evolutiva. La teoría del «plasma germinal» de Weismann establece que las células germinales tienen un linaje muy distinto del resto de las células del cuerpo, las células somáticas, y que las características que el cuerpo adquiere a lo largo de la vida no se transmiten a las células germinales. Esto contradecía de forma explícita las teorías de Jean-Baptiste Lamarck, muy aceptadas en la época incluso por Darwin. En los siguientes 20 años, la corriente de pensamiento iniciada por Weismann pasó a convertirse en la ciencia moderna sobre genética y desarrollo. En 1900 se redescubrieron los trabajos de Gregor Mendel sobre híbridos de guisantes y con ellos su concepto de segregación de caracteres independientes. Dos años más tarde Theodor Boveri y Walter Sutton habían descubierto que los elementos que determinan los caracteres identificados por Mendel se encuentran en los cromosomas. En 1907, Boveri demostró que la presencia de un juego de cromosomas normal es necesaria para el desarrollo embrionario del erizo de mar. En 1915, Thomas Morgan descubrió la localización física de los genes en los cromosomas de la mosca de la fruta en su obra maestra *The Mechanism of Mendelian Heredity* (*El mecanismo de la herencia mendeliana*) (Morgan et al. 1915).

En la actualidad, estas ideas conforman la base de la biología, pero durante el siglo xx se consideraron «degeneradas y fascistas». Los ideólogos de la Rusia soviética rechazaron violentamente la teoría del plasma germinal. A partir de los primeros años de la década de 1930 hasta 1964, la política soviética oficial rechazó las ideas de Weismann y la genética en su totalidad. Desde luego, Stalin no será recordado por su interés en la biología del desarrollo y todo indica que actuó por motivos políticos. La herencia de caracteres adquiridos hacía posible que la raza humana se perfeccionara gracias a la política «materialista progresista». De esta forma, los líderes soviéticos podían justificar las penurias que tenía que soportar la gente al considerarlas necesarias para la producción de futuras generaciones de perfectos comunistas. El ambiente político también favoreció el ascenso del conocido agrónomo soviético Trofim Lyenko. En un acalorado dis-

curso en la Academia de Ciencias Agrícolas pronunciado en agosto 1948, Lysenko denunció extensamente a Weismann y se burló de la «seudociencia burguesa» de sus seguidores. Sin ser consciente de ello, Lysenko realizó una descripción bastante acertada del concepto del genoma y de una sustancia que acabaría llamándose ADN:

Weismann negó la capacidad de heredar los caracteres adquiridos y elaboró una idea sobre una sustancia hereditaria especial que debía buscarse en el núcleo. Afirmó que la herencia estaba contenida en el cromosoma. [...] Una sustancia hereditaria e inmortal, independiente de los rasgos cualitativos presentes en el desarrollo del cuerpo vivo, y que permanece en el cuerpo mortal [...] éste es el concepto denodadamente idealista y profundamente místico de Weismann (Lysenko 1948).

Pero la naturaleza se muestra brutalmente indiferente a la teoría política. Los métodos de Lysenko fueron responsables de repetidos fracasos de cosechas de la URSS y, cuando China adoptó políticas agrícolas similares en 1958 en la época del «Gran Salto Adelante», contribuyeron a la mayor hambruna conocida de la historia, la de 1959-1961.

Clonación e identificación de las células

Junto con su concepto de plasma germinal, Weismann propuso la primera teoría experimental del desarrollo animal, un proceso denominado desarrollo en mosaicos. Afirmó que la célula única embrionaria, el cigoto, contiene factores o determinantes localizados en regiones diferenciadas. Al escindirse, los determinantes se distribuyen de forma desigual en células hijas y controlan su desarrollo futuro. El proceso continúa mientras los diferentes tipos de células se forman por «diferenciación», a medida que el embrión se desarrolla. Este modelo predice de forma clara que las células individuales del embrión en desarrollo no deberían compartir el mismo potencial. Sin embargo, en 1982, Hans Driesch proporcionó la primera prueba que desmentía la teoría de Weismann (Driesch 1892). Las células de los embriones tempranos de erizos de mar podían separarse y formar cada uno de ellos una larva completa. La división en la fase bicelular llevaba a la formación de dos larvas normales y las células individuales de la fase tetracelular producían cuatro larvas normales. De hecho, éstos fueron

los primeros animales clonados de forma experimental.

En un discurso pronunciado en la Universidad de Londres en octubre de 1913, Driesch afirmó que el embrión es un «sistema equipotencial armónico [...] donde cada elemento es capaz de desempeñar diferentes funciones. La verdadera función que desempeña en cada caso en particular depende de su posición». Desde entonces se han realizado muchas demostraciones que confirman que los embriones de muchos vertebrados, incluyendo los mamíferos, pueden reorganizarse al cambiar la configuración del número de células, para después recuperarse y formar un animal completo normal.

Al principio, la clonación por transferencia nuclear se presentó como un método adicional para probar que los núcleos de las células embrionarias tempranas y adultas tenían un potencial de desarrollo equivalente, y es una idea más antigua de lo que se cree. Yves Delage, un olvidado biólogo marino francés, hizo la primera referencia a este procedimiento en 1895, arguyendo que «siempre que no se produzcan daños, si el núcleo del óvulo puede sustituirse con el núcleo de una célula embrionaria común, entonces ese óvulo podría desarrollarse sin cambios» (Beetschen y Fischer 2004). Sin embargo, no se sabe si Delage llegó a completar este experimento. Este honor suele recaer en Hans Spemann, un antiguo alumno de Boveri. En 1928 Spemann realizó la primera transferencia nuclear en un notable estudio de microcirugía (Spemann 1928). La figura 2 muestra los dibujos del propio Spemann. Con ayuda de unas micropinzas y un mechón de pelo de su hija pequeña, escindió un embrión unicelular de salamandra en dos partes, una de las cuales contenía el núcleo de la célula (fig. 2A). Al desarrollarse, esta parte se dividió y formó un embrión, mientras que la otra permaneció como una bolsa clara de citoplasma (figs. 2B y 2C). El embrión siguió desarrollándose hasta alcanzar la fase de 16 células. En ese momento, se devolvió un solo núcleo al citoplasma vacío (fig. 2D). Esta célula única se convirtió en un embrión de salamandra normal en una fase ligeramente anterior (fig. 2E). Esto puso de manifiesto que los núcleos de células embrionarias eran capaces de formar un animal completo.

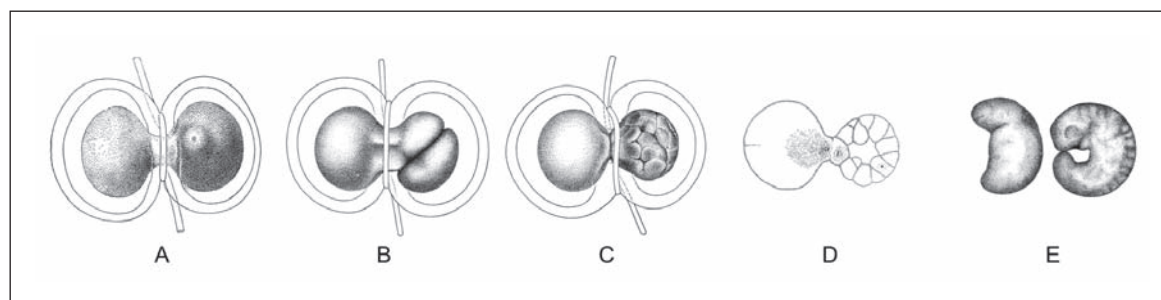


Figura 2. El experimento de transferencia nuclear de Hans Spemann con huevos de salamandra y un pelo de recién nacido. A) Se hizo un nudo para dividir un embrión unicelular en dos mitades conectadas por un puente de citoplasma, con el núcleo en la mitad derecha. B) Primera división celular en la mitad derecha nucleada. C) Fase de desarrollo posterior en la mitad nucleada. D) Durante la división celular, un núcleo hijo pasa a través del citoplasma vacío. E) Ahora el desarrollo lo convierte en dos mitades, pero con un retraso temporal, el embrión de la izquierda es más joven que su gemelo. H. Spemann (1936).

No se sabe si Spemann conocía el estudio anterior de Delage, pero en 1936, ya jubilado, Spemann propuso lo que llamó «un experimento de clonación propio del mundo de la fantasía» (Spemann 1936). Si se podían transferir los núcleos de las células en fases más avanzadas de desarrollo para devolverlos a huevos fertilizados, sería factible identificar de forma sistemática el momento en el que las células conservan o pierden su capacidad para formar un organismo completo, una cualidad que en la actualidad se denomina «totipotencia celular».

En las siguientes décadas un gran número de biólogos del desarrollo centraron sus estudios en erizos de mar y anfibios ya que eran relativamente fáciles de criar y manipular. Los ovocitos de rana son células de gran tamaño, de 1 a 2 milímetros de diámetro, y bastante visibles ya que forman esferas de color gris oscuro o marrón dentro de una capa protectora de gelatina. A principios de la década de 1950, Robert Briggs y Thomas King pusieron en práctica el experimento «fantasioso» de Spemann con ranas (Briggs y King 1952). Extrajeron el núcleo de un ovocito activado valiéndose de una aguja de cristal. Después, una célula única diseccionada a partir de un embrión en una fase posterior se introdujo en una pipeta de cristal muy fina conectada por un tubo de goma a una jeringa. La célula se rompió al introducirse en la pipeta y el núcleo liberado se inyectó en el huevo enucleado. Tras hacer un cultivo con los embriones reconstruidos, descubrieron que los núcleos celulares de los embriones en fase blastular podían desarrollarse de forma normal para convertirse en larvas en fase de alimentación. Tanto los núcleos como los embriones en una fase más tardía, en los que los linajes de células embrionarias más importantes, como mesodérmicos o endodérmicos, ya estaban establecidos, eran incapaces de hacerlo.

Más tarde John Gurdon y Ron Laskey ampliaron el estudio utilizando núcleos de tejidos juveniles y adultos, como la membrana interdigital de las ranas, y descubrieron que esos animales sobrevivían hasta la fase de renacuajos, pero no mucho más. Gurdon consiguió obtener ranas adultas a partir de tejido intestinal de renacuajos en 1962 (Gurdon 1962), pero la posibilidad de que en su tejido estuvieran presentes células germinales puso en duda los resultados. En aquel momento la consideración más relevante fue que la capacidad de desarrollo de los núcleos trasplantados disminuía con la edad y el ámbito de diferenciación de la célula donante. Los núcleos en la fase más temprana del embrión pueden ser equivalentes, pero en algún momento su destino queda determinado, «activado» por un cambio concreto, como la pérdida o la modificación irreversible del ADN contenido en el núcleo.

Pero esta consideración resulta difícil de conciliar con algunos fenómenos muy conocidos, sobre todo las capacidades regenerativas de la mayoría de los peces y anfibios, como los tritones y las salamandras. Si un tritón pierde una extremidad, las células de los tejidos circundantes

como la piel migran a la herida y realizan un proceso de «desarrollo inverso» diferenciador para formar un blastema. Es un conjunto de células embrionarias que se dividen rápidamente. Las células del blastema se diferencian y se reorganizan para formar una extremidad de sustitución. Esto probaba que algunas células diferenciadas adultas no tienen un destino determinado y pueden cambiar de identidad de forma radical. ¿Era la regeneración de la extremidad tan diferente de la generación de un animal completo mediante transferencia nuclear? ¿O el fracaso de la transferencia nuclear era consecuencia de limitaciones técnicas antes que las biológicas? Estos interrogantes bastaron para que algunos investigadores siguieran experimentando con la determinación celular.

Las ovejas abrieron el camino

Puesto que los biólogos son mamíferos, es lógico que les interesara más investigar especies a las que están próximos que erizos de mar o anfibios. Pero durante muchos años ello entrañaba grandes dificultades técnicas. Los embriones mamíferos crecen dentro de las condiciones controladas del tracto reproductivo femenino y no en un estanque o en agua de mar, y aunque son grandes si los comparamos con otras células de una décima de milímetro aproximadamente, lo cierto es que son prácticamente invisibles sin ayuda del microscopio. Hasta las décadas de 1970 y 1980 los cultivos embrionarios y las técnicas de micro manipulación no mejoraron lo suficiente para que la transferencia de núcleos de mamíferos fuese factible. La idea básica es prácticamente la misma que concibió Spemann: se extrae material genético de un huevo y después se sustituye con el núcleo de otra célula, casi siempre fusionando toda la célula con el ovocito.

Las investigaciones se centraron en el mamífero favorito del laboratorio, el ratón. Sin embargo, los intentos de repetir el experimento de Briggs y Kings con ratones seguían fracasando. En 1981, Karl Illmensee y Peter Hoppe afirmaron que habían clonado ratones mediante la transferencia de núcleos a partir de embriones en fase de blastocito (Illmensee y Hoppe 1981). Sin embargo, más tarde se averiguó y se llegó a la conclusión de que sus conclusiones eran falsas, a pesar de que nunca se probó que se tratara de un fraude intencionado. Después, en 1984, pareció que James McGrath y Davor Solter habían encontrado una solución a la transferencia nuclear en mamíferos. Transfirieron de forma sistemática núcleos de embriones en fase de blastocito de una, dos, cuatro y ocho células a cigotos enucleados, embriones en fase unicelular. Los núcleos de embriones unicelulares lograron desarrollarse y convertirse en blastocitos; el éxito fue mucho menor en los núcleos en la fase bicelular y fracasó estrepitosamente en fases más avanzadas. Lo atribuyeron a una pérdida rápida de totipotencia durante el desarrollo. Su estudio concluye con una afirmación rotunda: «La clonación de mamíferos por transferencia nuclear es biológicamente imposible». (McGrath y Solter 1984)

En retrospectiva, es de lamentar que muchos de los primeros intentos se realizaran con ratones. Desde entonces se ha averiguado que son una de las especies más difíciles de clonar por transferencia nuclear. Por esta razón, por muy extraña que parezca, la mayor parte de los descubrimientos se hicieron utilizando ganado. Los primeros mamíferos clonados por transferencia nuclear fueron tres ovejas de Suffolk. Steen Willadsen fusionó células únicas extraídas de embriones octocelulares con huevos enucleados sin fertilizar (Willadsen 1986). Paradójicamente, estas ovejas nacieron en 1984, tan sólo unos meses antes de que McGrath y Solter afirmaran que la clonación de mamíferos era imposible. El motivo de esta discrepancia era de tipo técnico. McGrath y Solter habían utilizado cigotos enucleados porque los ovocitos de ratón son demasiado frágiles para sobrevivir a la transferencia nuclear. Willadsen

pudo utilizar ovocitos sin fertilizar, que son más resistentes en las ovejas. Desde entonces, años de trabajo han demostrado que en gran número de especies, los ovocitos sin fertilizar pueden recibir con éxito transferencias nucleares, mientras que los cigotos sólo pueden utilizarse en una fase muy concreta. Hemos tenido que esperar hasta este año para tener un modelo que explicara esta diferencia, del que hablaremos más adelante (Egli, Birkhoff y Eggan 2008).

Durante la siguiente década, la transferencia nuclear se llevó a cabo en distintos mamíferos, pero, al igual que ocurrió con la rana, sólo uno tuvo éxito utilizando células obtenidas de embriones muy tempranos, o cultivados durante periodos de tiempo muy cortos.

A principios de la década de 1990, Keith Campbell e Ian Wilmut del Roslin Institute, cerca de Edimburgo, empezaron a estudiar cómo la elección del ovocito receptor y la fase

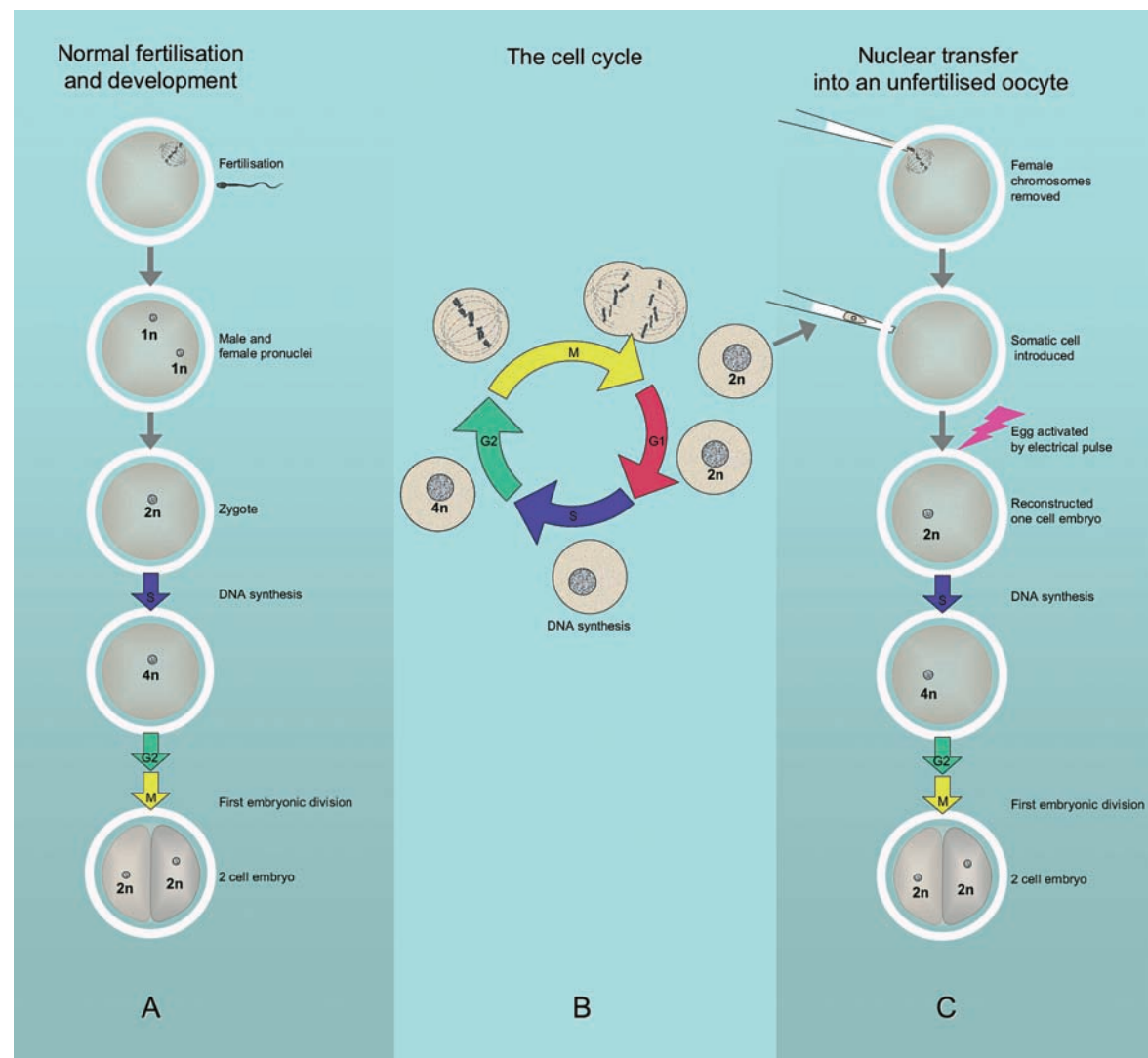


Figura 3. Transferencia nuclear y ciclo celular. A) Fertilización y desarrollo normal en el embrión en fase bicelular. B) El ciclo celular. A la fase G1 le siguen la fase S, cuando la célula duplica cada cromosoma, después la fase G2 y la mitosis (M), en la que el núcleo se rompe, los cromosomas duplicados se condensan, se alinean en el huso y se distribuyen en dos nuevas células hija. C) Transferencia nuclear utilizando una célula donante en la fase G1 y desarrollo hasta llegar al embrión en fase bicelular. 1n, 2n, 4n = copias de cada cromosoma.

del ciclo celular del donante nuclear afectaban al resultado de la transferencia nuclear. Fue una aportación determinante para el consiguiente éxito de la transferencia nuclear en mamíferos. Destacamos aquí los principales puntos.

Los ovocitos mamíferos se forman a partir de células germinales mediante un proceso llamado meiosis, que deja a cada ovocito sólo con una copia de cada cromosoma, cuya abreviatura suele ser «1n». Cuando la cabeza del espermatozoide entra, provoca que el ovocito termine la meiosis e inicie el desarrollo, tal y como ilustra la figura 3A. Los dos agrupamientos de cromosomas masculino y femenino se forman primero en pronúcleos separados, y después se unen para crear un único núcleo, en lo que es ahora el embrión unicelular o cigoto. Después, todos los cromosomas se replican mediante la síntesis del ADN preparada para la primera división de células embrionarias.

Esta primera división y todas las posteriores divisiones de células que forman y mantienen el cuerpo del animal se realizan mediante un proceso denominado mitosis. La mitosis es parte de un ciclo que garantiza que las células divididas conservan el número correcto de cromosomas. Este «ciclo celular» se divide de forma convencional en cuatro fases, tal y como se indica en la figura 3B. La primera fase se denomina gap1 (G1) en la que la célula tiene dos copias de cada cromosoma (2n). En la fase siguiente, la síntesis (S), la célula replica todo su ADN. Después viene la fase gap2 (G2) en la que cada cromosoma se presenta en cuatro copias (4n). En la mitosis (M), el núcleo se escinde, los cromosomas duplicados se condensan, se alinean en una estructura llamada huso y después se separan en dos nuevas células hija. Cada nueva célula contiene 2n cromosomas y el proceso se repite. Al dividirse rápidamente, el ciclo no lleva más de un día.

Esto tiene profundas implicaciones en la transferencia nuclear. Cuando un núcleo celular se transfiere a un ovocito no fertilizado tiene que ser activado, por ejemplo, por pulsación eléctrica, para desencadenar el inicio de su desarrollo. Esto pone en marcha la síntesis del ADN lista para la primera división celular. Sin embargo, esto ocurre con independencia de la fase del ciclo celular del núcleo donante. Si el núcleo entrante estaba en la fase S o G2 cuando el ADN ya se había replicado de forma parcial o total, su ADN se volverá a replicar, lo que provocará un número equivocadamente alto de cromosomas, o un daño cromosómico grave. El descubrimiento clave de Campbell y Wilmut fue que sólo las células donantes en fase G1 (antes de la replicación del ADN) soportarían un desarrollo normal en ovocitos no fertilizados, tal y como se muestra en la figura 3C.

El método que desarrollaron, y que se sigue utilizando, consiste en privar a las células donantes de factores de crecimiento reduciendo la cantidad de suero en el medio de cultivo durante unos días. Esto bloquea el ciclo celular antes de la fase S, que es exactamente lo que se quiere. Es importante destacar que la privación efectiva de suero exige que las células se cultiven durante varios días.

En 1995 nacieron Megan y Morag en el Roslin Institute, dos corderas creadas por transferencia de los núcleos a partir de células de un embrión de oveja de nueve días cultivadas por Jim McWhir y sometidas a entre 3 y 16 pases (Campbell et al. 1996). Estas ovejas no tardaron en suscitar un debate entre los coautores sobre cuál era el factor que propició el éxito del experimento. Según Campbell y Wilmut fue que la privación de suero antes de la transferencia nuclear no sólo coordinó el ciclo celular, sino que también indujo a un estado inactivo en el núcleo que lo hizo especialmente susceptible para la reprogramación por parte del ovocito. McWhir sostuvo que la clave residía en algunas propiedades de las células que había producido.

La transferencia nuclear en la oveja está dictada por la época natural de reproducción así que la pregunta no podía resolverse hasta el año siguiente. El plan original de 1996 consistía en volver a utilizar células embrionarias y también comprobar si la técnica podía ampliarse a células en una fase de desarrollo más avanzado, fibroblastos de un feto de 26 días. En ese momento estábamos trabajando con PPL Therapeutics, una compañía de biotecnología dedicada a producir proteínas farmacéuticas en la leche de ovejas transgénicas, y que estaba muy cerca del Roslin Institute. En el curso de una conversación durante una comida sugerimos un experimento más audaz y propusimos incluir células adultas en la época de transferencia nuclear de 1996. Esta idea fue acogida con escepticismo. Se dijo que era prematuro y que de todas formas no había fondos suficientes para ampliar el experimento. Sin embargo, si el trabajo adicional podía justificarse en términos comerciales, era posible que la compañía para la que trabajáramos aportara los fondos necesarios. Y así fue. Nos pusimos a investigar introduciendo transgenes de leche en células epiteliales mamarias de oveja que indujo Colin Wilde, del Hannah Research Institute de Ayr, como un medio para probar su expresión. Combinar ambos proyectos constituía una oportunidad idónea. Si las células mamarias podían convertirse en animales vivos, PPL tendría el potencial de producir «rebaños instantáneos» de ovejas que se sabía expresaban un transgén particular. Y, lo que es más interesante, utilizar células adultas para la transferencia nuclear abordaría la cuestión de la determinación celular, pendiente desde hacía mucho tiempo. Se presentó el caso a los directores de gestión e investigación de PPL, Ron James y Alan Colman, y la compañía se arriesgó a financiar el experimento. En febrero de 1996, se privó de suero a cultivos de células mamarias de oveja y también a células embrionarias cultivadas y se transportaron al Roslin Institute. Después, Bill Ritchie, el experto técnico de Wilmut, los transfirió a ovocitos enucleados de una oveja de raza Blackface (de cara negra) escocesa.

El 5 de julio nació una única cordera a la que su cuidador, John Bracken, llamó Dolly, en homenaje a Dolly Parton y a su gran talento como cantante. También nacieron dos corderas a partir de los fibroblastos fetales y cuatro de células

embrionarias. De esta forma se demostró que el éxito del experimento no se debía a ningún tipo de célula especial; la idea de que la inactividad había desempeñado también un papel se descartó posteriormente. Lo que se puso de manifiesto fue la importancia de la sincronización celular.

El 27 de febrero de 1997 se publicó una descripción del experimento (Wilmut et al. 1997). Más de una década después, podemos afirmar con tranquilidad que la transferencia nuclear a partir de una célula adulta descartó el concepto de determinación celular irreversible. Sin embargo, esto significaría pasar por alto la polémica que se prolongó hasta 17 meses después de su publicación. La idea de la determinación celular estaba tan asentada que varios prestigiosos científicos en Estados Unidos y Europa rechazaron el trabajo por considerarlo un fraude, recordando quizás la polémica de Illmensee. Un artículo del *New York Times* del 29 de julio de 1997 nos da una idea de la situación: «¿Cómo sabemos que todo eso no es más que un engaño? ¿Por qué, preguntan algunos, el resto del mundo se muestra tan dispuesto a aceptar la escandalosa noticia de que se ha clonado un animal adulto?».

Otros analistas defendieron la ineficacia de la transferencia nuclear adulta arguyendo que Dolly era una excepción, una aberración experimental. Muchos científicos eminentes sugirieron que no se había clonado a partir de una célula adulta, sino de material contaminante embrionario o fetal. Alguien dijo que las células fetales presentes en la circulación sanguínea de la oveja utilizadas para proporcionar las células mamarias habían penetrado de alguna manera los cultivos de células mamarias. Parecía que cualquier explicación alternativa, por poco plausible que resultara, era preferible a acabar con la doctrina de la determinación celular. La revista *Time* publicó un artículo el 2 de marzo de 1988 con el siguiente título «¿Fue Dolly un error?» que concluía diciendo: «En otras palabras, Dolly puede ser una casualidad y no un fraude. Pero sea lo que sea, cada vez es más probable que dentro de poco veamos clones de Bill Gates o Michael Jordan».

Mientras tanto, nosotros, y otros más, ya habíamos advertido de la existencia de más animales clonados (Schnieke et al. 1997), pero que se habían originado a partir de células fetales cultivadas y por tanto no confirmaban la clonación adulta.

Afortunadamente, las acusaciones y las especulaciones acabaron el 23 de julio de 1998. La edición de ese día de *Nature* publicaba dos destacados artículos. Uno ofrecía los resultados de un análisis independiente de huellas dactilares de ADN que confirmaban que el ADN nuclear de Dolly era idéntico a las células mamarias cultivadas (Signer et al. 1998). El segundo era un informe de Ryuzo Yanagimachi y Teruhiko Wakayama, de la Universidad de Hawai, en el que se describía otro animal clonado a partir de células adultas, un ratón al que se llamó «Cumulina» por las células del *cumulus* (folículo ovárico) utilizadas como donantes (Wakayama et al. 1998). La realidad de la clonación

adulta se aceptaba por fin. Ha pasado más de una década y es tiempo de pasar revista a los experimentos que se han realizado desde entonces.

Clonación con fines reproductivos

Inevitablemente, gran parte de los debates públicos, políticos y éticos se han centrado en la clonación para la reproducción de seres humanos y el resultado es que se promulgan en todo el mundo nuevas leyes y normativas. Es conveniente señalar que, en contra de lo que afirman algunos grupos religiosos y otros que buscan publicidad, ninguno de los científicos que trabajan en este campo consideró jamás llevar a cabo una clonación reproductiva en humanos.

MAMÍFEROS CLONADOS

Ganado, venado, gato, perro, hurón, cabra, gaur, caballo, ratón, muflón europeo, mula, cerdo, conejo, rata, mono rhesus, oveja, búfalo de la india, gato montés, lobo.

Como suele ser el caso, una vez que el método está bien establecido, es difícil ver por qué una vez se consideró imposible. Se ha empleado con éxito una variedad de diferentes tipos de células, tanto fetales como adultas, como donantes nucleares y se han clonado más de 20 especies, incluyendo peces, ranas, moscas de la fruta y los mamíferos que recoge la tabla. Sin embargo, la eficiencia es bastante reducida en la mayoría de las especies, ya que sólo entre el 1 y el 5% de los embriones reconstruidos llegaron a nacer. Los animales nacidos por transferencia nuclear pueden sufrir enfermedades, pero sus crías no, como es el caso de Bonny, el cordero de Dolly.

La mayoría de los experimentos de transferencia nuclear se siguen realizando en ganado. Los avances obtenidos son graduales más que espectaculares, aunque han alcanzado índices de éxito de alrededor del 15% en ganado. Un factor a destacar son los progresos en las técnicas de maduración de los ovocitos. Todos los ovocitos bovinos se obtienen ahora a partir de ovarios que se recogen en los mataderos en vez de extraerse del tracto reproductivo de animales vivos. Se obtiene así un suministro abundante de ovocitos que reduce en gran medida el número de animales que se necesitan. También permite la viabilidad comercial de la transferencia nuclear independientemente de que funcione o no, sobre todo en la reproducción de animales de élite con características muy atractivas, como es el caso de los caballos de carreras o toros para concursos. En Estados Unidos, compañías como ViaGen ofrecen clonación de ganado como parte de sus servicios de reproducción asistida. Su página web (www.viagen.com) dice: «ViaGen permite a los propietarios de ganado, caballos y cerdos conservar y multiplicar las mejores genéticas gracias a bancos de genes y servicios de clonación, y proteger sus marcas mediante servicios genómicos». A los leales (y ricos) propietarios de perros también les pue-

de interesar saber que «llamando al número gratuito 888-8VIAGEN pueden conocer las opciones disponibles para clonar su perro».

La transferencia nuclear se ha utilizado cuando la reproducción sexual normal es imposible como resultado de un accidente, enfermedad o infertilidad natural, tal y como se demostró clonando una mula (Woods et al. 2003). También se ha aplicado para reproducir especies en peligro de extinción como el gato montés europeo o razas de ganado poco frecuentes. Sin embargo, sólo aquellas especies con parientes domesticados que proporcionen ovocitos adecuados podrán beneficiarse de esta técnica. La clonación tampoco sirve para mejorar la diversidad genética de poblaciones animales reducidas, que es vital para la supervivencia a largo plazo.

Animales para la biomedicina

El futuro nos dirá si la transferencia nuclear puede llegar a ser otra técnica habitual, aunque costosa, de reproducción animal. Pero lo cierto es que ya se ha convertido en uno de los mejores métodos para instaurar linajes de grandes animales «transgénicos», es decir, modificados genéticamente. Para producir animales transgénicos existen dos opciones. El ADN transgénico puede introducirse directamente dentro del cigoto, con la esperanza de que se incorpore al genoma. Alternativamente, las modificaciones genéticas pueden realizarse en células cultivadas y utilizarse después para producir animales completos. El primer método es una suerte de lotería, ya que los animales deben producirse antes de analizar si está presente un transgén. El segundo método permite ejercer mucho más control e implica a un número menor de animales porque las células pueden analizarse minuciosamente en el laboratorio antes de que se produzca ningún animal.

En ratones, un método basado en la célula está disponible desde principios de la década de 1980. Las células madre embrionarias (en inglés ES) de ratones pueden aislarse en embriones tempranos, crecer indefinidamente mediante cultivo, ser objeto de manipulaciones como la incorporación de un transgén o la alteración de un gen en particular (genes diana), y luego pueden volver a incorporarse al embrión en desarrollo. El enorme potencial de la tecnología de genes diana en las células ES nos ha proporcionado casi todos los conocimientos de que disponemos sobre la función de los genes en animales completos. Así lo reconoció el Premio Nobel de Medicina de 2007, otorgado conjuntamente a Mario Capecchi, Martin Evans y Oliver Smithies. Hace tiempo que muchos investigadores saben que ampliar esta técnica a animales grandes tendría muchas y útiles aplicaciones. Pero a pesar de los intentos, las células ES funcionales no han podido y siguen sin poder obtenerse del ganado. La transferencia nuclear en ganado utilizando células somáticas que podrían prosperar y someterse a manipulación en cultivo superó claramente esta técnica.

En los experimentos que siguieron a Dolly demostramos que tanto las ovejas transgénicas y con genes diana pueden generarse mediante transferencia nuclear (Schnieke et al. 1997, McCreath et al. 2000). Desde entonces se han realizado muchos otros, por ejemplo, ganado con genes diana resistente a la enfermedad de las vacas locas (Kuroiwa et al. 2004). Sin embargo, gran parte de las aplicaciones se han realizado en el campo de la biomedicina, y los animales transgénicos que producen proteínas farmacéuticas en la leche han llegado más tarde de lo que se esperaba. ATryn, un fármaco anticoagulante utilizado para tratar pacientes con una deficiencia hereditaria de antitrombina, la proteína regula la coagulación de la sangre, se ha producido en cabras transgénicas a partir de un primer animal clonado, y GTC Biotherapeutics lo comercializó en noviembre de 2007. La transferencia nuclear también se utiliza para realizar modificaciones genéticas múltiples en cerdos con el fin de producir células u órganos que puedan luego trasplantarse a seres humanos, una técnica denominada xenotransplante.

También se han desarrollado una serie de modelos de grandes animales de enfermedades humanas graves como la fibrosis quística (Rogers et al. 2008). Suelen ser ampliaciones de trabajos llevados a cabo en ratones, donde la técnica de genes diana ha proporcionado una considerable información en relación con enfermedades como el cáncer. Se han producido muchas variedades de ratones con defectos genéticos, y han sido muy valiosas para comprender los mecanismos del inicio y el avance de los tumores (Frese y Tuveson 2007). Los ratones también son útiles en los estudios de viabilidad de las pruebas en diagnósticos nuevos y estrategias de tratamiento, de lo que hablaremos más adelante. Sin embargo, las importantes diferencias en tamaño del cuerpo, fisiología general, anatomía, dieta y esperanza de vida limitan la utilidad de los ratones. Por ejemplo, la radiación y la terapia térmica no pueden reducir su escala para tratar tumores de ratones. La transferencia nuclear brinda la oportunidad de ampliar la gama de modelos de enfermedades definidas genéticamente a otras especies, como cerdos, que se parecen más a los seres humanos en lo que se refiere a tamaño, anatomía y fisiología.

Transferencia nuclear, células madre embrionarias y medicina regenerativa

Tal y como se ha mencionado anteriormente, gran parte del interés de la transferencia nuclear a finales de la década de 1980 y principios de la de 1990 se debió a las posibilidades que ofrecía la tecnología de células madre embrionaria. Desde entonces, ambos campos se han entrelazado íntimamente.

Las células ES suelen aislarse a partir de embriones en fase de blastocisto. Un blastocisto es una diminuta bola llena de fluido de un centenar de células contenidas dentro de un racimo de células denominada masa celular interna (ICM) que da origen a todos los tejidos del cuerpo.

Los blastocistos, o ICM aislados, se cultivan y en unos días o una semana emergen colonias de pequeñas células muy concentradas que además siguen creciendo indefinidamente; son células ES. Por motivos que no se conocen con certeza, obtener células ES resulta bastante difícil en el caso de muchas especies y sólo ha sido posible en ratones, seres humanos y monos Rhesus. Se ha informado a la prensa de la obtención de células ES en ratas, pero todavía no se han publicado estos hallazgos en una revista científica.

Las células ES suelen utilizarse como un sucedáneo apropiado para el estudio del embrión temprano, pero sigue sin estar claro lo que son en realidad. Pueden ser un artefacto de cultivo de tejidos, algo aberrante creado como respuesta a las condiciones de crecimiento artificial. Sin embargo, pruebas recientes sugieren que son un tipo de célula presente durante un periodo corto de tiempo en el embrión, que puede ser capturado y conservado con unas condiciones de cultivo adecuadas (Silva y Smith 2008).

La característica definitoria de las células madre embrionarias es que pueden crecer de forma indefinida como células no diferenciadas y luego diferenciarse en muchos otros tipos de células. Cuando se introducen en un blastocisto pueden integrarse en el ICM y participar en la formación de todos los tejidos del cuerpo. Cuando se aplican los estímulos apropiados también pueden formar una amplia variedad de tipos de células en cultivo, que se denomina diferenciación *in vitro*. Desde que Jamie Thomson obtuvo por primera vez células ES humanas hace diez años, (Thomson et al. 1998) ha surgido un gran interés por la diferenciación *in vitro* como una posible fuente de sustitución de tejido humano, como las células nerviosas, células que producen insulina, o células musculares del corazón. Se han escrito muchos artículos sobre este tema, así que no entraremos en más detalles. El esquema básico se muestra en el panel A de la figura 4. La promesa de la terapia basada en ES es ya una realidad, pero puede que sean necesarias algunas palabras de cautela. Conseguir que las células madre embrionarias humanas generen cantidades útiles de tipos de células adecuadas, que estén apropiadamente caracterizadas para fines terapéuticos supone es un gran reto. Además, es necesario establecer métodos rigurosos que garanticen que los preparados obtenidos a partir de ES están libres de células que podrían formar tumores. Los científicos investigadores y la industria biotecnológica deberían ser realistas y evitar esa tendencia a airear a bombo y platillo sus descubrimientos.

Seguramente, Geron, la compañía farmacéutica de California, es la que más ha avanzado en terapias celulares ES humanas. Su página web (www.geron.com) informa sobre el desarrollo de células progenitoras nerviosas humanas obtenidas de células ES para lesiones graves de la columna vertebral y cardiomiocitos para el tratamiento de fallos cardíacos. Geron ha solicitado permiso para llevar a cabo pruebas clínicas con células progenitoras nerviosas en seres humanos, pero la United States Food and

Drug Administration no ha dado todavía su aprobación. Si se autorizan estos experimentos, el resultado será determinante para terapias futuras con células ES.

Si pueden producirse, los tejidos obtenidos de células ES tendrían que coincidir inmunológicamente con el paciente de la misma forma que un tejido donante normal, para evitar el rechazo. Además, es muy posible que los receptores precisen supresión inmunológica durante toda su vida. La coincidencia de los tejidos resulta problemática en pacientes con tipos de tejidos poco comunes, como las personas de raza mixta. Poco después del informe de Thomson se sugirió que la transferencia nuclear podría proporcionar un método para producir tejidos humanos a medida mediante «clonación terapéutica». Las células podrían extraerse de un paciente humano que necesitase una terapia de sustitución de tejidos y utilizarse para producir embriones clonados. Se obtendrían células ES y después se inducirían para su diferenciación en cultivo. El tejido de sustitución coincidiría perfectamente con el propio cuerpo del paciente (fig. 4B).

Se ha logrado dar algunos de los pasos necesarios con animales. Por ejemplo, se han obtenido células ES a partir de embriones de ratones por transferencia nuclear y se ha descubierto que son las mismas que las obtenidas de embriones normales. También se han producido células ES de monos Rhesus a partir de embriones clonados, pero hasta el momento no se han obtenido células madre embrionarias humanas por transferencia nuclear. El mayor obstáculo práctico es el suministro de ovocitos humanos no fertilizados, que ya es insuficiente para satisfacer las necesidades de la gente que desea someterse a las técnicas de reproducción asistida como la fertilización *in vitro* (FIV). Un reciente artículo en *Nature* revelaba que, a pesar de que han pasado dos años y se han invertido 100.000 dólares en publicidad local, los investigadores de células madre de la Universidad de Harvard sólo han conseguido una donante de óvulo (Maher 2008).

Esto quiere decir que es muy improbable que la clonación terapéutica se convierta en una realidad hasta que no se encuentre una fuente alternativa de ovocitos receptores. Hay muchos ovocitos animales, sobre todo de ganado, gracias a la maduración *in vitro*. La Human Fertilization and Embryology Authority (HFEA) del Reino Unido aprobó recientemente su investigación, pero son muchos quienes se oponen a la creación de embriones híbridos citoplásmicos. Los problemas biológicos también pueden surgir de la incompatibilidad entre los componentes del ovocito animal y del núcleo humano entrante. Los factores de reprogramación e importantes organelos celulares como las mitocondrias pueden no funcionar correctamente. Puede que la fuente más prometedora de ovocitos sea la maduración *in vitro* de ovocitos humanos inmaduros provenientes de ovarios donados. A pesar de que esté menos avanzada que en el ganado, la maduración *in vitro* de ovocitos humanos está mejorando, y se utiliza sobre todo

para ayudar a las mujeres que han tenido que someterse a una ovariectomía. Se tiene conocimiento de varios nacimientos normales a partir de ovocitos madurados *in vitro*.

A pesar de sus posibles beneficios, la derivación de células madre embrionarias humanas y la clonación terapéutica se enfrentan a una fuerte oposición religiosa y ética, y está claro que mucha gente no aceptará la generación artificial ni la destrucción de embriones humanos, a pesar de que muchos consideran que sólo son diminutas bolas de células. Las leyes son diferentes en todo el mundo. Por ejemplo, la HFEA inglesa dio su aprobación en 2007, el Ministerio de Sanidad español aprobó la investigación en 2008, mientras que en Alemania no existen planes para legalizar este tipo de procedimientos. Los ele-

vados costes y el tiempo requerido suponen un problema añadido. Lo más probable es que la clonación terapéutica quede limitada a pacientes ricos y sólo si su estado de salud les permite esperar varios meses. Dicho esto, los recientes avances en reprogramación nuclear han dejado obsoleta la reprogramación terapéutica.

Comprender la reprogramación

Un cuerpo humano contiene varios cientos de tipos de células, y cada uno de ellos difiere en una multitud de componentes celulares. La identidad de una célula, su forma, la rapidez con la que se divide, los materiales que sintetiza, los receptores que están en su superficie, y las múltiples nanomáquinas que llamamos ARN (ácido ribo-

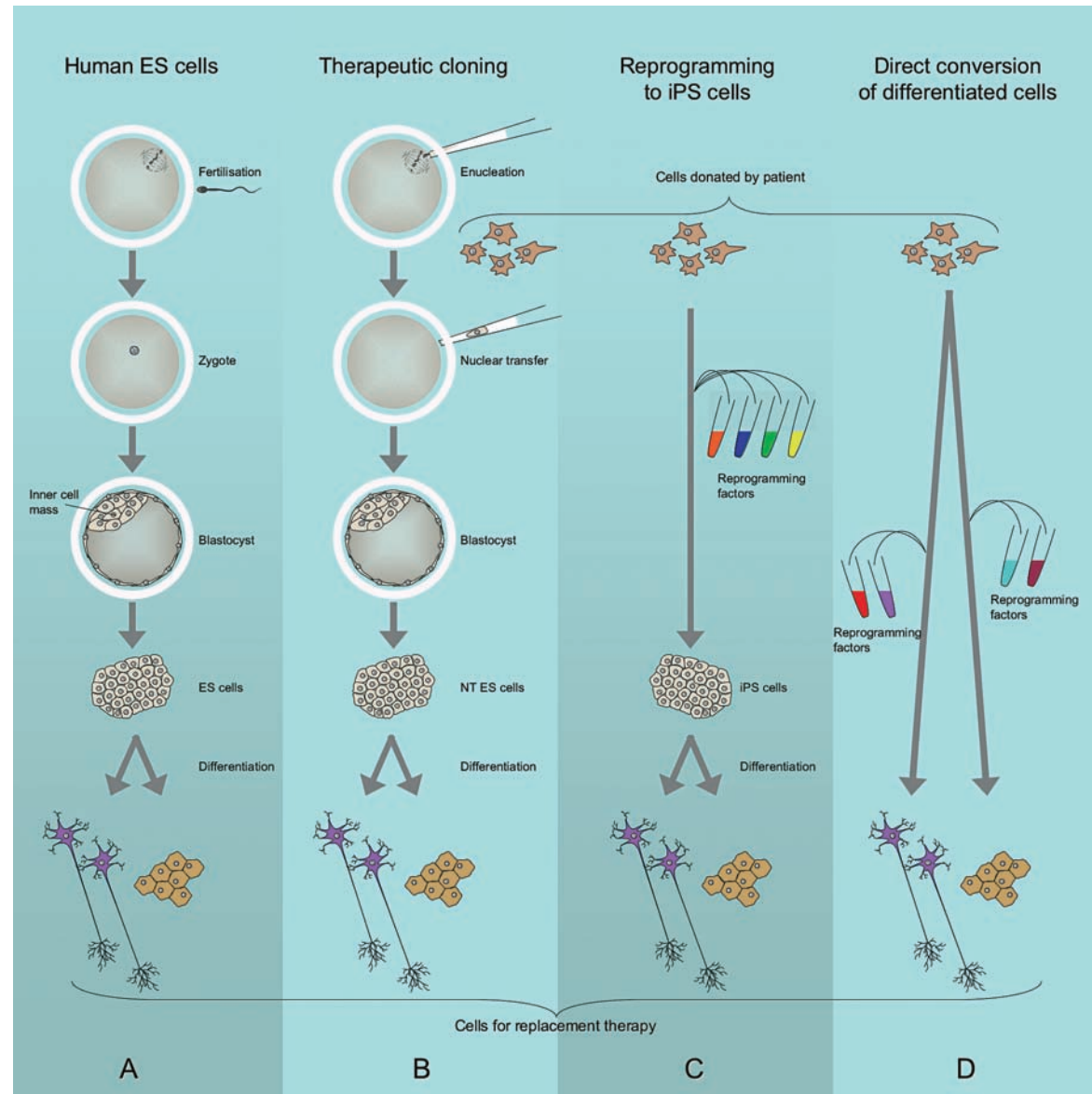


Figura 4. Generación de células diferenciadas para la investigación de enfermedades y la terapia celular. A) Derivación y diferenciación celular ES humana estándar. B–D) Derivación de células específicas de pacientes. B) Clonación terapéutica. C) Células iPS. D) Conversión directa de un tipo de célula diferenciada a otro. ES, células madre embrionarias; NT-ES, células ES derivadas por transferencia nuclear; iPS, células madre pluripotentes inducidas.

nucleico) y moléculas proteicas, son todos ellos el producto de diferentes modelos de expresión genética.

Clonar células adultas demostró que estos modelos no se deben a diferencias genéticas inmutables. Los núcleos de las células más diferenciadas, como las neuronas o los linfocitos B maduros especializados en sintetizar un único anticuerpo, conservan el potencial para formar todas las células del cuerpo (Hochedlinger y Jaenisch 2002). Cada célula tiene la misma información genética; en el caso de los seres humanos unos 3.000 millones de pares de bases de ADN y una cifra aproximada de 25.000 genes, pero éstos se expresan de forma diferente. Se puede trazar un paralelismo con el *software* y el *hardware* informático. Hay diferentes programas para los gráficos, para las matemáticas, para la música o para el tratamiento de textos, pero todos pueden funcionar en una misma máquina sin alterar sus componentes físicos. Por supuesto, a diferencia de los ordenadores, las células se organizan por sí solas y resulta inimaginable pensar que una célula pueda recibir un juego completo de instrucciones por parte de lo que llamaríamos un agente externo.

La regulación de la expresión genética lleva estudiándose más de 30 años, y se sabe que funciona a varios niveles: desde la accesibilidad del ADN dentro del núcleo hasta los factores de expresión; el índice al que los genes se transcriben en moléculas RNA mensajeras; el procesamiento y transporte del ARN, hasta la síntesis y degradación de los productos proteínicos. Si echamos un vistazo a los diagramas de un libro de texto moderno de biología celular o molecular, nos encontramos con multitud de flechas que representan los caminos regulatorios y los bucles de *feedback* que rigen el funcionamiento de nuestras células. Se suelen utilizar los términos «circuitos moleculares» o «redes de genes». La identidad de una célula es el producto de un complejo entramado de interacciones y tiene un estado dinámico, no estático. Se sabe que los factores regulatorios van constantemente del núcleo al citoplasma, afectando a su propia expresión y a la de otros genes. Se puede decir por tanto que una célula está constantemente actualizando su programa de expresión genética. Si el ciclo regulatorio favorece la continuación de un estado concreto, éste es estable. Y de la misma forma que una red física puede adoptar diferentes formas cuando se tira de ella o se la empuja, existen muchos modelos estables de expresión genética y muchos estados diferenciados.

En una célula en particular, algunos genes se expresan en gran medida, otros menos y otros nada. No se conoce por completo el proceso mediante el cual el modelo se mantiene y se transmite de forma fiable a las células hija. Pero sí se sabe que la cromatina, el complejo de ADN que rodea las proteínas histonas, lleva marcas que informan si los genes están activos o inactivos. Estas marcas son «epigenéticas» más que genéticas, en el sentido que no alteran la verdadera secuencia de ADN. Por ejemplo, el ADN que se encuentra dentro y alrededor de genes inactivos transporta

a menudo grupos de metilo añadidos a la citosina nucleotídica. Los genes activos e inactivos también muestran modificaciones químicas diferentes ante los histones. Esto afecta a lo fuerte que está encadenado el ADN y a lo «abierto» y receptivo que esté a los factores de transcripción.

Cuando un núcleo de una célula diferenciada se expone a un entorno extraño, por ejemplo cuando dos células se fusionan, los procesos regulatorios se interrumpen y el modelo de expresión genética se ve alterado de la misma forma. Por ejemplo, un núcleo de un hígado humano puede ser inducido para expresar genes musculares con una célula muscular de ratón (Blau, Chiu y Webster 1983) y los núcleos de varias células somáticas expresan genes embrionarios cuando se fusionan con células ES (Do, Han y Schöler 2006).

Se puede decir que la transferencia genética es una versión más completa del mismo fenómeno. Cuando se transfiere un núcleo a un ovocito enucleado, sufre una eliminación completa de los grupos de metilo de ADN y cambios significativos en modificaciones de histonas, con lo que se borra por completo su identidad previa. Kevin Eggan y sus colegas afirman que la clave del éxito de dicha reprogramación reside en la libre disponibilidad de los factores que regulan la transcripción genética (Egli, Birkhoff y Eggan 2008). Éstos se asocian normalmente con el ADN dentro del núcleo, pero se liberan en el citoplasma cuando el núcleo se escinde y se prepara para repartirse con los cromosomas en los dos nuevos núcleos. Los ovocitos sin fertilizar tienen gran abundancia de dichos factores libres, y están sanos y preparados para reprogramar un núcleo entrante; la cabeza del espermatozoide.

Pero ¿qué factores son responsables de reprogramar un núcleo a un estado embrionario? Por desgracia, los ovocitos de los mamíferos son diminutos, no se propagan, y por lo tanto son difíciles de analizar con la tecnología de la que se dispone actualmente. Por esa razón los investigadores se han centrado en las células madre embrionarias ES.

Reprogramación directa, un enfoque radicalmente nuevo

Años de intenso trabajo han revelado mucho sobre los mecanismos que mantienen las células ES en un estado indiferenciado y que desencadenan su diferenciación. En 2006 todo ello culminó en un importante hallazgo. Shinya Yamanaka y sus colegas de la Universidad de Kioto llegaron a la conclusión de que los factores regulatorios que se sabe son importantes para mantener las células ES indiferenciadas serían buenos candidatos para reprogramar los factores. Su grupo identificó 23 genes regulatorios y construyó vectores virales para transducirlos individualmente en otras células. Después se introdujeron varias combinaciones de genes en los fibroblastos de ratón y se seleccionaron células para la expresión de un gen expresado de forma característica en células ES. Se encontró un juego de cuatro factores de transcripción: Sox-2, Oct-4, c-Myc y Klf4, para convertir los fibroblastos en algo que se

pareciese a las células ES, que denominaron células madre (iPS) pluripotentes inducidas (Takahashi y Yamanaka 2006). Después de este primer estudio, Yamanaka y otros grupos de investigadores han refinado la técnica y la han ampliado a las células humanas (fig. 4C). En el momento de escribir estas líneas, la opinión general es que, en esencia, las células iPS y las células ES son las mismas. Sin embargo, todavía es pronto para realizar afirmaciones y algunos críticos han señalado que las diferencias pueden ser significativas (Liu 2008).

El descubrimiento de una receta tan increíblemente sencilla para reprogramar células diferenciadas a un estado embrionario ha desatado una actividad investigadora frenética en todo el mundo. A diferencia de la transferencia nuclear, no hay problemas éticos y las técnicas son fáciles, lo que abre el estudio de la reprogramación a muchos laboratorios. Además, algunos destacados grupos que se dedicaban a la investigación de la clonación terapéutica han cambiado de investigación. El *US Boston Globe* del 1 de agosto de 2008 citaba a Rudolf Jaenisch afirmando que el enfoque iPS «es mucho más fácil, y tiene muchas menos limitaciones y problemas, tanto éticos como de otra índole [...] Creo que avanzaremos en esta dirección».

El estudio de las células IPS se mueve a tal velocidad que es probable que este artículo esté ya obsoleto cuando se publique. Pero a medida que avanzan los estudios, se realizan importantes hallazgos. Al principio parecía que algunas células podían reprogramarse y otras no. Pero las células iPS se hacen ahora a partir de muchos tipos de células, como los linfocitos B maduros y las células beta de islotes pancreáticos, lo que demuestra que no se trata de un tipo de célula particularmente raro, ni de un artefacto experimental, como habían afirmado algunos escépticos. Aunque resulte desconcertante, diversos grupos de investigación están descubriendo que en general, las combinaciones diferentes y los números de factores son efectivas. Los mecanismos subyacentes siguen siendo un misterio, pero no por mucho tiempo. El análisis bioinformático de constelaciones completas de genes está revelando los modelos de expresión y los datos de las redes regulatorias que caracterizan a las células ES e iPS y a los acontecimientos implicados en la reprogramación directa (Mikkelsen et al. 2008; Müller et al. 2008).

Una aplicación inmediata de las células iPS es el estudio de enfermedades degenerativas. Las células iPS humanas ya se han aislado en pacientes con enfermedades de las neuronas motrices, la enfermedad del Parkinson, la distrofia muscular de Duchenne y la diabetes juvenil (tipo I) (Dimos et al. 2008; Park et al. 2008), y se están utilizando para generar placas del tipo de célula afectada en el laboratorio. La disponibilidad de las células iPS para enfermedades específicas tendrá un profundo impacto en la comprensión y tratamiento de muchos desórdenes graves. Permitirá que el efecto de los factores ambientales como los aditivos alimenticios, las toxinas o los patógenos en la degeneración

celular puedan ser examinados exhaustivamente en estudios a gran escala. También se podrán analizar muchos medicamentos con el fin de identificar cuáles pueden detener, ralentizar o revertir el avance de la enfermedad.

Las células IPS también han despertado un gran interés como fuente de sustitución de tejidos sin la necesidad de contar con óvulos humanos o células ES. En un experimento de prueba de concepto, Rudolf Jaenisch trató con éxito la anemia drepanocítica en ratones (Hanna et al. 2007). Las células de piel de un ratón con anemia drepanocítica se convirtieron en células iPS y el defecto genético se corrigió mediante genes diana. Las células iPS se indujeron para diferenciarse en células madre sanguíneas y después se trasplantaron al ratón, donde redujeron la anemia y aumentaron sus posibilidades de supervivencia.

Sin embargo, es preciso subrayar que dichas terapias basadas en células iPS están todavía lejos de las aplicaciones clínicas humanas. Los métodos actuales de producir células iPS incluyen algunos genes cancerígenos peligrosos, así que habrá que encontrar otras alternativas. Pero resulta esperanzador que ya existan algunos estudios previos que indican que los agentes químicos pueden sustituir la necesidad de algunos genes en la receta original, y variaciones como añadir ARN instructivo en vez de genes también se están estudiando.

Si las células iPS son idénticas a las células ES, se enfrentan necesariamente a los mismos problemas en lo que se refiere a su uso terapéutico. Al igual que las células ES, las células iPS no diferenciadas pueden formar tumores, por lo que deben quedar absolutamente excluidas de cualquier medicamento terapéutico. También se deben crear métodos para inducir la diferenciación de poblaciones puras de tipos de células terapéuticas. Se han establecido condiciones de diferenciación para algunos de ellos, como las neuronas motoras, pero se deben crear procedimientos para muchas otras células potencialmente útiles.

Los dos años de historia de la revolución iPS han sido asombrosos, y casi han dejado obsoleta la clonación terapéutica. Pero ahora hay signos de otro cambio más. Aunque el ovocito era una caja negra que no revelaba fácilmente sus funciones, la derivación de células iPS ha abierto las puertas al estudio de la reprogramación. Cada vez son más los conocimientos sobre el desarrollo normal de muchos tipos de células, y el papel de las moléculas regulatorias clave cada vez está más claro, lo que permite que se utilicen como «botones e interruptores» para controlar la identidad celular. Si el objetivo es producir células diferenciadas para ordenarlas, ¿por qué hacerlo directamente sin utilizar un intermediario embrionario? En una espectacular publicación (Zhou et al. 2008) de agosto de 2008, Doug Melton y sus colegas informaban de que habían tratado a ratones diabéticos con tres genes instructivos transportados en vectores virales. Introdujeron algunas de las células exocrinas en el páncreas de los ratones, que normalmente segregan enzimas digestivas,

para convertirlas directamente en insulina produciendo células beta sin ninguna formación intermediaria de IPS, u otras células de tipo ES. No cabe duda de que este trabajo se encuentra en su fase inicial, pero ha abierto otro camino a la producción de células (fig. 4D). Pero lo que resulta más provocador es que, al haberse realizado el estudio en ratones y no en cultivos, ahora hay pacientes que exigen una terapia de sustitución y que son capaces de ingerir un coctel de factores instructivos diseñados para generar nuevas células en su propio cuerpo sin necesidad de un trasplante. ¿Podría estar también en el horizonte la regeneración de órganos completos?

Conclusiones

En un reciente ensayo (Thomas 2007), John Meurig Thomas destacó la impredecibilidad básica del progreso científico y los tortuosos caminos que a menudo separan los

primeros descubrimientos de las investigaciones y el desarrollo de dispositivos y procedimientos modernos que nos son familiares. Es ya sabido que después de hacer público su invento, en 1958, Charles Townes y Arthur Schawlow no previeron una aplicación práctica para el láser óptico.

Originalmente, la clonación se concibió para investigar la determinación de la identidad celular y su destino, pero ahora está más orientada hacia la habilidad de cambiar el destino celular. ¿Quién sabe cuál acabará siendo el mayor legado de Dolly? Después de más de once años, es evidente que ha logrado que la gente se formule estas preguntas, y la sensación generalizada es que hay muchas puertas abiertas. Científicos de talento se han sentido atraídos por esta investigación y han emprendido proyectos que habrían sido inconcebibles antes de 1997. Creemos que el auge de la investigación actual aportará significativos avances en medicina y beneficiará a la salud humana.

Bibliografía

- Beetschen, J. C., y J. L. Fischer. «Yves Delage (1854–1920) as a forerunner of modern nuclear transfer experiments». *Int. J. Dev. Biol.* 48 (2004): 607–612.
- Blau, H. M., C. P. Chiu y C. Webster. «Cytoplasmic activation of human nuclear genes in stable heterocaryons». *Cell* 32 (1983): 1.171–1.180.
- Briggs, R., y T. J. King. «Transplantation of living nuclei from blastula cells into enucleated frogs' eggs». *Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU.* 38 (1952): 455–463.
- Campbell, K. H., J. McWhir, W. A. Ritchie y I. Wilmut. «Sheep cloned by nuclear transfer from a cultured cell line». *Nature* 380 (1996): 64–66.
- Dimos, J. T., K. T. Rodolfa, K. K. Niakan, L. M. Weisenthal, H. Mitsumoto, W. Chung, G. F. Croft, et al. «Induced pluripotent stem cells generated from patients with ALS can be differentiated into motor neurons». *Science* 321 (2008): 1.218–1.221.
- Do, J. T., D. W. Han, y H. R. Schöler. «Reprogramming somatic gene activity by fusion with pluripotent cells». *Stem Cell Rev.* 2 (2006): 257–264.
- Driesch H. «Entwicklungsmechanisme Studien. I. Der Werth der beiden ersten Furchungszellen in der Echinodermentwicklung. Experimentelle Erzeugen von Theil und Doppelbildung». *Zeit. für wiss. Zool* 53: 160–178, 1892, 183–184.
- Egli, D., G. Birkhoff y K. Eggan. «Mediators of reprogramming: transcription factors and transitions through mitosis». *Nat. Rev. Mol. Cell. Biol.* 9 (2008): 505–516.
- Frese, K. K. y D. A. Tuveson. «Maximizing mouse cancer models». *Nat. Rev. Cancer* 7 (2007): 645–658.
- Gurdon, J. B. «The developmental capacity of nuclei taken from intestinal epithelium cells of feeding tadpoles». *J. Embryol. Exp. Morphol.* 10 (1962): 622–640.
- Hanna, J. M. Wernig, S. Markoulaki, C. W. Sun, A. Meissner, J. P. Cassady, C. Beard, et al. «Treatment of sickle cell anemia mouse model with iPS cells generated from autologous skin». *Science* 318 (2007): 1.920–1.923.
- Hochedlinger, K. y R. Jaenisch. «Monoclonal mice generated by nuclear transfer from mature B and T donor cells». *Nature* 415 (2002): 1.035–1.038.
- Illmensee, K. y P. C. Hoppe. «Nuclear transplantation in *Mus musculus*: developmental potential of nuclei from preimplantation embryos». *Cell* 23 (1981): 9–18.
- Kuroiwa, Y., P. Kasinathan, H. Matsushita, J. Sathiyaselan, E. J. Sullivan, M. Kakitani, K. Tomizuka, I. Ishida y J. M. Robl. «Sequential targeting of the genes encoding immunoglobulin- μ and prion protein in cattle». *Nat. Genet.* 36 (2004): 775–780.
- Liu, S. V. «iPS cells: a more critical review». *Stem Cells Dev.* 17, 2008: 391–397.
- Lysenko, T. D. *Soviet Biology: Report and concluding remarks to the 1948 session of the Lenin Academy of Agricultural Sciences*. (Edición inglesa) Londres: Birch Books, 1948. Versión online: www.marxists.org/reference/archive/lysenko/works/1940s/report.htm
- McCreath, K. J., J. Howcroft, K. H. S. Campbell, A. Colman, A. E. Schnieke y A. J. Kind. «Production of gene-targeted sheep by nuclear transfer from cultured somatic cells». *Nature* 405 (2000): 1.066–1.069.
- McGrant, J. y D. Solter. «Inability of mouse blastomere nuclei transferred to enucleated zygotes to support development in vitro». *Science* 226 (1984): 1.317–1.319.
- Maher, B. «Egg shortage hits race to clone human stem cells». *Nature* 453, 2008, 828–829.
- Mikkelsen, T. S., J. Hanna, X. Zhang, M. Ku, M. Wernig, P. Schorderet, B. E. Bernstein, R. Jaenisch, E. S. Lander y A. Meissner. «Dissecting direct reprogramming through integrative genomic analysis». *Nature* 454, 2008, 49–55.
- Morgan, T. H., A. H. Sturtevant, H. J. Muller y C. B. Bridges. *The Mechanism of Mendelian Heredity*. Nueva York: Henry Holt and Co., 1915.
- Müller, F. J., L. C. Laurent, D. Kostka, I. Ulitsky, R. Williams, C. Lu, I. H. Park, et al. «Regulatory networks define phenotypic classes of human stem cell lines». *Nature* 455 (2008): 401–405.
- Park, I. H., N. Arora, H. Huo, N. Maherali, T. Ahfeldt, A. Shimamura, M. W. Lensch, C. Cowan, K. Hochedlinger y G. Q. Daley. «Disease-specific induced pluripotent stem cells». *Cell* 134 (2007): 877–886.
- Rogers, C. S., Y. Hao, T. Rokhlina, M. Samuel, D. A. Stoltz, Y. Li, E. Petroff, et al. «Production of CFTR-null and CFTR-DeltaF508 heterozygous pigs by adeno-associated virus-mediated gene targeting and somatic cell nuclear transfer». *J. Clin. Invest.* 118 (2008): 1.571–1.577.
- Schnieke, A. E. A. J. Kind, W. A. Ritchie, K. Mycock, A. R. Scott, M. Ritchie, I. Wilmut, A. Colman y K. H. S. Campbell. «Human factor IX transgenic sheep produced by transfer of nuclei from transfected fetal fibroblasts». *Science* 278 (1997): 2.130–2.133.
- «Production of gene-targeted sheep by nuclear transfer from cultured somatic cells.» *Nature* 405, 1997b, 1066–1069.
- Signer, E. N., Y. E. Dubrova, A. J. Jeffreys, C. Wilde, L. M. Finch, M. Wells y M. Peaker. «DNA fingerprinting Dolly». *Nature* 394 (1998): 329–330.
- Silva, J. y A. Smith. «Capturing pluripotency». *Cell* 132 (2008): 532–536.
- Spemann, H. «Die Entwicklung seitlicher und dorso-ventraler Keimhälfen bei verzögert-er Kernversorgung». *Zeit. für wiss. Zool* 132 (1928): 105–134.
- , *Experimentelle Beiträge zu einer Theorie der Entwicklung*. Berlin: Springer, 1936. (Edición inglesa, *Embryonic development and induction*, 1938.)
- Takahashi, K. y S. Yamanaka. «Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors». *Cell* 126 (2006): 663–76.
- Thomas, J. M. «Unpredictability and chance in scientific progress». *Progress in Informatics* 4 (2007): 1–4.
- Thomson, J. A., J. Itskovitz-Eldor, S. S. Shapiro, M. A. Waknitz, J. J. Swiergiel, V. S. Marshall y J. M. Jones. «Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts». *Science* 282 (1998): 1.145–1.147.
- Wakayama, T., A. C. Perry, M. Zuccotti, K. R. Johnson y R. Yanagimachi. «Full-term development of mice from enucleated oocytes injected with cumulus cell nuclei». *Nature* 394 (1998): 369–374.
- Weismann, A. *Das Keimplasma. Eine Theorie der Vererbung*. Jena: Gustav Fischer, 1892.
- Willadsen, S. M. «Nuclear transplantation in sheep embryos». *Nature* 320 (1986): 63–65.
- Wilmut, I., A. E. Schnieke, J. McWhir, A. J. Kind y K. H. Campbell. «Viable offspring derived from fetal and adult mammalian cells». *Nature* 385 (1997): 810–813.
- Woods, G. L., K. L. White, D. K. Vanderwall, G. P. Li, K. I. Aston, T. D. Bunch, L. N. Meerdo y B. J. Pate. «A mule cloned from fetal cells by nuclear transfer». *Science* 301 (2003): 1.063.
- Zhou, Q., J. Brown, A. Kanarek, J. Rajagopal y D. A. Melton. «In vivo reprogramming of adult pancreatic exocrine cells to beta-cells». *Nature*, 27 de agosto 2008. [existe un formato ePub anterior]