

Métodos de generación de cerdos transgénicos

J. Gadea¹, F.A. García-Vázquez

Departamento de Fisiología. Facultad de Veterinaria. Universidad de Murcia. Campus de Espinardo. Murcia 30.100 España. <http://www.um.es/grupo-fisiovet>

Resumen

La generación de animales transgénicos ha supuesto una gran revolución biotecnológica en los campos de ciencia y de la salud. El cerdo es un animal de gran importancia en la producción animal, pero también lo es como animal de experimentación usado como modelo de los nuevos procesos biotecnológicos y de las enfermedades humanas. En los últimos 25 años, el desarrollo de la transgénesis porcina ha ido asociado al desarrollo y la aplicación de nuevas tecnologías de biología molecular y de reproducción asistida. En este documento revisamos los métodos empleados hasta el momento para la generación de porcinos transgénicos, analizando tanto las ventajas que cada tecnología ofrece como las limitaciones que las técnicas presentan. Describimos desde los primeros estudios realizados en la transgénesis porcina mediante inyección pronuclear hasta los últimos avances en células madre pluripotenciales inducidas que acaban de ser descritas, pasando por el empleo de los virus, los espermatozoides como mediadores de la transferencia genética y los procesos de transferencia nuclear (clonación). Igualmente aportamos la experiencia acumulada por nuestro grupo de investigación en los últimos años en este apasionante campo de la ciencia.

Palabras clave: cerdo, microinyección, células madre, virus, espermatozoide, técnicas reproductivas.

Summary

Methodologies for generating transgenic pigs

The production of transgenic animals was a great biotechnology revolution in the fields of science and health. Pig is a very important animal for the agriculture industry, but also it is an important lab animal used in models for biotechnological studies and human diseases. In the last 25 years, transgenic pigs have been improved by the development and application of new molecular biology and assisted reproductive technologies. In this manuscript we review the different methodologies used for producing transgenic pigs. We analyze the advantages and limitations that each methodology offers. We describe from the first studies for producing transgenic pigs by pronuclear injection to the latest studies with induced pluripotent stem cells (iPSC) recently described. We also analyze the used of virus, sperm mediated gene transfer and somatic nuclear transfer technology. Finally we contribute with our own experience developed in this amazing field of science by our research group during recent years.

Key words: porcine, virus, microinjection, stem cells, spermatozoa, reproductive techniques.

1. Autor al que dirigir la correspondencia. E-mail: jgadea@um.es

Introducción

Desde el descubrimiento de la doble hélice de ADN en la década de los 50 se abrieron grandes posibilidades para comprender la estructura del material genético y los procesos de la expresión génica. Posteriormente, en la década de los 80 se desarrolló la tecnología capaz de manipular el material genético y producir animales transgénicos. Este desarrollo ha permitido la aplicación del conocimiento en diversos aspectos de la vida, que tiene un beneficio directo sobre toda la humanidad como se pone de manifiesto en el diagnóstico rápido y preciso de enfermedades de origen infeccioso y genético, la selección de animales, el desarrollo de la terapia celular o de la medicina regenerativa, etc.

En este sentido, la posibilidad de crear animales transgénicos que codifiquen un carácter de nuestro interés o anulen algún carácter indeseable, puede tener una gran repercusión en la producción animal y en el desarrollo biotecnológico. La aplicación de esta tecnología permitiría no sólo la obtención de la producción deseada más rápidamente que por la clásica selección natural, sino también trasladar genes de una especie a otra, es decir generar un producto propio de otra especie. Por ejemplo, ya se produce la α -1-antitripsina humana en la leche de cabras modificadas genéticamente que sirve para el tratamiento de los pacientes con enfisema pulmonar y un número importante de agentes farmacológicos producidos de la misma manera están en fase experimental preclínica o clínica (revisado por Dunn *et al.*, 2005).

La producción de estos animales transgénicos es una empresa tecnológicamente compleja, a la par que apasionante, que requiere un amplio equipo multidisciplinar (biología molecular, reproducción asistida, bioseguridad, etc.) y lleva implícito un alto coste económico. Sin embargo, una vez obtenidos los primeros animales transgénicos fundadores,

éstos pueden transmitir el transgén a la prole por mecanismos reproductivos normales, generando un nuevo producto de un gran valor añadido que puede compensar la inversión realizada.

En lo que a la especie porcina se refiere, la historia de los transgénicos da un gran salto cuando dos equipos de investigación en Estados Unidos y Alemania publican en el año 1985 la generación de cerdos transgénicos mediante el empleo de técnicas de inyección pronuclear (Hammer *et al.*, 1985; Brem *et al.*, 1985). Desde entonces hasta nuestros días se ha producido un gran avance en la generación de animales transgénicos con el desarrollo de nuevas técnicas y metodologías como el uso de vectores virales, de los espermatozoides como mediadores de la transferencia genética, la clonación de las células somáticas y el uso de células madre (*stem cells*) (Tabla 1). Este desarrollo tecnológico ha permitido superar en parte las limitaciones que presentaba la microinyección como método para generar transgénicos (revisado por Nagashima *et al.*, 2003; Bacci, 2007; Niemann y Kues, 2007; Robl *et al.*, 2007).

En estos dos documentos consecutivos pretendemos, por una parte, describir los métodos empleados más frecuentemente para la generación de porcinos transgénicos, planteando las ventajas y limitaciones que cada tecnología presenta. Posteriormente, en un segundo documento, analizaremos las aplicaciones que tienen actualmente y puedan tener estos animales en un futuro próximo tanto en el ámbito de la salud como el de la producción animal.

¿Qué entendemos por cerdo transgénico o modificado genéticamente?

Un cerdo transgénico o modificado genéticamente es aquel al cual se le ha introducido un material genético exógeno (molécu-

Tabla 1. Algunos pasos importantes en la aplicación de tecnologías para la generación de cerdos transgénicos
 Table 1. Some important milestones in the application of the technologies for producing transgenic pigs

Metodología	Características	Referencia
Inyección pronuclear	Primeros cerdos transgénicos mediante virus	Hammer et al., 1985; Brem et al., 1985
Retrovirus aviáres	Primeros cerdos transgénicos producidos mediante virus	Petters et al., 1987
Inyección pronuclear	Uso de ovocitos madurados y fecundados <i>in vitro</i>	Kubish et al., 1995
Transgénesis mediada por espermatozoides	Primeros cerdos transgénicos producidos mediante SMGT	Sperandio et al., 1996
Transgénesis mediada por espermatozoides	Generación de cerdos hDAF	Lavitrano et al., 1997
Lentivirus Leucemia murina de Moloney	Infección de ovocitos	Cabot et al., 2001
Transferencia nuclear	Primeros cerdos transgénicos producidos mediante transferencia nuclear	Park et al., 2001
Transgénesis mediada por espermatozoides e ICSI	Primer lechón transgénico SMGT-ICSI	Lai et al., 2001
Transferencia nuclear	Primeros cerdos transgénicos <i>knock-out</i>	Lai et al., 2002
Lentivirus Leucemia murina de Moloney	Inyección en el espacio perivitelino del cigoto	Hofmann et al., 2003
Lentivirus Anemia infecciosa equina	Inyección en el espacio perivitelino del cigoto	Whitelaw et al., 2004

las de ADN recombinante) de forma intencionada por el hombre para lograr nuevas propiedades. Para lograr que todas las células del organismo expresen este nuevo gen, se incorpora dicho gen en un embrión en estadio de cigoto. Si este ADN exógeno se integra en las células de la línea germinal, podrá ser entonces transmitido a la descendencia de acuerdo a las clásicas leyes mendelianas de la herencia de caracteres.

Actualmente también se diseñan animales transgénicos que tiene anulada una región de su material genético propio y por tanto no pueden expresar ese carácter (*Knock-out*). El uso de los animales *Knock-out* facilita el estudio de la función de un gran número de genes y proteínas. Pero en un sentido más amplio puede entenderse por animal modificado genéticamente aquel al que se le ha introducido el ADN después del nacimiento. Esta es la base de la terapia génica que pretende utilizar los genes como un "medicamento" para el tratamiento de un individuo. O bien, la denominada transferencia genética en testículo (Testis mediated gene transfer, TMGT), que implica la transferencia de genes directamente al testículo y que permitirá producir animales transgénicos mediante el uso de los espermatozoides generados a partir del testículo genéticamente modificado (revisado por Celebi *et al.*, 2003; Coward *et al.*, 2007).

¿Cómo se produce un cerdo transgénico?

Inyección pronuclear

Mediante esta técnica se creó el primer animal transgénico por Gordon *et al.* (1980), basándose en la microinyección de genes directamente en el pronúcleo de ovocitos de ratón recién fecundados. Esta técnica ha sido la más usada en la producción de ratones transgénicos desde la década de los 80

(Gordon y Ruddle, 1981) y a lo largo de los años ha sido adaptada para su uso en animales de granja.

En la especie porcina el proceso comienza con la obtención de cigotos en estado pronuclear o embriones de dos células procedentes de cerdas inseminadas, aunque de forma alternativa también pueden usarse cigotos producidos *in vitro* mediante técnicas de FIV o ICSI (Kubish *et al.*, 1995; Koo *et al.*, 1997). Posteriormente y mediante el empleo de un sistema de micromanipulación embrionaria se inyecta en el pronúcleo pequeños volúmenes de una solución de ADN con agujas de pequeño calibre (Hammer *et al.*, 1985; Brem *et al.*, 1985). El equipo de microinyección consta básicamente de un microscopio invertido y dos brazos de micromanipulación. Uno de ellos está conectado a una pipeta de sujeción, que por presión negativa mantiene fijo el cigoto, por lo que habitualmente se le denomina "*holder*". Una vez que el cigoto está firmemente sujeto, se inyecta el ADN en el interior del núcleo con el empleo de una microaguja adaptada al otro brazo de micromanipulación. Tras este proceso de inyección los embriones son transferidos a una hembra receptora.

En los animales domésticos en general y en concreto en el caso del cerdo, la obtención de embriones en estado pronuclear supone una mayor dificultad técnica y un coste superior a la obtención de embriones murinos. Pero además, la eficiencia de esta técnica de inyección pronuclear es menor en la especie porcina que la conseguida en ratones debido a diversos factores. Primeramente, porque la visualización de los pronúcleos del cigoto se ve dificultada por la presencia de gotas de grasa. Este hecho se puede solventar mediante la centrifugación de los cigotos a alta velocidad (10-15.000 g x 3-5 min.), desplazando las gotas de grasa hacia un polo del cigoto, pero esta centrifugación implica la reducción en las tasas de desarro-

llo embrionario (Wall *et al.*, 1985). Pero sin duda la limitación más importante que presenta esta técnica en la especie porcina, y en general en los animales de granja, es el bajo rendimiento del sistema para integrar el ADN inyectado en el genoma del embrión receptor, la integración es al azar y los problemas en la correcta expresión de las proteínas. Según una revisión de Pursel *et al.* (1990) entre el 0,31 y el 1,73% de los cigotos inyectados llegan a dar lugar a un cerdo transgénico frente a la media del 3% de rendimiento que se obtiene en los ratones.

Otra importante cuestión a tener en consideración es el alto grado de mosaicismo que presentan los animales transgénicos creados mediante inyección pronuclear que puede alcanzar hasta el 60-80% de los animales (Koo *et al.*, 1997). La presencia en un mismo individuo de células que presentan el fenotipo modificado junto con otras células que conservan el fenotipo original, podría estar relacionado no sólo con una integración del transgén de manera desigual en las diversas células, sino también con el sistema de regulación que controla la transcripción y translación, que pudiera silenciar de manera selectiva la expresión de la proteína en algunas blastómeras y no en otras.

Para mejorar el rendimiento de esta técnica de microinyección en la especie porcina se han estudiado diversos factores del proceso como son las condiciones del cultivo, el lugar de inyección, tipo de hembra donante, embrión producido *in vitro* o *in vivo*, tipo y tamaño del ADN, etc. (Willians *et al.*, 1992; Hajdu *et al.*, 1994; Martin *et al.*, 1996; Koo *et al.*, 1997; Martin *et al.*, 2000; Nottle *et al.*, 2001). Del mismo modo, se ha optimizado el proceso de transferencia de los embriones a las cerdas receptoras (sincronía entre donantes y receptoras, número de embriones a transferir, etc) para mejorar los resultados (revisado por Martin y Pinkert, 2002). En cualquier caso y a pesar de las mejoras intro-

ducidas, estudios posteriores han confirmado que la eficiencia de esta técnica en la especie porcina se mantiene estable y difícilmente puede ser mejorada con la tecnología disponible. Así en términos generales consideramos que aproximadamente el 1-2% de los cigotos microinyectados llega a generar un animal transgénico (Hirabayashi *et al.*, 2001; Uchida *et al.*, 2001; Nottle *et al.*, 2001).

Transgénesis mediada por virus

Una alternativa a la microinyección pronuclear es el uso de virus que inserten genes exógenos en el genoma del animal a transformar. El virus actúa como un sistema natural de transferencia de ADN a varios tipos de células (Pfeifer, 2004). Esta transferencia puede llevarse a cabo de diversas formas, como son la exposición de las células a una alta concentración de virus, por co-cultivo en monocapa de células infectadas con virus, y mediante la microinyección de los virus directamente en el interior de los blastocistos o en el espacio perivitelino de los cigotos (Petters *et al.*, 1997; Cabot *et al.*, 2001; Hoffman *et al.*, 2003; Whitelaw *et al.*, 2004).

Para generar animales transgénicos se han utilizado fundamentalmente los retrovirus. Estos son virus con envoltura que presentan un genoma de ARN monocatenario y se replican a través de una forma intermedia de ADN bicatenario mediante la enzima transcriptasa inversa. Este ADN generado se integra en el genoma del hospedador y se comporta como un gen más. Estos virus han sido modificados para que pierdan su carácter patogénico, aunque siguen siendo capaces de infectar células y de transportar una pequeña cantidad de ADN, que aunque limitada, es suficiente para transferir una amplia variedad de construcciones genéticas.

Petters *et al.* (1987) describen por primera vez el uso de retrovirus aviares para infectar

embriones porcinos. Posteriormente se han utilizado retrovirus de la leucemia murina de Moloney para infectar ovocitos que se han fecundado *in vitro* y transferido a una cerda receptora para producir cerdos transgénicos (Cabot *et al.*, 2001). Entre las limitaciones o desventajas del uso de los retrovirus se encuentra primeramente el hecho de que únicamente permiten la transferencia de construcciones de tamaño inferior a 10 kb (revisado por Wall, 2002). Otra desventaja ha sido descrita en numerosos casos en los que la utilización de retrovirus ha permitido la transferencia de los genes, pero estos no son expresados adecuadamente en los animales transgénicos, por lo que la utilidad de estos virus es limitada (revisado por Pfeifer, 2004).

Por último haremos mención a los lentivirus, que se encuentran dentro de la familia de los retrovirus, y que se han utilizado con éxito para producir cerdos transgénicos (Hoffman *et al.*, 2003; Pfeifer, 2004; Whitelaw *et al.*, 2004 y 2008). La principal ventaja del uso de los lentivirus como vectores de transgénesis es la gran eficiencia de la técnica. En este sentido, mientras que el porcentaje de nacidos transgénicos para el porcino se encuentra próximo al 1-2% cuando se utiliza la microinyección pronuclear, con el uso de los lentivirus en la especie porcina se han obtenido entre 3 y 35% según los diferentes estudios (revisado por Park, 2007). Del mismo modo mejoran sustancialmente los niveles de expresión tanto en los fundadores como en la progenie. Por el contrario, como desventajas de esta técnica podemos destacar la inestabilidad de los vectores, la difícil manipulación y preparación de los mismos (Houbine, 2005; Park, 2007). Una vez que se superen los problemas de bioseguridad que aun plantea el uso de virus y los de estabilidad, esta técnica podrá ser de gran aplicabilidad en el futuro próximo, debido a su relativa sencillez y gran eficiencia.

El espermatozoide como vector de la transgénesis

La capacidad de los espermatozoides para capturar ADN exógeno fue descrita por primera vez por Brackett *et al.* (1971) en el conejo. Este descubrimiento y sus importantes implicaciones fueron ignoradas durante casi 20 años, y no es hasta 1989 cuando se demuestra la capacidad que tenían los espermatozoides de ratón de transportar ADN exógeno y transferir estas moléculas al interior del ovocito en el proceso de la fecundación dando lugar a animales modificados genéticamente (Lavitano *et al.*, 1989). Desde entonces esta técnica, denominada transgénesis mediada por espermatozoides (Sperm mediated gene transfer, SMGT), fue objeto del interés de toda la comunidad científica, ya que podría ser considerada, por su relativa sencillez y bajo coste, como la técnica de elección para la producción de animales de granja modificados genéticamente. Sin embargo, las dificultades para repetir los experimentos en otros laboratorios y la baja eficiencia en la integración de los transgenes en el genoma del animal, llevó asociada una considerable controversia durante numerosos años (Brinster *et al.*, 1989; Birnstiel y Busslinger, 1989; Spadafora, 1998). En cualquier caso, usando esta técnica se han descrito porcentajes que se encuentran entre el 5 y el 80% de animales transgénicos del total de nacidos y su eficiencia varía según las especies de aplicación (revisado por Smith y Spadafora, 2005).

En la especie porcina Sperandio *et al.* (1996) describen por primera vez la generación de lechones transgénicos producidos mediante el uso espermatozoides incubados en presencia de ADN exógeno y la aplicación de la dosis de inseminación artificial mediante un procedimiento convencional. Poco tiempo después, el mismo equipo confirmó la generación de animales transgénicos usando

esta misma metodología que expresaban un gen humano (human decay acceleration factor) relacionado con los estudios de xenotrasplantes (Lavitrano *et al.*, 1997, 1999, 2002 y 2003). Posteriormente se utilizó para generar animales poli-transgénicos utilizando en este caso la inseminación laparoscópica (Webster *et al.*, 2005). En cualquier caso, los resultados no son concluyentes ya que la repetitividad de la técnica es muy reducida por factores no bien definidos (Gandolfi *et al.*, 1996; Kang *et al.*, 2008; Wu *et al.*, 2008).

Nuestra aportación en este campo se ha centrado en analizar los factores que determinan la unión del espermatozoide al ADN exógeno y la eficiencia de la técnica (García-Vázquez, 2007). Entre estos factores se encuentra la presencia de plasma seminal, el tipo de ADN, el origen del espermatozoide, el medio de incubación, los tratamientos espermáticos, etc. (García-Vázquez *et al.*, 2007-2009). Una de las conclusiones más determinantes a las que hemos llegado es el hecho de que en nuestras condiciones experimentales la unión del ADN exógeno se produce a espermatozoides con membrana alterada (García-Vázquez *et al.*, 2009). Este hecho determina que la probabilidad de obtener animales transgénicos haciendo uso de la inseminación o la fecundación *in vitro* es limitada (García-Vázquez *et al.*, 2009). Como alternativa cabe la posibilidad de utilizar la inyección intracitoplasmática de espermatozoides (ICSI) que permiten el uso de espermatozoides independientemente de la alteración de membrana que presenten, como se puso de manifiesto en la especie murina (Perry *et al.*, 1999, Moreira *et al.*, 2004 y 2007). Posteriormente se ha aplicado la ICSI en la especie porcina para generar embriones y animales transgénicos con una mayor eficiencia y repetitividad (Lai *et al.*, 2001; Naruse *et al.*, 2005; Kurome *et al.*, 2007, García-Vázquez *et al.*, 2007-2009, Wu *et al.*, 2009). Mediante la combinación

de la ICSI y SMGT hemos logrado obtener animales transgénicos procedentes de diversas camadas.

Un nuevo abordaje es el que se plantea con la transgénesis activa con el uso de recombinasas o transposasas que puedan mejorar la eficiencia de la transgénesis (Shinohara *et al.*, 2007). En el ratón, el uso de la proteína de origen bacteriano recombinasa A y la proteína Tn5 transposasa incrementan notablemente las tasas de transgénesis tanto usando microinyección como ICSI-SMGT (Kaneke *et al.*, 2005; Suganuma *et al.*, 2005; Moreira *et al.*, 2007). En la especie porcina, se ha demostrado la mejora de la eficiencia al usar la proteína recombinasa A procedente de *E. coli* al usar en un sistema de microinyección (Maga *et al.*, 2003) y nuestras experiencias usando la técnica de ICSI-SMGT han puesto de manifiesto que las tasas de embriones que expresan el transgén está próxima al 90% y es posible obtener lechones transgénicos por transferencia de estos embriones (García-Vázquez *et al.*, 2009).

Por otra parte, se han usado adenovirus deficientes en la replicación recombinante para transferir ADN exógeno a células de diferentes tejidos. Un equipo de la Universidad Autónoma de Barcelona (Farre *et al.*, 1999) ha utilizado esta técnica para introducir ADN exógeno a espermatozoides porcinos que utilizados en fecundación *in vitro* e inseminación artificial dieron lugar a embriones y lechones transgénicos.

Células madre

Mediante el empleo de la inyección pronuclear es posible generar grandes animales transgénicos pero con esta tecnología no es posible realizar modificaciones genéticas dirigidas (Gene targeting), lo que aportaría la ventaja de poder elegir el locus que se desea modificar y tener un buen control de la modulación

de ese locus. El uso de la tecnología de las células madre embrionarias (Embryonic stem cells ES) permite hacer modificaciones genéticas dirigidas (Gene targeting).

Las *células madre* (o *stem cells*) son células que tienen la habilidad de dividirse y diferenciarse en varios tipos de células o tejidos. Existen diferentes tipos de células madre: las células madre embrionarias (CME), inducidas (CMI) o adultas (CMA). Las CME y CMI tienen la característica de ser pluripotentes, es decir, pueden derivar a cualquier tipo celular. Sin embargo las CMA son multipotentes, lo que significa que únicamente puede dar lugar a células de su propia línea germinal (ej.: las células hematopoyéticas).

Las CME se aíslan de la masa celular interna (ICM) de los blastocistos y tienen la capacidad para formar quimeras y contribuir a la formación de la línea germinal (Capecchi, 2005). Tras la obtención se procede al cultivo *in vitro* de estas células madre embrionarias y finalmente se transfieren con la ayuda de un micromanipulador al interior de un blastocisto receptor, para dar lugar finalmente a animales quiméricos, es decir células originarias de 2 cigotos, que tras la fecundación se combinan formando uno solo, por lo tanto el nuevo animal posee dos tipos de células diferentes, cada una con distinta constitución genética.

Las células embrionarias se han desarrollado en ratones desde la década de los ochenta (Evans y Kaufman, 1981; Martin, 1981) y más recientemente en ratas (Li *et al.*, 2008), perros (Hatoya *et al.*, 2006) y gatos (Yu *et al.*, 2008). En la especie porcina en la década de los noventa aparecieron las primeras referencias de la derivación de células similares a las embrionarias (ESC-like cells) (Notariani *et al.*, 1990; Piedrahita *et al.*, 1990), pero esas células como otras derivadas de embriones bovinos, caprinos o/y ovinos no cumplen todos los criterios que definen a las verdade-

ras células embrionarias (Ezashi *et al.*, 2009) y a pesar de múltiples esfuerzos, no ha sido posible todavía conseguir estas células embrionarias en estas especies domésticas (revisado por Muñoz *et al.*, 2009). Por lo que algunas de las alternativas que se barajan en los animales de granja son el uso de células germinales embrionarias, células madre espermatogónicas o células madre germinales multipotentes.

Recientemente se ha descrito la generación de células madres pluripotentes inducidas (ipSC) porcinas a partir de células somáticas (Ezashi *et al.*, 2009; Esteban *et al.*, 2009). Estas células presentan características similares a las células madres embrionarias y pueden ser una pieza fundamental para el desarrollo biotecnológico en los próximos tiempos (Roberts *et al.*, 2009).

Transferencia nuclear

Como alternativa a la microinyección se encuentra la técnica de transferencia nuclear de una célula somática a un ovocito enucleado que se le conoce por el término de clonación y que ha tenido un gran desarrollo desde la generación de la oveja Dolly (Willmut *et al.*, 1997). El avance de esta tecnología ha permitido un gran impulso en la generación de cerdos transgénicos (revisado por Lai y Prather, 2003). Los primeros cerdos clonados fueron descritos por Polejaeva *et al.* (2000) y rápidamente esta tecnología fue aplicada para generar los primeros cerdos transgénicos que expresaban el marcador GFP (Park *et al.*, 2001) y posteriormente los primeros cerdos knock-out (Lai *et al.*, 2002).

Para llevar a cabo esta técnica, primeramente se aíslan células somáticas (habitualmente fibroblastos fetales porcinos) que son sometidas a un proceso de transformación, de modo que se puede incluir nuevo material genético o anular la expresión de algún

gen. Este proceso de transformación es complejo y poco eficiente; comienza con la obtención de fibroblastos procedentes de fetos porcinos de unos 30-35 días de edad como células donantes del núcleo (revisado por Yanagimachi, 2002). Estas células fetales son sometidas a diversos procesos de transfección como la electroporación o la transfección mediada por lípidos, para conseguir la recombinación homóloga. En la mayoría de los casos la recombinación se produce al azar con integraciones no homólogas. Posteriormente se selecciona la población de células que se han transfectado adecuadamente para finalmente transferir el núcleo de estas células a un ovocito enucleado mediante la ayuda de un micromanipulador e inducir pulsos eléctricos para el inicio del desarrollo embrionario (Kragh *et al.*, 2004).

Las utilidades de la clonación son enormes, desde la clonación de animales en peligro de extinción hasta la generación de animales transgénicos. Esta tecnología es fundamental en el diseño de animales *knock out* como los que se han empleado para la producción de cerdos destinados al xenotrasplante donde se anula la expresión de la enzima α -1,3-galactosil transferasa (Lai *et al.*, 2002; Kolber-Simonds *et al.*, 2004) que reduce el rechazo hiper agudo, o para producir cerdos transgénicos como modelos de la enfermedad de la fibrosis quística (Roger *et al.*, 2008).

A pesar de la utilidad de esta técnica, la eficiencia es sensiblemente baja con valores entre el 1-2% de los ovocitos empleados (revisado por Yanagimachi, 2002; Lai y Prather, 2003). Los problemas están asociados principalmente a fallos en la reprogramación del núcleo transferido, gran mortalidad perinatal y a ciertas anomalías anatómicas y fisiológicas (Ej.: rápido envejecimiento por acortamiento de los telómeros).

Conclusiones y perspectivas de futuro

En los 25 años transcurridos desde la generación de los primeros cerdos transgénicos hasta nuestros días, se ha producido un gran avance en las técnicas y métodos. Sin embargo, este campo de la ciencia aun se encuentra en una fase inicial de desarrollo. Probablemente se verá potenciado en el futuro próximo por la demanda de nuevos modelos que permitan estudiar enfermedades humanas. Es de esperar que para ello se haga uso principalmente de la técnica de transferencia nuclear por las grandes ventajas que aporta en la generación de animales knock-out (Tabla 2). Pero igualmente se potenciará el uso de lentivirus para aprovechar su alto grado de eficiencia, o el uso de los espermatozoides como vectores, una vez que puedan ser resueltos los problemas de repetitividad que ahora adolece. Por otra parte, si se consigue desarrollar el aislamiento y mantenimiento de las células madre embrionarias ayudara a desarrollar nuevos modelos transgénicos. En último término, la inyección pronuclear seguirá disponible para resolver algunos modelos aun cuando su eficiencia sea reducida.

Agradecimientos

A todos los miembros del grupo de investigación Fisiología de la Reproducción de la Universidad de Murcia y al Dr. Alfonso Gutiérrez-Adán del INIA por el gran trabajo desarrollado en los estudios de transgénesis porcina. Éstos han sido financiados por el Ministerio de Ciencia e Innovación (proyectos AGL-2006-03495 y AGL-2009-12512-C02-01) y la Comunidad Autónoma de la Región de Murcia - Fundación Séneca (proyectos 10BIO2005/01-6463 y 08752/PI/08).

Tabla 2. Ventajas y limitaciones de las diversas tecnologías aplicadas en la generación de cerdos transgénicos
 Table 2. *Advantages and limitations of each technologies used for producing transgenic pigs*

Metodología	Ventajas	Inconvenientes
Inyección pronuclear	Preparación del ADN sencilla Larga experiencia Interesante para transgénicos knock-in Tamaño de ADN mayor	Dificultad técnica para inyectar zigotos Baja eficiencia (1-2%) Integración en el genoma al azar Alto grado de mosaicismo
Virus	Alta eficiencia (3-35%) Técnica sencilla	Tamaño del gen limitado < 10kb Expresión inadecuada Manipulación de virus compleja (bioseguridad) Baja estabilidad de los virus Integración en el genoma al azar
Transgénesis mediada por espermatozoides	Sencillez de la técnica Posibilidad de uso de la inseminación artificial	Baja repetitividad Bajo rendimiento Integración en el genoma al azar
Transferencia nuclear	Permite multi-transgénesis Permite recombinación homologa Posibilidad de generar knock-out Bajo grado mosaicismo	Complejidad técnica Baja eficiencia de la técnica (0.2-3.4%) Fallos en la programación celular Anomalías anatómicas y fisiológicas en animales nacidos
Células madre embrionarias		Tecnología no disponible

Bibliografía

- Bacci ML. A brief overview of transgenic farm animals. *Vet Res Commun*. 2007 Aug; 31 Suppl 1:9-14.
- Birnstiel ML, Busslinger M. Dangerous liaisons: spermatozoa as natural vectors for foreign DNA? *Cell*. 1989 Jun 2; 57(5):701-2.
- Brackett BG, Baranska W, Sawicki W, Koprowski H. Uptake of heterologous genome by mammalian spermatozoa and its transfer to ova through fertilization. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1971; 68(2):353-7.
- Brem G, Brenig B, Goodman HM, Selden RC, Graf F, Kruff B, Springmann K, Hondele J, Meyer J, Winnacker EL, Kräusslich H. Production of transgenic mice, rabbits and pigs by microinjection into pronuclei. *Zuchthygiene*, 1985, 20: 251-252.
- Brinster RL, Sandgren EP, Behringer RR, Palmiter RD. No simple solution for making transgenic mice. *Cell*. 1989 Oct 20; 59(2):239-41.
- Cabot RA, Kühholzer B, Chan AW, Lai L, Park KW, Chong KY, Schatten G, Murphy CN, Abeydeera LR, Day BN, Prather RS. Transgenic pigs produced using in vitro matured oocytes infected with a retroviral vector. *Anim Biotechnol*. 2001 Nov; 12(2):205-14.
- Capecchi MR. Gene targeting in mice: functional analysis of the mammalian genome for the twenty-first century. *Nat Rev Genet*. 2005 Jun; 6(6):507-12.
- Celebi C, Guillaudoux T, Auvray P, Vallet-Erdtmann V, Jégou B. The making of "transgenic spermatozoa". *Biol Reprod*. 2003 May; 68(5):1477-83.
- Coward K, Kubota H, Parrington J. In vivo gene transfer into testis and sperm: developments and future application. *Arch Androl*. 2007 Jul-Aug; 53(4):187-97.
- Dunn DA, Pinkert CA, Kooyman DL. Transgenic animals and their impact on the drug discovery industry. *Drug Discov Today*. 2005 Jun 1; 10(11):757-67.
- Esteban MA, Xu J, Yang J, Peng M, Qin D, Li W, Jiang Z, Chen J, Deng K, Zhong M, Cai J, Lai L, Pei D. Generation of induced pluripotent stem cell lines from Tibetan miniature pig. *J Biol Chem*. 2009 Jun 26; 284(26):17634-40.
- Evans MJ, Kaufman MH. Establishment in culture of pluripotential cells from mouse embryos. *Nature*. 1981 Jul 9; 292(5819):154-6.
- Ezashi T, Telugu BP, Alexenko AP, Sachdev S, Sinha S, Roberts RM. Derivation of induced pluripotent stem cells from pig somatic cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2009 Jul 7; 106(27): 10993-8.
- Farre L, Rigau T, Mogas T, García-Rocha M, Canal M, Gomez-Foix AM, Rodríguez-Gil JE. Adenovirus-mediated introduction of DNA into pig sperm and offspring. *Mol Reprod Dev*. 1999 Jun; 53(2):149-58.
- Gandolfi F, Terqui M, Modina S, Brevini TA, Ajmone-Marsan P, Foulon-Gauzé F, Courot M. Failure to produce transgenic offspring by intra-tubal insemination of gilts with DNA-treated sperm. *Reprod Fertil Dev*. 1996; 8(7): 1055-60.
- García-Vázquez FA, García-Roselló E, Gutiérrez-Adán A, Gadea J. Effect of sperm treatment on efficiency of EGFP-expressing porcine embryos produced by ICSI-SMGT. *Theriogenology*. 2009 Sep 1; 72(4):506-18.
- García-Vázquez FA, Gumbao D, Gutiérrez-Adán A, Gadea J. Efecto del tratamiento espermático y el tamaño de adn en la interacción transgén- espermatozoide en la especie porcina. *ITEA Información Técnica Económica Agraria*. 28:51-53. 2007.
- García-Vázquez FA, Gutiérrez-Adán A, Gadea J. Evaluación de la unión espermatozoide-ADN exógeno en espermatozoides eyaculados y epididimarios. *Archivos de Medicina Veterinaria*. 2009. 41.131-138.
- García-Vázquez FA, Ruiz S, Grullón LA, De Ondiz A, Gutiérrez-Adán A, Gadea J. Transgénesis mediada por espermatozoides en la especie porcina: evaluación de la calidad seminal en presencia de ADN exógeno y la producción /in vivo/ de embriones transgénicos. *Revista cien-*

- tífica de la Facultad de Ciencias Veterinarias de la Universidad del Zulia. (in press)
- García-Vázquez FA. Transgénesis Mediada por Espermatozoides en la Especie Porcina: factores que afectan a la eficiencia de la técnica. Tesis doctoral. Universidad de Murcia. 2007.
- Gordon JW, Ruddle FH. Integration and stable germ line transmission of genes injected into mouse pronuclei. *Science*. 1981 Dec 11; 214(4526):1244-6.
- Gordon JW, Scangos GA, Plotkin DJ, Barbosa JA, Ruddle FH. Genetic transformation of mouse embryos by microinjection of purified DNA. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1980 Dec; 77(12):7380-4.
- Hajdu MA, Knight JW, Canseco RS, Krisher RL, Velandar WH, Pearson RE, Gwazdauskas FC. Effect of culture conditions, donor age, and injection site on in vitro development of DNA microinjected porcine zygotes. *J Anim Sci*. 1994 May; 72(5):1299-305.
- Hammer RE, Pursel VG, Rexroad CE Jr, Wall RJ, Bolt DJ, Ebert KM, Palmiter RD, Brinster RL. Production of transgenic rabbits, sheep and pigs by microinjection. *Nature*. 1985 Jun 20-26; 315(6021):680-3.
- Hatoya S, Torii R, Kondo Y, Okuno T, Kobayashi K, Wijewardana V, Kawate N, Tamada H, Sawada T, Kumagai D, Sugiura K, Inaba T. Isolation and characterization of embryonic stem-like cells from canine blastocysts. *Mol Reprod Dev*. 2006 Mar; 73(3):298-305.
- Hirabayashi M, Takahashi R, Ito K, Kashiwazaki N, Hirao M, Hirasawa K, Hochi S, Ueda M. A comparative study on the integration of exogenous DNA into mouse, rat, rabbit, and pig genomes. *Exp Anim*. 2001 Apr; 50(2):125-31.
- Hofmann A, Kessler B, Ewerling S, Weppert M, Vogg B, Ludwig H, Stojkovic M, Boelhaue M, Brem G, Wolf E, Pfeifer A. Efficient transgenesis in farm animals by lentiviral vectors. *EMBO Rep*. 2003 Nov; 4(11):1054-60.
- Houdebine LM. Use of transgenic animals to improve human health and animal production. *Reprod Domest Anim*. 2005 Aug; 40(4):269-81.
- Kaneko T, Moisyadi S, Suganuma R, Hohn B, Yanagimachi R, Pelczar P. Recombinase-mediated mouse transgenesis by intracytoplasmic sperm injection. *Theriogenology*. 2005 Nov; 64(8):1704-15.
- Kang JH, Hakimov H, Ruiz A, Friendship RM, Buhr M, Golovan SP. The negative effects of exogenous DNA binding on porcine spermatozoa are caused by removal of seminal fluid. *Theriogenology*. 2008 Nov; 70(8):1288-96.
- Kolber-Simonds D, Lai L, Watt SR, Denaro M, Arn S, Augenstein ML, Betthausen J, Carter DB, Greenstein JL, Hao Y, Im GS, Liu Z, Mell GD, Murphy CN, Park KW, Rieke A, Ryan DJ, Sachs DH, Forsberg EJ, Prather RS, Hawley RJ. Production of alpha-1,3-galactosyltransferase null pigs by means of nuclear transfer with fibroblasts bearing loss of heterozygosity mutations. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2004 May 11; 101(19):7335-40.
- Koo DB, Kim NH, Lim JG, Lee SM, Lee HT, Chung KS. Comparison of in vitro development and gene expression of in vivo- and IVM/IVF-derived porcine embryos after microinjection of foreign DNA. *Theriogenology*. 1997 Jul 15; 48(2):329-40.
- Kragh PM, Vajta G, Corydon TJ, Purup S, Bolund L, Callesen H. Production of transgenic porcine blastocysts by hand-made cloning. *Reprod Fertil Dev*. 2004; 16(3):315-8
- Kubisch HM, Larson MA, Funahashi H, Day BN, Roberts RM. Pronuclear visibility, development and transgene expression in IVM/IVF-derived porcine embryos. *Theriogenology*. 1995 Aug; 44(3):391-401.
- Kurome M, Saito H, Tomii R, Ueno S, Hiruma K, Nagashima H. Effects of sperm pretreatment on efficiency of ICSI-mediated gene transfer in pigs. *J Reprod Dev*. 2007 Dec; 53(6):1217-26
- Lai L, Kolber-Simonds D, Park KW, Cheong HT, Greenstein JL, Im GS, Samuel M, Bonk A, Rieke A, Day BN, Murphy CN, Carter DB, Hawley RJ, Prather RS. Production of alpha-1,3-galactosyltransferase knockout pigs by nuclear transfer cloning. *Science*. 2002 Feb 8; 295(5557):1089-92.

- Lai L, Prather RS. Creating genetically modified pigs by using nuclear transfer. *Reprod Biol Endocrinol.* 2003 Nov 7; 1:82. Review.
- Lai L, Sun Q, Wu G, Murphy CN, Kühholzer B, Park KW, Bonk AJ, Day BN, Prather RS. Development of porcine embryos and offspring after intracytoplasmic sperm injection with liposome transfected or non-transfected sperm into in vitro matured oocytes. *Zygote.* 2001 Nov; 9(4):339-46.
- Lavitrano M, Bacci ML, Forni M, Lazzereschi D, Di Stefano C, Fioretti D, Giancotti P, Marfé G, Pucci L, Renzi L, Wang H, Stoppacciaro A, Stassi G, Sargiacomo M, Sinibaldi P, Turchi V, Giovannoni R, Della Casa G, Seren E, Rossi G. Efficient production by sperm-mediated gene transfer of human decay accelerating factor (hDAF) transgenic pigs for xenotransplantation. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2002 Oct 29; 99(22):14230-5.
- Lavitrano M, Camaioni A, Fazio VM, Dolci S, Farace MG, Spadafora C. Sperm cells as vectors for introducing foreign DNA into eggs: genetic transformation of mice. *Cell* 1989; 57(5): 717-23.
- Lavitrano M, Forni M, Bacci ML, Di Stefano C, Varzi V, Wang H, Seren E. Sperm mediated gene transfer in pig: Selection of donor boars and optimization of DNA uptake. *Mol Reprod Dev.* 2003 Mar; 64(3):284-91.
- Lavitrano M, Forni M, Varzi V, Pucci L, Bacci ML, Di Stefano C, Fioretti D, Zoraqi G, Moioli B, Rossi M, Lazzereschi D, Stoppacciaro A, Seren E, Alfani D, Cortesini R, Frati L. Sperm-mediated gene transfer: production of pigs transgenic for a human regulator of complement activation. *Transplant Proc.* 1997 Dec; 29(8):3508-9.
- Lavitrano M, Stoppacciaro A, Bacci ML, Forni M, Fioretti D, Pucci L, Di Stefano C, Lazzereschi D, Rughetti A, Ceretta S, Zannoni A, Rahimi H, Moioli B, Rossi M, Nuti M, Rossi G, Seren E, Alfani D, Cortesini R, Frati L. Human decay accelerating factor transgenic pigs for xenotransplantation obtained by sperm-mediated gene transfer. *Transplant Proc.* 1999 Feb-Mar; 31(1-2):972-4.
- Li P, Tong C, Mehrian-Shai R, Jia L, Wu N, Yan Y, Maxson RE, Schulze EN, Song H, Hsieh CL, Pera MF, Ying QL. Germline competent embryonic stem cells derived from rat blastocysts. *Cell.* 2008 Dec 26; 135(7):1299-310.
- Maga EA, Sargent RG, Zeng H, Pati S, Zarling DA, Oppenheim SM, Collette NM, Moyer AL, Conrad-Brink JS, Rowe JD, BonDurant RH, Anderson GB, Murray JD. Increased efficiency of transgenic livestock production. *Transgenic Res.* 2003 Aug; 12(4):485-96.
- Martin GR. Isolation of a pluripotent cell line from early mouse embryos cultured in medium conditioned by teratocarcinoma stem cells. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1981 Dec; 78(12):7634-8.
- Martin MJ, Houtz J, Adams C, Thomas D, Freeman B, Keirns J, Cottrill F. Effect of pronuclear DNA microinjection on the development of porcine ova in utero. *Theriogenology.* 1996 Sep; 46(4):695-701.
- Martin MJ, Pinkert CA. Production of transgenic swine by DNA microinjection. In: *Transgenic Animal Technology: A Laboratory Handbook*, Carl A. Pinkert, editor. Academic Press, San Diego, 2002, 618 pp
- Martin, M.J., Adams, C., Cottrill, F., Houtz, J., Keirns, J., Thomas, D., Byrne, G.W., Diamond, L.E., Kooyman, D.L., Sharma, A. and Logan, J. 2000. The effect of size and molecular concentration of DNA on the production of transgenic swine by pronuclear microinjection. 3rd International Conference on Transgenic Animals, Beijing, China.
- Moreira PN, Giraldo P, Cozar P, Pozueta J, Jiménez A, Montoliu L, Gutiérrez-Adán A. Efficient generation of transgenic mice with intact yeast artificial chromosomes by intracytoplasmic sperm injection. *Biol Reprod.* 2004 Dec; 71(6):1943-7.
- Moreira PN, Pérez-Crespo M, Ramírez MA, Pozueta J, Montoliu L, Gutiérrez-Adán A. Effect of Transgene Concentration, Flanking Matrix Attachment Regions, and RecA-Coating on the Efficiency of Mouse Transgenesis Mediated by Intracytoplasmic Sperm Injection. *Biol Reprod.* 2007 Feb; 76(2):336-43.

- Muñoz M, Trigel B, Molina I, Díez C, Caamaño JN, Gómez E. Constraints to progress in embryonic stem cells from domestic species. *Stem Cell Rev Rep*. 2009 Mar; 5(1):6-9.
- Nagashima H, Fujimura T, Takahagi Y, Kurome M, Wako N, Ochiai T, Esaki R, Kano K, Saito S, Okabe M, Murakami H. Development of efficient strategies for the production of genetically modified pigs. *Theriogenology*. 2003 Jan 1; 59(1):95-106.
- Naruse K, Ishikawa H, Kawano HO, Ueda H, Kurome M, Miyazaki K, Endo M, Sawasaki T, Nagashima H, Makuuchi M. Production of a transgenic pig expressing human albumin and enhanced green fluorescent protein. *J Reprod Dev*. 2005 Aug; 51(4):539-46.
- Niemann H, Kues WA. Transgenic farm animals: an update. *Reprod Fertil Dev*. 2007; 19(6):762-70.
- Notarianni E, Laurie S, Moor RM, Evans MJ. Maintenance and differentiation in culture of pluripotent embryonic cell lines from pig blastocysts. *J Reprod Fertil Suppl*. 1990; 41:51-6.
- Nottle MB, Haskard KA, Verma PJ, Du ZT, Grupen CG, McIlpatrick SM, Ashman RJ, Harrison SJ, Barlow H, Wigley PL, Lyons IG, Cowan PJ, Crawford RJ, Tolstoshev PL, Pearse MJ, Robins AJ, d'Apice AJ. Effect of DNA concentration on transgenesis rates in mice and pigs. *Transgenic Res*. 2001 Dec; 10(6):523-31.
- Park F. Lentiviral vectors: are they the future of animal transgenesis? *Physiol Genomics*. 2007 Oct 22; 31(2):159-73.
- Park KW, Cheong HT, Lai L, Im GS, Kühholzer B, Bonk A, Samuel M, Rieke A, Day BN, Murphy CN, Carter DB, Prather RS. Production of nuclear transfer-derived swine that express the enhanced green fluorescent protein. *Anim Biotechnol*. 2001 Nov; 12(2):173-81.
- Perry AC, Wakayama T, Kishikawa H, Kasai T, Okabe M, Toyoda Y, Yanagimachi R. Mammalian transgenesis by intracytoplasmic sperm injection. *Science*. 1999 May 14; 284(5417):1180-3.
- Petters RM, Shuman RM, Johnson BH, Mettus RV. Gene transfer in swine embryos by injection of cells infected with retrovirus vectors. *J Exp Zool*. 1987 Apr; 242(1):85-8.
- Pfeifer A. Lentiviral transgenesis. *Transgenic Res*. 2004 Dec; 13(6):513-22.
- Piedrahita JA, Anderson GB, Bondurant RH. On the isolation of embryonic stem cells: Comparative behavior of murine, porcine and ovine embryos. *Theriogenology*. 1990 Nov; 34(5):879-901.
- Polejaeva IA, Chen SH, Vaught TD, Page RL, Mullins J, Ball S, Dai Y, Boone J, Walker S, Ayares DL, Colman A, Campbell KH. Cloned pigs produced by nuclear transfer from adult somatic cells. *Nature*. 2000 Sep 7; 407(6800):86-90.
- Pursel VG, Bolt DJ, Miller KF, Pinkert CA, Hammer RE, Palmiter RD, Brinster RL. Expression and performance in transgenic pigs. *J Reprod Fertil Suppl*. 1990; 40:235-45.
- Roberts RM, Telugu BP, Ezashi T. Induced pluripotent stem cells from swine (*Sus scrofa*): why they may prove to be important. *Cell Cycle*. 2009 Oct 1; 8(19):3078-81.
- Robl JM, Wang Z, Kasinathan P, Kuroiwa Y. Transgenic animal production and animal biotechnology. *Theriogenology*. 2007 Jan 1; 67(1):127-33.
- Rogers CS, Stoltz DA, Meyerholz DK, Ostedgaard LS, Rokhlina T, Taft PJ, Rogan MP, Pezzulo AA, Karp PH, Itani OA, Kabel AC, Wohlford-Lenane CL, Davis GJ, Hanfland RA, Smith TL, Samuel M, Wax D, Murphy CN, Rieke A, Whitworth K, Uc A, Starner TD, Brogden KA, Shilyansky J, McCray PB Jr, Zabner J, Prather RS, Welsh MJ. Disruption of the CFTR gene produces a model of cystic fibrosis in newborn pigs. *Science*. 2008 Sep 26; 321(5897):1837-41.
- Shinohara ET, Kaminski JM, Segal DJ, Pelczar P, Kolhe R, Ryan T, Coates CJ, Fraser MJ, Handler AM, Yanagimachi R, Moisyadi S. Active integration: new strategies for transgenesis. *Transgenic Res*. 2007 Jun; 16(3):333-9.
- Smith K, Spadafora C. Sperm-mediated gene transfer: applications and implications. *Bioessays* 2005; 27(5):551-62.
- Spadafora C. Sperm cells and foreign DNA: a controversial relation. *Bioessays*. 1998 Nov; 20(11):955-64.

- Sperandio S, Lulli V, Bacci ML, Forni M, Maione B, Spadafora C, Lavitrano M (1996) Sperm-mediated DNA transfer in bovine and swine species. *Anim Biotechnol* 7: 59-77.
- Suganuma R, Pelczar P, Spetz JF, Hohn B, Yanagimachi R, Moisyadi S. Tn5 transposase-mediated mouse transgenesis. *Biol Reprod*. 2005 Dec; 73(6):1157-63.
- Uchida M, Shimatsu Y, Onoe K, Matsuyama N, Niki R, Ikeda JE, Imai H. Production of transgenic miniature pigs by pronuclear microinjection. *Transgenic Res*. 2001 Dec; 10(6):577-82.
- Wall RJ, Pursel VG, Hammer RE, Brinster RL. Development of porcine ova that were centrifuged to permit visualization of pronuclei and nuclei. *Biol Reprod*. 1985 Apr; 32(3):645-51.
- Wall RJ. New gene transfer methods. *Theriogenology*. 2002 Jan 1; 57(1):189-201.
- Webster NL, Forni M, Bacci ML, Giovannoni R, Razzini R, Fantinati P, Zannoni A, Fusetti L, Dalprà L, Bianco MR, Papa M, Seren E, Sandrin MS, Mc Kenzie IF, Lavitrano M. Multi-transgenic pigs expressing three fluorescent proteins produced with high efficiency by sperm mediated gene transfer. *Mol Reprod Dev*. 2005 Sep; 72(1):68-76.
- Whitelaw CB, Lillico SG, King T. Production of transgenic farm animals by viral vector-mediated gene transfer. *Reprod Domest Anim*. 2008 Jul; 43 Suppl 2:355-8.
- Whitelaw CB, Radcliffe PA, Ritchie WA, Carlisle A, Ellard FM, Pena RN, Rowe J, Clark AJ, King TJ, Mitrophanous KA. Efficient generation of transgenic pigs using equine infectious anaemia virus (EIAV) derived vector. *FEBS Lett*. 2004 Jul 30; 571(1-3):233-6.
- Williams BL, Sparks AE, Canseco RS, Knight JW, Johnson JL, Velandar WH, Page RL, Drohan WN, Young JM, Pearson RE, *et al*. In vitro development of zygotes from prepubertal gilts after microinjection of DNA. *J Anim Sci*. 1992 Jul; 70(7):2207-11.
- Wilmut I, Schnieke AE, McWhir J, Kind AJ, Campbell KH. Viable offspring derived from fetal and adult mammalian cells. *Nature*. 1997 Feb 27; 385(6619):810-3.
- Wu Y, Liu CJ, Wan PC, Hao ZD, Zeng SM. Factors affecting the efficiency of producing porcine embryos expressing enhanced green fluorescence protein by ICSI-mediated gene transfer method. *Anim Reprod Sci*. 2009 Jul; 113(1-4):156-66.
- Wu Z, Li Z, Yang J. Transient transgene transmission to piglets by intrauterine insemination of spermatozoa incubated with DNA fragments. *Mol Reprod Dev*. 2008 Jan; 75(1):26-32.
- Yanagimachi R. Cloning: experience from the mouse and other animals. *Mol Cell Endocrinol*. 2002 Feb 22; 187(1-2):241-8.
- Yu X, Jin G, Yin X, Cho S, Jeon J, Lee S, Kong I. Isolation and characterization of embryonic stem-like cells derived from in vivo-produced cat blastocysts. *Mol Reprod Dev*. 2008 Sep; 75(9):1426-32.
- (Aceptado para publicación el 20 de noviembre de 2009)