

Biotécnicas reproductivas en la especie porcina: pasado, presente y futuro

MARINONE, A.I.¹; KAISER, G.²; HOZBOR, F.²; MUCCI, N.²

RESUMEN

Argentina posee condiciones agroecológicas y sanitarias ideales para la producción de cerdos. Hasta 1990, la producción porcina en Argentina era realizada como actividad secundaria dentro de la explotación agropecuaria. Sin embargo, a partir del 2005 el número de cabezas porcinas comenzó a aumentar alcanzado los 3 millones, y creció sostenidamente llegando actualmente a los 4,9 millones de cabezas. Además de ser importante desde el punto de vista productivo, la especie porcina también es considerada como modelo esencial en distintos tipos de investigaciones biomédicas, y como potencial donante de órganos para humanos. El interés combinado en la biotecnología porcina, tanto por el campo biomédico como por la industria porcina, incrementa la necesidad de un mayor desarrollo de nuevas tecnologías, así como de un aumento en la mejora e implementación de las ya existentes. El objetivo de este trabajo es hacer una revisión de las principales biotécnicas reproductivas *in vitro* aplicadas en la especie porcina, así como también de las nuevas metodologías de edición génica, las cuales pueden ser utilizadas no solo para el mejoramiento productivo y genético de esta especie, sino también para investigaciones relacionadas con el modelo de enfermedades humanas y xenotrasplantes.

Palabras clave: porcino, biotecnología, reproducción, *in vitro*, edición génica.

ABSTRACT

*Argentina has ideal agro-ecological and sanitary conditions for pig breeding. Until 1990, porcine production was carried out as a secondary activity within the agricultural fields. However, in 2005 the number of pigs began to increase and reached 3 million heads. Currently the porcine stock in Argentina is represented by 4.9 million heads. In addition to being important from a productive point of view, the porcine species are also essential biological models for different types of biomedical research and as potential donor of organs for humans. The combined interest in porcine biotechnology, both in the biomedical field and in the pig industry, increases the need for further development of new technologies as well as an increase in the improvement and implementation of the already existing ones. The objective of this work is to make a review of the main *in vitro* reproductive biotechnologies applied in pigs, as well as of the new gene editing tools, which can be used not only for the production and genetic improvement of this species, but also for researches related to the human disease modeling and xenotransplantation.*

Keywords: porcine, biotechnology, reproduction, *in vitro*, gene editing.

¹Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET), Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria (INTA), Estación Experimental Agropecuaria (EEA) Balcarce, Laboratorio de Biotecnología de la Reproducción, Balcarce, Ruta 226 km 73,5 (7620), Buenos Aires, Argentina. Correo electrónico: marinone.anaines@inta.gob.ar

²Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria (INTA), Estación Experimental Agropecuaria (EEA) Balcarce, Laboratorio de Biotecnología de la Reproducción, Balcarce, Ruta 226 km 73,5 (7620), Buenos Aires, Argentina.

PRODUCCIÓN PORCINA EN ARGENTINA

Nuestro país se caracteriza por su amplia disponibilidad de superficie terrestre y por poseer condiciones agroecológicas propicias que le permiten ser un gran productor de cereales y oleaginosas. En la producción porcina argentina, el rubro alimentación impacta en el costo de producción entre el 60% y el 80%, valores similares a los demás países productores del mundo. Sin embargo, la mayoría de los ellos son altamente dependientes de la importación de granos y los costos de mano de obra son superiores, posicionando a la Argentina como uno de los países de menor costo en la producción de cerdos. A su vez, nuestro país se ve beneficiado debido a que se encuentra libre del Síndrome Respiratorio y Reproductivo Porcino (PRSS), enfermedad presente en los principales países productores y exportadores de cerdo y causal de significativas pérdidas económicas en la producción primaria de esta especie. Sumado a esto, contamos con tecnología disponible, genética de primer nivel y profesionales capacitados y especializados en producción porcina (Papotto, 2006).

Hasta 1990 la producción de cerdos en Argentina era realizada como actividad secundaria dentro de la explotación agropecuaria, principalmente realizada por pequeños productores localizados en zonas donde el cultivo de maíz (principal insumo) era preponderante. En la década de 1990 hubo una fuerte incorporación tecnológica, de la mano de inversiones del orden de los 120 millones de dólares, principalmente en granjas de alta productividad. Sin embargo, la rentabilidad productiva fue nula, debido principalmente al tipo de cambio fijo y la fuerte competencia de carne porcina y subproductos provenientes desde el exterior, principalmente de Brasil. Esto contribuyó a que, durante esa década, el stock porcino se redujera a la mitad, pasando de 4 a 2 millones de cabezas. Luego de la salida de la convertibilidad en 2002, se vislumbró una clara recuperación de la actividad porcina. A partir de 2005, el stock comenzó a recuperarse alcanzando los 3 millones de cabezas, los cuales se mantuvieron constantes hasta 2010. Desde 2010 en adelante el stock creció a una tasa del 8% interanual, alcanzando en 2016, los 4,9 millones de cabezas y una cantidad de madres en estrato comercial que alcanza a 949.825 cabezas. Una de las razones de este crecimiento fue el incremento del consumo de la carne de cerdo en el mercado interno. Con respecto a la distribución del stock nacional por provincia, más del 63% de la población de porcinos se concentra en la región Centro; principalmente en Buenos Aires, Córdoba y Santa Fe (Ministerio de Hacienda y Finanzas Públicas, 2016).

En cuanto a los sistemas de producción, el sector vivió en los últimos años un proceso de transformación. Si bien los sistemas de producción de pequeña y mediana escala productiva (10 a 200 madres) son los que prevalecen en el país, se ha producido un importante aumento en el número de productores que a partir de estratos de 100 madres han confinado parte o totalmente sus animales, convirtiéndose en empresas tecnificadas de mayor eficiencia productiva. También se ha observado en estos últimos años la instalación de megaempresas con un alto grado de tecnificación

de índices productivos equiparables a los sistemas más eficientes a nivel mundial (Brunori, 2014).

Los cerdos, además de ser animales importantes desde el punto de vista productivo, también son considerados modelos biológicos esenciales en distintos tipos de investigaciones biomédicas (Kirk, 2003; Prather *et al.*, 2003; Kues y Niemann, 2004; Vodicka *et al.*, 2005; Lunney, 2007; Swindle, 2007; Vajta *et al.*, 2007; Zhou *et al.*, 2015). Debido a los avances tecnológicos en modificaciones genéticas y clonación mediante la transferencia de células somáticas (SCNT), el rango de aplicaciones de los modelos porcinos se ha incrementado marcadamente (Cabot *et al.*, 2001; Park *et al.*, 2001; Dai *et al.*, 2002; Lai *et al.*, 2002; Phelps *et al.*, 2003; Kolber-Simonds *et al.*, 2004; Matsunari *et al.*, 2008; Huang *et al.*, 2014; Zhou *et al.*, 2015).

La escasez de órganos humanos para realizar trasplante y el aumento en su demanda han motivado en los últimos años un interés particular por el desarrollo de líneas de investigación relacionadas con el trasplante de órganos entre especies distintas (xenotrasplantes), señalándose en particular al cerdo como potencial donante para humanos (Klymiuk *et al.*, 2010; Flisiokowska *et al.*, 2013). Los cerdos representan un modelo biológico de elección en medicina humana debido a que existen muchas similitudes entre ambas especies, tanto en tamaño corporal, anatomía, dieta y sus respuestas fisiológicas y fisiopatológicas. Además, ofrecen la posibilidad de ser criados bajo las más altas normas de higiene y, debido a su alta fertilidad y prolificidad, pueden producir un gran número de descendientes. (Niemann y Rath, 2001).

El interés combinado en la biotecnología porcina, tanto por el campo biomédico como por la industria porcina *per se* incrementa la necesidad de un mayor desarrollo de nuevas tecnologías, así como de un aumento de mejora e implementación de las ya existentes.

Las biotécnicas reproductivas *in vitro* disponibles en la especie porcina son la producción *in vitro* de embriones por fecundación *in vitro* (FIV), inyección intracitoplasmática de espermatozoides (ICSI) y clonación por transferencia nuclear de células somáticas (SNCT). El objetivo de este trabajo es hacer una revisión de las principales biotécnicas reproductivas *in vitro* aplicadas en la especie porcina, las que sumadas a herramientas de edición génica constituyen las bases para el mejoramiento productivo y genético de esta especie, y para investigaciones relacionadas con el modelo de enfermedades humanas y xenotrasplantes.

PRODUCCIÓN *IN VITRO* DE EMBRIONES

La producción *in vitro* (PIV) de embriones porcinos ha sido de particular interés para los investigadores durante muchos años (Gil *et al.*, 2010). Este proceso incluye tres etapas tecnológicas que, en orden cronológico, son: (1) la maduración *in vitro* (MIV) de ovocitos inmaduros obtenidos de ovarios derivados de mataderos, (2) fecundación *in vitro* (FIV) de ovocitos madurados y (3) cultivo *in vitro* (CIV) de cigotos. Estos tres pasos comprenden un conjunto complejo de pro-

cesos fisiológicos, en el que cada uno condiciona *per se* el éxito o el fracaso de la siguiente etapa (Yoshioka, 2011).

El éxito de la PIV a gran escala de embriones porcinos puede proporcionar embriones viables de manera más eficiente, con menos costo y en menor tiempo en comparación con la recolección quirúrgica de embriones obtenidos *in vivo* de cerdas. Además, dado que los ovarios porcinos contienen grandes cantidades de folículos (Gruppen *et al.*, 1995), podrían proporcionar un gran número de ovocitos y posteriormente embriones viables. La producción de un gran número de embriones puede beneficiar a la investigación en distintas áreas, como el estudio de los factores que controlan el desarrollo embrionario temprano, y que inciden en alta tasa de mortalidad embrionaria temprana en esta especie. Debido a que esto último ocasiona grandes pérdidas económicas (Día, 2000), el resultado de estas investigaciones podría generar un aumento de la eficiencia y de la producción de carne (Day, 2000, Gil *et al.*, 2010).

Aunque se han logrado avances en las técnicas de PIV embriones en la especie porcina, el uso de embriones porcinos producidos *in vitro* es limitado en sistemas de producción comercial por lo que su aplicación no ha producido grandes cambios en términos económicos y técnicos (Nagai *et al.*, 2006; Gajda, 2009; Dang-Nguyen *et al.*, 2011; Yoshioka, 2011; Zhang *et al.*, 2012). Los embriones producidos *in vitro* sufren una alta tasa de pérdida durante el desarrollo temprano, ya que aproximadamente el 10-15% de estos se detienen en mitosis en la etapa de 2 a 4 células (Jeon *et al.*, 2011). Al igual que en otras especies, los embriones PIV de porcino son generalmente menos viables que sus contrapartes producidas *in vivo* (Dang-Nguyen *et al.*, 2011; Yoshioka, 2011). Las tasas de desarrollo de blastocistos PIV oscilan entre el 6-7% y el 20-30%, dependiendo de los laboratorios y las condiciones de cultivo (Nagai *et al.*, 2006; Isom *et al.*, 2012). A su vez, el número total de células por embrión producido *in vitro* es inferior al obtenido *in vivo* a igual edad (58-139 vs. 150-250, Gajda y Smorag, 2004). La transferencia de embriones PIV estaría acompañada de anomalías en el desarrollo, tales como aumento de la mortalidad embrionaria, gestación prolongada y mayor peso corporal de la progenie (Gajda, 2009).

Los cerdos son generalmente sacrificados a los 6 o 7 meses de edad para que los productores cumplan con las demandas del mercado. Por lo tanto, los ovarios de matadero se recolectan generalmente de cerdas prepúberes que todavía no han experimentado ciclos estrales regulares. Archibong *et al.* (1992) mostraron que la calidad inherente de los ovocitos aumenta a medida que las cerdas pasan de su primer a tercer estro, debido a que la supervivencia de los embriones luego de la transferencia de las cerdas donantes de primer estro fue menor que la de las cerdas de tercer estro.

De acuerdo con los hallazgos en otras especies, la calidad de los ovocitos aumenta con el aumento del tamaño del folículo antral (Marcha *et al.*, 2002; Bagg *et al.*, 2007), y los ovocitos de los adultos son superiores en calidad en comparación con los ovocitos de los animales prepúberes

(Marcha *et al.*, 2001; Gruppen *et al.*, 2003; Sherrer *et al.*, 2004). Teniendo en cuenta esta última información, podría pensarse que la baja eficiencia de los sistemas PIV en esta especie se encuentren influenciados fuertemente por el tipo de material utilizado, como se ha comprobado en, por ejemplo, los bovinos (Aston *et al.*, 2006).

MADURACIÓN *IN VITRO* DE OVOCITOS PORCINOS

La maduración del ovocito (tanto nuclear como citoplasmática) hace referencia a todos los cambios nucleares, citoplasmáticos que sufre el ovocito con el fin de prepararse para ser fecundado con éxito y desarrollar posteriormente un embrión viable.

Los ovocitos, al momento de ser extraídos de los folículos ováricos se encuentran en un estado fisiológico nuclear y citoplasmático denominado inmaduro, que no permite su desarrollo luego de ser fecundados. El objetivo de la MIV es lograr que los ovocitos, obtenidos en general a partir de ovarios de matadero, lleguen a la etapa de metafase II (M-II) u ovocito "maduro" para que puedan ser fecundados *in vitro* (FIV).

La maduración nuclear comienza tras la reanudación de la meiosis, una vez que el ovocito es separado físicamente del folículo, y su finalización se alcanza cuando el ovocito completa la primera división meiótica, se forma el primer cuerpo polar (1CP) y la meiosis se detiene en metafase II (Hunter, 1988).

La maduración citoplasmática, en cambio, es un término más amplio que abarca una serie de acontecimientos no directamente relacionados con la progresión de la meiosis, pero que preparan al ovocito para la fecundación y el desarrollo embrionario posteriores (Abeydeera, 2002). Una vez alcanzada la maduración nuclear, las mitocondrias migran para situarse en una posición perinuclear (Thibault *et al.*, 1987; Cran, 1985; Moor *et al.*, 1990). Los gránulos corticales (GC), compuestos por glicoproteínas y enzimas hidrolíticas, migran hacia la periferia del ovocito, aumentando de número al final del periodo de maduración (Cran, 1985), y se sitúan debajo de la membrana plasmática formando una monocapa (Crang y Cheng, 1986); este proceso se considera fundamental para el bloqueo de la polispermia.

Se han utilizado diversos tipos de medios de cultivo para la maduración de ovocitos porcinos, incluyendo North Carolina State University (NCSU, Petters y Wells 1993), medio de cultivo de tejidos modificado (TCM) -199 y medio Tyrode modificado que contiene lactato y piruvato (TLP) (Yoshida *et al.*, 1993). Estos medios suelen contener suero fetal bovino (SFB) y fluido folicular porcino (FFp).

La maduración y la capacidad de desarrollo de los ovocitos porcinos están influenciadas por la presencia de FFp en el medio y el tamaño del folículo de donde se obtiene el FFp (Naito *et al.*, 1988; Huang *et al.*, 2002; Budiyanto *et al.*, 2013). Estudios previos indican que la adición de 10% de FFp obtenido de folículos grandes mejora la penetración espermática, la fecundación normal y promueve la madu-

ración nuclear y citoplasmática de los ovocitos (Naito *et al.*, 1988, Yoshida *et al.*, 1990, 1992, Funahashi y Day, 1997). Además, estudios más recientes demuestran que el FFP también protege al ovocito del estrés oxidativo durante la MIV (Tatemoto *et al.*, 2004)

Además de SFB y FFP, otros suplementos también se adicionan para ayudar a los ovocitos a estar listos para la fecundación en términos de maduración nuclear y citoplasmática. La utilización de hormonas y factores de crecimiento en el medio de maduración ha mostrado efectos positivos en la progresión meiótica, entre otros los más utilizados son la hormona luteinizante (LH), la hormona estimulante del folículo (FSH) (Mattioli *et al.*, 1991), el factor de crecimiento transformador (TGF), la androstenediona (Singh *et al.*, 1995), la gonadotropina sérica de yegua preñada (PMSG), la gonadotropina coriónica humana (hCG) (Funahashi y Day 1997, Funahashi *et al.*, 1997), el factor de crecimiento similar a la insulina I (IGF-I) (Illera *et al.*, 1998) y el estradiol-17 (Funahashi y Day 1997; Bing *et al.*, 2001).

Las células del *cumulus oophorus*, las cuales se encuentran íntimamente relacionadas con el ovocito a través de la zona pelúcida, son esenciales para la nutrición de este y la transmisión de señales intra y extrafolículo. También desempeñan un papel importante en el control de la maduración nuclear por el mantenimiento del bloqueo meiótico en la etapa de metafase I (revisado en Tanghe *et al.*, 2002). Además, las células del *cumulus oophorus* protegen los ovocitos contra la apoptosis inducida por el estrés oxidativo (Tatemoto *et al.*, 2000) y reducen la fragmentación del ADN en los ovocitos (Wongsrikeao *et al.*, 2005). De allí la importancia de que los ovocitos porcinos que ingresan dentro de una rutina de maduración *in vitro* deban poseer células de granulosa para poder madurar. En nuestros trabajos de puesta a punto de la técnica hemos observado que los ovocitos porcinos presentan cumulus muy frágiles, por lo cual la presión durante la aspiración de los folículos debe ser mínima para obtener ovocitos que sean aptos para madurar.

La maduración nuclear y citoplasmática no necesariamente ocurren en forma sincronizada. Con el fin de coordinar ambos procesos y mejorar por ende la competencia de desarrollo de los ovocitos, se han suplementado los medios de MIV con inhibidores de la quinasa dependientes del ciclo celular como la butirólactona-1 (Wu *et al.*, 2002) y la roscovitina (Romar y Funahashi, 2005), inhibidores de la síntesis proteica como la cicloheximida (Ye *et al.*, 2005), y dibutilil adenosina monofosfato cíclico (cAMP) (Funahashi *et al.*, 1997; Somfai *et al.*, 2003). La suplementación de los medios con estas drogas tiene como objetivo retrasar la maduración nuclear y de esta forma lograr una sincronización con la maduración del citoplasma. Sin embargo, solo con la cicloheximida y dibutilil cAMP se logró mejorar el desarrollo de los ovocitos al estadio de blastocistos (Funahashi *et al.*, 1997; Somfai *et al.*, 2003; Ye *et al.*, 2005). En un trabajo realizado por Funahashi *et al.*, 1997, la suplementación con dibutilil cAMP en el MIV durante las primeras 20 h de cultivo mejoró significativamente la tasa de desarrollo de blastocistos luego de la FIV ($21,5 \pm 2,5\%$) en compara-

ción con los controles ($9,2 \pm 1,6\%$). En otro trabajo (Ye *et al.*, 2005), en el cual el medio de MIV fue suplementado con cicloheximida se observó que el índice de formación de blastocistos mejoró también significativamente ($32,8\% \pm 2,0\%$ versus $16,7\%$) en comparación con los no tratados. Aproximadamente el 10-30% de los ovocitos no alcanzan la etapa de metafase II al final de la MIV. La mayoría de los ovocitos incompetentes de cerdo se detienen en una etapa inmadura que se caracteriza por cromosomas metafásicos y la falta de formación del primer cuerpo polar (1CP) (revisado en Kikuchi *et al.*, 2009). En este sentido, se ha demostrado que ovocitos que no alcanzan la M-II pueden ser fecundados, aunque resultan en embriones con ploidía anormal (Somfai *et al.*, 2005).

Se sugiere que la maduración citoplasmática de ovocitos porcinos se podría mejorar mediante la reducción del estrés oxidativo causado por la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS), las que producen un ambiente de maduración *in vitro* inadecuado (Tatemoto *et al.*, 2000, 2001). Las vías metabólicas mediadas por antioxidantes, como el glutatión reducido (GSH), controlan los niveles celulares de especies reactivas de oxígeno (ROS) y protegen al ovocito contra los efectos perjudiciales del estrés oxidativo. El contenido de GSH del ovocito puede aumentarse mediante la suplementación con compuestos de tiol tales como cisteína (Yoshida *et al.*, 1993), cisteamina, glutamina, β -mercaptoetanol o fluido folicular al medio de MIV (Jeong y Yang 2001). También se encontró que la suplementación del medio MIV con FFP favorece la distribución normal de las mitocondrias durante la maduración y este proceso se asoció con una mayor competencia de desarrollo embrionario después de la activación partenogénica (Brevini *et al.*, 2005).

FECUNDACIÓN *IN VITRO* DE OVOCITOS PORCINOS

El principal problema encontrado en la FIV de los ovocitos porcinos es la alta incidencia de poliespermia (ovocitos con más de 1 pronúcleo masculino). Esta última podría ser causada por condiciones inadecuadas de maduración o fecundación (Niwa 1993) que generan una falla ovocitaria en el mecanismo de bloqueo de la entrada de espermatozoides. De acuerdo con Wang *et al.* (1999), la poliespermia *in vitro* podría deberse a un retraso en el establecimiento de la reacción de la ZP (la cual se traduce en un "endurecimiento" de esta) unido a la penetración simultánea de los espermatozoides, por lo que al incrementarse el número de espermatozoides en las cercanías del ovocito, se aumenta la probabilidad de penetraciones simultáneas.

La fecundación y las tasas de monospermia en la FIV porcina dependen en gran medida de la concentración de espermatozoides y del tiempo de cocultivo de las gametas (Nagai, 1996), lo cual requiere un ajuste óptimo de estos factores para el logro de una tasa de penetración controlada. Existen informes sobre laboratorios que incuban las gametas durante aproximadamente 6 h (Abeydeera y Day, 1997; Funahashi *et al.*, 1997; Yoshioka *et al.*, 2003). Sin embargo, Kikuchi *et al.* (2006) encontraron que la incuba-

ción con espermatozoides durante 6 h duplica el número promedio de espermatozoides por ovocito en comparación con 3 h, lo que conduce a una mayor poliespermia, mientras que la formación de pronúcleos no mejora significativamente. Cuando se aplicaron períodos de cocultivo de menos de 3 h, las tasas de penetración y poliespermia no se vieron afectadas, y la eficiencia global de la PIV de embriones “normales” no fue mejorada (Gil *et al.*, 2004). Recientemente (datos aún no publicados) en nuestro laboratorio fueron comparados dos tiempos de coincubación de gametas, 3 horas contra 5 horas. Los resultados obtenidos indicaron que la tasa de división y formación de blastocistos fue similar entre ambos tratamientos, lo que indicó que el porcentaje de ovocitos polispermicos fue mayor para el tratamiento de 5 horas de coincubación. A partir de estos datos, concluimos que 3 horas de coincubación de ovocitos y espermatozoides es el tiempo óptimo para la obtención de embriones porcinos capaces de desarrollar normalmente.

Antes de la inducción de la capacitación de los espermatozoides para la FIV, estos son lavados y centrifugados para separarlos del plasma seminal (Nagai *et al.*, 1988; Cheng *et al.*, 1986; Abeydeera *et al.*, 1997). Los espermatozoides de cerdo resisten una alta fuerza (2400 g) durante un tiempo relativamente corto de centrifugación (3 minutos) (Carvajal *et al.*, 2004). Los espermatozoides porcinos han sido tratados mayoritariamente por centrifugación en gradiente de Percoll (de Vries y Colenbrander, 1990; Horan *et al.*, 1991; Petrunkina *et al.*, 2003; Guthrie y Welch, 2007; Yeste *et al.*, 2009) ya que este procedimiento resulta en mayores índices de penetración *in vitro* (Matas *et al.*, 2011; Caballero *et al.*, 2004; Matas *et al.*, 2003) e incrementa las tasas de división (Grant *et al.*, 1994) y de formación de blastocistos (Jeong *et al.*, 2001). A su vez, para adquirir su capacidad fecundante (la capacitación espermática y la reacción acrosomal) los espermatozoides porcinos necesitan calcio extracelular (Fraser, 1995), por lo cual es de suma importancia que los medios de FIV incluyan este elemento en sus formulaciones en forma de sales que permitan hacerlo disponible para los eventos fisiológicos mencionados.

La FIV se lleva a cabo utilizando alguno de los siguientes medios: TCM199 (Nagai y Moor 1990, Yoshida *et al.*, 1990); Brackett y Oliphant (BO) (Kikuchi *et al.*, 1993, Wang *et al.*, 1995; Funahashi *et al.*, 2000); medio de bicarbonato de Krebs - Ringer (Naito *et al.*, 1988); medio tamponado con Tris modificado (Abeydeera y Day 1997); medio de fecundación de cerdos (PigFM) (Suzuki *et al.*, 2002); o medio gamético porcino (PGM) (Yoshioka *et al.*, 2003).

En cuanto a los aditivos, muchas moléculas específicas se han utilizado como suplementos a los medios de FIV. Entre los suplementos clásicos utilizados se encuentran las metilxantinas (como la cafeína y la teofilina) que son inhibidores de la fosfodiesterasa, lo que resulta en un aumento de cAMP intracelular (Casillas *et al.*, 1970). Tanto la cafeína como la teofilina se utilizan para inducir la capacitación de los espermatozoides. La cafeína además estimula la reacción acrosomal (Funahashi *et al.*, 2000a; Funahashi *et al.*, 2000b), lo que resulta en la inducción de poliespermia (Funahashi *et al.*, 2001). Una coincubación transitoria, en

la que los ovocitos desnudados son cocultivados con espermatozoides en medio que contiene cafeína durante 5 a 30 minutos y luego en medio libre de cafeína, reduce la incidencia de penetración polispermica en un 40% (Funahashi *et al.*, 2004).

Otros aditivos utilizados con una función biológica conocida *in vivo* son las glicosidasas, proteasas séricas, factores de crecimiento, aminoácidos y proteínas. Un trabajo reciente (Romero-Aguirre y Gómez Corta *et al.*, 2015) que utiliza medio TALP modificado (mTALP) suplementado con α -fucosidasa (una glicosidasa que compone el fluido oviductal) exógena demostró aumentar el porcentaje de penetración en un 30%, duplicar el número de espermatozoides unidos a la ZP, y así disminuir la poliespermia. Con respecto a las proteasas séricas, se ha observado que la utilización de plasminógeno en los medios de FIV contribuye a la regulación de la entrada del espermatozoide al ovocito, separando más del 50% de los espermatozoides unidos a la zona pelúcida activa (Coy *et al.*, 2012).

También se ha demostrado que el ácido lisofosfatídico (LPA) actúa en forma similar a un factor de crecimiento en un amplio número de células animales. La adición de LPA en una concentración de 10 mM durante 6 h al medio de fecundación aumentó la proporción de ovocitos penetrados por espermatozoides en un 10% y la tasa de monospermia en un 5% (Zhang *et al.*, 2015). Pese a estos resultados, el mecanismo por el cual el LPA reduce la frecuencia de la poliespermia sigue siendo poco claro.

En cuanto a los aminoácidos, Tareq *et al.* (2013) han estudiado recientemente los efectos sobre la FIV realizada durante 6 horas cuando se suplementa mTALP con diversas combinaciones de dipéptidos. La adición de 2 mM de L-alanil-L-glutamina y 2 mM de L-glicil-L-glutamina mejoró significativamente la fecundación en un 10% y la monospermia en un 30% en comparación con los ovocitos fecundados en mTALP sin dipéptidos.

También se ha comprobado que la albumina sérica bovina (BSA) y la cafeína son importantes moduladores de la penetración espermática (Abeydeera y Day 1997).

Una estrategia utilizada para aumentar la incidencia de monospermia sin disminuir la tasa de penetración de espermatozoides, es la incubación de ovocitos en un medio con un 10% o 30% de fluido oviductal porcino antes de la fecundación (Kim *et al.*, 1996). La incubación de los espermatozoides durante 2,5 h en cultivo de células oviductales antes de la fecundación reduce la tasa de poliespermia al 40-50% (Nagai y Moor 1990). Se ha visto que el cocultivo de ovocitos con células epiteliales oviductales también resulta en un mayor porcentaje de ovocitos monospermicos (Kano *et al.*, 1994). Esto indica que los espermatozoides porcinos necesitan interactuar con las células de oviducto para poder capacitarse y seleccionarse para llevar a cabo una fecundación adecuada. Si bien estos procedimientos podrían llevarse a cabo en el laboratorio, la disponibilidad de células en cultivo para cada una de los procedimientos de fecundación *in vitro* lo hacen poco viable desde el punto de vista práctico.

CULTIVO *IN VITRO* DE EMBRIONES

Los procedimientos de MIV y FIV tienen una eficiencia de aproximadamente 35% de formación de blastocistos sobre el total de los ovocitos inmaduros, con resultados repetibles. Sin embargo, se sabe que los ovocitos fecundados con más de un pronúcleo masculino forman blastocistos en porcentajes similares a aquellos normalmente fecundados (Han *et al.*, 1999a). Aunque el desarrollo del embrión hasta el estadio de blastocisto es posible en el cultivo, la prueba definitiva de la viabilidad embrionaria es establecer preñeces y animales nacidos vivos después de la transferencia a hembras receptoras.

En las cerdas la colecta de embriones *in vivo* se realiza el día 6 del ciclo (día 0= comienzo del estro) y de manera quirúrgica, bajo anestesia general. Los embriones se transfieren a una receptora también de manera quirúrgica con resultados que varían entre el 60-80% de preñez posttransferencia (Polge, 1982; Wallenhorst y Holtz, 1999) o mediante una técnica no quirúrgica desarrollada más recientemente con la cual se obtuvo una tasa de preñez posttransferencia del 70% (Martinez *et al.*, 2014).

En el caso de embriones producidos *in vitro*, estos se transfieren en el día 5 o 6 postfecundación, en estadios de blastocistos o blastocistos expandidos (Mito *et al.*, 2015). Se han logrado diversos grados de éxito en términos de preñeces y nacidos vivos después de la transferencia de embriones producidos *in vitro* al oviducto/útero de las cerdas receptoras (Day *et al.*, 2000, Marchal *et al.*, 2001). De acuerdo a estos resultados, solo el 20 al 30% de los embriones transferidos sobreviven a pesar de las mejoras considerables en las técnicas de IVP.

Se han observado distintas diferencias morfológicas entre los embriones *in vitro* e *in vivo* (Wang *et al.*, 1999). Los blastómeros bien definidos y masa celular interna prominente son evidentes en embriones recuperados *in vivo* en etapa temprana. Según Papaioannou y Ebert (1988), el número de células de blastocistos producidos *in vitro* es menor que sus homólogos *in vivo*. Wang *et al.* (1999) señalan que, la división anormal y el bajo número de células en los blastocistos producidos *in vitro* se deben a defectos en la distribución de los filamentos de actina dentro del citoplasma. La insuficiente maduración citoplasmática de los ovocitos madurados *in vitro* y las condiciones subóptimas de cultivo de embriones pueden ser responsables de la mala calidad del embrión.

En general, los blastocistos producidos *in vitro* presentan altas tasas de fragmentación del ADN y células apoptóticas. Los embriones producidos *in vitro* se caracterizan por un mayor número de núcleos que exhiben fragmentación del ADN (Bryla *et al.*, 2009), y mayor presentación de anomalías cromosómicas (MacLauley *et al.*, 2003; Ulloa Ulloa *et al.*, 2008). Además, tienen tasas inferiores de división y desarrollo asincrónico de pronúcleos en comparación con embriones obtenidos *in vivo* (Laurincik *et al.*, 1994).

Los medios capaces de sobrellevar el desarrollo de embriones porcinos más comúnmente utilizados incluyen el

medio de Whitten (Menino *et al.*, 1982), el medio bicarbonato de Ringer de Krebs modificado (Krisher *et al.*, 1989), el medio NCSU-23 (Petters *et al.*, 1993), el medio de cultivo de embriones de Beltsville-3 (Dobrinsky *et al.*, 1996) y el medio de cigoto porcino (PZM) (Yoshioka *et al.*, 2002).

Dos estudios compararon la efectividad de los diferentes medios de cultivo disponibles, concluyendo que el medio NCSU-23 fue superior en términos de desarrollo a la fase blastocisto (Petters *et al.*, 1993; Long *et al.*, 1999). Se consideró que las diferencias en la presencia y abundancia de glucosa, piruvato y lactato eran la causa principal de la diferencia observada entre los medios. En un trabajo realizado por Peters *et al.* (1991) se observó que la suplementación del medio NCSU-23 con taurina e hipotaurina mejoró el desarrollo temprano de embriones porcinos recuperados *in vivo* en el estadio de 2 células hasta el estadio de blastocisto (Petters *et al.*, 1993). Los medios suplementados con taurina e hipotaurina tuvieron una producción de blastocistos de 80% (Hipotaurina), 67% (Taurina) y 93% (Taurina e Hipotaurina) los cuales difirieron del medio sin suplementar, que tuvo un 45% de blastocistos (Petters *et al.*, 1993).

El estudio de los requerimientos del embrión porcino durante su desarrollo es de suma importancia, ya que permite adecuar los medios de cultivo de acuerdo con las necesidades nutricionales y energéticas para cada etapa de desarrollo embrionario, y de esta manera mejorar la tasa de formación de blastocistos. Los requerimientos energéticos y nutricionales de los embriones están asociados con modificaciones bioquímicas y morfológicas que sufren conforme avanza el desarrollo, incluyendo la activación de genes específicos, la compactación de las mórulas y la formación y expansión de blastocistos. Varios informes han identificado al piruvato, al lactato y a la glucosa como nutrientes esenciales e importantes fuentes de energía para los embriones tempranos de mamíferos (Brinster 1974, Brown y Whittingham, 1992). La evidencia sugiere que la adición de piruvato y lactato a medios de cultivo embrionario durante la etapa de división temprana de los embriones porcinos es beneficiosa para el desarrollo de blastocistos *in vitro* (Karja *et al.*, 2006). Por el contrario, las altas concentraciones de glucosa durante la fase de división inicial son perjudiciales para el desarrollo embrionario en hámster (Schini y Bavister, 1988), ratones (Chatot *et al.*, 1989), humanos (Conaghan *et al.*, 1993), bovinos (Takahashi y First, 1992) y porcinos (Flood y Wiebold, 1988), causando en esta última especie estrés oxidativo en la activación de los genes cigóticos o dificultad para superar el bloqueo de 4 células (Ankrah y Appiah-Opong, 1999; Medvedev *et al.*, 2004). Teniendo en cuenta lo anterior, cambiar la composición del medio de cultivo después de 2 días para simular las condiciones cambiantes que se producen *in vivo* parece una justificación válida. Sin embargo, otros investigadores han descrito la eficacia de un medio de cultivo de un solo paso, el medio de cigoto porcino (PZM) (Yoshioka *et al.*, 2002), cuya composición se basa en la concentración de elementos inorgánicos y sustratos energéticos encontrados en oviductos porcinos (Iritani *et al.*, 1974; Nichol *et al.*, 2004). Las distintas formulaciones de los medios PZM, a

diferencia del NCSU-23, contienen lactato y piruvato como fuente energética en lugar de glucosa, e hipotaurina en lugar de taurina. A partir del cultivo *in vitro* de embriones en los medios PZM-4 y PZM-5 durante 5 días se logró el nacimiento de lechones luego de la transferencia a receptoras (Yoshioka *et al.*, 2002; Yoshioka *et al.*, 2003; Yoshioka *et al.*, 2012). Se ha confirmado la mejor producción de embriones con PZM comparado con otros medios de cultivo de embriones porcinos en las distintas técnicas de obtención de embriones *in vitro*, incluyendo FIV, partenogénesis y clonación por SCNT (Transferencia nuclear de células somáticas) (Yoshioka *et al.*, 2002; Im *et al.*, 2004; Nanassy *et al.*, 2008). Los medios PZM 4 y 5 son capaces de generar mayor cantidad y calidad de blastocistos, al mismo tiempo que resulta práctica su implementación ya que no es necesario cambiar el medio o suplementarlo durante la fase de cultivo embrionario.

INYECCIÓN INTRACITOPLASMÁTICA DE ESPERMATÓZOIDES (ICSI)

En los cerdos, la inyección intracitoplasmática de espermatozoides (ICSI) se considera una técnica con potencial para producir descendientes vivos a partir de espermatozoides no móviles y para prevenir la polispermia, que se produce con frecuencia en la fecundación *in vitro*. Sin embargo, la eficiencia de la producción *in vitro* de embriones por ICSI y la calidad de los embriones son todavía inferiores a la de la FIV convencional (Nakai *et al.*, 2014).

El procedimiento más comúnmente utilizado para la ICSI en porcinos incluye la inmovilización de un espermatozoide, su aspiración en una pipeta de inyección y su posterior introducción en el citoplasma de un ovocito. En este procedimiento, la inmovilización de espermatozoides y la disrupción de la membrana plasmática del espermatozoide antes de la inyección se consideran críticas para la fecundación exitosa, porque son beneficiosas para el manejo del espermatozoide y para la liberación de factores solubles del espermatozoide que se cree que inducen la activación de ovocitos (Svalander *et al.*, 1995; Vanderzwalmen *et al.*, 1996; Dozortsev *et al.*, 1997).

En la ICSI, los espermatozoides pueden ser inmovilizados de forma mecánica por diferentes técnicas (Bourne *et al.*, 1995; Dozortsev *et al.*, 1998; Pope *et al.*, 1998; Martin, 2000; Wu *et al.*, 2001; Horiuchi *et al.*, 2002). Existen laboratorios que utilizan polivinilpirrolidona (PVP) para retrasar el movimiento de los espermatozoides y para facilitar la ruptura de la cola de esperma a pesar de sus efectos perjudiciales sobre la supervivencia y el desarrollo de los ovocitos inyectados (Tesarik *et al.*, 1994; Feichtinger *et al.*, 1995). A pesar de que es perjudicial para la eficiencia del sistema, por cuestiones técnicas es necesario inmovilizar los espermatozoides, por lo que este último es el método más adoptado.

Una de las razones del escaso desarrollo embrionario observado después de la ICSI en la especie porcina es el fracaso de la formación de pronúcleo (PN) masculino (Lee

et al., 2003). Si bien el PN femenino se forma en ovocitos porcinos inyectados con espermatozoides, en muchos casos, la cabeza del espermatozoide no se descondensa (Kren *et al.*, 2003) lo que resulta en el fracaso de la formación del PN masculino y la subsecuente singamia. Sin embargo, el hecho de obtener ovocitos fecundados normalmente mostrando dos cuerpos polares y dos PN después de ICSI tampoco garantiza el desarrollo embrionario a la fase de blastocisto (Yong *et al.*, 2005). Incluso después de una fecundación normal, la proporción de embriones ICSI que se desarrollan hasta la etapa de blastocisto es baja. Según una revisión realizada por García Rosello *et al.* (2009), la tasa de fecundación (formación de dos pronúcleos) por ICSI en cerdos varía alrededor del 60%. Sin embargo, la formación de blastocistos ronda el 10% sobre la cantidad de ovocitos divididos.

Otro factor para tener en cuenta es que el momento de la primera división tiene un efecto importante sobre el desarrollo embrionario temprano (Comizzoli *et al.*, 2000; Leoni *et al.*, 2006). Los embriones producidos por ICSI muestran retraso en la división, lo que se refleja en un desarrollo embrionario alterado (Nakai *et al.*, 2014).

Un método modificado para ICSI fue desarrollado por Yong *et al.* (2005) por medio del cual se daña mecánicamente la membrana de la cabeza del espermatozoide y se aspira el espermatozoide en la aguja de inyección ya sea por la cabeza o por la cola. Mediante este método y en comparación con la ICSI convencional, las tasas de supervivencia, división y desarrollo embrionario al estadio de blastocisto fueron significativamente mayores en la ICSI modificada (71,7, 60,6 y 17,5%) en comparación con la ICSI convencional (48,1, 48,7 y 10,5%).

A partir de estos resultados se puede inferir que la ICSI es una técnica que requiere de un entrenamiento y equipamiento especial, y que su empleo es justificado en el caso de querer obtener animales genéticamente modificados, cuando existen problemas de motilidad espermática, cuando se quiere obtener descendencia de un animal que murió recientemente, o cuando se emplea semen liofilizado.

TRANSFERENCIA DE CÉLULAS SOMÁTICAS (SCNT)

Al igual que en el resto de las especies, la clonación fue pensada en principio con fines de mejoramiento genético. Sin embargo, poco a poco su aplicación se vio orientada a la generación, preservación y multiplicación de animales de alto valor obtenidos por métodos de ingeniería genética. Más recientemente, la aplicación potencial de esta técnica es la de crear modelos de enfermedades humanas y para proporcionar órganos para el xenotrasplante.

Los primeros lechones producidos por SCNT se lograron tanto con ovocitos madurados *in vivo* (Onishi *et al.*, 2000; Polajeva *et al.*, 2000) como con ovocitos madurados *in vitro* (Betthausen *et al.*, 2000). Desde entonces, el número de lechones clonados producidos ha aumentado constantemente, pero todavía esta técnica presenta una eficiencia global muy baja (revisado en Vajta *et al.*, 2007), manteniéndose

dose en 1-2% de embriones desarrollados a término en relación con los ovocitos utilizados (Colman, 2000). Esta baja eficiencia podría estar dada por una variedad de factores, entre los que se incluyen la fuente y calidad de ovocitos, los protocolos utilizados en cada laboratorio, el tipo y estadio de células donantes y la falta de reprogramación adecuada del núcleo trasplantado. El desarrollo normal de un embrión resulta de la expresión secuencial de un conjunto de genes. Se cree que la regulación de la expresión génica es el resultado de diferentes factores que se asocian con el ADN. Estas asociaciones modifican la estructura tridimensional del ADN (estado epigenético), haciendo que los genes individuales sean más o menos propensos a someterse a la transcripción. Durante la fecundación, el ovocito regula el estado epigenético del ADN derivado de la madre y el padre para iniciar adecuadamente el desarrollo temprano (Lee y Prather, 2013). Durante la SCNT, el ovocito reprograma el ADN de un núcleo donante que contiene información genética materna y paterna cambiando su estado somático a estado embrionario. Este cambio se debe a la combinación única de factores presentes en el ovocito. Se sabe que es posible llevar a cabo con éxito este cambio. Sin embargo, el proceso no es muy eficiente ya que solo alrededor del 1% de los embriones de SCNT se desarrollan hasta convertirse en un nacimiento normal. Esto se debe a que los factores de reprogramación en el ovocito no están diseñados para manejar el estado epigenético de las células somáticas. Por lo tanto, esta reprogramación del ADN de la célula donante por parte de los ovocitos resulta en una transición incompleta, causando así en un gran número de oportunidades un desarrollo anormal después del proceso de clonación (revisado por Whitworth y Prather, 2010).

Los patrones anormales de metilación del ADN se observan en el embrión antes de la implantación y posimplantación, así como también en el recién nacido. Las marcas epigenéticas anormales, como fallas en la metilación del ADN, podrían ser la principal razón para la baja eficiencia después de SCNT, ya que la metilación del ADN es uno de los mecanismos intrínsecos de regulación de la expresión génica (Lee y Prather, 2013).

Aunque estos defectos epigenéticos se detectan en clones, su progenie no suele mostrar ningún signo de anomalías (revisado en Prather *et al.*, 2004) ya que estos cambios son de expresión de los genes, no de la estructura del ADN. Esto indica que durante el desarrollo de las células germinales (espermatozoides u ovocitos) en los clones, la remodelación epigenética es adecuada y los espermatozoides u ovocitos que producen son normales.

Los patrones aberrantes de metilación del ADN no solo se encuentran en embriones y clones derivados de SCNT, sino también en embriones producidos por FIV (Bonk *et al.*, 2008). Una posible razón de esta anomalía se debe a las condiciones de cultivo *in vitro*. Se sabe que las condiciones de cultivo *in vitro* afectan al estado epigenético de los embriones y, por lo tanto, pueden dar como resultado un desarrollo anormal. Por lo tanto, además de una mejor comprensión de la remodelación epigenética que debe ocurrir en el momento de la transferencia nuclear, las mejoras en

el sistema de cultivo de embriones también son necesarias para aumentar la eficiencia de SCNT.

GENERACIÓN DE CERDOS GENÉTICAMENTE MODIFICADOS PARA MEJORAR SU CAPACIDAD PRODUCTIVA, COMO MODELO DE ENFERMEDADES Y TRASPLANTE DE ÓRGANOS A HUMANOS

Las nuevas técnicas de modificación del genoma, combinadas con las biotécnicas reproductivas *in vitro* anteriormente mencionadas, podrían utilizarse para incorporar o bloquear genes de interés. De esta forma se podrían lograr cerdos con mayor capacidad o calidad productiva y sanitaria, modelos para el estudio de enfermedades humanas con base genética, y utilizar a la especie porcina como donantes de órganos para humanos.

Aunque con técnicas de modificación genética más anticuadas y menos eficientes, se han logrado obtener cerdos con una mayor capacidad de crecimiento y desarrollo y la obtención de líneas con alta resistencia a enfermedades. En general estas modificaciones consisten en la introducción de un gen de otra especie (transgen) en el ADN de embriones. De esta manera se obtuvo el primer cerdo genéticamente modificado, el cual fue generado hace más de 3 décadas con propósitos productivos, sobreexpresando hormona de crecimiento humana (Hammer *et al.*, 1985). A partir de entonces, numerosos grupos de investigación han generado diversos tipos de modelos experimentales. Uno de los más importantes es el denominado Enviropig. Estos cerdos presentan glándulas salivales modificadas genéticamente, que les ayudan a digerir el fósforo en el alimento, eliminando la necesidad de suplementos adicionales o enzimas en la alimentación, y reduciendo al mismo tiempo la contaminación por este elemento en el medioambiente. Luego de este desarrollo, investigadores de la Universidad de Guelph crearon la línea de cerdos "Cassie" con el propósito de permitir que el gen pueda ser transferido a muchas generaciones de una manera más estable (Meidingen *et al.*, 2013).

Desde el punto de vista sanitario, un grupo de investigadores recientemente informó la obtención de cerdos resistentes al virus del Síndrome Respiratorio y Reproductivo Porcino (PRRS). Este virus es causante de grandes pérdidas económicas, generando en los animales infectados problemas reproductivos, disminución de peso y alta tasa de mortalidad, sin haberse logrado aún ninguna vacuna efectiva. El receptor CD163 hallado en macrófagos resulta ser la vía de entrada del virus a estas células. Mediante edición génica mediada por CRISPRs han podido anular la expresión de este receptor y así, la entrada del virus a los macrófagos, obteniendo cerdos resistentes para esta enfermedad (Burkad *et al.*, 2017). Estas metodologías de edición génica permiten cortar segmentos específicos del genoma de un individuo, pudiendo anularse la expresión de genes e incluso introducirse en estos cortes nuevos genes para lograr de esta manera individuos transgénicos. Dentro de las metodologías de edición génica se encuentran los zinc fingers, TALENs y los ya nombrados CRISPRs.

Como se describió anteriormente el cerdo es considerado el biomodelo de elección para el estudio de enfermedades humanas con base genética. Así, en los últimos años se han desarrollado modificaciones genéticas en cerdos con el propósito de entender la causa y generar blancos posibles de tratamiento de un gran número de enfermedades. Entre las más importantes pueden mencionarse la enfermedad Huntington, Alzheimer, atrofia muscular espinal, enfermedades cardiovasculares ligadas a desórdenes enzimáticos, diabetes, retinitis pigmentosa, distrofia muscular y cáncer de mama (Prather *et al.*, 2013; Holm *et al.*, 2017).

Si bien el porcino como potencial donante de órganos al humano posee numerosas ventajas, la principal limitante es el rechazo inmunológico de tipo "hiperagudo". Este tipo de mecanismo se ha documentado solo luego del trasplante de un órgano porcino a un receptor primate (Yang y Sykes, 2007; Le Bas-Bernardet *et al.*, 2008; D'Apice y Cowan, 2009). Una posible solución para el rechazo a injertos de origen porcino es modificar genéticamente los cerdos para permitir que sus órganos no sean reconocidos como extraños cuando se trasplantan a seres humanos. Hasta ahora, se han establecido muchas líneas de cerdos genéticamente modificadas o transgénicas con el objetivo de superar los diversos mecanismos de rechazo de xenoinjertos de cerdo a primate (Ekser *et al.*, 2009; Liu *et al.*, 2013; Li *et al.*, 2013; Reyes *et al.*, 2014).

Existen estrategias de modificación genética que facilitan la adaptación de los cerdos como donantes para el trasplante de órganos. Los cerdos modificados genéticamente a los que se les eliminó el antígeno alfa-1,3-Gal (Lai *et al.*, 2002), principal elemento responsable del inicio del rechazo hiperagudo, se consideran la base para nuevas modificaciones genéticas que pueden abordar otros mecanismos de rechazo e incompatibilidades entre los sistemas de coagulación de sangre porcina y de primate. Estas modificaciones incluyen la regulación de la expresión de proteínas reguladoras del complemento humano, CD39, receptor de la proteína C endotelial, hemo oxigenasa 1, trombomodulina, inhibidor de la vía del factor tisular, así como moduladores del sistema inmune celular tal como ligando inductor de la apoptosis relacionada con el TNF alfa humano, HLA-E / beta-2-microglobulina, y CTLA-4lg (Klymiuk *et al.*, 2010).

Mediante técnicas de biología molecular se ha determinado que ciertos genes son responsables directos o indirectos del desarrollo de determinados órganos en mamíferos superiores. Por un lado, trabajos efectuados en embriones de ratón mostraron que un Knockout (anulado artificial de un gen) del gen Pdx1 genera un animal sin páncreas (Offield *et al.*, 1996), un Knockout de Sal1 genera ratones sin riñones (Nishinakamara *et al.*, 2001), un Knockout de Runx1 produce muerte embrionaria por carencia de hematopoyesis y, un Knockout de Nkx 2-5 genera severos retardos en el desarrollo cardíaco. Por otro lado, la complementación embrionaria es una técnica que permite la generación de embriones y animales con linajes celulares de más de un origen. Desde el año 1993, cuando fue informada por primera vez (Chen *et al.*, 1993) se la ha utilizado con distintos propósitos y hoy constituye la base

sobre la que se apoyan los principales trabajos de investigación que buscan generar órganos humanos en cerdos.

A través de la generación de Knockouts específicos, es posible anular un linaje celular y de este modo prevenir su contribución en la formación de un órgano o tejido. Al mismo tiempo, los factores extrínsecos necesarios para que las células se diferencien en ese órgano o tejido permanecen invariables. De este modo, podría considerarse que queda un "hueco" o "nicho" en donde podrían colocarse células para promocionar su diferenciación hacia el órgano o tejido faltante. Es aquí donde la complementación embrionaria juega un rol preponderante ya que si a estos embriones modificados genéticamente, a los que se les anula el gen responsable del desarrollo de un órgano específico, se le inyectase células pluripotentes de otro, el origen celular del órgano que surja corresponderá a estas últimas células y no al animal que lo contiene. Así, en 2007, un grupo de investigadores inyectaron células pluripotentes de ratón en embriones de la misma especie a los cuales por edición génica se les había anulado el gen Pdx1 logrando obtener crías con epitelio pancreático proveniente de las células complementadas (Stanger *et al.*, 2007).

Recientemente, existen trabajos que han demostrado que pueden generarse quimeras humano-cerdo. Estos animales fueron obtenidos inyectando células madre pluripotentes inducidas (hiPSCs) en blastocistos porcinos, una estrategia que ha sido eficiente en generar órganos casi totalmente xenogénicos en ratones y ratas (Kobayashi *et al.*, 2010; Yamaguchi *et al.*, 2017).

CONCLUSIÓN

Podemos concluir que el cerdo representa una especie muy importante tanto desde el punto de vista productivo como biomédico y que el uso de todas las biotécnicas reproductivas sumadas a las herramientas de edición génica actualmente disponibles, constituyen la base para el mejoramiento genético. Este último puede aplicarse tanto para maximizar la productividad de esta especie en cuanto a calidad y cantidad de carne como para generar animales para el estudio de enfermedades en humanos o potencial fuente de órganos para trasplante.

BIBLIOGRAFÍA

- ABEYDEERA, L.R.; DAY, B.N. 1997a. Fertilization and subsequent development in vitro of pig oocytes inseminated in a modified Tris-buffered medium with frozen-thawed ejaculated spermatozoa. *Biol. Reprod.* 57: 729-734.
- ABEYDEERA, L.R.; DAY, B.N. 1997b. In vitro penetration of pig oocytes in a modified Tris- buffered medium: effect of BSA, caffeine and calcium. *Theriogenology*; 48: 537-544.
- ABEYDEERA, L.R.; DAY, B.N. 1997. Fertilization and subsequent development in vitro of pig oocytes inseminated in a modified tris-buffered medium with frozen-thawed ejaculated spermatozoa. *Biology of Reproduction* 57, 729-734.
- ABEYDEERA, L.R. 2002. In vitro production of embryos in swine. *Theriogenology*; 57: 257-273.

- ANKRAH, N.A.; APPIAH-OPONG, R. 1999. Toxicity of low levels of methylglyoxal: depletion of blood glutathione and adverse effect on glucose tolerance in mice. *Toxicol. Lett.* 109, 61-67. doi:10.1016/S0378-4274(99)00114-9
- ARCHIBONG, A.E.; MAURER, R.R.; ENGLAND, D.C.; STORMSHAK, F. 1992. Influence of sexual maturity of donor on in vivo survival of transferred porcine embryos. *Biol Reprod.* 47:1026-30.
- BAGG, M.A.; NOTTLE, M.B.; ARMSTRONG, D.T.; GRUPEN, C.G. 2007. Relationship between follicle size and oocyte developmental competence in prepubertal and adult pigs. *Reprod Fertil Dev.* 19:797-803.
- BETHHAUSER, J.; FORSBERG, E.; AUGENSTEIN, M.; CHILDS, L.; EILERTSEN, K.; ENOS, J.; FORSYTHE, T.; GOLUEKE, P.; JURGELLA, G.; KOPPANG, R. 2000. Production of cloned pigs from in vitro systems. *Nat. Biotech.* 18:1055-1059.
- BING, Y.Z.; NAGA, T.; RODRIGUEZ-MARTINEZ, H. 2001. Effects of cysteamine, fsh and estradiol-17beta on in vitro maturation of porcine oocytes. *Theriogenology.* Mar 1;55(4):867-76.
- BONK, A.J.; LI, R.; LAI, L.; HAO, Y.; LIU, Z.; SAMUEL, M.; FERGASON, E.A.; WHITWORTH, K.M.; MURPHY, C.N.; ANTONIOU, E.; PRATHER, R.S. 2008. Aberrant DNA methylation in porcine in vitro-, parthenogenetic-, and somatic cell nuclear transfer produced blastocysts. *Mol. Reprod. Dev.* 75:250-264.
- BOURNE, H.; RICHINGS, N.; LIU, D.Y.; CLARKE, G.N.; HARARI, O.; BAKER, H.W. 1995. Sperm preparation for intracytoplasmic injection: methods and relationship to fertilization results. *Reprod. Fertil. Dev.*, 7, 177-183.
- BREVINI, T.A.; VASSENA, R.; FRANCISCI, C.; GANDOLFI, F. 2005. Role of adenosine triphosphate, active mitochondria, and microtubules in the acquisition of developmental competence of parthenogenetically activated pig oocytes. *Biology of Reproduction* 72, 1218-1223.
- BRINSTER, R.L. 1974. Embryo development. *J. Anim. Sci.* 38, 1003-1012.
- BROWN, J.J.G.; WHITTINGHAM, D.G. 1992. The dynamic provision of different energy substrates improves development of one-cell randombred mouse embryos in vitro. *J. Reprod. Fertil.* 95, 503-511. doi:10.1530/JRF.0.0950503
- BRUNORI, J.C. 2014. Producción de cerdos en Argentina: situación, oportunidades, desafíos. (Disponible: <http://www.elsitioporci.com/> verificado: febrero 2018).
- BRYLA, M.; TRZCINSKA, M.; WIECZOREC, J. 2009. Analysis of in vivo- and in vitro-derived pig expanded blastocysts based on DNA fragmentation. *Anim. Sci. Pap. Rep.* 27, 59-68.
- BUDIYANTO, A.; TAKESHIGE, O.; DAI-ICHIRO, F.; SHOICHIRO, S.; AKIRA, O.; TAKASHI, N. 2013. In Vitro Fertilization and Development of Porcine Oocytes Matured in Follicular Fluid. *Journal of Reproduction and Development*, Vol. 59, N.º 2.
- BURKARD, C.; LILLICO, S.G.; REID, E.; JACKSON, B.; MILEHAM, A.J.; AIT-ALI, T. 2017. Precision engineering for PRRSV resistance in pigs: Macrophages from genome edited pigs lacking CD163 SRCR5 domain are fully resistant to both PRRSV genotypes while maintaining biological function. *PLoS Pathog* 13(2): e1006206. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1006206>
- CABALLERO, I.; VÁZQUEZ, J.M.; GIL, M.A.; CALVETE, J.J.; ROCA, J.; SANZ, L. 2004. Does seminal plasma PSP-I/PSP-II spermadhesin modulate the ability of boar spermatozoa to penetrate homologous oocytes in vitro? *J Androl*; 25:1004-12.
- CABOT, R.A.; KÜHHOLZER, B.; CHAN, A.W.; LAI, L.; PARK, K.W.; CHONG, K.Y.; SCHATTE, G.; MURPHY, C.N.; ABEYDEERA, L.R.; DAY, B.N.; PRATHER, R.S. 2001. Transgenic pigs produced using in vitro matured oocytes infected with a retroviral vector. *Anim Biotechnol*; 12: 205-214.
- CARVAJAL, G.; CUELLO, C.; RUIZ, M.; VÁZQUEZ, J.M.; MARTÍNEZ, E.A.; ROCA, J. 2004. Effects of centrifugation before freezing on boar sperm cryosurvival. *J. Androl.* 25:389-96.
- CASILLAS, E.R.; HOSKINS, D.D. 1970. Activation of monkey spermatozoal adenylyl cyclase by thyroxine and triiodothyronine. *Biochem Biophys Res Commun.* 40:255-62.
- CHATOT, C.L.; ZIOMEK, C.A.; BAVISTER, B.D.; LEWIS, J.L.; TORRES, I. 1989. An improved culture medium supports development of randombred 1-cell mouse embryos in vitro. *J. Reprod. Fertil.* 86, 679-688. doi:10.1530/JRF.0.0860679
- CHENG, WTK.; Polge, C.; Moor, R.M. 1986. In vitro fertilization of pig and sheep oocytes. *Theriogenology* 25:146.
- CHEN, J.; LANSFORD, R.; STEWART, V.; YOUNG, F.; ALT, F.W. 1993. RAG-2- deficient blastocyst complementation: an assay of gene function in lymphocyte development. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90, 4528-4532.
- COLMAN, A. 2000. Somatic cell nuclear transfer in mammals: Progress and applications. *Cloning* 1, 185-200.
- CONAGHAN, J.; HANDYSIDE, A.H.; WINSTON, R.M.; LEESE, H.J. 1993. Effects of pyruvate and glucose on the development of human preimplantation embryos in vitro. *J. Reprod. Fertil.* 99, 87-95. doi:10.1530/JRF.0.0990087
- COMIZZOLI, P.; MARQUANT-LE GUIENNE, B.; HEYMAN, Y.; RENARD, J.P. 2000. Onset of the first S-phase is determined by a paternal effect during the G1-phase in bovine zygotes. *Biol Reprod*; 62: 1677-1684. [Medline] [CrossRef].
- COY, P.; JIMÉNEZ-MOVILLA, M.; GARCÍA-VÁZQUEZ, F.A.; MONDÉJAR, I.; GRULLÓN, L.; ROMAR, R. 2012. Oocytes use plasminogen-plasmin system to remove supernumerary spermatozoa. *Hum. Reprod.* 27:1985-93.
- CRAN, D.G. 1985. Qualitative and quantitative structural changes during pig oocyte maturation. *J. Reprod. Fertil.* 74: 237-245.
- CRAN, D.G.; CHENG, W.T.K. 1986. The cortical reaction in pig oocytes during in vivo and in vitro fertilization. *Gamete Res.* 13: 241-251.
- DAI, Y.; VAUGHT, T.D.; BOONE, J.; CHEN, S.H.; PHELPS, C.J.; BALL, S.; MONAHAN, J.A.; JOBST, P.M.; MCCREATH, K.J.; LAMBORN, A.E.; COWELL-LUCERO, J.L.; WELLS, K.D.; COLMAN, A.; POLEJAEVA, I.A.; AYARES, D.L. 2002. Targeted disruption of the alpha 1,3-galactosyltransferase gene in cloned pigs. *Nat. Biotechnol.*; 20: 251-255.
- DANG-NGUYEN, T.Q.; KIKUCHI, K.; SOMFAI, T.; OZAWA, M.; NAKAI, M.; MAEDOMARI, N.; VIET-LINH, N.; KANAI, Y.; NGUYEN, B.; NAGAI, T. 2011. Evaluation of developmental competence of in vitro-produced porcine embryos based on the timing, pattern and evenness of the first cleavage and onset of the second cleavage. *Journal of Reproduction and Development* 56, 593-600.
- DAY, B.N. 2000. Reproductive biotechnologies: current status in porcine reproduction. *Anim. Reprod. Sci.* 60-61:161-172.
- D'APICE, A.J.; COWAN, P.J. 2009. Xenotransplantation: The next generation of engineered animals. *Transpl. Immunol.* 21:111-115.
- DE VRIES, A.C.; COLENBRANDER, B. 1990. Isolation and characterization of boar spermatozoa with and without a cytoplasmic droplet. *Int. J. Biochem.* 22:519-24.
- DOBROINSKY, J.R.; JOHNSON, L.A.; RATH, D. 1996. Development of a culture medium (BECM-3) for porcine embryos: effects of bovine serum albumin and fetal bovine serum on embryo development. *Biol. Reprod.* 55:1069-74.
- DOZORTSEV, D.; QIAN, C.; ERMILOV, A.; RYBOUCHKIN, A.; DE SUTTER, P.; DHONT, M. 1997. Sperm-associated oocyte-activating factor is released from the spermatozoon within 30 min after injection as a result of the sperm-oocyte interaction. *Hum. Reprod.*, 12, 2792-2796.

- DOZORTSEV, D.; WAKAIAMA, T.; ERMILOV, A.; YANAGIMACHI, R. 1998. Intracytoplasmic sperm injection in the rat. *Zygote* 6, 143-147.
- EKSER, B.; RIGOTTI, P.; GRIDELLI, B.; COOPER, D.K. 2009. Xenotransplantation of solid organs in the pig-to-primate model. *Transpl. Immunol.* 21(2):87-92.
- FEICHTINGER, W.; OBRUCA, A.; BRUNNER, M. 1995. Sex chromosomal abnormalities and intracytoplasmic injection. *Lancet* 346, 1566.
- FLISIKOWSKA, T.; KIND, A.; SCHNIEKE, A. 2013. Genetically modified pigs to model human diseases. *J. Appl. Genet.* [En prensa].
- FLOOD, M.R.; WIEBOLD, J.L. 1988. Glucose metabolism by preimplantation pig embryos. *J. Reprod. Fertil.* 84, 7-12. doi:10.1530/JRF.0.0840007
- FRASER, L.R. 1995. Ionic control of sperm function. *Reproduction* 7, 905-925.
- FUNAHASHI, H.; DAY, B.N. 1997. Advances in in vitro production of pig embryos. *J. Reprod. Fertil* 52 (Suppl): 271-283.
- FUNAHASHI, H.; FUJIWARA, T.; NAGAI, T. 2000. Modulation of the function of boar spermatozoa via adenosine and fertilization promoting peptide receptors reduce the incidence of polyspermic penetration into porcine oocytes. *Biology of Reproduction* 63, 1157-1163.
- FUNAHASHI, H.; CANTLEY, T.C.; DAY, B.N. 1997. Synchronization of meiosis in porcine oocytes by exposure to dibutyl cyclic adenosine monophosphate improves developmental competence following in vitro fertilization. *Biol. Reprod.* 57:49-53.
- FUNAHASHI, H.; ASANO, A.; FUJIWARA, T.; NAGAI, T.; NIWA, K.; FRASER, L.R. 2000. Both fertilization promoting peptide and adenosine stimulate capacitation but inhibit spontaneous acrosome loss in ejaculated boar spermatozoa in vitro. *Mol. Reprod. Dev.* 55:117-24.
- FUNAHASHI, H.; NAGAI, T. 2001. Regulation of in vitro penetration of frozen thawed boar spermatozoa by caffeine and adenosine. *Mol. Reprod. Dev.* 58:424-31.
- FUNAHASHI, H.; ROMAR, R. 2004. Reduction of the incidence of polyspermic penetration into porcine oocytes by pretreatment of fresh spermatozoa with adenosine and a transient co-incubation of the gametes with caffeine. *Reproduction* 128:789-800.
- GAJDA, B.; SMORAĞ, Z. 2004. Cell number in pig blastocysts cultured in different media. *Ann Anim. Sci.* 4:315-320.
- GAJDA, B. 2009. Factors and methods of pig oocyte and embryo quality improvement and their application in reproductive biotechnology. *Reproductive Biology* 9(2):97-112.
- GARCÍA-ROSELLÓ, E.; GARCÍA-MENGUAL, E.; COY, P.; ALFONSO, J.; SILVESTRE, MA. 2009. Intracytoplasmic sperm injection in livestock species: an update. *Reprod. Domest. Anim.* 44(1):143-51. doi: 10.1111/j.1439-0531.2007.01018.x
- GIL, M.A.; RUIZ, M.; VAZQUEZ, J.M.; ROCA, J.; DAY, B.N.; MARTINEZ, E.A. 2004. Effect of short periods of sperm-oocyte coincubation during in vitro fertilization on embryo development in pigs. *Theriogenology* 62, 544-552.
- GIL, M.A.; CUELLO, C.; PARRILLA, I.; VAZQUEZ, J.M.; ROCA, J.; MARTINEZ, E.A. 2010. Advances in swine in vitro embryo production technologies. *Reprod. Domest. Anim. Suppl* 2:40-8. doi: 10.1111/j.1439-0531.2010.01623.x
- GRANT, S.A.; LONG, S.E.; PARKINSON, T.J. 1994. Boar spermatozoa prepared by Percoll gradient centrifugation. *J. Reprod. Fertil* 100:477-83.
- GUTHRIE, H.D.; WELCH, G.R. 2007. Use of fluorescence-activated flow cytometry to determine membrane lipid peroxidation during hypothermic liquid storage and freeze-thawing of v. 1994. Fertilizability and structural properties of boar sperm loaded with 4, 4-difluoro-5-(4-phenyl-1,3-butadienyl)-4-bora-3a,4a-diaza-s-indacene-3-undecanoic acid. *J. Anim. Sci.* 85: 1402-11.
- GRUPEN, C.G.; NAGASHIMA, H.; NOTTLE, M.B. 1995. Cysteine enhances in vitro development of porcine oocytes matured and fertilized in vitro. *Biol. Reprod.* 53: 173-178.
- GRUPEN, C.G.; MCILFATRICK, S.M.; ASHMAN, R.J.; BOQUEST, A.C.; ARMSTRONG, D.T.; NOTTLE, M.B. 2003. Relationship between donor animal age, follicular fluid steroid content and oocyte developmental competence in the pig. *Reprod. Fertil. Dev.* 15:81-7.
- HAMMER, R.E.; PURSEL, V.G.; REXROAD, C.E. JR. WALL, R.J.; BOLT, D.J.; EBERT, K.M.; PALMITER, R.D.; BRINSTER, R.L. 1985. Production of transgenic rabbits, sheep and pigs by microinjection. *Nature* 315(6021):680-3.
- HAN, Y.M.; ABEYDEERA, L.R.; KIM, J.H.; MOON, H.B.; CABOT, R.A.; DAY, B.N.; PRATHER, R.S. 1999. Growth retardation of inner cell mass cells in polyspermic porcine embryos produced in vitro. *Biology of Reproduction* 60, 1110-1113.
- HORAN, R.; POWELL, R.; MCQUAID, S.; GANNON, F.; HOUGHTON, J.A. 1991. Association of foreign DNA with porcine spermatozoa. *Arch. Androl.* 26:83-92.
- HORIUCHI, T.; EMUTA, C.; YAMAUCHI, Y.; OIKAWA, T.; NUMABE, T.; YANAGIMACHI, R. 2002. Birth of normal calves after intracytoplasmic sperm injection of bovine oocytes: a methodological approach. *Theriogenology* 57, 1013-1024.
- HUANG, J.; GUO, X.; FAN, N.; SONG, J.; ZHAO, B.; OUYANG, Z.; LIU, Z.; ZHAO, Y.; YAN, Q.; YI, X.; SCHAMBACH, A.; FRAMP-TON, J.; ESTEBAN, MA.; YANG, D.; YANG, H.; LAI, L. 2014. RAG1/2 knockout pigs with severe combined immunodeficiency. *J Immunol.* 1;193(3):1496-503.
- HUNTER, R.F.H.; NICHOL, R. 1988. Capacitation potential of the fallopian tube: a study involving surgical insemination and the subsequent incidence of polyspermy. *Gamete Res.* 21: 255-266.
- HOLM, I.E.; ALSTRUP, A.K.; LUO, Y. 2016. Genetically modified pig models for neurodegenerative disorders. *J. Pathol.*;238(2):267-87. doi: 10.1002/path.4654.
- IM, G.S.; LAI, L.X.; LIU, Z.H.; HAO, Y.H.; WAX, D.; BONK, A. 2004. In vitro development of preimplantation porcine nuclear transfer embryos cultured in different media and gas atmospheres. *Theriogenology* 61:1125-35.
- IRITANI, A.; SATO, E.; NISHIKAWA, Y. 1974. Secretion rates and chemical composition of oviduct and uterine fluids in sows. *J. Anim. Sci.*; 39:582-8.
- ISOM, S.C.; LI, R.F.; WHITWORTH, K.M.; PRATHER, R.S. 2012. Timing of first embryonic cleavage is a positive indicator of the in vitro developmental potential of porcine embryos derived from in vitro fertilization, somatic cell nuclear transfer and parthenogenesis. *Mol. Reprod. Dev.* 79(3):197-207. doi: 10.1002/mrd.22013
- JEONG, B.S.; YANG, X. 2001. Cysteine, glutathione, and Percoll treatments improve porcine oocyte maturation and fertilization in vitro. *Mol. Reprod. Dev.* 59:330-5.
- JEON, Y.; JEONG, S.H.; BISWAS, D.; JUNG, E.M.; JEUNG, E.B.; LEE, E.S.; HYUN, S.H. 2011. Cleavage pattern and survivin expression in porcine embryos by somatic cell nuclear transfer. *Theriogenology.* 76(7):1187-96. doi: 10.1016/j.theriogenology.2011.04.003
- JEONG, B.S.; YANG, X. 2001. Cysteine, glutathione and Percoll treatments improve porcine oocyte maturation and fertilization in vitro. *Molecular Reproduction and Development* 59, 330-335.
- KANO, K.; MIYANO, T.; KATO, S. 1994. Effect of oviductal epithelial cells on fertilization of pig oocytes in vitro. *Theriogenology* 42, 1061-1068.

- KARJA, N.W.K.; KIKUCHI, K.; FAHRUDIN, M.; OZAWA, M.; SOMFAI, T.; OHNUMA, K.; NOGUCHI, J.; KANEKO, H.; NAGAI, T. 2006. Development to the blastocyst stage, the oxidative state, and the quality of early developmental stage of porcine embryos cultured in alteration of glucose concentrations *in vitro* under different oxygen tensions. *Reprod. Biol. Endocrinol.* 54, 1-12.
- KĄTSKA-KSIAŻKIEWICZ, L. 2006. Pig embryo production by *in vitro* maturation and fertilization of ovarian oocytes. A review. *J. Anim. Feed. Sci.* 15:525-542.
- KIKUCHI, K.; NAKAI, M.; SHIMADA, A.; KASHIWAZAKI, N. 2006. Production of viable porcine embryos by *in vitro* fertilization (IVF) and intracytoplasmic sperm injection (ICSI). *Journal of Mammalian Ova Research* 23, 96-106.
- KIKUCHI, K.; NAGAI, T.; MOTLIK, J.; SHIOYA, Y.; IZAIKE, Y. 1993. Effect of follicle cells on *in vitro* fertilization of pig follicular oocytes. *Theriogenology* 39, 593-599.
- KIM, N.H.; FUNAHASHI, H.; ABEYDEERA, L.R.; MOON, S.J.; PRATHER, R.S.; DAY, B.N. 1996. Effects of oviductal fluid on sperm penetration and cortical granule exocytosis during fertilization of pig oocytes *in vitro*. *Journal of Reproduction and Fertility* 107, 79-86.
- KIRK, A.D. 2003. Crossing the bridge: large animal models in translational transplantation research. *Immun. Rev.* 196: 176-196.
- KLYMIUK, N.; AIGNER, B.; BREM, G.; WOLF, E. 2010. Genetic modification of pigs as organ donors for xenotransplantation. *Mol. Reprod. Dev.* 77(3):209-221.
- KOBAYASHI, T.; YAMAGUCHI, T.; HAMANAKA, S. 2010. Generation of rat pancreas in mouse by interspecific blastocyst injection of pluripotent stem cells. *Cell.* 142:787-799.
- KOLBER-SIMONDS, D.; LAI, L.; WATT, SR.; DENARO, M.; ARN, S.; AUGENSTEIN, ML.; BETTHAUSER, J.; CARTER, DB.; GREENSTEIN, JL.; HAO, Y.; IM, GS.; LIU, Z.; MELL, GD.; MURPHY, CN.; PARK, KW.; RIEKE, A.; RYAN, DJ.; SACHS, D.H.; FORSBERG, E.J.; PRATHER, R.S.; HAWLEY, R.J. 2004. Production of alpha-1,3-galactosyltransferase null pigs by means of nuclear transfer with fibroblasts bearing loss of heterozygosity mutations. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 101: 7335-7340.
- KREN, R.; KIKUCHI, K.; NAKAI, M.; MIYANO, T.; OGUSHI, S.; NAGAI, T.; SUZUKI, S.; FULKA, J.; FULKA, J. JR. 2003. Intracytoplasmic sperm injection in the pig: where is the problem? *J. Reprod. Dev.* 49: 271-273. [Medline] [CrossRef]
- KRISHER, R.L.; PETERS, R.M.; JOHNSON, B.H.; BAVISTER, B.D.; ARCHIBONG, A.E. 1989. Development of porcine embryos from the one-cell stage to blastocyst in mouse oviducts maintained in organ-culture. *J. Exp. Zool.* 249:235-9.
- KUES, W.A.; NIEMANN, H. 2004. The contribution of farm animals to human health. *Trends Biotechnol.* 22: 286-294.
- LAI, L.; KOLBER-SIMONDS, D.; PARK, K.W.; CHEONG, H.T.; GREENSTEIN, J.L.; IM, G.S.; SAMUEL, M.; BONK, A.; RIEKE, A.; DAY, B.N.; MURPHY, C.N.; CARTER, D.B.; HAWLEY, R.J.; PRATHER, R.S. 2002. Production of alpha-1,3-galactosyltransferase knockout pigs by nuclear transfer cloning. *Science* 295: 1089-1092.
- LAURINCIK, J.; RATH, D.; NIEMANN H. 1994. Differences in pronucleus formation and first cleavage following *in vitro* fertilization between pig oocytes matured *in vivo* and *in vitro*. *Journal of Reproduction and Fertility* 102, 277-284.
- LE BAS-BERNADET, S.; ANEGON, I.; BLANCHO, G. 2008. Progress and prospects: Genetic engineering in xenotransplantation. *Gene Ther.* 15:1247-1256.
- LEE, J.W.; TIAN, X.C.; YANG, X. 2003. Failure of male pronucleus formation is the major cause of lack of fertilization and embryo development in pig oocytes subjected to intracytoplasmic sperm injection. *Biol. Reprod.* 68: 1341-1347. [Medline] [CrossRef].
- LEE, K.; PRATHER; R.S. 2013. Advancements in somatic cell nuclear transfer and future perspectives. *Animal Frontiers* doi:10.2527/af.2013-0034
- LI, W.C.; ZHANG, H.M.; LI, J.; DONG, R.K.; YAO, B.C.; HE, X.J.; WANG, H.Q.; SONG, J. 2013. Comparison of biomechanical properties of bile duct between pigs and humans for liver xenotransplant. *Transplant Proc.* 45(2):741-7. doi: 10.1016/j.transproceed.2012.11.006
- LIU, Y.; YANG, J.Y.; LU, Y.; YU, P.; DOVE, C.R.; HUTCHESON, J.M.; MUMAW, J.L.; STICE, S.L.; WEST, F.D. 2013. α -1,3-Galactosyltransferase knockout pig induced pluripotent stem cells: a cell source for the production of xenotransplant pigs. *Cell Reprogram.* 15(2):107-16. doi: 10.1089/cell.2012.0062
- LONG, C.R.; DOBRINSKY, J.R.; JOHNSON, LA. 1999. *In vitro* production of pig embryos: comparisons of culture media and boars. *Theriogenology* 51:1375-90.
- LUNNEY, J.K. 2007. Advances in swine biomedical model genomics. *Int. J. Biol. Sci.* 3: 179-184.
- MCCAULEY, T.C.; MAZZA, M.R.; DIDION, B.A.; MAO, J.; WU, G.; COPPOLA, G.; COPPOLA, GF.; DI BERARDINO, D.; DAY, B.N. 2003. Chromosomal abnormalities in day-6, *in vitro*-produced pig embryos. *Theriogenology* 60:1569-1580
- MARCHAL, R.; FEUGANG, J.M.; PERREAU, C.; VENTURI, E.; TERQUI, M.; MERMILLOD, P. 2001. Meiotic and developmental competence of prepubertal and adult swine oocytes. *Theriogenology* 56:17-29.
- MARCHAL, R.; VIGNERON, C.; PERREAU, C.; BALI-PAPP, A.; MERMILLOD, P. 2002. Effect of follicular size on meiotic and developmental competence of porcine oocytes. *Theriogenology* 57:1523-32.
- MARTIN, M.J. 2000. Development of *in vivo*-matured porcine oocytes following intracytoplasmic sperm injection. *Biol. Reprod.* 63, 109-112.
- MARTINEZ, E.A.; ANGEL, M.A.; CUELLO, C.; SANCHEZ-OSORIO, J.; GOMIS, J.; PARRILLA, I.; VILA, J.; COLINA, I.; DIAZ, M.; REIXACH, J. 2014. Successful non-surgical deep uterine transfer of porcine morulae after 24 hour culture in a chemically defined medium. *PLoS ONE*, 9. e104696.
- MATAS, C.; COY, P.; ROMAR, R.; MARCO, M.; GADEA, J.; RUIZ, S. 2003. Effect of sperm preparation method on *in vitro* fertilization in pigs. *Reproduction* 125:133-41.
- MATAS, C.; VIEIRA, L.; GARCIA-VAZQUEZ, F.A.; AVILES-LOPEZ, K.; LOPEZ UBEDA, R.; CARVAJAL, J.A. 2011. Effects of centrifugation through three different discontinuous Percoll gradients on boar sperm function. *Anim. Reprod. Sci.* 127:62-72.
- MATTIOLI, M.; BACCI, M.L.; GALEATI, G.; SEREN, E. 1991. Effects of LH and FSH on the maturation of pig oocytes *in vitro*. *Theriogenology* 236: 95-105.
- MATSUNARI, H.; ONODERA, M.; TADA, N.; MOCHIZUKI, H.; KARASAWA, S.; HARUYAMA, E.; NAKAYAMA, N.; SAITO, H.; UENO, S.; KUROME, M.; MIYAWAKI, A.; NAGASHIMA, H. 2008. Transgenic-cloned pigs systemically expressing red fluorescent protein, Kusabira-Orange. *Cloning Stem Cells* 10: 313-323.
- MEIDINGER, R.G.; AJAKAIYE, A.; FAN, M.Z.; ZHANG, J.; PHILLIPS, J.P.; FORSBERG, C.W. 2013. Digestive utilization of phosphorus from plant based diets in the Cassie line of transgenic Yorkshire pigs that secrete phytase in the saliva. *Journal of Animal Science.* DOI: 10.2527/jas.2012-5575
- MINISTERIO DE HACIENDA Y FINANZAS PÚBLICAS. 2016. Informe de cadenas de valor. AÑO 1 N.º 9. (Disponible: http://www.economia.gov.ar/peconomica/docs/SSPE_Cadena_Valor_Porcina.pdf verificado: febrero de 2018).
- MEDVEDEV, S.; ONISHI, A.; FUCHIMOTO, D.; IWAMOTO, M.; NAGAI, T. 2004. Advanced *in vitro* production of pig blastocysts ob-

- tained through determining the time for glucose supplementation. *J. Reprod. Dev.* 50, 71-76. doi:10.1262/JRD.50.71
- MENINO, A.R.; WRIGHT, R.W. 1982. Development of one-cell porcine embryos in two culture systems. *J. Anim. Sci.* 54:583-8.
- MITO, T.; YOSHIOKA, K.; NOGUCHI, M.; YAMASHITA, S.; MISUMI, K. 2015. Birth of piglets from in vitro-produced porcine blastocysts vitrified and warmed in a chemically defined medium. *Theriogenology* 8, 1314-1320.
- MOOR, R.M.; MATTIOLI, M.; DING, J.; NAGAI, T. 1990. Maturation of pig oocytes in vivo and in vitro. *J. Reprod. Fertil* 40 (Suppl): 197-210.
- NAGAI, T.; FUNAHASHI, H.; YOSHIOKA, K.; KIKUCHI, K. 2006. Up date of *in vitro* production of porcine embryos. *Front. in Biosci.* 11:2565-2573.
- NAGAI, T.; MOOR, R.M. 1990. Effect of oviduct cells on the incidence of polyspermy in pig eggs fertilized in vitro. *Molecular Reproduction and Development* 26, 377-382.
- NAGAI, T.; TAKAHASHI, T.; MASUDA, H.; SHIOYA, Y.; KUYAMA, M.; FUKUSHIMA, M. 1988. In-vitro fertilization of pig oocytes by frozen boar spermatozoa. *J. Reprod. Fertil* 84:585-91.
- NAGAI, T. 1996. In vitro maturation and fertilization of pig oocytes. *Anim Reprod Sci*; 42: 153-163.
- NAITO, K.; FUKUDA, Y.; TOYODA, Y. 1988. Effects of porcine follicular fluid on male pronucleus formation in porcine oocytes matured in vitro. *Gamete Research* 21, 289-295.
- NAKAI, M.; OZAWA, M.; MAEDOMARI, N.; NOGUCHI, J.; KANEKO, H. 2014. Delay in cleavage of porcine embryos after intracytoplasmic sperm injection (ICSI) shows poorer embryonic development. *Reprod. Dev.* 60: 256-259.
- NAQVI, A.N. 2007. Application of molecular genetic technologies in livestock production: potentials for developing countries. *Adv. Biol. Res.* 1(3-4):72-84.
- NANASSY, L.; LEE, K.; JAVOR, A.; MACHATY, Z. 2008. Effects of activation methods and culture conditions on development of parthenogenetic porcine embryos. *Anim. Reprod. Sci.* 104:264-74.
- NICHOL, R.; HUNTER, R.H.; GARDNER, D.K.; LEESE, H.J.; COOKE, G.M. 2014. Concentrations of energy substrates in oviductal fluid and blood plasma of 34 C.G. *Gruppen Theriogenology* 81 24-37.
- NIEMANN, H.; RATH, D. 2001. Progress in reproductive biotechnology in swine. *Theriogenology* 56(8):1291-1304.
- NISHINAKAMURA, R.; MATSUMOTO, Y.; NAKAO, K.; NAKAMURA, K.; SATO, A.; COPELAND, N. G.; YOKOTA, T. 2001. Murine homolog of SALL1 is essential for ureteric bud invasion in kidney development. *Development*, 128, 3105-3115.
- NIWA, K. 1993. Effectiveness of in vitro maturation and in vitro fertilization techniques in pigs. *J. Reprod. Fertil* 48 (Suppl): 49-59.
- OFFIELD, M.F.; JETTON, T.L.; LABOSKY, P.A.; RAY, M.; STEIN, R.W.; MAGNUSON, M.A.; HOGAN, B.L.; WRIGHT, C.V. 1996. PDX-1 is required for pancreatic outgrowth and differentiation of the rostral duodenum. *Development* 122, 983-995.
- ONISHI, A.; IWAMOTO, M.; AKITA, T.; MIKAWA, S.; TAKEDA, K.; AWATA, T.; HANADA, H.; PERRY, A.C. 2000. Pig cloning by microinjection of fetal fibroblast nuclei. *Science* 289:1188-1190.
- PAPOTTO, D. 2006. Producción porcina en Argentina, pasado, presente y futuro. v Congreso de Producción Porcina del Mercosur, Río Cuarto.
- PAPAIOANNOU, V.E.; EBERT, K.M. 1988. The preimplantation pig embryo: Cell number and allocation to trophectoderm and inner cell mass of the blastocyst in vivo and in vitro. *Development* 102:793-803.
- PETRUNKINA, A.M.; SIMON, K.; GUNZEL-APEL, A.R.; TOPFER-PETERSEN, E. 2003. Regulation of capacitation of canine spermatozoa during coculture with heterologous oviductal epithelial cells. *Reprod. Domest. Anim.* 38:455-63.
- PETTERS, R.M.; WELLS, K.D. 1993. Culture of pig embryos. *J. Reprod. Fertil* 48 (Suppl): 61-73.
- POLGE, C. 1982. Embryo transplantation and preservation. En: COLE, D.J.A.; FOXCROFT, G.R. (editors). *Control of pig reproduction*. London: Butterworth; p. 277-91.
- POLEJAEVA, I.A.; CHEN, S.H.; VAUGHT, T.D.; PAGE, R.L.; MULLINS, J.; BALL, S.; DAI, Y.; BOONE, J.; WALKER, S.; AYARES, D.L. 2000. Cloned pigs produced by nuclear transfer from adult somatic cells. *Nature* 407:86-90.
- POPE, C.E.; JOHNSON, C.A.; MCRAE, M.A.; KELLER, G.L.; DRESSER, B.L. 1998. Development of embryos produced by intracytoplasmic sperm injection of cat oocytes. *Anim. Reprod. Sci.* 53, 221-236.
- PRATHER, R.S.; SUTOVSKY, P.; GREEN, J.A. 2004. Nuclear remodeling and reprogramming in transgenic pig production. *Exp. Biol. Med.* (Maywood) 229:1120-1126.
- PRATHER, R.S.; LORSON, M.; ROSS, J.W.; WHYTE, J.J.; WALTERS, E. 2013. Genetically engineered pig models for human diseases. *Annu. Rev. Anim. Biosci.* 1, 203-219.
- REYES, L.M.; BLOSSER, R.J.; SMITH, R.F.; MINER, A.C.; PARRIS, L.L.; BLANKENSHIP, R.L.; TECTOR, M.F.; TECTOR, A.J. 2014. Characterization of swine leucocyte antigen alleles in a crossbred pig to be used in xenotransplant studies. *issue Antigens.* 84(5):484-8. doi: 10.1111/tan.12430
- ROMAR, R.; FUNAHASHI, H. 2005. In vitro maturation and fertilization of porcine oocytes after a 48 h culture in roscovitine, an inhibitor of p34 (cdc2)/cyclin B kinase. *Animal Reproduction Science* 92, 321-333.
- ROMERO-AGUIRREGOMEZCORTA, J.; MATÁS, C.; COY, P. 2015. a-L-fucosidase enhances capacitation-associated events in porcine spermatozoa. *Vet. J.* 203:109-14.
- SCHINI, S.A.; BAVISTER, B.D. 1988. Two-cell block to development of cultured hamster embryos is caused by phosphate and glucose. *Biol. Reprod.* 39, 1183-1192. doi:10.1095/BIOLREPROD39.5.1183
- SHERRER, E.S.; RATHBUN, T.J.; DAVIS, D.L. 2004. Fertilization and blastocyst development in oocytes obtained from prepubertal and adult pigs. *J. Anim. Sci.* 82:102-8.
- SINGH, B.; RUTLEDGE, J.M.; ARMSTRONG, D.T. 1995. Epidermal growth factor and its receptor gene expression and peptide localization in porcine ovarian follicles. *Mol. Reprod. Dev.* 40: 391-399.
- SOMFAI, T.; KIKUCHI, K.; ONISHI, A.; IWAMOTO, M.; FUCHIMOTO, D.; PAPP, B.A.; SATO, E.; NAGAI, T. 2003. Meiotic arrest maintained by cAMP during the initiation of maturation enhances meiotic potential and developmental competence and reduces polyspermy of IVM/IVF porcine oocytes. *Zygote* 11, 199-206.
- STANGER, B.Z.; TANAKA, A.J.; MELTON, D.A. 2007. Organ size is limited by the number of embryonic progenitor cells in the pancreas but not the liver. *Nature* 22;445(7130):886-91.
- SUZUKI, K.; ASANO, A.; ERIKSSON, B.; NIWA, K.; NAGAI, T.; RODRIGUEZ-MARTINEZ, H. 2002. Capacitation status and in vitro fertility of boar spermatozoa: effects of seminal plasma, cumulus-oocyte-complexes-conditioned medium and hyaluronan. *International Journal of Andrology* 25, 84-93.
- SVALANDER, P.; FORSBERG, A.S.; JAKOBSSON, A.H.; WIKLAND, M. 1995. Factors of importance for the establishment of a successful program of intracytoplasmic sperm injection treatment for male infertility. *Fertil. Steril.*, 63, 828-837.

- SWINDLE M.M. 2007. Swine in the laboratory. CRC press 2.^a edición.
- TAKAHASHI, Y.; FIRST, N. L. 1992. In vitro development of bovine one-cell embryos: influence of glucose, lactate, pyruvate, amino acids and vitamins. *Theriogenology* 37, 963-978. doi:10.1016/0093-691X(92) 90096-A
- TANGHE, S.; VAN SOOM, A.; NAUWYNCK, H.; CORYN, M.; DE KRUIF, A. 2002. Minireview: functions of the cumulus oophorus during oocyte maturation, ovulation, and fertilization. *Molecular Reproduction and Development* 61, 414-424.
- TAREQ, KM.; AKTER, QS.; TSUJII, H.; KHANDOKER, MA.; CHOI, I. 2013. Effect of dipeptides on in vitro maturation, fertilization and subsequent embryonic development of porcine oocytes. *Asian-Australas J. AnimSci.* 26:501-8.
- TATEMOTO, H.; SAKURAI, N.; MUTO, N. 2000. Protection of porcine oocytes against apoptotic cell death caused by oxidative stress during in vitro maturation: role of cumulus cells. *Biology of Reproduction* 63, 805-810.
- TATEMOTO, H.; OOTAKI, K.; SHIGETA, K.; MUTO, N. 2001. Enhancement of developmental competence after in vitro fertilization of porcine oocytes by treatment with ascorbic acid 2-O-alpha-glucoside during in vitro maturation. *Biology of Reproduction* 65, 1800-1806.
- TATEMOTO, H.; MUTO, N.; SUNAGAWA, I.; SHINJO, A.; NAKADA, T. 2004. Protection of porcine oocytes against cell damage caused by oxidative stress during in vitro maturation: role of superoxide dismutase activity in porcine follicular fluid. *Biol. Reprod.* 71:1150-7.
- TESARIK, J.; SOUSA, M.; TESTART, J. 1994. Human oocyte activation failure after intracytoplasmic sperm injection. *Hum. Reprod.* 9, 511-518.
- THIBAUT, C.; SZOLLOSI, D.; GERARD, M. 1987. Mammalian oocyte maturation. *Reprod. Nutr. Dev.* 27: 856-896.
- ULLOA ULLOA, C.M.; YOSHIZAWA, M.; KOMORIYA, E.; MITSUI, A.; NAGAI, T.; KIKUCHI, K. 2008. The blastocyst production rate and incidence of chromosomal abnormalities by developmental stage in vitro produced porcine embryos. *J. Reprod. Dev.* 54, 22-29.
- VANDERZ WALMEN, P.; BERTIN, G.; LEJEUNE, B.; NIJS, M.; VANDAMME, B.; SCHOYSMAN, R. 1996. Two essential steps for a successful intracytoplasmic sperm injection: injection of immobilized spermatozoa after rupture of the oolemma. *Hum. Reprod.* 11, 540-547.
- WALLENHORST, S.; HOLTZ, W. 1999. Transfer of pig embryos to different uterine sites. *J. Anim. Sci.* 77:2327-9.
- WANG, WH.; MACHATY, Z.; ABEYDEERA, LR.; PRATHER, RS.; DAY, BN. 1999. Time course of cortical and zona reaction of pig oocytes upon intracellular calcium increase induced by thimerosal. *Zygote* 7: 79-86.
- WANG, W.H.; ABEYDEERA, L.R.; FRASER, L.R.; NIWA, K. 1995. Functional analysis using chlortetracycline fluorescence and in vitro fertilization of frozen-thawed ejaculated boar spermatozoa incubated in a protein-free chemically defined medium. *Journal of Reproduction and Fertility* 104, 305-313.
- WHITWORTH, K.M.; PRATHER, R.S. 2010. Somatic cell nuclear transfer efficiency: How can it be improved through nuclear remodeling and reprogramming? *Mol. Reprod. Dev.* 77:1001-1015.
- WONGSRIKEAO, P.; OTOI, T.; MURAKAMI, M.; KARJA, N.W.; BUDIYANTO, A.; MURAKAMI, M.; NII, M.; SUZUKI, T. 2005. Relationship between DNA fragmentation and nuclear status of in vitro-matured porcine oocytes: role of cumulus cells. *Reproduction Fertility and Development* 16, 773-780.
- WU, J.; CARRELL, D.T.; WILCOX, A.L. 2001. Development of in vitro matured oocytes from porcine preantral follicles following intracytoplasmic sperm injection. *Biol. Reprod.* 65, 1579-1585.
- WU, G.M.; SUN, Q.Y.; MAO, J.; LAI, L.; MCCAULEY, T.C.; PARK, K.W.; PRATHER, R.S.; DIDION, BA.; DAY, B.N. 2002. High developmental competence of pig oocytes after meiotic inhibition with a specific M-phase promoting factor kinase inhibitor, Butyrolactone I. *Biology of Reproduction* 67, 170-177.
- YAMAGUCHI, T.; SATO, H.; KATO-ITOH, M. 2017. Interspecies organogenesis generates autologous functional islets. *Nature* 542:191-196.
- YANG, Y.G.; SYKES, M. 2007. Xenotransplantation: Current status and a perspective on the future. *Nat. Rev. Immunol.* 7:519-531.
- YE, J.; CAMPBELL, K.H.S.; CRAIGON, J.; LUCK, M.R. 2005. Dynamic changes in meiotic progression and improvement of developmental competence of pig oocytes in vitro by follicle-stimulating hormone and cycloheximide. *Biology of Reproduction* 72, 399-406.
- YESTE, M.; LLOYD, R.E.; BADIA, E.; BRIZ, M.; BONET, S.; HOLT, W.V. 2009. Direct contact between boar spermatozoa and porcine oviductal epithelial cell (OEC) cultures is needed for optimal sperm survival in vitro. *Anim. Reprod. Sci.* 113:263-78.
- YONG, H.Y.; HONG, J.Y.; KANG, S.K.; LEE, B.C.; LEE, E.S.; HWANG, W.S. 2005. Sperm movement in the ooplasm, dithiothreitol pretreatment and sperm freezing are not required for the development of porcine embryos derived from injection of head membrane-damaged sperm. *Theriogenology* 63: 783-794. [Medline] [CrossRef]
- YOSHIDA, M.; ISHIZAKI, K.; KAWAGISHI, H. 1990. Blastocyst formation by pig embryos resulting from in vitro fertilization of oocytes matured in vitro. *Journal of Reproduction and Fertility* 88, 1-8.
- YOSHIDA, M.; ISHIZAKI, Y.; KAWAGISHI, H.; BAMBA, K.; KOJIMA, Y. 1992. Effects of pig follicular fluid on maturation of pig oocytes in vitro and on their subsequent fertilizing and developmental capacity in vitro. *J. Reprod. Fertil* 95:481-8.
- YOSHIDA, M. 1993. Role of glutathione in the maturation and fertilization of pig oocytes in vitro. *Mol. Reprod. Dev.* 35: 76-81.
- YOSHIOKA, K.; SUZUKI, C.; TANAKA, A.; ANAS, IM.; IWAMURA, S. 2002. Birth of piglets derived from porcine zygotes cultured in a chemically defined medium. *Biol. Reprod.* 66:112-9.
- YOSHIOKA, K.; SUZUKI, C.; ITOH, S.; KIKUCHI, K.; IWAMURA, S.; Rodriguez-Martinez, H. 2003. Production of piglets derived from in vitro-produced blastocysts fertilized and cultured in chemically defined media: effects of theophylline, adenosine, and cysteine during in vitro fertilization. *Biology of Reproduction* 69, 2092-2099.
- YOSHIOKA, K. 2011. Development and application of a chemically defined medium for the in vitro production of porcine embryos. *J. Reprod. Dev.* 57(1):9-16.
- YOSHIOKA, K.; NOGUCHI, M.; SUZUKI, C. 2012. Production of piglets from in vitro-produced embryos following non-surgical transfer. *Anim. Reprod. Sci.* 131:23-9.
- ZHANG, W.; YI, K.; YAN, H.; ZHOU, X. 2012. Advances on in vitro production and cryopreservation of porcine embryos. *Anim. Reprod. Sci.* 132(3-4):115-22. doi: 10.1016/j.anireprosci.2012.05.008
- ZHANG, J.Y.; JIANG, Y.; LIN, T.; KANG, J.W.; LEE, J.E.; JIN, D.I. 2015. Lysophosphatidic acid improves porcine oocyte maturation and embryo development in vitro. *Mol. Reprod. Dev.* 82:66-77.
- ZHOU, X.; XIN, J.; FAN, N.; ZOU, Q.; HUANG, J.; OUYANG, Z.; ZHAO, Y.; ZHAO, B.; LIU, Z.; LAI, S.; YI, X.; GUO, L.; ESTEBAN, M.A.; ZENG, Y.; YANG, H.; LAI, L. 2015. Generation of CRISPR/Cas9-mediated gene-targeted pigs via somatic cell nuclear transfer. *Cell Mol Life Sci.* 72(6):1175-84.