

Salamone, Daniel F. (diciembre 2004). *Clonación de animales de granja : El sueño de todo granjero*. En: Encrucijadas, no. 29. Universidad de Buenos Aires. Disponible en el Repositorio Digital Institucional de la Universidad de Buenos Aires: <<http://repositorioubas.sisbi.uba.ar>>

Clonación de animales de granja

El sueño de todo granjero

Más allá de toda la encarnizada polémica que continuará desarrollándose en torno de esta técnica, la clonación es básicamente un método de reproducción asexual, por el cual se puede duplicar genéticamente un ser vivo. Aplicado a la producción agropecuaria, este procedimiento abre la posibilidad de generar copias de animales particularmente valiosos por la calidad de su carne o de su leche. Pero además, el manejo refinado de la clonación permite la creación de animales transgénicos, que se convierten en verdaderas fábricas vivientes de medicamentos, ya que pueden segregar en su leche diferentes sustancias de interés farmacológico. Y aún más, expertos en biotecnología pronostican que en algunos años podrían obtenerse animales manipulados genéticamente para que sean utilizados como donantes de órganos que no provoquen rechazo en los seres humanos. Nuestro país ha sido uno de los pioneros en el desarrollo y aplicación de este método entre los países periféricos.

Daniel F. Salamone,

Médico veterinario, UBA. MS, PhD, Univ. of Massachusetts.

En este artículo se hará una breve reseña, descripción de los problemas y potencialidades de la clonación en animales de granja. Para una revisión minuciosa es recomendable leer los artículos de Renard et al., 2002 y Dinnyés et al., 2002. Mi experiencia en el área comenzó a gestarse durante el período que va desde 1998 y hasta 2000 cuando fui a realizar mis estudios de doctorado en la Universidad de Massachusetts (UMass). Habían actuado como imán para mi nuevo destino de estudio, el excelente desempeño científico del Profesor de dicha casa el Dr. Rafael Fissore, quien había sido compañero mío durante la carrera de médico veterinario en la UBA, así como el nacimiento de Charly y George, los primeros animales clonados y transgénicos producidos por el equipo integrado por el argentino José Cibelli, quien era allí entonces estudiante de doctorado. Su director, el Dr. Jim Robl, había sido quien 12 años antes reportara la primera clonación en bovinos a partir de células embrionarias, y era uno de los mayores especialistas mundiales en el área. La oveja Dolly que había nacido recientemente invitaba a imaginar el potencial de la técnica de clonación en producción animal. Estar en la UMass amalgamaba la posibilidad de estar próximo a un grupo de excelentes profesionales, en un momento en que el tema era realmente candente. Fue también interesante seguir el surgimiento de numerosas compañías formadas por profesores y estudiantes de dicha universidad que intentaban el desafío nada fácil de tornar ciencia en negocios.

Durante esos años la empresa de biotecnología de capitales nacionales "Biosidus", en trabajos en conjunto con el Dr. J Lino Barañao, había intentado cristalizar un "Tambo Farmacéutico" utilizando la técnica de microinyección de ovocitos recién fertilizados para generar los animales transgénicos. Como en la mayor parte del mundo, esta técnica se mostraba ineficiente y esquiva para obtener resultados deseados. El Dr. J Lino Barañao acertadamente sugirió reencauzar el proyecto hacia la clonación y transgénesis, entusiasmándome para que me sumara al esfuerzo de dicho equipo de trabajo. En un trabajo pionero en Argentina, logramos en un tiempo récord generar gran número de clones bovinos, algunos de ellos transgénicos, los cuales fueron sucesivamente

multiplicados por clonación obteniendo a partir de estos últimos una segunda generación de animales clonados y transgénicos (Salamone et al., 2003).

Esto nos dio la confianza suficiente para emprender un proyecto de investigación en el área en el marco del sector público. Gracias a la gestión del decano de la Facultad de Agronomía de la UBA y de un crédito FOMEC se pudo montar un laboratorio a full de clonación animal en dicha facultad. Sumado a esto, se obtuvo la financiación de la Agencia de Investigaciones Científicas a través de un PICT 2002, el cual fue presentado en conjunto con el grupo del INTA de Bariloche en colaboración con el Dr. Alejandro Gibbons. Este proyecto tiene como objetivo realizar experiencias destinadas a mejorar los resultados de la clonación en cabras y ovejas.

La utilización de animales para la producción de bienes y servicios comenzó con los mismos inicios de la civilización. Por milenios, la estrategia usada para incrementar las características productivas de los animales fue la selección y reproducción de los individuos que despertaban mayor interés por sus características productivas o estéticas. Se usaba la variación genética causada por mutaciones al azar y seguida por la propagación de los animales con genes de interés a través de la reproducción sexual, con la inevitable falta de predictibilidad causada por la combinación aleatoria de características maternas y paternas.

Desde hace unas pocas décadas, con el advenimiento de la biología molecular, ha sido posible la introducción y/o eliminación de genes que inducen a modificaciones beneficiosas para la producción animal (resistencia a enfermedades, mayor eficiencia en la obtención de energía, etc.) y crear fenotipos totalmente novedosos. Con la clonación se ha facilitado y multiplicado el número de estos animales y también se ha permitido propagar esta información genética a través de la realización de copias idénticas de un mismo ejemplar por la reproducción asexual.

El principio básico del trasplante o la transferencia nuclear consiste en remover el núcleo de un ovocito maduro no fertilizado, el cual se denomina "ovocito recipiente", y transferirle el núcleo de una célula llamada "donante". El ovocito recipiente brindará el ambiente necesario para que el núcleo de la donante se transforme y exprese los genes de un embrión así como los elementos necesarios para que se produzcan las primeras divisiones celulares del cigoto (óvulo fecundado). Pero la célula donante dará la mayor parte de la información genética al embrión reconstituido.

La extracción del núcleo del ovocito se realiza generalmente por aspiración mediante observación microscópica y con pipetas diminutas manejadas a través de precisos micromanipuladores. Seguidamente se coloca la célula donante en perfecto contacto con la membrana del ovocito para fusionar ambas células por medio de un pulso eléctrico. Como el tamaño del citoplasma del ovocito enucleado es mayor que aquel de la célula somática, los constituyentes de las células somáticas son diluidos. Durante años se había pensado que el núcleo de la célula tenía la capacidad de controlar la función celular y que los cambios producidos durante el desarrollo embrionario y/o fetal determinaban para siempre el futuro de toda célula. Se consideraba que si una célula se diferenciaba a un tipo celular determinado lo hacía sin posibilidad de volver a un estado indiferenciado. Ahora, por la clonación, se sabe que el estado de diferenciación de una célula es reversible, el núcleo puede "reprogramarse" y a partir de una sola célula adulta se puede producir un individuo adulto.

Hitos en la clonación

La metodología para clonación por trasplante nuclear en mamíferos fue desarrollada en el ratón en los años '80 usando como donante células de embriones denominadas "blastómeros", pero los resultados en esta especie fueron desalentadores. Sin embargo, Willadsen en 1986, usando como donante blastómeros de embriones tempranos ovinos, produjo los primeros corderos clonados. Un año después, Robl et al., 1987, con el mismo tipo de células donante produjeron los primeros terneros clonados. La técnica de clonado con células embrionarias, si bien permitía obtener varias copias idénticas del mismo animal, no logró tener gran aceptación en la producción agropecuaria debido a numerosos factores. Entre ellos, el hecho de que se debe trabajar con células embrionarias cuyo mérito genético es desconocido y que los embriones tempranos tienen un reducido número de células difíciles de mantener in vitro. Así, el entusiasmo inicial fue disminuyendo y prácticamente ninguna compañía estaba usando esta técnica comercialmente hasta que Wilmut et al. (1997) publicaron el nacimiento de la oveja Dolly. Este animal fue producido por clonación de células de un animal adulto. Seguidamente, dos trabajos de los grupos del Instituto de Roslin (Schnieke et al., 1997) en ovinos y de la Universidad de Massachusetts en bovinos, en el cual participó el médico veterinario argentino José Cibelli (Cibelli et al., 1998), demostraron que por clonación también era posible producir animales transgénicos usando células fetales transfectadas como donante. Demostrándose que la técnica de trasplante nuclear es extremadamente eficiente para producir animales transgénicos. El motivo por el cual se utilizaron las células fetales fue que las mismas pueden multiplicarse in vitro por períodos más prolongados que las adultas, lo que permite realizar modificaciones genéticas con mayor facilidad y además un mayor número de clones llega a término y sobrevive luego del nacimiento (Heyman et al., 2002).

Wakayama et al., 1998 repitió los resultados de clonación con animales adultos y produjo numerosos ratones clonados utilizando como donantes células del cúmulus (células que rodean al ovocito). Investigadores japoneses tuvieron aun resultados más alentadores dado que produjeron varias terneras clonadas a partir de adultos usando también células del cúmulus (Kato et al., 1999). Dado que las células donantes utilizadas inicialmente por muchos investigadores habían sido provenientes de hembras, nadie había producido machos por clonación a partir de animales adultos hasta que se logró en el ratón (Wakayama and Yanagimachi, 1999).

Los telómeros, que son la parte extrema de los cromosomas, de la primera oveja clonada, Dolly, eran más cortos y no se correspondían con la edad real de Dolly sino con la edad de la célula donante (Ashworth et al., 1998). En otras palabras, sus telómeros eran los de una oveja varios años más vieja que la que correspondía a la edad de Dolly. Los telómeros se van acortando cada vez que las células se dividen llegando hasta un determinado tamaño, a partir del cual las células no se dividen más. Normalmente este mecanismo protege al organismo de que se multipliquen en exceso células potencialmente peligrosas. Sin embargo, investigadores de la compañía ACT con base en Massachusetts han demostrado exactamente lo contrario (Lanza et al., 2000), y por clonación podrían elongarse los telómeros y en términos celulares rejuvenecer las células. En el ámbito nacional fue desarrollada participando en el proyecto "Tambo Farmacéutico" del laboratorio Biosidus y más recientemente en un proyecto financiado por la Facultad de Agronomía de la UBA y la Agencia de Investigaciones Científicas a través de un PICT 2002 y realizado en conjunto con personal del INTA de Bariloche destinado a mejorar los resultados de la clonación en cabras y ovejas. Parte de los resultados en bovinos han sido publicado como resúmenes (Salamone et al 2003, 2004, 2005).

¿Cómo clonar?

Todas las células somáticas del mismo individuo tienen la misma información genética y se reproducen in vitro con gran facilidad. De una pequeña porción de tejido animal inferior al tamaño de una moneda pueden aislarse y cultivarse células. Comúnmente para el cultivo se utiliza una placa de Petri, las células se multiplican formando una monocapa, es decir una capa única de células sobre toda la superficie, que progresivamente llenará la placa tomando cada célula contacto con otra. Cuando esto sucede se dice que las células han alcanzado confluencia. En el momento de la confluencia, una placa de 12 cm de diámetro puede contener entre 5 a 10 millones de células. En este estado, las células pueden desprenderse unas de otras y de la placa por un tratamiento enzimático con tripsina y pueden replaquearse a menor concentración y por ende en un número mayor de placas. Este procedimiento puede repetirse sucesivamente y luego de pocas semanas se pueden generar decenas de placas confluentes de células somáticas. Debido a que para el trasplante nuclear se requiere sólo una célula para generar un embrión, teóricamente pueden producirse grandes cantidades de animales idénticos no siendo el recurso genético la limitante.

La obtención de ovocitos recipientes puede realizarse de ovarios de animales que se sacrifican para consumo como en el caso de los bovinos que se obtienen en el matadero local. En general, los ovarios se llevan al laboratorio en solución fisiológica a 30°C. Los ovocitos en conjunto con las células que lo rodean denominadas células del cúmulus se obtienen por aspiración folicular negativa con una aguja conectada por una tubuladura a un tubo de ensayo plástico. En las experiencias que realizamos en ovinos y caprinos en conjunto con el grupo del Dr Gibbons del INTA de Bariloche, dado que es más difícil encontrar frigoríficos que sacrifiquen un número adecuado de animales de estas especies hemos optado por la recuperación por laparoscopia de los ovocitos a partir de animales vivos, los cuales luego se reutilizan.

Antes de utilizar los ovocitos deben separarse las células del cúmulus que están rodeando al ovocito. Esto se hace por utilización de un equipo denominado vortex que genera vibraciones de alta frecuencia, los ovocitos-células del cúmulus se colocan en un tubo ensayo en medios adecuados con el agregado de una enzima denominada hialuronidasa que disgrega la sustancia intercelular amorfa que se encuentra entre estas células. Como en las especies domésticas de granja no suele verse el núcleo debido al alto contenido lipídico del ovocito, es necesario teñirlo con un colorante para ADN. El colorante vital utilizado es el Hoechst 33342 y cuando el ovocito recibe luz en el microscopio su núcleo se observa de color azul brillante.

La mayor parte de los grupos que realizan la técnica de clonación utilizan micromanipuladores. Estos son dispositivos mecánicos o electrónicos que se acoplan a microscopios especiales. Los micromanipuladores en uno de sus extremos contienen joysticks o tornillos en los que el operador puede ejercer movimientos manuales, los cuales se trasladaran a movimientos suaves del orden de micras al otro extremo. En este último extremo se acoplan dos micropipetas, una de bordes redondeados que sostendrá al ovocito (micropipeta de sujeción) y otra más delgada, con bisel y de bordes cortantes para aspirar y/o inyectar la célula donante. Estas micropipetas están unidas por una larga tubuladura plástica a jeringas, las cuales pueden ejercer una presión negativa o positiva. Es decir que el movimiento tridimensional de las micropipetas esta dado por manipulación de joysticks o tornillos y la sujeción, aspiración e inyección por movimientos en las jeringas.

La extracción del núcleo del ovocito se realiza sosteniéndolo con la pipeta de sujeción y aspirando el núcleo con la otra micropipeta.

En el trasplante nuclear propiamente dicho el núcleo se introduce con la micropipeta y se incorpora la célula completa, debajo de la zona pellucida en contacto con la célula enucleada (sin núcleo). Luego se realiza la fusión por un pulso eléctrico. El pulso eléctrico causa una rotura transitoria de las membranas a fusionar y dado que éste es de muy corta duración, esta rotura es reparada rápidamente, pero si ambas membranas están en perfecta oposición se forman pequeños canales entre ambas células. Debido a la inestabilidad termodinámica, estas pequeñas aberturas se hacen mayores y las dos células se transforman en una luego de un cierto período de tiempo.

En la reproducción sexual, el núcleo del ovocito madurado in vitro, normalmente luego de la primera división meiótica se detiene en el estadio de metafase II, hasta el momento de ser fertilizado por un espermatozoide. Luego de la fertilización será el espermatozoide mediante un proceso denominado "activación" quien inicie una serie de duplicaciones sucesivas del ADN y divisiones celulares. En la clonación, la activación debe ser realizada artificialmente por la aplicación de diversos métodos químicos o físicos. Una posibilidad es inducir la activación con ionomicina por cuatro minutos. Esta crea poros que permiten la brusca entrada de calcio en la célula, seguido por tres horas de incubación en una droga cuyas siglas son DMAP (Susko-Parrish et al., 1994) y cuya función es reducir la actividad de ciertos complejos proteicos. La combinación de ambas mimetiza un compuesto recientemente aislado del espermatozoide que induce la síntesis de ADN y la división embrionaria.

Finalmente se necesitará reintroducir el embrión en un animal que lo gestee y como es más fácil introducir embriones en el útero que en trompas de Falopio, en general se cultiva el embrión hasta el estadio de blastocisto, el cual ya se puede introducir en el útero y exitosamente generar una preñez. Para cultivar in vitro un embrión es necesario contar con incubadoras que no sólo den la temperatura adecuada, sino que mantengan una mezcla de gases y una humedad apropiada. En general, los embriones se colocan en pocillos plásticos en medio de cultivo cubiertos por aceite mineral. Este último evita tanto los cambios de osmolaridad del medio, como la contaminación y los cambios bruscos de la composición gaseosa en el medio. Se cultivan por 5-7 días dependiendo de la especie, de manera tal que los embriones puedan ser implantados en forma no quirúrgica en una vaca receptora previamente sincronizada a la edad del embrión o en forma laparoscópica en una cabra o una oveja.

El desarrollo fetal debe evaluarse reiteradamente debido a las constantes pérdidas fetales, de manera de optimizar el uso de los animales receptores.

Algunos de los grandes problemas del clonado, inicialmente descritos en los trabajos de neocelandeses y japoneses (Wells et al., 1999; Kato et al., 1999), siguen siendo las numerosas pérdidas durante la preñez como así la alta mortalidad perinatal, que fuerza a cuidados intensivos de los recién nacidos. La causa aparente de este problema al menos en parte se debe a anomalías placentarias. Una de las hipótesis es que la expresión de los genes de los animales clonados es incorrecta y que la célula donante fue reprogramada ineficientemente por el ovocito enucleado.

Problemas, presente y futuro de la técnica

Muchos autores, incluyendo nuestros propios trabajos, describen alto número de pérdidas fetales y mortandad perinatal de los terneros producidos por clonación. En nuestra experiencia, el primer bovino producido murió en el parto, demostrando la necesidad de incrementar los cuidados intensivos de los recién nacidos.

En la Argentina se han adoptado muchas de las llamadas “Biotecnologías de la Reproducción” con relativa rapidez, tanto por la acción de profesionales de la actividad privada como la realizada por investigadores de organismos oficiales. Prueba de esto es la realización en 1978 de las primeras transferencias quirúrgicas de embriones por el Dr. Rodríguez Dubra y colaboradores, los primeros nacimientos por fertilización in vitro (Salamone et al. 1995), las preñeces (Salamone et al. 2003) y nacimiento de terneras por clonación y transgénesis incluyendo la generación de clones de clones (Salamone et al. 2004). Todos estos hechos fueron producidos pocos años después de generadas estas tecnologías en los países desarrollados y siendo Argentina pionera en relación con otros países del tercer mundo. Lo que nos permite ser optimistas respecto a las posibilidades futuras para el desarrollo y aplicación de estas técnicas en nuestro país.

El clonado de animales ha tenido un progreso tan vertiginoso y un interés general tan grande que ha sido fácil seguir su evolución por los medios de divulgación masiva. Sin embargo, ha prevalecido el enfoque alarmista debido a su potencial aplicación en humanos. Por el contrario, es mi opinión que esta técnica ayudará a generar conocimientos básicos para descubrir las bases de la totipotencialidad celular y la rediferenciación de los tejidos, permitiendo su aplicación terapéutica, para regenerar tejidos lesionados, incluyendo el tejido nervioso, y el pancreático entre otros. La metodología basada en la transfección de cultivos celulares y posterior trasplante nuclear permite aumentar la eficiencia en la producción de animales de granja transgénicos. La aplicación más inmediata es la producción de proteínas recombinantes en leche, de hecho ya hemos producido exitosamente ovinos transgénicos que expresan hormona del crecimiento humano en su leche a niveles insospechados altos. Estas hormonas podrán utilizarse para tratar a las personas que sufren la enfermedad del enanismo. Los animales que actuaron como biorreactores se generaron a partir de líneas celulares que fueron transfectadas con una construcción genética con el gen humano de la hormona del crecimiento y un promotor que induce la expresión de dicho gen en la glándula mamaria en lactancia. A partir de esta línea se realizó la clonación generando estos animales transgénicos.

A la pregunta ¿cuáles serán sus aplicaciones agropecuarias en nuestro sistema de producción? La respuesta es que están libradas a nuestra capacidad de imaginación e innovación. La aplicación más inmediata será la multiplicación de rodeos de elite. La utilización de animales clonados facilitará la producción y difusión de animales transgénicos. Por ejemplo, existe interés en Europa en reemplazar el gen PrP que torna a los bovinos susceptibles al virus de la vaca loca por otro que le otorgue mayor resistencia. Numerosas compañías ya han producido animales transgénicos y clonados especialmente expresando nuevas proteínas en leche de valor farmacéutico (Baguisi et al., 1999; Salamone et al. 2003). La producción de órganos y tejidos animales humanizados para ser utilizados en trasplante ha despertado también un interés enorme. Esto implicará la expresión de ciertas proteínas humanas y el silenciamiento de algunas proteínas de origen animal. Todo esto indica la enorme potencialidad de esta técnica y el futuro desarrollo que pueda alcanzar en nuestro país.

Agradecimientos

Al Ingeniero Agrónomo Fernando Villela por permitir concretar en realidad mi sueño de volver a trabajar en la Argentina en la actividad académica. Al Dr. Lino Barañao por su constante inspiración y apoyo. A la empresa Biosidus por hacerme participe en el proyecto "Tambo Farmacéutico". A mi equipo de trabajo de la UBA por permitirme tener sueños aún pendiente.

Bibliografía

- Ashworth, D., Bishop, M., Campbell, K., Colman, A., Kind, A., Schnieke, A., Blott, S., Griffin, H., Haley, C., McWhir, J., and Wilmut, I. 1998. DNA microsatellite analysis of Dolly. *Nature* 394, 329.
- Baguisi, A., Behboodi, E., Melican, D. T., Pollock, J. S., Destrempe, M. M., Cammuso, C., Williams, J. L., Nims, S. D., Porter, C. A., Midura, P., Palacios, M. J., Ayres, S. L., Denniston, R. S., Hayes, M. L., Ziomek, C. A., Meade, H. M., Godke, R. A., Gavin, W. G., Overstrom, E. W., and Echelard, Y. 1999. Production of goats by somatic cell nuclear transfer. *Nat Biotechnol* 17, 456-61.
- Cibelli, J. B., Stice, S. L., Golueke, P. J., Kane, J. J., Jerry, J., Blackwell, C., Ponce de Leon, F. A., and Robl, J. M. 1998. Cloned transgenic calves produced from nonquiescent fetal fibroblasts [see comments]. *Science* 280, 1256-8.
- Dinnyés A, De Sousa P., King T., and Wilmut I. 2002. Somatic Cell Nuclear Transfer: Recent Progress and Challenges *Cloning and Stem Cells* 4: 81-90.
- Forsberg EJ, Strelchenko N.S., Augenstein M.L, Betthausen J.M., Childs L.A., Eilertsen K.J., Enos J.M., Forsythe T.M., Golueke P.J., Koppang R.W., Lange G., Lesmeister T.L., Mallon K.S., Mell G.D., Misica P.M., Pace M.M., Pfister-Genskow M., Voelker G.R., Watt S.R., y Bishop. 2002. Production of Cloned Cattle from In Vitro Systems *Biol Reprod* 67, 327–333 .
- Kato, Y., Yabuuchi, A., Motosugi, N., Kato, J., and Tsunoda, Y. 1999. Developmental potential of mouse follicular epithelial cells and cumulus cells after nuclear transfer. *Biol Reprod* 61, 1110-4.
- Y. Heyman, Chavatte-Palmer P., LeBourhis D., Camous S., Vignon X., and Renard J.P. 2002. Frequency and Occurrence of Late-Gestation Losses from Cattle Cloned Embryos. *Biol Reprod* 66: 6-13.
- Lanza, R. P., Cibelli, J. B., Blackwell, C., Cristofalo, V. J., Francis, M. K., Baerlocher, G. M., Mak, J., Schertzer, M., Chavez, E. A., Sawyer, N., Lansdorp, P. M., and West, M. D. 2000. Extension of cell life-span and telomere length in animals cloned from senescent somatic cells. *Science* 288, 665-9.
- Renard J. P., Zhou Q, LeBohurgis D, Chavatte-Palmer, I Hue, Y Heyman and Vignon X. 2002. Nuclear Transfer Technologies: Between successes and doubts *Theriogenology* 57: 203
- Robl, J. M., Prather, R., Barnes, F., Eyestone, W., Northey, D. Gilligan, B., and First, N. L. 1987. Nuclear transplantation in bovine embryos. *J Anim Sci* 64, 642-7.
- Salamone D. F., Adams G.P. and Mapletoft R.J. 1999. Changes in Bovine Cumulus-Oocyte Complex Morphology and Oocyte Developmental Competence in Subordinate Follicles During the Different Phases of Follicle Wave. *Theriogenology*, (52)4: 549-561.
- Salamone D. F., Damiani P., Fissore R. A., Robl J. M. and Duby R. T. 2001. Ooplasmic and Nuclear Maturation of Calf Oocytes: Assessment By Biochemical And Nuclear Transfer Approach. *Biology of Reproduction*, Junio, 64:1761-1768
- Salamone D. F., Santos C. B., Barañao J. L., Bussmann L., Artuso J., Valdez A., Munar C., Werning C. and Melo C. 2003. Effect of different culture systems, donor cell origin and roscovitin treatment of recipient oocytes in bovine cloning. *Theriogenology* 59: 285.
- Salamone D. F., Valdez A. y Barañao J. L. 1995. Producción de los Primeros Terneros Nacidos en la Argentina Por Maduración Y Fertilización In Vitro de Ovocitos Recuperados de Animales Sacrificados para Consumo. Seminario Internacional de Embriones

Biotecnología y Tecnologías Avanzadas. 4-5 Mayo Montevideo. Uruguay.

- Schnieke, A. E., Kind, A. J., Ritchie, W. A., Mycock, K., Scott, A. R., Ritchie, M., Wilmut, I., Colman, A., and Campbell, K. H. 1997. Human factor IX transgenic sheep produced by transfer of nuclei from transfected fetal fibroblasts. *Science* 278, 2130-3.
- Susko-Parrish J.L., Leibfried-Rutledge M.L., Northe D.L., Schutzhus V., First N.L. 1994. Inhibition of protein kinase after an induced calcium transient causes transition of bovine oocytes to embryonic cycles without meiotic completion. *Dev Bio*; 166:729-739.
- Wakayama, T., Perry, A. C., Zuccotti, M., Johnson, K. R., and Yanagimachi, R. (1998). Full-term development of mice from enucleated oocytes injected with cumulus cell nuclei [see comments]. *Nature* 394, 369-74.
- Wakayama, T., and Yanagimachi, R. (1999). Cloning of male mice from adult tail-tip cells [news]. *Nat Genet* 22, 127-8.
- Wells, D. N., Misica, P. M., and Tervit, H. R. (1999). Production of cloned calves following nuclear transfer with cultured adult mural granulosa cells. *Biol Reprod* 60, 996-1005.
- Wilmut, I., Schnieke, A. E., McWhir, J., Kind, A. J., and Campbell, K. H. (1997). Viable offspring derived from fetal and adult mammalian cells [see comments] [published erratum appears in *Nature* 1997 Mar 13;386(6621):200]. *Nature* 385, 810-3.