

CLONACIÓN

(clonación/transferencia de núcleos/reprogramación)

PEDRO JOSÉ OTAEGUI

Departamento de Bioquímica y Biología Molecular. Facultad de Veterinaria. Universidad Autónoma de Barcelona. 08193 Bellaterra (Barcelona).
e-mail: ivbqa@blues.uab.es

Presentado por Pedro García Barreno, 6 de mayo de 1997

INTRODUCCIÓN

El nacimiento de la oveja Dolly, producida por trasplante de núcleos, ha supuesto la demostración de algo que hasta ahora se creía era biológicamente imposible: la clonación de un mamífero adulto. Este resultado espectacular ha puesto en primer plano de actualidad los estudios en transferencia de núcleos que ya desde el inicio de los años cincuenta se han estado llevando a cabo. En este artículo me gustaría exponer como el progreso en estos estudios ha permitido adquirir los conocimientos y desarrollar la metodología necesaria para realizar un experimento semejante.

Los experimentos en transferencia de núcleos fueron propuestos por primera vez por Spemann en 1938 como una forma de investigar el potencial del genoma del núcleo de células diferenciadas (1). La idea consistía en transferir núcleos de células de embriones en estadios progresivamente más avanzados en su desarrollo, a embriones en estadio de una célula previamente enucleados. Este experimento se planteaba a comienzos de siglo como una de las respuestas a la forma en que las células se diferencian. Por esas épocas, existían dos hipótesis. Una sugería que la diferenciación celular se conseguía a través de la pérdida de genes. Es decir, conforme avanzaba la diferenciación de una estirpe celular, la cantidad de información genética almacenada en el núcleo iba disminuyendo, guardándose la que era necesaria para el correcto funcionamiento del tejido diferenciado y deseándose la información que no fuera a utilizarse en el futuro. Así, en el núcleo de las células diferenciadas tan solo se encontraría el DNA necesario para el desarrollo y el mantenimiento de ese tipo celular concreto. El resto se habría ido perdiendo a lo largo del proceso de diferenciación celular.

La segunda hipótesis ofrecía una explicación distinta. En este caso la cantidad de información presente en el núcleo de cualquier célula diferenciada sería la misma que la que se encontraba en el núcleo del cigoto. La diferenciación celular no se produciría por pérdida de material o información genética sino que sería debida a la distinta utilización de esa información por las diversas estirpes celulares. Es decir, en el núcleo de cualquier célula diferenciada de un organismo

adulto se mantendría toda la información necesaria para generar un nuevo organismo adulto.

Es en este contexto en el que Spemann propone su experimento: tomemos el núcleo de una célula somática diferenciada proveniente de un individuo adulto; introduzcámoslo en el citoplasma de un cigoto enucleado y veamos si el embrión reconstituido de esta forma es capaz de desarrollarse. Si lo consigue, será la prueba de la existencia de toda la información necesaria en el núcleo de las células diferenciadas, esto es, el núcleo de las células diferenciadas es totipotente. Si por el contrario, este embrión no se desarrolla, significará que el núcleo de las células diferenciadas no es totipotente.

Examinando las condiciones propuestas por Spemann más detalladamente, veremos que las condiciones que han de darse para que una transferencia de núcleos permita conseguir un embrión capaz de desarrollarse, no sólo hasta el nacimiento, sino hasta el estado de adulto fértil, son las siguientes. Primero, toda la información genética presente en el cigoto debe estar presente también en la célula utilizada como donante del núcleo transferido, esto implica que no se produzcan pérdidas de DNA durante el desarrollo. En segundo lugar, esta información debe ser accesible una vez el núcleo es transferido al nuevo citoplasma (esto significa que, por ejemplo, los genes deben ser accesibles para los factores de transcripción) permitiendo que la expresión génica del núcleo transferido sea modulada hacia una expresión equivalente a la de los pronúcleos (reprogramación). Si alguna de estas dos primeras condiciones no puede cumplirse, nos encontraríamos ante una barrera biológica para la clonación por medio de transferencia de núcleos. En tercer lugar, la transferencia de núcleos no debe producir consecuencias dañinas o letales para el embrión reconstruido. La investigación de posibles situaciones en las que se produzcan dichas consecuencias dañinas y el diseño de nuevas metodologías que permitan evitarlas, constituirá una aproximación a la mejora de la tecnología de transferencia de núcleos. Un factor que se ha demostrado que tiene importantes implicaciones para el desarrollo posterior a la transferencia de núcleos es la replicación anormal del DNA que ocurre al usar células do-

nadoras de núcleos y de recipiente en momentos inapropiados del ciclo celular.

PROGRAMA DE DESARROLLO: REPROGRAMACIÓN

Antes de explicar el concepto de reprogramación, conviene exponer lo que entendemos por programa de desarrollo. En el momento de la fertilización, el espermatozoide, además de completar la dotación genética del cigoto, activa el desarrollo del embrión resultante de dicha fertilización. El oocito completa la meiosis, se forman los pronúcleos, se replica el DNA y a continuación se lleva a cabo la primera división mitótica. A partir de este momento el desarrollo del embrión conlleva la aparición de distintos tipos celulares que poco a poco acaban diferenciándose en el ingente número de células que constituyen los distintos órganos y tejidos de un organismo adulto. Lo que entendemos por programa de desarrollo es el conjunto de instrucciones que cada estirpe celular necesita para llegar, partiendo del cigoto, al estadio de diferenciación final. El final de todas estas células, en un grado mayor o menor de diferenciación será la muerte, bien durante la vida del organismo del cual forman parte, bien a consecuencia de la muerte de este organismo. Tan solo un pequeño número de células escapan a esta suerte: las células germinales. Estas, después de unirse a otra formarán un nuevo individuo que crecerá y repetirá el ciclo.

Al realizar una transferencia de núcleos, lo que estamos pidiendo al núcleo que transferimos es que detenga su diferenciación y vuelva atrás en este programa de desarrollo. Una especie de "rebobinado" de las instrucciones de diferenciación, de tal forma que se sitúe al inicio del proceso. Esto es, que de alguna forma se convierta en el equivalente, en términos de diferenciación, de los pronúcleos del cigoto. Esta vuelta al inicio, este "rebobinado", es lo que denominamos reprogramación.

Para conseguir una adecuada reprogramación es necesario que exista totipotencia del núcleo, es decir, se requiere que sean cualesquiera los mecanismos utilizados durante la diferenciación celular, su acción sea completamente reversible. En otras palabras, el núcleo transferido al interior del citoplasma (provenga este de un oocito o de un cigoto) debe convertirse en semejante a un pronúcleo desde el punto de vista del desarrollo. La expresión de los genes característicos de su anterior tejido o estadio de desarrollo debe silenciarse y, en el momento adecuado, la expresión de los genes requeridos para el desarrollo durante estos estadios iniciales ha de ser activada. Realmente, el único test válido para comprobar la totipotencia de un núcleo sigue siendo su capacidad para dirigir el desarrollo de un embrión reconstruido por transferencia de núcleos hasta llegar a un individuo adulto fértil.

EXPERIMENTOS CON ANFIBIOS

Los primeros experimentos en clonación por transferencia de núcleos fueron realizados con embriones de anfibios (2, 3).

En estos experimentos, núcleos tomados de células de embriones en estadio de blástula y de gástrula fueron inyectados dentro del citoplasma de oocitos enucleados de *Rana pipiens*. Los embriones así reconstruidos completaron su desarrollo normal y se convirtieron en individuos adultos fértiles. En los años siguientes, la transferencia de núcleos fue probada de una forma extensiva utilizándose principalmente dos especies de anfibios: *Xenopus laevis* y *Rana pipiens* (ver 4 - 8).

Estos experimentos de transferencia de núcleos realizados con embriones de anfibios sugirieron que, al menos en los estadios iniciales del desarrollo, la diferenciación se consigue por medios que no conllevan la pérdida de totipotencia nuclear. (2, 3, 9 - 12). Incluso se consiguieron individuos adultos a partir de células tomadas de la mucosa del intestino de renacuajo (12). De todas maneras, aunque existían evidencias que probaban la multipotencialidad genética de los núcleos de células somáticas especializadas, en ningún caso se demostró que células somáticas diferenciadas de individuos adultos fueran totipotentes. En otras palabras, no fue posible obtener individuos adultos a partir de células diferenciadas de individuos adultos. Esto es, no se consiguió clonar un individuo adulto (13 - 18).

Quisiera resaltar que ya en estos primeros experimentos se realizaron dos observaciones muy importantes, que al cabo de los años llevarían a desarrollar una metodología eficiente de clonación. En primer lugar, se vio que se obtenían mejores resultados al utilizar oocitos, en lugar de cigotos, como recipientes del núcleo. (8, 13, 18, 19). En segundo lugar, se observó que una gran proporción de embriones clonados morían debido a errores en la segregación de las cromátidas durante las primeras mitosis. Como explicaré más adelante, estos errores aparecían a consecuencia de la transferencia de núcleos. Es decir, los embriones no morían por una incapacidad del núcleo transferido para dirigir el desarrollo (falta de totipotencia), sino por lesiones causadas al embrión debido al mismo proceso de transferencia de núcleos (20).

EXPERIMENTOS CON MAMÍFEROS: AVANCES EN LA METODOLOGÍA

Aunque los primeros experimentos en transferencia de núcleos utilizando embriones de mamífero se iniciaron en la década de los setenta (21 - 28) habrá que esperar a una serie de avances metodológicos para que se realicen de una forma rutinaria y en una proporción similar a los realizados con embriones de anfibios.

Estos primeros experimentos en transferencia de núcleos con embriones de mamífero toparon con graves dificultades técnicas debidas principalmente al tamaño del oocito y del cigoto (unas 1000 veces menor que el huevo de rana), y a su mayor sensibilidad a las manipulaciones de microcirugía. No fue hasta el establecimiento de un método de enucleación no invasivo (29) que los experimentos en transferencia de núcleos con embriones de mamífero se realizaron en una escala similar a los ya llevados a cabo con anfibios (30 - 35).

Los primeros experimentos se realizaron utilizando como donantes de núcleos células embrionarias procedentes de embriones no implantados. Como recipientes para estos núcleos fueron utilizados cigotos. Rápidamente se observó, como había sucedido con los anfibios, que los oocitos en metafase proporcionaban un recipiente más adecuado (36 - 39). Un nuevo avance técnico fue el uso de fluorocromos específicos para el DNA que permitió visualizar los cromosomas y facilitó enormemente la enucleación de oocitos en metafase II (40 - 41).

Al utilizar estos nuevos protocolos de transferencia de núcleos, rápidamente se obtuvieron individuos adultos, a partir de células embrionarias, en la mayoría de especies domésticas (38, 42 - 44). El estadio de desarrollo más avanzado a partir del cual se obtuvieron individuos adultos era el blastocisto. Se obtuvieron individuos adultos después de transferir núcleos de células de la masa celular central (ICM) del blastocisto de embriones de oveja (45), conejo (46) y vaca (47). Por otro lado se obtienen embriones que completan el desarrollo hasta blastocisto utilizando como donantes de núcleos células diferenciadas como timocitos (48), células primordiales masculinas (49), células de la granulosa y fibroblastos (47). También se obtuvo desarrollo hasta blastocisto con embriones producidos por transferencia de núcleos interespecífica (50).

En resumen, los datos de experimentos en transferencia de núcleos realizados tanto con embriones de anfibios como con embriones de mamífero, sugerían la existencia de una progresiva restricción desde el punto de vista del desarrollo, cuando células en estadios progresivamente más avanzados se utilizan como donantes de núcleos. Diversos investigadores han sugerido la existencia de una relación entre este hecho y el estadio del desarrollo en el cual se produce el inicio de la transcripción del genoma embrionario en las diversas especies (34, 51 - 53). Sin embargo no estaba claro si esta relación era debida a una pérdida de totipotencia del núcleo transferido o si era producida por la distinta duración del periodo de tiempo desde la transferencia de núcleos hasta el inicio de la transcripción del genoma embrionario. Durante este periodo, el núcleo transferido puede recuperarse de la transferencia y adaptarse al nuevo ambiente citoplasmático. De esta forma, en los embriones de especies con una activación más tardía del genoma embrionario - por ejemplo, la oveja - los núcleos transferidos tendrían más tiempo para adaptarse y ser reprogramados que en el caso de embriones de especies con una activación inmediata del genoma embrionario.

¿BARRERA BIOLÓGICA O PROBLEMA METODOLÓGICO?

La elevada proporción de embriones que completan su desarrollo al transferir núcleos entre embriones de ratón que se encuentran en un estadio similar de desarrollo (29, 51, 54) demostraba que las técnicas de transferencia de núcleos, *per se*, no tienen un efecto importante en el desarrollo del em-

brión reconstruido. Por lo tanto, cuando la totipotencia de núcleos tomados de estadios más avanzados fue puesta a prueba mediante experimentos de transferencia de núcleos, la incapacidad de desarrollarse observada en los embriones reconstruidos de esta manera fue interpretada como la prueba de la pérdida de la totipotencia del núcleo transferido, y de la incapacidad de reprogramar dichos núcleos por parte del citoplasma del cigoto (51, 52).

Así, a finales de los años ochenta, las opiniones de los investigadores se dividían entre quienes pensaban que no era posible clonar individuos adultos mediante transferencia de núcleos, debido a la existencia de una barrera biológica que impedía la reprogramación del núcleo transferido, y la de aquellos que, aun sin negar la posible existencia de dicha barrera, pensaban que todavía no se había alcanzado. Para estos últimos, la metodología utilizada en la transferencia de núcleos era mejorable.

Esta opinión se fundamentaba en dos observaciones realizadas tanto en experimentos con embriones de mamífero como de anfibio. En primer lugar, como ya se ha mencionado, se tenía la evidencia de que el tipo de recipiente utilizado afectaba de una forma dramática al desarrollo del embrión reconstruido por transferencia de núcleos. Esta observación indicaba que factores externos al núcleo -que fueron denominados factores de reprogramación- y, por añadidura, a su grado de diferenciación, afectaban al proceso de reprogramación. La segunda observación era que la fase del ciclo celular en la que se encontraba tanto la célula donadora de núcleos, como la célula de la cual se obtenía el citoplasma afectaba al desarrollo del embrión resultante de la transferencia de núcleos (55).

Conjuntamente, estas observaciones sugerían que las relaciones núcleo-citoplasmáticas inmediatamente después de la transferencia de núcleos, y no la totipotencia del núcleo transferido, podrían ser responsables de la falta de desarrollo observada en los embriones producidos por transferencia de núcleos.

Es decir, estas observaciones indicaban que el desarrollo del embrión producido por transferencia de núcleos no era únicamente una cuestión de totipotencia del núcleo. Además de ello, existían una serie de factores que debían ser investigados para conocer con mayor detalle las relaciones núcleo-citoplasmáticas que se dan después de la transferencia. Este mayor entendimiento podría conducir, posiblemente, al diseño de protocolos y técnicas de transferencia de núcleos más eficientes.

INFORMACIÓN GENÉTICA EN EL NÚCLEO DE LA CÉLULA DONANTE

Otro de los argumentos a favor de la inexistencia de barreras biológicas a la clonación, lo constituye el hecho de la conservación de la integridad del genoma durante el desarrollo del organismo y la diferenciación celular.

Perdidas de DNA se han descrito en unas pocas especies de protozoos ciliados, nemátodos, crustáceos e insectos (56 - 58). Entre los vertebrados, se producen pérdidas de DNA en la reorganización de los genes de la inmunoglobulina en gallinas (59), en los linfocitos B (60) y en los receptores de los linfocitos T en mamíferos (61, 62).

Exceptuando dichas ocasiones, puede decirse que la evidencia disponible hoy en día indica que la integridad del genoma es retenida a lo largo del desarrollo incluso en células somáticas especializadas. Esta evidencia indica que un elevado número de genes silenciados pueden mantenerse en el genoma en ausencia de expresión, y que en las condiciones favorables pueden ser estimulados para funcionar y permanecer funcionales. Esta activación ha sido documentada en cultivos celulares, experimentos de transdiferenciación, heterokariones e híbridos celulares, cáncer y transferencia de núcleos (8, 63 - 72).

REPROGRAMACIÓN DE LA EXPRESIÓN GÉNICA DESPUÉS DE LA TRANSFERENCIA DE NÚCLEOS

La reprogramación de la expresión del genoma después de la transferencia de núcleos puede ser estudiada de diversas formas: observación directa de cambios en el RNA y la producción de péptidos (14, 52, 73 - 79), observación de la estructura del núcleo (80), cambios en antígenos de membrana regulados durante el desarrollo (81) y la recapitulación de eventos que ocurren durante el desarrollo preimplantatorio (38, 42-46, 82). A partir de la evidencia disponible, puede concluirse que la reprogramación del núcleo transferido, aunque puede ser incompleta o parcial, es un fenómeno común después de la transferencia de núcleos.

No está claro cuál es el mecanismo mediante el que se consigue esta reprogramación. Cambios en la morfología del núcleo transferido han sido descritos extensivamente. Estos cambios, debidos fundamentalmente a intercambios de proteínas entre el núcleo y el citoplasma han sido descritos tanto en anfibios (4 - 6) como en mamíferos (31, 36, 44, 83)).

Parece probable que esta remodelación del núcleo transferido esté relacionada con la reprogramación que sufre. Así, uno de los candidatos que han sido propuestos como responsables de esta reprogramación es el proceso, o grupo de factores, envuelto en los intensos cambios morfológicos que ocurren después de la fertilización en el núcleo del oocito y del espermatozoide. Estos cambios causan la remodelación de los cromosomas del oocito y del núcleo del espermatozoide en pronúcleos funcionales capaces de sintetizar DNA (84 - 87). La evidencia publicada sugiere que esta remodelación está producida por factores existentes en el citoplasma del oocito en metafase II de la meiosis que son inactivados o secuestrados de alguna forma durante el proceso de formación de los pronúcleos. (36, 88 - 90)

DAÑOS PRODUCIDOS POR O A CONSECUENCIA DE LA TRANSFERENCIA DE NÚCLEOS. EFECTO DEL CICLO CELULAR EN LA TRANSFERENCIA DE NÚCLEOS

Ya los experimentos realizados con embriones de anfibios, sugerían que el fracaso observado en el desarrollo de embriones producidos mediante transferencia de núcleos, al usar como donantes de núcleos células diferenciadas, era un resultado del daño ocasionado a los cromosomas por la incapacidad de estos núcleos de células diferenciadas en adquirir la característicamente más rápida pauta de replicación del DNA que se da en los estadios iniciales del desarrollo (3, 5, 91 - 94). Como resultado de esta incapacidad, cromosomas que estaban todavía inmersos en la replicación del DNA eran obligados a entrar en mitosis y sufrían daños mecánicos debidos a una anormal separación de las cromátidas en la anafase (18).

También se han detectado importantes efectos del ciclo celular post transferencia de núcleos en mamíferos. La fase del ciclo celular tanto del núcleo como del citoplasma utilizados en la transferencia afecta, de una manera vital, a la replicación del DNA del núcleo transferido.

La replicación del DNA ocurre solamente una vez durante cada ciclo celular. Así, en el ciclo celular mitótico normal existen controles que evitan la re-replicación del DNA (para una revisión ver 95). Este control parece ser que se establece mediante un factor permisivo ("licensing factor" LF) que se une a los cromosomas durante la mitosis e induce la replicación del DNA durante la interfase. Este factor es consumido o inactivado de alguna manera una vez que la replicación del DNA se ha producido. La integridad de la membrana nuclear durante la interfase es crucial para evitar que nuevo LF entre en el núcleo e induzca la re-replicación del DNA antes de que las cromátidas hermanas se separen durante la fase de mitosis (96 - 98).

Al investigar la síntesis del DNA del núcleo transferido en embriones vacunos producidos por transferencia de núcleos (99, 100), se observó que los resultados variaban dependiendo de si el núcleo era transferido a un oocito en metafase II o en fase de síntesis (S).

Al usar un oocito en metafase II como recipiente, la membrana nuclear del núcleo transferido se desmantelaba y se producía replicación del DNA, independientemente de la fase del ciclo celular en la que se encontrase el núcleo transferido (99, 100). El desmantelamiento de la membrana nuclear es producido por la actividad del factor promotor de la mitosis (MPF). Si los núcleos son transferidos a recipientes que tienen altos niveles de actividad del MPF puede inducirse re-replicación de DNA que ya ha sido replicado, lo cual puede acabar produciendo aneuploidia. Una forma de evitarlo es transferir núcleos en fase G1, ya que en este caso, la replicación normal del DNA todavía no se ha producido. Sin embargo si se transfieren núcleos que se encuentran en fase de síntesis, la re-replicación inducida por la pérdida de membrana nuclear puede provocar graves errores. Si se

transfieren núcleos en G2 pueden obtenerse células hijas tetraploides.

Por otro lado, si el oocito era activado y cultivado el tiempo suficiente para permitir la desaparición de MPF activo, era la fase celular del núcleo transferido quien determinaba si se producía o no replicación del DNA (99, 100). En este caso se observó replicación de DNA al transferir núcleos en fase G1 y S; pero no al transferir núcleos en fase G2.

Estos resultados sugerían que para evitar anomalías en la replicación del DNA, que pueden resultar letales para el embrión reconstruido, existen dos estrategias. Bien se transfieren únicamente núcleos en G1 o bien se utiliza únicamente recipientes en los cuales la actividad del factor promotor de la mitosis (MPF) ha desaparecido. Esta segunda aproximación permitiría utilizar cualquier tipo de núcleo (G1, S o G2)

EVITAR LA RE-REPLICACIÓN DEL DNA: EL RECIPIENTE UNIVERSAL

Al poner a prueba esta segunda estrategia con embriones de oveja, se observó un incremento del 50% en el desarrollo a blastocisto de los embriones producidos por transferencia de núcleos (101). Los blastocistos obtenidos pasaron del 20% al 67% de los embriones reconstruidos. Este resultado confirmaba que una gran parte de la mortalidad embrionaria observada hasta ahora en los embriones producidos por transferencia de núcleos era causada por una inadecuación de las fases del ciclo celular del núcleo y recipiente que, muy probablemente, causaba alteraciones en la replicación del DNA después de la transferencia.

Una de las ventajas de esta aproximación es que permite utilizar todos los núcleos de un embrión, sin necesidad de sincronizarlos en una fase determinada. Por ello, al citoplasma con bajos niveles de actividad MPF se le llamó "recipiente universal".

Hay que mencionar aquí que la combinación de núcleos en G1 con citoplasma en metafase II incrementaba de una manera similar la eficacia de estas técnicas de clonación (102 - 103).

Sin embargo, al utilizar embriones de ratón como material para un experimento en el que estudiábamos más detalladamente el efecto del ciclo celular en el desarrollo después de la transferencia de núcleos (Otaegui *et al*, en preparación), realizamos unas observaciones que nos hicieron cambiar la hipótesis de trabajo. Las células embrionarias de ratón, a diferencia de las de oveja, pueden ser fácilmente sincronizadas de manera que podemos utilizar núcleos en distintas fases del ciclo celular (G1, inicio S, final S, G2). Teóricamente, y en ausencia de otros factores distintos a la re-replicación del DNA, al transferir núcleos en cualquiera de estas fases a un "recipiente universal" obtendríamos similares proporciones de desarrollo a blastocisto. Los resultados no cuadraron con esta hipótesis. Los embriones re-

construidos con núcleos en el periodo inicial de la fase G1 se desarrollaban hasta blastocisto en una proporción varias veces superior a lo que obteníamos al utilizar núcleos en otras fases. Además, este resultado coincidía con que esta fase del ciclo celular (inicio de G1) era la única que podía utilizarse como donante de núcleos si el recipiente estaba en metafase II. Claramente, estos núcleos en el inicio de la fase G1 tenían alguna característica que los hacía especiales. Por un lado eran más fácilmente reprogramables al ser transferidos a un recipiente universal. En este caso, tomamos como prueba de su mayor reprogramabilidad su mayor proporción de desarrollo a blastocisto. Por otro lado, eran resistentes a la inducción de re-replicación del DNA después del dismantelamiento de la membrana nuclear provocada por altos niveles de MPF.

LA HIPÓTESIS DEL DNA "DESNUDO"

Las diferencias en la configuración de la cromatina podrían ser responsables de las diferencias observadas entre los grupos donde se predecía una replicación normal del DNA. Así, el 43 y el 60% de los embriones producidos al transferir núcleos de células en la fase inicial de G1, tomados de embriones en 4 células, a citoplasma en metafase II y en fase S respectivamente, se desarrollaron hasta blastocisto. Mientras que únicamente el 15% de embriones lo hacían al transferir núcleos en fase S a citoplasma en fase S. La hipótesis del DNA "desnudo" propone que estos resultados reflejan diferencias de accesibilidad de los factores de transcripción (y de reprogramación) al DNA cromosómico del núcleo transferido.

Aunque no es un fenómeno totalmente generalizado, un gran número de factores de transcripción se separan de los cromosomas durante la mitosis (104, 105). En circunstancias normales, una vez completada la mitosis, estos factores que controlan la transcripción retornan a la cromatina para seguir regulando la expresión génica de las células hijas. Sin embargo, si núcleos desprovistos de dichos factores de transcripción son transferidos a un ambiente citoplasmático distinto, los factores de transcripción que migrarán al núcleo transferido serán los presentes en este nuevo citoplasma que, una vez unidos a la cromatina, modularán una expresión génica apropiada a la fase del desarrollo del citoplasma. El desplazamiento de factores de transcripción de los cromosomas mitóticos antes de la transferencia de núcleos puede así resultar en un periodo permisivo para la modificación de la expresión génica de los núcleos transferidos. En células HeLa, se ha descrito un periodo en el inicio de la fase G1 donde la membrana nuclear ya se ha formado y la cromatina esta todavía parcialmente condensada (106). Los protocolos de transferencia de núcleos podrían aprovechar esta situación utilizando núcleos en esta fase de inicio de G1 o incluso en mitosis. En comparación, en los núcleos en fase S, la cromatina se encuentra totalmente descondensada y los factores de transcripción ya han migrado al núcleo, dificultando considerablemente la reprogramación del núcleo por parte del citoplasma recipiente.

«DOLLY»

Al intentar replicar estos experimentos con células en cultivo ("stem cell" de ratón), la mayor dificultad técnica que nos encontramos fue la de sincronizar una proporción adecuada de células en este inicio de la fase G1. Dificultades que hicieron abandonar esta aproximación.

Sin embargo, existía otra forma de conseguir núcleos carentes o, al menos, suficientemente desprovistos de factores de transcripción: inducir la entrada de las células donadoras en quiescencia. Intuitivamente, puede explicarse esta situación si imaginamos que al cultivar las células donadoras de núcleos en un medio prácticamente sin nutrientes, se provoca una especie de situación de emergencia en la que la célula dedica todas sus reservas a mantenerse viva. Esto lo consigue minimizando el número de genes que se expresan y desviando la mayor cantidad de moléculas estructurales a la combustión y la obtención de energía. En este estado, llegará un momento en el que la presencia de factores de transcripción unidos a la cromatina del núcleo celular se ve reducido al mínimo compatible con la vida. Utilizando esta aproximación, los doctores Wilmut y Campbell del Instituto Roslin consiguieron el año 1995 dos ovejas adultas a partir de células fetales ovinas mantenidas en cultivo por trece pasajes (107). Animados por estos resultados, el año 1996 utilizaron como donantes de núcleos células mamarias mantenidas en cultivo. De estos experimentos nació Dolly (108).

APLICACIONES DE LAS TÉCNICAS DE CLONACIÓN

Al contemplar las posibles aplicaciones de estos procedimientos de clonación, me gustaría aclarar que me referiré a ellas exclusivamente desde el punto de vista del investigador. Debemos tener muy claro que la metodología de clonación por transferencia de núcleos sigue siendo, fundamentalmente, una importantísima herramienta de investigación. Mediante estos experimentos podremos descifrar y conocer mejor los mecanismos moleculares que producen la reprogramación del núcleo transferido y del proceso de diferenciación celular. Aun cuando el nacimiento de Dolly demuestra que la reprogramación de núcleos de células diferenciadas es posible, no sabemos como se produce. Hay muchas preguntas planteadas: ¿cuales son los mecanismos moleculares que intervienen? ¿es posible clonar cualquier especie? ¿es posible utilizar como donante cualquier célula? ¿de cualquier tejido?

Conocer y explicar mejor el proceso de diferenciación celular puede tener importantes aplicaciones en la salud, pues permitirá entender de una forma más precisa procesos como el cáncer, el desarrollo de los individuos y el envejecimiento celular e individual.

Entre las aplicaciones a corto y medio plazo de estas técnicas se incluye la facilitación de la obtención de animales transgénicos de granja. Animales que pueden usarse como productores de proteínas humanas de interés farmacéutico. Recientemente se ha comunicado el nacimiento de ovejas

obtenidas de embriones reconstruidos con núcleos de fibroblastos embrionarios previamente transfectados *in vitro*. La obtención de animales transgénicos mediante transferencia de núcleos de células transfectadas y seleccionadas *in vitro* reduce de una manera muy importante el coste de estos procedimientos (tanto en tiempo como en dinero) y permite la aplicación de técnicas de recombinación homóloga que hacen posible una manipulación genética mucho más precisa.

A más largo plazo este tipo de técnicas podrán llegar a ser utilizadas en la recuperación de razas e incluso especies en vías de desaparición o ya definitivamente extintas (los mamuts congelados de Siberia son un buen primer candidato).

Por otra parte, y ya moviéndonos en los límites de la ciencia ficción, es posible imaginar que la conjunción de las técnicas de manipulación genética, clonación por transferencia de núcleos y xenotransplante de órganos permitirán crear animales donantes de órganos "personalizados". Aunque en el momento actual este tipo de tecnología plantea graves cuestiones de seguridad biológica (paso de virus de unas especies a otras) y provoca un número mayor de preguntas que de respuestas.

BIBLIOGRAFÍA

1. Spemann, H. (1938) Embryonic Development and Induction, repr. 1967, Hafner, New York. (cited by DiBenardino 1979).
2. Briggs, R. & King, T.J. (1952) Transplantation of living nuclei from blastula cells into enucleated frogs' eggs. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **38**, 455-463.
3. Briggs, R. & King, T.J. (1960) Nuclear transplantation studies on the early gastrula (*Rana pipiens*). *Dev. Biol.* **2**, 252-270.
4. Gurdon, J.B., Laskey, R.A., DeRobertis, E.M. & Partington, G.A. (1979) Reprogramming of transplanted nuclei in amphibia. *Int. Rev. Cytol. (suppl)* **9**, 161-178.
5. DiBenardino, M.A. (1979) Nuclear and chromosomal behavior in amphibian nuclear transplants. *Int. Rev. Cytol. (suppl.)* **9**, 129-160.
6. DiBenardino, M.A. (1987) Genomic potential of differentiated cells analyzed by nuclear transplantation. *Am. Zool.* **27**, 623-644.
7. DiBenardino, M.A. (1988) Genomic multipotentiality of differentiated somatic cells. *Cell Diff. Develop.* **25 (suppl.)**, 129-136.
8. DiBenardino, M.A. & Hoffner-Orr, N. (1992) Genomic potential of erythroid and leukocytic cells of *Rana pipiens* analyzed by nuclear transfer into diplotene and maturing oocytes. *Differentiation* **50**, 1-13.
9. Gurdon, J.B. (1962) Adult frogs derived from the nuclei of single somatic cells. *Dev. Biol.* **4**, 256-273.
10. Gurdon, J.B. & Uehlinger, V. (1966) «Fertile» intestine nuclei. *Nature* **210**, 1240-1241.

11. Kobel, H.R., Brun, R.B. & Fischberg, M. (1973) Nuclear transplantation with melanophores, ciliated epidermal cells, and the established cell-line A-8 in *Xenopus laevis*. *J. Embryol. Exp. Morphol.* **29**, 539-547.
12. Gurdon, J.B. (1986) Nuclear transplantation in eggs and oocytes. *J. Cell Sci. (suppl.)* **4**, 287-318.
13. DiBenardino, M.A., Orr Hoffner, N. & McKinnell, R.G. (1986) Feeding tadpoles cloned from Rana erythrocyte nuclei. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* **83**, 8231-8234.
14. Gurdon, J.B., Brennan, S., Fairman, S. & Mohun, T.J. (1984) Transcription of muscle-specific actin genes in early *Xenopus* development: Nuclear transplantation and cell dissociation. *Cell* **38**, 691-700.
15. Brun, R.B. (1978) Developmental capacities of *Xenopus* eggs, provided with erythrocyte or erythroblast nuclei from adults. *Dev. Biol.* **65**, 271-284.
16. Gurdon, J.B., Laskey, R.A. & Reeves, O.R. (1975) The development capacity of nuclei transplanted from keratinized skin cells of adult frogs. *J. Embryol. Exp. Morphol.* **34**, 93-112.
17. Wabl, M.R., Brun, R.B. & DuPasquier, L. (1975) Lymphocytes of the toad *Xenopus laevis* have the gen set for promoting tadpole development. *Science* **190**, 1310-1312.
18. DiBenardino, M.A. & Hoffner, N. (1983) Gene reactivation in erythrocytes: Nuclear transplantation in oocytes and eggs of Rana. *Science* **219**, 862-864.
19. Orr Hoffner, N., DiBenardino, M.A. & McKinnell, R.G. (1986) The genome of frog erythrocytes displays centuplicate replications. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **83**, 1369-1373.
20. DiBenardino, M.A. & Hoffner, N. (1970) Origin of chromosomal abnormalities in nuclear transplants - A reevaluation of nuclear differentiation and nuclear equivalence in amphibians. *Dev. Biol.* **23**, 185-209.
21. Graham, C. F. (1969) The fusion of cells with one- and two-cell mouse embryos. *Wistar Institute Symposium monograph* **9**, 19-33.
22. Baranska, W. & Koprowski, H. (1970) Fusion of unfertilized mouse eggs with somatic cells. *J. Exp. Zool.* **174**, 1-14.
23. Bernstein, R.M. & Mukherjee, B.B. (1972) Control of nuclear RNA synthesis in 2-cell and 4-cell mouse embryos. *Nature* **238**, 457-459.
24. Lin, T.P. & Florence, J. (1973) Cell fusion induced by a virus within the zona pellucida of mouse eggs. *Nature* **242**, 47-49.
25. Bromhall, J.D. (1975) Nuclear transplantation in the rabbit egg. *Nature* **258**, 719-722.
26. Modlinski, J.A. (1975) Haploid mouse embryos obtained by microsurgical removal of one pronucleus. *J. Embryol. Exp. Morph.* **33**, 897-905.
27. Modlinski, J.A. (1978) Transfer of embryonic nuclei to fertilized mouse eggs and development of tetraploid blastocysts. *Nature* **273**, 466-467.
28. Modlinski, J.A. (1981) The fate of inner cell mass and trophectoderm nuclei transplanted to fertilized mouse eggs. *Nature* **292**, 342-343.
29. Mc Grath, J. & Solter, D. (1983a) Nuclear transplantation in the mouse embryo by microsurgery and cell fusion. *Science* **220**, 1300-1302.
30. Howlett, S.K., Barton, S.C. & Surani, M.A.H. (1989) Effects of the number, stage and parental origin of nuclei in reconstructed mouse eggs. *J. Reprod. Fert., (suppl.)* **38**, 99-105.
31. Prather, R.S., Sims, M.M., First, N.L. (1990) Nuclear transplantation in the pig embryo: nuclear swelling. *J. Exp. Zool.* **255**, 355-358.
32. Bondioli, K.R., Westhusin, M.E. & Looney, C.R. (1990) Production of identical bovine offspring by nuclear transfer. *Theriogenology* **33**, 165-174.
33. First, N.L. & Prather, R.S. (1991) Genomic potential in mammals. *Differentiation* **48**, 1-8.
34. Wilmut, I. & Campbell, K.H.S. (1992) Embryo multiplication in livestock: present procedures and the potential for improvement. In: Lauria A and Gandolfi F (ed), *Embryonic Development And Manipulation in Animal Development*. Trends in Research and Applications. London: Portland Press, 135-145.
35. Campbell, K.H.S., Loi, P., Otaegui, P.J. & Wilmut, I. (1996) Cell cycle co-ordination in embryo cloning by nuclear transfer. *Reviews of Reprod.* **1**, 40-46.
36. Czolowska, R., Modlinski, J.A. & Tarkowski, A.K. (1984) Behaviour of thymocyte nuclei in nonactivated and activated mouse oocytes. *J. Cell Sci.* **69**, 19-34.
37. Mc Grath, J. & Solter, D. (1986) Nucleocytoplasmic interaction in the mouse embryo. *J. Embryol. Exp. Morphol., (suppl.)*, **97** 277-289.
38. Willadsen, S.M. (1986) Nuclear transplantation in sheep embryos. *Nature* **320**, 63-65.
39. Robl, J.M., Prather, R., Barnes, F., Eyestone, W., Northey, D., Gilligan, B. & First, N.L. (1987) Nuclear transplantation in bovine embryos. *J. Anim. Sci.* **64**, 642-647.
40. Ebert, K.M., Hammer, R.E. & Papaianou, V.E. (1985) A simple method for counting nuclei in the preimplantation mouse embryo. *Experimentia* **41**, 1207-1209.
41. Tsunoda, Y., Yasui, T., Shioda, Y., Nakamura, K., Uchida, T. & Sugie, T. (1988) Differential sensitivity of mouse pronuclei and zygote cytoplasm to Hoechst stain and ultraviolet irradiation. *J. Reprod. Fert.* **82**, 173-178.
42. Prather, R.S., Barnes, F.L., Sims, M.M., Robl, J.M., Eyestone, W.H. & First, N.L. (1987) Nuclear transplantation in the bovine embryo: assessment of donor nuclei and recipient oocyte. *Biol. Reprod.* **37**, 859-866.
43. Prather, R.S., Sims, M.M., First, N.L. (1989) Nuclear transplantation in early pig embryos. *Biol. Reprod.* **41**, 414-8.
44. Stice, S.L. & Robl, J.M. (1988) Nuclear reprogramming in nuclear transplanted rabbit embryos. *Biol. Reprod.* **39**, 657-664.
45. Smith, L.C. & Wilmut, I. (1989) Influence of nuclear and cytoplasmic activity on the development in vivo of sheep embryos after nuclear transplantation. *Biol. Reprod.* **40**, 1027-1035.

46. Collas, P. & Robl, J.M. (1991) Relationship between nuclear remodeling and development in nuclear transplant rabbit embryos. *Biol. Reprod.* **45**, 455-465.
47. Collas, P. & Barnes, F.L. (1994) Nuclear transplantation by microinjection of inner cell mass and granulosa cell nuclei. *Mol Reprod Develop.* **38**, 264-267.
48. Kono, T., Kwon, O.Y., Ogawa, M. & Nakahara, T. (1991) Development of mouse oocytes receiving embryonic nuclei and thymocytes. *Theriogenology* **35**, 227.
49. Moens, A., Chastant, S., Chesne, P., Betteridge, K.J. & Renard, J.P. (1995) Nuclear transfer using gonia from male rabbit fetuses. *Theriogenology* **43**, 283.
50. Wolfe, B.A., Kraemer, D.C. (1992). Interspecies nuclear transplantation. In: *Symposium on cloning mammals by nuclear transplantation*, edited by Seidel GE Jr. Colorado State University. Colorado. p. 42-44.
51. Mc Grath, J. & Solter, D. (1984) Inability of mouse blastomere nuclei transferred to enucleated zygotes to support development in vitro. *Science* **226**, 1317-1319.
52. Howlett, S.K., Barton, S.C. & Surani, M.A.H. (1987) Nuclear cytoplasmic interactions following nuclear transplantation in mouse embryos. *Development* **101**, 915-923.
53. Prather, R.S. & First, N.L. (1990) Cloning embryos by nuclear transfer. *J. Reprod. Fert. (suppl.)* **41**, 125-134.
54. Mc Grath, J. & Solter, D. (1983b) Nuclear transplantation in the mouse embryos. *J. Exp. Zool.* **228**, 355-362.
55. Smith, L.C., Wilmut, I. & Hunter, R.H. (1988) Influence of cell cycle stage at nuclear transplantation on the development in vitro of mouse embryos. *J. Reprod. Fert.* **84**, 619-624.
56. Klobutcher, L.A., Jahn, C.L. & Prescott, D.M. (1984) Internal sequences are eliminated from genes during macronuclear development in the ciliated protozoan *Oxytricha nova*. *Cell* **36**, 1045-1055.
57. Hennig, W. (1986) Results and problems in cell differentiation. Vol 13: *Germ line-soma differentiation*. W Hennig and J Reinert (eds) Springer-Verlag, Berlin.
58. Tobler, H. (1986) The differentiation of germ and somatic cell lines in Nematodes. In: *Results and problems in cell differentiation*. Vol 13: *Germ line-soma differentiation*. W Hennig and J Reinert (eds) pp. 1-69 Springer-Verlag, Berlin.
59. Weill, J.C. & Reynaud, C.A. (1987) The chicken B cell compartment. *Science* **238**, 1094-1098.
60. Alt, F.W., Blackwell, T.K. & Yancopoulos, G.D. (1987) Development of the primary antibody repertoire. *Science* **238**, 1079-1087.
61. Hood, L., Kronenberg, M. & Hunkapiller, T. (1985) T cell antigen receptors and the immunoglobulin supergene family. *Cell* **40**, 225-229.
62. Marrack, P. & Kappler, J. (1987) The T cell receptor. *Science* **238**, 1073-1079.
63. Harris, M. (1986) Induction and reversion of asparagine auxotrophs in CHO-K1 and V79 cells. *Somatic Cell Mol. Genet.* **12**, 459-466.
64. Eguchi, G. (1988) Cellular & molecular background of Wolffian lens regeneration. *Cell Differ. Dev. (suppl.)* **25** 147-158.
65. Harris, H. (1974) Nucleus and Cytoplasm. Clarendon. Oxford.
66. Blau, H.M., Chiu, C.P. & Webster, C. (1983) Cytoplasmic activation of human nuclear genes in stable heterokaryons. *Cell* **32**, 1171-1180.
67. Blau, H.M., Pavlath, G.K., Hardeman, E.C., Chiu, C.P., Silberstein, L., Webster, S.G., Miller, S.C. & Webster, C. (1985) Plasticity of the differentiated state. *Science* **230**, 758-766.
68. Baron, M.H. & Maniatis, T. (1986) Rapid reprogramming of globin gene expression in transient heterokaryons. *Cell* **46**, 591-602.
69. Blau, H.M. & Baltimore, D. (1991) Differentiation requires continuous regulation. *J. Cell Biol.* **112**, 781-783.
70. Harris, H. (1985) Suppression of malignancy in hybrid cells : The mechanism. *J. Cell Sci.* **79**, 83-94.
71. Pierce, G.B. (1985) Carcinoma is to embryology as mutation is to genetics. *Am. Zool.* **25**, 707-712.
72. Sachs, L. (1987) Cell differentiation and bypassing of genetic defects in the suppression of malignancy. *Cancer Res.* **47**, 1981-1986.
73. Etkin, L.D. (1976) Regulation of lactate dehydrogenase (LDH) and alcohol dehydrogenase (ADH) synthesis in liver nuclei, following their transfer into oocytes. *Dev.Biol.* **52**, 201-209.
74. DeRobertis, E.M. & Gurdon, J.B. (1977) Gene activation in somatic nuclei after injection into amphibian oocytes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **74**, 2470-2474.
75. Korn, L. J. & Gurdon, J. B. (1981) The reactivation of developmentally inert 5S genes in somatic nuclei injected into *Xenopus* oocytes. *Nature* **289**, 461-465.
76. Wakefield, L. & Gurdon, J.B. (1983) Cytoplasmic regulation of 5S RNA genes in nuclear-transplant embryos. *EMBO J.* **2**, 1613-1619.
77. Latham, K.E., Garrels, J.I., Chang, C. & Solter, D. (1991) Quantitative analysis of protein synthesis in mouse embryos. I. Extensive reprogramming at the one- and two-cell stages. *Development* **112**, 921-932.
78. Latham, K.E., Garrels, J.I. & Solter, D. (1994) Alterations in protein synthesis following transplantation of mouse 8-cell stage nuclei to enucleated 1-cell embryos. *Dev Biol.* **163**, 341-350.
79. Yang, Z., Goff, A.K. & Smith, L.C. (1995) Protein synthesis patterns in nuclear transfer, parthenogenetically activated and IVF bovine embryos during early development. *Theriogenology.* **43**, 361.
80. Dyban, A.P., Lee, K., O'Neill, G.T., Speirs, S. & Kaufman, M.H. (1988) Cytogenetic study of silver-staining NOR in 8-cell stage mouse blastomeres fused to 1-cell stage embryos. *Development* **104**, 453-463.
81. Van Stekelenburg-Hamers, A.E.P., Rebel, H.G., Van Inzen, W.G., De Loos, F.A.M., Drost, M., Mummery, C.L., Weima, S.M. & Trouson, A.O. (1994) Stage specific appearance of the

- mouse antigen TEC-3 in normal and nuclear transfer bovine embryos: reexpression after nuclear transfer. *Mol. Reprod. Dev.* **37**, 27-33.
82. Cheong, H.T., Takahashi, Y. & Kanagawa, H. (1993) Birth of mice after transplantation of early cell-cycle -stage embryonic nuclei into enucleated oocytes. *Biol. Reprod.* **48**, 958-963.
 83. Stice, S.L., Keefer, C.L. & Matthews, L. (1994) Bovine nuclear transfer embryos: oocyte activation prior to blastomere fusion. *Mol. Reprod. Dev.* **38**, 61-68.
 84. Longo, F. (1985) Pronuclear events during fertilization. In: *Biology of Fertilization* (Metz CB and Monroy A eds). Vol 3, pp 251-298. Academic Press, Orlando, FL.
 85. Poccia, D. (1986) Remodelling of nucleoproteins during gametogenesis, fertilization and early development. *Int. Rev. Cytol.* **105**, 1-65.
 86. Zirkin, B.R., Perreault, S.D. & Naish, S.J. (1989) Formation and function of the male pronucleus during mammalian fertilization. In: *The molecular biology of fertilization* (Schatten H and Schatten G eds). Academic Press Inc; pp 91-114.
 87. Perreault, S.D. (1992) Chromatin remodeling in mammalian zygotes. *Mutation Res.* **269**, 43-55.
 88. Tarkowski, A.K. & Balakier, H. (1980) Nucleo- cytoplasmic interactions in cell hybrids between mouse oocytes, blastomeres and somatic cells. *J. Embryol. Exp. Morph.* **55**, 319-330.
 89. Szöllösi, D., Czolowska, R., Soltynska, M.S., Tarkowski, A.K. (1986). Remodelling of thymocyte nuclei in activated mouse oocytes: an ultrastructural study. *Eur. J. Cell Biol.* **42**, 140-151.
 90. Naish, S.J., Perreault, S.D., Foehner, A.L. & Zirkin, B.R. (1987) DNA synthesis in the fertilizing hamster sperm nucleus: sperm template availability and egg cytoplasmic control. *Biol. Reprod.* **36**, 245-253.
 91. Davidson, E.H. (1986) Gene activity in early development. Third edition. Academic Press Inc. (London).
 92. Diffley, J.F.X. & Stillman, B. (1990) The initiation of chromosomal DNA replication in eukaryotes. *TIG* **6**, 427-432.
 93. Briggs, R., Signoret, J. & Humphrey, R.R. (1964) Transplantation of nuclei of various cell types from neurulae of the Mexican axolotl (*Ambystoma mexicanum*). *Dev. Biol.* **10**, 233-246.
 94. Gurdon, J.B. (1964) The transplantation of living cell nuclei. *Adv. Morphol.* **4**, 1-43.
 95. Kelly, T.J., Nurse, P. & Forsburg, S.L. (1993) Coupling DNA replication to the cell cycle. Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology, Volume **LVIII**, 637-644.
 96. Blow, J.J. & Laskey, R.A. (1988) A role for the nuclear envelope in controlling DNA replication within the cell cycle. *Nature* **332**, 546-548.
 97. Cox, L.S. (1992) DNA replication in cell-free extracts from *Xenopus* eggs is prevented by disrupting nuclear envelope function. *J. Cell Sci.* **101**, 43-53.
 98. Leno, G.H., Downes, C.S. & Laskey, R.A. (1992) The nuclear membrane prevents replication of human G2 nuclei but not G1 nuclei in *Xenopus* egg extract. *Cell* **69**, 151-158.
 99. Barnes, F.L., Collas, P., Powell, R., King, W.A., Westhusin, M. & Shepherd, D. (1993) Influence of recipient oocyte cell cycle stage on DNA synthesis, nuclear envelope breakdown, chromosome constitution and development in nuclear transplant bovine embryos. *Mol Reprod. Dev.* **36**, 33-41.
 100. Campbell, K.H.S., Ritchie, W.A. & Wilmot, I. (1993) Nuclear-cytoplasmic interactions during the first cell cycle of nuclear transfer reconstructed bovine embryos: implications for DNA replication and development. *Biol. Reprod.* **49**, 933-942.
 101. Campbell, K.H.S., Loi, P., Cappai, P. & Wilmot, I. (1994) Improved development to blastocyst of ovine nuclear transfer embryos reconstructed during the presumptive s-phase of enucleated activated oocytes. *Biol. Reprod.* **50**, 1385-1393
 102. Collas, P., Basile, J.J. & Robl, J.M. (1992) Influence of cell cycle stage of the donor nucleus on development of nuclear transplant rabbit embryos. *Biol. Reprod.* **46**, 492-500.
 103. Otaegui, P.J., O'Neill, G.T., Campbell, K.H. & Wilmot, I. (1994) *Mol. Reprod. Dev.* **39**, 147-152.
 104. Martínez-Balbás, M.A., Dey, A., Rabindran, S.K., Ozato, K. & Wu, C. (1995) Displacement of sequence-specific transcription factors from mitotic chromatin. *Cell* **83**, 29-38.
 105. Gauthier-Rouviere, C., Cavadore, J.C., Blanchard, J.M., Lamb, N. & Fernandez, A. (1991) p67SRF is a constitutive nuclear protein implicated in the modulation of genes required throughout the G1 period. *Cell Reg.* **2**, 575-588.
 106. Pfeffer, U., Di Vinci, A., Geido, E., Vidali, G. & Giaretti, W. (1991) Cell cycle dependent alterations of chromatin structure in situ as revealed by the accessibility of the nuclear protein AF-2 to monoclonal antibodies. *J. Cellular Phy.* **149**, 567-574.
 107. Campbell, K.H.S., McWhir, J., Ritchie, W.A. & Wilmot, I. (1996) Sheep cloned by nuclear transfer from a cultured cell line. *Nature* **380**, 64-66.
 108. Wilmot, I., Schnieke, A.E., McWhir, J., Kind, A.J. & Campbell, K.H. (1997) Viable offspring derived from fetal and adult mammalian cells. *Nature* **385**, 810-813.