

Universidad Politécnica de Valencia

Departamento de Ciencia Animal



UNIVERSITAT
POLITÈCNICA
DE VALÈNCIA

**“OPTIMIZACIÓN DE LAS
ESTRATEGIAS REPRODUCTIVAS DE
MICROMANIPULACIÓN PARA LA
PRODUCCIÓN *IN VITRO* DE
EMBRIONES PORCINOS”**

TESIS DOCTORAL

Presentada por: Elena GARCÍA MENGUAL

Dirigida por: Empar GARCÍA ROSELLÓ
 Miguel Ángel SILVESTRE CAMPS

Tutor Académico: Juan José PASCUAL AMORÓS

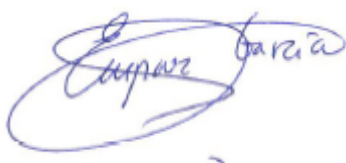
Valencia, Noviembre 2015

Los Doctores, Empar García Roselló, Profesora del Departamento de Medicina y Cirugía Animal de la Facultad de Veterinaria de la Universidad CEU Cardenal Herrera y Miguel Ángel Silvestre Camps, Profesor del departamento de Biología Funcional y Antropología Física de la Universitat de València

CERTIFICAN:

Que la presente memoria titulada “Optimización de las estrategias reproductivas de micromanipulación para la producción *in vitro* de embriones porcinos”, ha sido realizada por Dña. Elena García Mengual, licenciada en Ciencias Biológicas por la Universitat de València, bajo su dirección y constituye su Memoria de Tesis para optar al título de Doctor en Ciencia Animal por la Universidad Politécnica de Valencia.

Y para que así conste a los efectos oportunos, firman el presente certificado



Dra. Empar García Roselló



Dr. Miguel Ángel Silvestre Camps.

En Valencia, a 11 de Noviembre de 2015



UNIVERSIDAD
POLITECNICA
DE VALENCIA

El Dr. Juan José Pascual Amorós Catedrático del departamento de Ciencia Animal de la Universidad
Politécnica de Valencia

CERTIFICA:

Que Dña. Elena García Mengual, licenciada en Ciencias Biológicas por la Universitat de València, ha
realizado bajo su tutela el trabajo que, con el título “Optimización de las estrategias reproductivas de
micromanipulación para la producción *in vitro* de embriones porcinos”, presenta para optar al grado de
Doctor en Ciencia Animal por la Universidad Politécnica de Valencia.

Y para que así conste a los efectos oportunos, firma el presente certificado

Dr. Juan José Pascual Amorós

Valencia, 11 de Noviembre de 2015

El trabajo que a continuación se presenta se acoge a la modalidad de tesis por compendio de publicaciones del departamento de Ciencia Animal de la Universidad Politécnica de Valencia. Consta de tres de artículos publicados en las revistas *Zygote* (2007), *Theriogenology* (2011) y *Czech Animal Reproduction Journal* (2015). El nexo común que los une es profundizar en el conocimiento de dos de las técnicas de micromanipulación más utilizadas para la producir embriones transgénicos *in vitro*, siendo el objetivo final el de mejorar los resultados de la inyección intracitoplasmática de espermatozoides y la transferencia nuclear de células somáticas, sin realizar ninguna modificación genética en los embriones.

Los experimentos planteados y detallados en cada uno de los artículos han sido financiados por la Conselleria de Empresa, Universidad y Ciencia de la Generalitat Valenciana (GV05/212), INIA (RTA2007-0110-00-00), y pretenden aportar una contribución parcial al campo de la producción *in vitro* de embriones de porcino.

AGRADECIMIENTOS

A mis directores de tesis, Drs. Miguel Ángel Silvestre Camps y Empar García Roselló, por brindarme la oportunidad de realizar la Tesis Doctoral, por compartirlo todo y confiar en mí, por animarme y alentarme en cada una de las fases de la investigación, por su completa dedicación, incluso en los momentos más difíciles, gracias por esperarme.

A la Dra. Rita P. Cervera por su rauda, veloz y valiosísima asistencia en carretera, tan lejos pero tan cerca.

Al Dr. Fernando García Ximénez, mentor de mi mentor, y “gestador” en esencia pura, por empezar la siembra.

Al Dr. Juan José Pascual, por “heredarme” y estar ahí siempre que lo he necesitado.

A mis compañeros de fatigas, Alberto, Nacho, Cris y Javi, sin los que nada hubiese sido lo mismo, por el trabajo en equipo en las interminables jornadas de laboratorio, y todos los “nadie dijo que esto fuera fácil...”, que allanaron el camino de la fase experimental de esta tesis.

A todas y cada una de las integrantes del departamento de Genética Reproductiva de Sistemas Genómicos y a Xavi, por acogerme, llegar a 5º de “eleno” sin libro de texto y asumir los daños colaterales: “demá no vinc”.

A todos mis amig@s por su paciencia y apoyo incondicional en los buenos y menos buenos ratos, por velar e inmortalizar todas esas apneas que han sido absolutamente necesarias para llegar hasta aquí.

A mis padres, a mis abuelos y a Luis, por todo y más.

*Cuando salgas de esa tormenta,
no serás la misma persona
que entró en ella.
De eso se trata, esta tormenta.*

Haruki Murakami

INDICE

RESUMEN	I
ABSTRACT	III
RESUM	V
INTRODUCCIÓN.....	1
1. Producción <i>in vitro</i> de embriones de porcino: estrategias reproductivas	1
2. Transgénesis	1
3. Técnicas de producción de embriones transgénicos	8
i. Transgénesis mediante microinyección en pronúcleos	10
ii. Infección de oocitos o embriones con vectores retro- y lentivirales	11
iii. Transgénesis por manipulación de células madre embrionarias	12
iv. Transgénesis mediada por espermatozoides (SMGT, <i>sperm mediated gene transfer</i>)	13
v. Transgénesis mediada por transferencia nuclear o clonación	14
4. Avances en biotecnología de la reproducción	18
OBJETIVOS.....	19
EXPERIMENTOS.....	23
1. Oocyte activation procedures and influence of serum on porcine oocyte maturation and subsequent parthenogenetic and nuclear transfer embryo development.	25
2. Viability of ICSI oocytes after caffeine treatment and sperm membrane removal with Triton X-100 in pigs.	41
3. Male pronucleus formation after ICSI: effect of oocyte cysteine or sperm Triton X-100 treatments.	65
DISCUSIÓN GENERAL	85
CONCLUSIONES	93
BIBLIOGRAFÍA INTRODUCCIÓN Y DISCUSIÓN	95

RESUMEN

La producción *in vitro* (PIV) de embriones goza de múltiples aplicaciones, entre las que cabe destacar la obtención de animales transgénicos/modificados genéticamente que resultan de amplia utilidad en el ámbito biomédico y podrían llegar a resultarlo en el agropecuario. En este sentido, tanto la inyección intracitoplasmática de espermatozoides (ICSI) con espermatozoides transfectados, como la transferencia nuclear de células somáticas (SCNT) con células transfectadas, han demostrado ser estrategias válidas para generar animales con ADN exógeno integrado de manera estable, capaces de transmitirlo a su descendencia. Sin embargo, para lograrlo es necesario disponer de un gran número de embriones PIV. A pesar del desarrollo durante las últimas décadas de sistemas de PIV de embriones de porcino para estas estrategias, y la disponibilidad de gran variedad de protocolos, persisten aún ciertos puntos críticos que limitan el desarrollo embrionario y por lo tanto su aplicación a gran escala.

El objetivo principal de esta tesis ha perseguido por lo tanto, la optimización de los protocolos de ICSI y SCNT con el fin de mejorar la viabilidad de los embriones PIV de porcino. El planteamiento inicial consistió en abordar el estudio tanto de la maduración *in vitro* (MIV) como de la activación oocitaria en el marco de la SCNT. Para ello se seleccionó de entre tres propuestas de activación artificial, el protocolo de activación eléctrica (que resultó ser el más eficiente bajo nuestras condiciones de trabajo), y se estudió a continuación el efecto del suplemento de suero en el medio de MIV, constatando que no se incrementaba el desarrollo de embriones partenogenotas producidos mediante activación eléctrica ni de aquellos producidos mediante SCNT.

Por otra parte, y con el fin de optimizar la técnica de ICSI se abordaron diferentes aspectos como la concentración de Ca^{2+} en el medio de microinyección, el pre-tratamiento espermático con Triton X-100 (TX), así como la adición de suplementos de cafeína o cisteína al medio de cultivo *in vitro* (CIV) pos-ICSI, con el fin de favorecer la descondensación del núcleo espermático y la activación oocitaria. Observando que: i) la concentración de Ca^{2+} no influyó en la tasa de división, ni en la de desarrollo de embriones partenogenotas procedentes de oocitos microinyectados sin espermatozoide (sham injection); ii) la cafeína no incrementó la formación pronuclear ni en el desarrollo embrionario posterior, y en combinación con el pre-tratamiento espermático con TX redujo la activación oocitaria y el desarrollo embrionario; iii) la formación pronuclear no se vio incrementada por el pre-tratamiento espermático con TX ni por el tratamiento con cisteína, independientemente del momento de la evaluación estudiado.

ABSTRACT

In vitro production (IVP) of embryos has multiple applications, including the development of transgenic / genetically modified animals that are of broad utility in the biomedical field and could reach to be so in agriculture. In this sense, both the intracytoplasmic sperm injection (ICSI) with transfected sperm, as somatic cell nuclear transfer (SCNT) with transfected cells, have proved to be valid strategies to generate animals with stably integrated exogenous DNA, capable of transmitting it to their offspring. However, to make it feasible the availability of a large number of IVP embryos it's necessary. Despite the development of IVP systems of pig embryos for these strategies in the last decades, and a high variety of protocols, there are still some critical issues that limit embryonic development and therefore its application on a large scale.

The main objective of this thesis has then pursued, optimizing the ICSI and SCNT protocols in order to improve the viability of IVP porcine embryos. The initial approach was to address the study both *in vitro* maturation (IVM) and oocyte activation within the SCNT frame. To this end, the most efficient electrical activation protocol under our working conditions was selected from among three proposals, and we then studied the effect of serum supplement on IVM medium, noticing that it doesn't increase the development of parthenogenetic embryos produced by electrical activation nor of those produced by SCNT.

Moreover, and in order to optimize the ICSI technique, different aspects such as Ca^{2+} concentration in the microinjection medium, sperm pretreatment with Triton X-100 (TX) and the addition of cysteine or caffeine supplements to the *in vitro* culture (IVC) medium post-ICSI, were studied in order to promote sperm nucleus decondensation and oocyte activation. Noticing that: i) the concentration of Ca^{2+} did not influence the cleavage rate, nor the development of parthenogenetic embryos from microinjected oocytes without sperm (sham injection); ii) caffeine did not increase either the pronuclear formation neither the subsequent embryo development, in combination with TX sperm pre-treatment it reduced oocyte activation and embryo development rates; iii) the pronuclear formation was not increased by the sperm pre-treatment with TX nor by the cysteine treatment, regardless of the time of the study assessment.

RESUM

La producció *in vitro* (PIV) d'embrions gaudeix de múltiples aplicacions, entre les quals cap assenyalar l'obtenció d'animals transgènics/modificats genèticament que resulten d'àmplia utilitat en el àmbit biomèdic y podrien arribar a ser-ho en el àmbit agropecuari. En aquest sentit, tant la injecció intracitoplasmàtica d'espermatozoïds (ICSI) amb espermatozoïds transfectats, com la transferència nuclear de cèl.lules somàtiques (SCNT) amb cèl.lules transfectades, han demostrat ser estratègies vàlides per a l'obtenció d'animals amb ADN exogen integrat de manera estable, capaços de transmetre-l a la seva descendència. No obstant això, per aconseguir-ho és necessari disposar d'un gran nombre d'embrions PIV. Malgrat el desenvolupament durant les últimes dècades de sistemes de PIV d'embrions de porcí per a aquestes estratègies, i la disponibilitat de gran varietat de protocols, persisteixen encara certs punts crítics que limiten el desenvolupament embrionari i per tant la seva aplicació a gran escala.

L'objectiu principal d'aquesta tesi ha perseguit per tant, l'optimització dels protocols d' ICSI i SCNT per tal de millorar la viabilitat dels embrions PIV de porcí. El plantejament inicial va consistir en abordar l'estudi tant de la maduració *in vitro* (MIV) com de l'activació oocitària en el marc de la SCNT. Per a fer-ho es va seleccionar entre tres propostes d'activació artificial, el protocol d'activació elèctrica (que va resultar ser el més eficient a les nostres condicions de treball), i es va estudiar a continuació l'efecte del suplement de sèrum en el medi de MIV, constatant que no va incrementar el desenvolupament d'embrions partenogenotes produïts mitjançant activació elèctrica ni d'aquells produïts mitjançant SCNT.

D'altra banda, i per tal d'optimitzar la tècnica de l'ICSI es van abordar diferents aspectes com la concentració de Ca^{2+} en el medi de microinjecció, el pretractament espermàtic amb Triton X-100 (TX), així com l'addició de suplementes de cafeïna o cisteïna al mitjà de cultiu *in vitro* (CIV) pos-ICSI, per tal d'afavorir la descondensació del nucli espermàtic i l'activació oocitària. Observant que: i) la concentració de Ca^{2+} no va influir en la taxa de divisió, ni en la de desenvolupament d'embrions partenogenotes procedents d'oòcits microinjectats sense espermatozoïd (sham injection); ii) la cafeïna no va incrementar la formació pronuclear ni en el desenvolupament embrionari posterior, i en combinació amb el pretractament espermàtic amb TX va reduir l'activació oocitària i el desenvolupament embrionari; iii) la formació pronuclear no es va veure incrementada pel pretractament espermàtic amb TX ni pel tractament amb cisteïna, independentment del moment de l'evaluació estudiat.

INTRODUCCIÓN

1. Producción *in vitro* de embriones de porcino: estrategias reproductivas

Los ovarios de matadero procedentes de ejemplares de abasto constituyen una fuente prácticamente ilimitada y económica de materia prima para la producción *in vitro* (PIV) de embriones. La PIV goza a su vez de múltiples aplicaciones: desde la generación de embriones para investigación básica y desarrollo de otras líneas de investigación, cómo la criopreservación de genomas o la transferencia de embriones con fines reproductivos, hasta la recuperación de razas en peligro de extinción, pasando por la obtención de ejemplares transgénicos, entre otras.

Los oocitos procedentes de estos ovarios son inmaduros por lo tanto, siempre que queramos utilizarlos para la PIV de embriones, es necesario someterlos a un proceso de maduración *in vitro* (MIV) hasta alcanzar el estadio de oocito maduro o metafase II (MII). La PIV de embriones puede abordarse entonces desde diferentes estrategias reproductivas, sometiendo estos oocitos maduros bien a la fecundación *in vitro* (FIV) convencional, a la inyección intracitoplasmática de espermatozoides (ICSI, *intracytoplasmic sperm injection*), a la transferencia nuclear (TN) de células somáticas (SCNT, *somatic cell nuclear transfer*), o a la activación partenogenota. La elección de una u otra estrategia vendrá determinada en función de la aplicación a la que se vayan a destinar los embriones PIV.

Entre las múltiples aplicaciones de la PIV de embriones de porcino, la obtención de cerdos transgénicos destaca por su enorme potencial en cuanto a las posibles aplicaciones de estos animales tanto en el ámbito biomédico como en el agropecuario. En este sentido, tanto la ICSI con espermatozoides transfectados (SMGT, *sperm mediated gene transfer*) (Yong et al., 2006) como la SCNT de células transfectadas (Lee et al., 2005) han demostrado ser estrategias válidas para generar animales con ADN exógeno integrado de manera estable, capaces de transmitirlo a su descendencia. Si bien, abordar estas estrategias requiere disponibilidad de un gran número de embriones PIV (Kurome et al., 2006).

2. Transgénesis

Desde que surgieron la agricultura y la ganadería, nuestros ancestros han aprovechado la capacidad de los seres vivos de evolucionar rápidamente bajo la presión del ambiente para favorecer, mediante cruzamientos dirigidos, la generación de la mayoría de variedades y razas útiles para el ser humano: es lo que conocemos como selección genética convencional. El hombre ha inducido así grandes transformaciones genéticas en determinadas especies hasta el punto de que algunas de ellas serían incapaces de sobrevivir sin su ayuda. Es el caso por ejemplo del triticale, un cereal híbrido procedente del cruzamiento entre trigo y centeno; o la mula, un animal híbrido estéril procedente del cruce de una yegua y un burro. Hasta hace unas décadas ésta era la única

manera de seleccionar aquellos genes y alelos asociados a algún tipo de beneficio, sin embargo este tipo de selección no implica generalmente que los genes sean conocidos.

Definición

La transgénesis se puede definir como la introducción de ADN exógeno en un genoma huésped -que puede ser un organismo unicelular o multicelular, procedente del reino bacteria, vegetal o animal- de modo que éste se mantenga estable de forma hereditaria y afecte a todas las células en los organismos multicelulares. El ADN exógeno, recibe el nombre de transgén, y está compuesto por una región promotora específica, un gen que codifica para la proteína de interés, y elementos reguladores que protegen y potencian la expresión del gen. La proteína codificada por el transgén recibe el nombre de proteína recombinante.

Knockin y knockout

Existen básicamente dos estrategias diferentes de modificación genética: “ganancia de función” y “pérdida de función”. Normalmente la ganancia de función se consigue mediante la adición de genes exógenos y el animal transgénico derivado se conoce como *knockin*. En el caso del silenciamiento génico o pérdida de función, el transgénico derivado se conoce como *knockout*. Los planteamientos propuestos para el silenciamiento génico resultan muy complejos y pueden basarse en la sustitución de genes (recombinación homóloga- Bernstein y Breitman, 1989) o la adición de nuevos genes (ARN-antisentido- Izant y Weintraub, 1985; micro-ARN- Scherer y Rossi, 2003) para alterar la expresión de la proteína diana.

Desde que en 1980 se obtuvieron los primeros ratones transgénicos generados mediante la técnica de microinyección en pronúcleos (Gordon et al., 1980), el campo de la transgénesis ha evolucionado notablemente. Gracias a este progreso, los cerdos modificados genéticamente (MG) han constituido en la última década una gran promesa tanto en el ámbito de la biomedicina como en el agropecuario. Su desarrollo y aplicación ha sido notablemente importante en el entorno biomédico convirtiéndose en pieza clave de la investigación traslacional, por el contrario su aplicación agropecuaria ha estado limitada hasta la fecha a trabajos de laboratorio.

Aplicaciones biomédicas

- Modelo animal para el estudio de enfermedades humanas

Una de las aplicaciones más importantes de los organismos MG es el estudio de la función y regulación de genes específicos relacionados con enfermedades humanas. La transgénesis permite diseñar y producir animales domésticos que expresen cierta enfermedad (siempre y cuando se conozca qué genes la causan). Hasta la fecha, miles de enfermedades humanas se han caracterizado en base a la herencia genética mendeliana tal y como refleja el catálogo *Online*

Mendelian Inheritance in Man[®] (OMIM[®], <http://omim.org/>), de manera que estos animales constituyen un valioso modelo experimental para el estudio de los síntomas, las causas y el tratamiento de una gran variedad de ellas. En este sentido ciertas características del ratón, como su reducido tamaño, su fácil manejo o el reducido coste de adquisición y mantenimiento lo han convertido en el principal modelo animal de experimentación, cuenta además con ventajas como un corto intervalo entre generaciones, y la posibilidad de obtener ratones transgénicos con relativa facilidad, de hecho la generación de animales *knockout* en ratón es un procedimiento estándar habiéndose obtenido cientos de miles de cepas portadoras de genes *knockout* según refleja el *Mouse Knockout and Mutation Database* (MKMD; [http:// research.bmn.com/mkmd](http://research.bmn.com/mkmd)). A pesar de ello, el ratón guarda ciertas diferencias con la especie humana, tanto a nivel fisiológico como de expresión génica, que no siempre permiten su utilización para mimetizar las enfermedades humanas. El modelo porcino adquiere entonces gran relevancia por su similitud tanto anatómica, como fisiológica, genética y metabólica con la especie humana (Bendixen et al., 2010). Entre otras ventajas, los cerdos son animales domésticos productivos, se sacrifican por la carne, su cría y mantenimiento resultan fáciles, son muy prolíficos y pueden mantenerse en condiciones higiénicas adecuadas para evitar la transmisión de infecciones. Por otra parte, están disponibles en gran variedad de fenotipos y genotipos, y son de fácil acceso para biopsias y muestras post mortem, además de presentar menos problemas éticos y económicos si los comparamos con otros modelos animales como los primates no humanos, por ejemplo.

Así, desde la aparición del primer cerdo transgénico como modelo para el estudio de la Retinitis Pigmentosa humana en 1997 que expresaba el gen mutado de la rodopsina (Petters et al., 1997), hasta la fecha, la especie porcina ha sido utilizada para generar 14 bio-modelos (Tabla 1, revisado en (Fan and Lai, 2013)).

El método de elección para la modificación genética en el modelo porcino es la transferencia nuclear de células somáticas (SCNT, *somatic cell nuclear transfer*) que han sido previamente transfectadas. Hasta la fecha mediante SCNT se ha clonado un gran número de cerdos MG de manera aleatoria, y se utilizan actualmente como modelos de enfermedades humanas. Sin embargo, únicamente se ha conseguido obtener unos cuantos específicamente modificados (*knockin* y *knockout*) mediante esta técnica, debido a la baja competencia de proliferación y la extremadamente baja frecuencia de recombinación del ADN homólogo en las células somáticas (Yang et al., 2011).

Tabla 1: Cerdos transgénicos generados como modelo de enfermedad humana (Fan and Lai, 2013. Genetically modified pig models for human diseases. *Journal of Genetics and Genomics = Yi Chuan Xue Bao*, 40, 67–73.)

Enfermedad humana	Características genéticas	Metodología	Referencia
Huntington	Mutante Huntington (<i>HTT</i>) ⁺	MPN	(Uchida et al., 2001)
	Mutante Huntington (<i>HTT</i>) ⁺	SCNT	(Yang et al., 2010)
Alzheimer	Proteína precursora amiloide (<i>APP</i>) K670Nt/M671L ⁺	SCNT	(Kragh et al., 2009)
Atrofia muscular espinal	Neurona motora de supervivencia (<i>SMN</i>) ^{+/-}	SCNT	(Lorson et al., 2011)
Enfermedades cardiovasculares	Receptor de peroxisoma-proliferador-activado- γ (<i>PPAR-γ</i>) ^{-/-}	SCNT	(Yang et al., 2011)
	Oxido nítrico sintasa 3 endotelial (<i>eNOS3</i>) ⁺	SCNT	(Hao et al., 2006; Whyte and Laughlin, 2010)
	Catalasa (<i>CAT</i>) ⁺	SCNT	(Whyte et al., 2011)
	Alipoproteína CIII (<i>ApoCIII</i>) ⁺	SCNT	(Wei et al., 2012)
Diabetes mellitus (MODY3)	Factor nuclear 1 alfa de hepatocito homeobox A, dominante negativo (<i>HNF1α</i>) ^{dn} ⁺	SCNT	(Umeyama et al., 2009)
Diabetes mellitus tipo 2	Receptor del polipeptido insulínico dependiente de glucosa (<i>GIPR</i>) ^{dn} ⁺	Inyección de lentivirus	(Renner et al., 2010)
Retinitis pigmentosa	Mutante Rodopsina P347L (<i>RHO P347L</i>) ⁺	MPN	(Petters et al., 1997)
	Mutante Rodopsina P23H (<i>RHO P23H</i>) ⁺	SCNT	(Ross et al., 2012)
Distrofia macular de Stargardt tipo 3	Elongación mutante de cadena larga de ácidos grasos-4 (<i>ELOVL4</i>) ⁺	MPN y SCNT	(Sommer et al., 2011)
Cáncer de mama	Gen 1 asociado al cáncer de mama (<i>BCRA1</i>) ^{+/-}	SCNT	(Luo et al., 2011)

MPN: microinyección en pronúcleos; SCNT: transferencia nuclear de células somáticas.

– Síntesis de órganos, tejidos y células para xenotrasplantes

El trasplante de órganos entre humanos (alotrasplante) es el único tratamiento para un gran número de enfermedades en las que algún órgano falla de manera terminal. Durante las últimas tres décadas los buenos resultados obtenidos han permitido consolidar con éxito los programas clínicos de alotrasplantes y ha determinado que las indicaciones de trasplante crezcan, hasta el punto de que técnicamente hoy en día, se trata de un procedimiento rutinario. Desafortunadamente el creciente desequilibrio entre la oferta y la demanda de órganos a nivel mundial hace que cada día aumente el número de pacientes en lista de espera (Shimazono, 2007). Sólo en Europa los datos recogidos por la Organización Nacional de Trasplantes cifran en un total de 59.219 los enfermos a la espera de un trasplante a fecha 31 de diciembre de 2012 (www.ont.es). De ahí la búsqueda de fuentes alternativas de órganos. Una de las más prometedoras son los xenotrasplantes que consisten en trasplantar órganos, tejidos o células de procedencia animal en humanos. Desde que en 1963 se realizara el primer xenotrasplante renal de chimpancé a humano, esta posibilidad no ha dejado de ser investigada (revisado en Auchincloss and Sachs, 1998). En este sentido, como se ha indicado anteriormente, el cerdo es considerado el animal más afín para donar órganos, gracias a su parecido con el ser humano, en términos de anatomía, neurobiología, sistema cardiovascular, tracto gastrointestinal y genoma (Bendixen et al., 2010).

El rechazo inmunológico del órgano trasplantado es el principal obstáculo que presentan los xenotrasplantes. Los principales obstáculos inmunológicos en los xenotrasplantes incluyen: i) Rechazo hiperagudo (HAR, *hyperacute rejection*): sucede a los pocos segundos o minutos, debido a la activación de la cascada del complemento; ii) Rechazo humoral agudo (AHXR, *acute humoral xenograft rejection*): ocurre a los pocos días tras el trasplante y se caracteriza por la evidencia morfológica de daño tisular agudo, la evidencia inmunopatológica de actividad de anticuerpos así como la evidencia serológica de anticuerpos circulantes contra antígenos HLA u otros antígenos anti-endotelio del donante; iii) Rechazo celular (ICMR, *immune cell-mediated rejection*): ocurre a los pocos días tras el trasplante y durante este proceso la sangre del nuevo órgano es dañada por células T que destruyen el órgano (este rechazo también ocurre tras el alotrasplante y normalmente puede ser controlado y/o suprimido mediante el empleo de sustancias inmunosupresoras); iv) Rechazo crónico: es un proceso inmunológico complejo que resulta en el rechazo del órgano trasplantado tras varios años. Para este último tipo de rechazo la única terapia posible es un nuevo trasplante (revisado en Kues and Niemann, 2004). El estudio de los procesos que acontecen en cada una de las fases de rechazo permitirá el diseño y producción de cerdos transgénicos que reduzcan o eliminen la respuesta de rechazo. Actualmente ya se han establecido técnicas de transgénesis para modificar la *inmunogenicidad* de las células y órganos porcinos. Las principales estrategias desarrolladas con éxito para sobrepasar la primera barrera inmunológica, el HAR en xenotrasplantes de porcino, son la síntesis de proteínas reguladoras del complemento humano (RCA's) en cerdos transgénicos, y/o el silenciamiento de las estructuras antigénicas presentes en la superficie del órgano porcino responsables del HAR (revisado en Niemann and Kues, 2007; Bendixen et al., 2010). A pesar de todos estos avances, la prevención contra la transmisión de zoonosis como el PERV (*Porcine endogenous retrovirus*) es uno de los puntos críticos para la aplicación clínica de los xenotrasplantes, ya que el retrovirus no patógeno presente en las células donantes de porcino podría infectar células humanas. En este sentido, el ARN de interferencia (ARNi) aparece como una prometedora opción para silenciar la expresión del PERV en células de porcino, que ya ha sido utilizada con éxito para generar transgénicos por SCNT (Dieckhoff et al., 2008; Ramsoondar et al., 2009), y recientemente se ha demostrado la posibilidad de inactivar el PERV para la aplicación clínica de los xenotrasplantes de porcino a humano (Yang et al., 2015).

Durante los últimos 18 años se han generado un gran número de cerdos transgénicos con la finalidad de mejorar las expectativas de los xenotrasplantes (Tabla 2).

Si bien el xenotrasplante es una respuesta potencial a la escasez de órganos, actualmente su futuro depende de i) una nueva modificación genética de los cerdos, ii) de la introducción de nuevos agentes inmunosupresores dirigidos a los sistemas de plasma y células inmunes innatas, y por último iii) del desarrollo de métodos clínicamente aplicables a inducir tolerancia donante-específica.

Tabla 2: Resumen de cerdos MG con utilidad biomédica en xenotrasplantes (modificado de Luo et al., 2012: Genetically modified pigs for biomedical research. *Journal of Inherited Metabolic Disease*, 35, 695–713).

Utilidad biomédica	Transgén	Metodología	Referencia
Contra HAR	hCD59	MPN	(Fodor et al., 1994)
	hCD59	SCNT	(Ahn et al., 2010)
	hDAF (hC55)	SMGT	(Lavitrano et al., 1997, 2002; Lazzereschi et al., 2000)
	hDAF (hC55)	MPN	(Murakami et al., 2000)
	hDAF y hTFPI	SCNT	(Lee et al., 2011)
	hCD46	MPN	(Adams et al., 2001; Diamond et al., 2001)
	α 1-2FT	MPN	(Sharma et al., 1996; Koike et al., 1997)
	hGnT-III	MPN	(Miyagawa et al., 2001a, 2001b)
	GT-KO	SCNT	(Lai et al., 2002b)
	GT-KO/hDAF/hGnT-III	SCNT	(Takahagi et al., 2005)
	hCD59/hMPC/hDAF	MPN	(Zhou et al., 2005)
Contra AHXR	hA20	SCNT	(Oropeza et al., 2009)
	shTNFR1-Fc	SCNT	(Cho et al., 2011)
Contra ICMR	hTRAIL	MPN	(Klose et al., 2005)
	hCTLA4-Ig	MPN	(Martin et al., 2005)
	pCTLA4-Ig	SCNT	(Phelps et al., 2009)
	pCTLA4-Ig	SCNT	(Klymiuk et al., 2012)
	HLA-E y hu β 2m	MPN	(Weiss et al., 2009)
Contra PERV	shPERV (anti-pol)	SCNT	(Dieckhoff et al., 2008)
	shPERV (anti-gag y anti-pol)	SCNT	(Ramsoondar et al., 2009)

HAR: rechazo hiperagudo (*hyperacute rejection*); **AHXR:** rechazo humoral agudo (*acute humoral xenograft rejection*); **ICMR:** rechazo celular (*immune cell-mediated rejection*); **PERV:** retrovirus endógeno porcino (*porcine endogenous retrovirus*); **MPN:** microinyección en pronúcleos; **SCNT:** transferencia nuclear de células somáticas (*somatic cell nuclear transfer*); **SMGT:** transgénesis mediada por espermatozoides (*sperm mediated gene transfer*)

– Producción de biofármacos y biomoléculas.

Otro de los grandes éxitos de los organismos MG es su utilización como biorreactores capaces de secretar proteínas de interés biológico en la leche, la sangre u otros órganos y tejidos de los animales transgénicos. Se han obtenido biorreactores para la producción de anticuerpos y/o proteínas específicas para el tratamiento de enfermedades humanas, así como otras biomoléculas de interés terapéutico o industrial. La especie porcina cuenta con cerdos GM capaces de secretar en su leche proteínas de origen humano de utilidad terapéutica, como la proteína C, los factores VIII y IX de la coagulación para el tratamiento de la hemofilia, la albúmina humana, la eritropoyetina y recientemente se ha descrito el factor de von Willebrand (revisado en Gadea and García-Vázquez, 2010). Se han generado también cerdos que producen hemoglobina humana que podría servir, una vez purificada, como componente principal sustitutivo de la sangre humana. Además de las glándulas mamarias, en esta misma línea se han propuesto otros órganos productores de fluidos en los animales domésticos que podrían actuar como biorreactores ya que permiten una fácil recuperación del material objeto de interés. Es el caso de las vesículas seminales, las proteínas producidas formarán parte del plasma seminal; o la glándula parótida que secretará las proteínas recombinantes en la saliva. Otra alternativa sería la utilización de la vejiga urinaria o el riñón lo que permitiría la recogida de proteínas recombinantes en la orina. Las ventajas de este último modelo son la facilidad para la recolección de la orina, la abundante cantidad de proteína que puede obtenerse, y que permite recogerla durante toda la vida del animal (revisado en Gadea and García-Vázquez, 2010).

Aplicaciones agropecuarias

Entre las principales aplicaciones de la transgénesis en el ámbito de la producción animal porcina cabe destacar la resistencia a enfermedades, la mejora de la digestión y la modificación del metabolismo animal, la optimización de la leche, la composición y el crecimiento de la canal, así como la reproducción, o la reducción del efecto contaminante de la acción ganadera, entre otras (Tabla 3).

Sin embargo, a pesar de presentarse hace unas décadas como un gran abanico de posibilidades para la sanidad y la producción animal, las aplicaciones agropecuarias de los cerdos MG no han tenido tanta repercusión como las aplicaciones biomédicas y el desarrollo de esta tecnología se encuentra en una fase muy inicial, lejos de una aplicación a gran escala.

La falta de aceptación, por parte de la sociedad, de los productos alimenticios MG que son percibidos por el consumidor como dañinos o peligrosos, es una de las causas del freno en el desarrollo de estas aplicaciones. Por otra parte, la problemática en torno a la obtención de autorización para comercializar productos derivados de animales MG no ha contribuido a mejorar la situación. De acuerdo con la legislación vigente estos productos deben someterse a un sistema de

evaluación de seguridad alimentaria que resulta complejo, largo y costoso. Finalmente, son muy pocas las empresas que pueden abordar este proceso cuando además el beneficio esperado no es elevado (Gadea and García-Vázquez, 2010).

Tabla 3. Ejemplos de cerdos transgénicos con aplicación en producción animal. (modificado de Gadea and García-Vázquez, 2010)

Objetivo	Características	Metodología	Referencia
Incrementar índice de crecimiento	Hormona del crecimiento (b-GH)	MPN	(Pursel et al., 1989)
Aumentar resistencia a enfermedades	IgA de ratón	MPN	(Lo et al., 1991)
Aumentar resistencia frente a influenza porcina	Proteína Mx de ratón	MPN	(Müller et al., 1992)
Favorecer desarrollo muscular	CSK de pollo	MPN	(Pursel et al., 1992)
Incrementar cantidad de lactosa en leche	a-lactoalbumina bovina	MPN	(Bleck et al., 1998)
Aumentar porcentaje de magro	Insulin-like growth factor I(hIGF-1)	MPN	(Pursel et al., 2004)
Aumentar aprovechamiento de los fosfatos, reducir contaminación	Fitasa	MPN	(Golovan et al., 2001)
Incrementar porcentaje de ácidos grasos insaturados	Enzima desaturasa procedente de las espinacas	MPN	(Saeki et al., 2004)
Incrementar porcentaje de ácidos grasos insaturados	Enzima desaturasa procedente de <i>Caenorhabditis elegans</i>	SCNT	(Lai et al., 2006)

MPN: microinyección en pronúcleos; SCNT: transferencia nuclear de células somáticas

3. Técnicas de producción de embriones transgénicos

La generación de un animal transgénico es un proceso complejo que requiere de un gran esfuerzo multidisciplinar por parte de expertos en ingeniería genética, biología molecular, biotecnología de la reproducción, así como veterinarios y personal agropecuario. La complejidad del proceso reside precisamente en que cada una de las disciplinas implicadas debe ser capaz de asegurar el cumplimiento de una serie de requisitos críticos a lo largo de todo el proceso.

La ingeniería genética y la biología molecular resultan de vital importancia para el conocimiento previo del gen y su función, así como para el diseño del “*construct*”: la elección del gen a transferir, de la secuencia promotora responsable de dirigir la expresión, es decir la construcción del vector de manera que consigamos una expresión fiable del transgén. Los expertos en biología molecular son también los encargados de la identificación de los animales fundadores en la primera generación mediante Southern Blot o PCR, así como de verificar la integridad del transgén y determinar el número de copias integradas del mismo.

Por otra parte, los expertos en biotecnología de la reproducción son los últimos responsables de elegir el método para introducir el transgén. La mayoría de estrategias existentes o sugeridas requieren la utilización de técnicas de reproducción asistida. Las más comúnmente utilizadas incluyen la microinyección en pronúcleos, la infección mediante vectores retrovirales de oocitos o embriones, la manipulación de células embrionarias (ESC, *embryonic stem cells*), la transgénesis mediada por espermatozoides (SMGT, *sperm mediated gene transfer*), y la clonación mediante transferencia nuclear de células somáticas previamente transfectadas (SCNT, *somatic cell nuclear transfer*).

Por último los veterinarios son los encargados de la transferencia de los embriones transgénicos a una hembra receptora y el personal agropecuario se encargará de velar y garantizar el mantenimiento de los animales en las mejores condiciones.

Es importante asegurar la correcta inserción del transgén completo en un locus específico predeterminado, con una correcta regulación de la expresión tanto espacial (en cualquier lugar, o en un tejido diana), como temporal (en relación con un periodo fisiológico predeterminado, o durante una función particular). Una correcta integración debe asegurar un nivel de expresión lo suficientemente alto con el fin de observar efectos fenotípicos o funcionales significativos así como la ausencia de alteración o disrupción de las funciones normales, y por último pero no por ello menos importante, la capacidad de producir más animales transgénicos idénticos.

Pasos cruciales implicados en la producción de animales domésticos transgénicos:

- Identificar el gen (análisis del genoma)
- Clonar el gen
- Producir un “*construct*” que garantice la expresión en el tejido específico
- Transferir el gen
- Probar la integración del gen
- Probar la expresión (ARN mensajero y proteína)
- Demostrar la transmisión a la línea germinal (herencia)
- Cría selectiva

Marcaje y seguimiento celular

La proteína verde fluorescente o GFP (*green fluorescent protein*) es una proteína producida por la medusa *Aequorea victoria*, que emite bioluminiscencia en la zona verde del espectro visible. El gen que codifica esta proteína está aislado y se utiliza habitualmente en biología molecular como marcador. Los primeros modelos de cerdos transgénicos procedentes de SCNT utilizaron también el gen GFP (Park et al., 2001; Lai et al., 2002a), de manera que los embriones que habían integrado el transgén eran capaces de expresar GFP, lo que permitía diferenciarlos fácilmente de los que no.

Desde entonces ya se han producido cerdos que expresan proteína rojo fluorescente (Matsunari et al., 2008) y proteínas multigen fluorescentes (azul, verde, rojo) (Webster et al., 2005). Los tejidos de estos cerdos transgénicos son muy útiles para investigaciones biomédicas que requieran células u órganos marcados fenotípicamente o genotípicamente. Un ejemplo de su aplicación es el modelo animal desarrollado para el estudio de enfermedades pancreáticas como la diabetes. Mediante MIV y transferencia genética mediada por espermatozoides, ICSI-SMGT (*sperm mediated gene transfer*) se obtuvieron cerdos MG capaces de expresar GFP de manera específica en el páncreas, sin alterar la función fisiológica del mismo (Matsunari et al., 2014). Esto permitió hacer

un seguimiento del devenir de las células pancreáticas, y en definitiva estudiar su desarrollo y regeneración, demostrando la utilidad de estos cerdos transgénicos como modelo animal de gran tamaño.

Durante los últimos años se han optimizado una serie de estrategias para la obtención de animales transgénicos, con diferentes niveles de eficiencia en función de la especie animal en la que se aplican.

i. Transgénesis mediante microinyección en pronúcleos

La transgénesis mediante microinyección en pronúcleos consiste en inyectar un pequeño volumen de una solución que contiene varias copias del "*construct*", en el pronúcleo masculino de embriones en estadio de una célula, y posteriormente transferir estos embriones a hembras receptoras con el fin de completar su desarrollo embrionario. Los embriones que hayan integrado el ADN exógeno en su genoma, previamente a la primera división, producirán un organismo transgénico; de modo que el transgén pasará a las siguientes generaciones a través de la línea germinal siguiendo el modelo de herencia mendeliana. Durante los últimos 20 años y hasta la aparición de nuevas tecnologías, éste ha sido el método más utilizado para la producción de transgénicos desde la especie murina (Gordon and Ruddle, 1983), hasta especies domésticas como la porcina (Hammer et al., 1985) o los rumiantes (Krimpenfort et al., 1991). Sin embargo la técnica presentó desde un principio una serie de limitaciones:

- No permite la modificación dirigida (*gene targeting*), el lugar de integración del transgén es aleatorio, por lo que puede interferir con otros genes en detrimento de la salud del animal.
- Puede generar animales mosaico con respecto al transgén dependiendo del momento en el que el ADN microinyectado se integre en el genoma del animal (Wilkie et al., 1986). Aunque la microinyección se realiza en el estadio de formación de pronúcleos (PN), el transgén no siempre se integra de inmediato, con frecuencia esto ocurre una o varias divisiones más tarde, en estadios embrionarios multicelulares o al menos después de la primera replicación cromosómica. El resultado puede ser un animal mosaico con algunas células que contengan el transgén y otras que no (Keefer, 2004). Para eliminar los problemas de mosaicismo normalmente son necesarios experimentos de reproducción mediante cruzamientos, cuya finalidad es la generación de un "verdadero" animal fundador con un único lugar de inserción en todas sus células incluida la línea germinal que pueda transmitir el gen siguiendo las leyes de la herencia Mendeliana. Aún así, la integración aleatoria del transgén en el genoma puede resultar en niveles variables de expresión, con lo que no hay garantías de que el animal fundador o su descendencia expresen altas cantidades de la proteína deseada.

- En el caso de la especie porcina, la microinyección en pronúcleos resulta especialmente complicada, en comparación con otras especies el citoplasma del oocito porcino es particularmente opaco debido a la presencia de gotas lipídicas intracitoplasmáticas. Esto impide distinguir los PN, por lo que serían necesarias nuevas manipulaciones previas a la microinyección, como una centrifugación o tinción para poder distinguir los PN.
- La eficiencia (animales transgénicos/oocito microinyectado) es baja, oscila entre el 1 y el 5%, en función de la especie y de la destreza del investigador (Garrels et al., 2012).

Estas dificultades en el proceso de microinyección *per se*, junto con las dificultades de integración del transgén, ya no sólo en porcino sino también en especies como el conejo, la rata o los rumiantes, son la principal causa por la cual hoy en día la adición de genes en grandes mamíferos se lleve a cabo utilizando básicamente la SCNT.

ii. Infección de oocitos o embriones con vectores retro- y lentivirales

Los retrovirus son virus que actúan como un sistema natural de transferencia de ADN, insertando una copia de ADN de su material genético en el ADN de la célula huésped en varios tipos celulares en mamíferos (Varmus, 1988). La infección se puede llevar cabo sobre embriones en estadio pre-implantación u oocitos (Jaenisch et al., 1975; Chan et al., 1998), y consiste en exponerlos *in vitro* a una solución de concentrado viral, o incubarlos sobre una mono-capa de células productoras del virus. Otro modo de infección consiste en microinyectar el virus en el espacio perivitelino del oocito, y a continuación fecundarlo para obtener un embrión.

Curiosamente, la primera transferencia de ADN exógeno en un mamífero se llevó a cabo utilizando ADN viral. En 1974, Jaenisch y Mintz obtuvieron ratones aparentemente sanos portadores de copias de ADN viral exógeno, inyectando ADN viral en blastocistos de ratón.

La ventaja principal de la transferencia génica mediada por retrovirus en animales frente a la microinyección en pronúcleos reside en que la transferencia génica mediada por retrovirus puede utilizarse en estadios más avanzados del desarrollo del embrión, y en la facilidad técnica de exponer los embriones al virus. Sin embargo, también existen inconvenientes con el uso de retrovirus para la generación de animales transgénicos (Lois et al., 2002):

- Alta letalidad embrionaria (73%).
- La secuencia de ADN que puede transportar el vector tiene un tamaño reducido (9,5kb) debido al limitado volumen físico de la partícula viral. Esto limita su aplicación para transferir genes de mayor tamaño.
- La integración preferencial de los retrovirus en células en división. En la infección de embriones tempranos con retrovirus, a menudo se da un retraso en la integración del

transgén ya que la infección por el retrovirus requiere la rotura de la envoltura nuclear durante la mitosis, dando lugar a animales mosaico, con múltiples lugares de inserción y con muy baja transmisión del transgén en la línea germinal. Existe una elevada probabilidad de aparición de animales mosaico, por lo tanto sin garantías de transmitir el transgén a la siguiente generación.

Para intentar atajar algunas de estas dificultades se ha descrito la utilización de lentivirus, una clase de retrovirus con una elevada eficiencia en la integración del ADN exógeno en embriones de ratón (Lois et al., 2002) y en especies domésticas como el cerdo (Hofmann et al., 2003; Whitelaw et al., 2004), ya que no requieren que las células estén en división para integrarse y tienen un amplio espectro de células huésped diana. Mediante la utilización de lentivirus se han conseguido eficacias del 13% (Hofmann et al., 2003) y del 31% (Whitelaw et al., 2004) en la producción de cerdos transgénicos, con un alto nivel de expresión del transgén, el 90% de los embriones transgénicos.

Por otra parte, queda por elucidar en qué medida la integración múltiple de vectores lentivirales en el genoma huésped estaría asociada con efectos colaterales no deseados, tales como la activación de oncogenes o la mutagénesis insertacional (Niemann and Kues, 2007).

iii. Transgénesis por manipulación de células madre embrionarias

Consiste en la obtención de animales MG a partir de la inyección de células madre embrionarias (ESC, *embryonic stem cells*) o células germinales primordiales (PGC, *primordial germ cells*) MG en embriones en estadio pre-implantación.

Las ESC son células pluripotentes, indiferenciadas y derivadas de la masa celular interna de embriones en estadio de blastocisto, que son capaces de producir todos los tejidos de un individuo. Una vez aisladas, las ESC pueden cultivarse *in vitro* indefinidamente, resultando un número ilimitado de células idénticas, cada una de las cuales tiene el potencial necesario para diferenciarse en varios tipos celulares (Wobus et al., 1984).

La transgénesis por manipulación de ESC implica la introducción de ADN exógeno en las ESC mediante diversas técnicas, como la electroporación, la lipofección, la biolística, la microinyección, el fosfato cálcico, o la infección viral. Una vez transfectadas, las ESC pueden ser reintroducidas con la ayuda de la microinyección en un blastocisto generando una quimera, o bien ser utilizadas como células donantes para transferencia nuclear generando un clon.

Esta estrategia puede aplicarse en todos aquellos animales cuyas ESC puedan ser manipuladas y transfectadas *in vitro* (revisado en Melo et al., 2007).

Entre las ventajas de las ESC para producir animales transgénicos cabe destacar que pueden cultivarse *in vitro* durante varias generaciones para producir un número ilimitado de células

idénticas; que se pueden transfectar *in vitro* con ADN exógeno; pueden aislarse y derivarse a partir de una sola célula; además las ESC transfectadas pueden ser analizadas en cuanto a la incorporación del transgén y seleccionadas antes de ser utilizadas para la producción de embriones quimera o clonados. En este sentido la principal ventaja de esta estrategia reside en que estas células pueden utilizarse para transferencia nuclear y los individuos clonados a partir de ESC modificadas genéticamente son organismos totalmente transgénicos que expresan el transgén tanto en la línea celular germinal como en la línea somática.

A pesar de que en primates y roedores se ha conseguido aislar y cultivar *in vitro* con éxito múltiples líneas de ESC, hasta la fecha no se ha conseguido en porcino, limitando su aplicación para la obtención de transgénicos en esta especie (Roberts et al., 2015). No obstante, el reciente advenimiento de las células madre pluripotentes inducidas (iPSC, *induced pluripotent stem cells*) generadas mediante la expresión inducida de factores de transcripción relacionados con la pluripotencia, y que permiten que una célula somática diferenciada pueda revertir a un estado similar al embrionario, ha abierto nuevas vías al conseguir generarse con éxito en la especie porcina (Cheng et al., 2012)

iv. Transgénesis mediada por espermatozoides (SMGT, *sperm mediated gene transfer*)

Esta estrategia se basa en la capacidad intrínseca que tienen los espermatozoides para adherir ADN exógeno tal y como demostraron por primera vez Brackett y colaboradores en 1971 con espermatozoides de conejo (Brackett et al., 1971). Básicamente consiste en incubar los espermatozoides procedentes de eyaculado o del epidídimo en una solución con ADN exógeno (para que éste se adhiera a los espermatozoides), y utilizarlos después como vectores para introducir genes en oocitos receptores durante la fecundación *in vitro* (Lavitrano et al., 1989). La SMGT se ha llevado a cabo en ratones, conejos, cerdos, gallinas, ranas, vacuno y en algunas especies de peces (revisado en Robl et al., 2007). El ADN exógeno puede integrarse en el ADN espermático o bien simplemente unirse al espermatozoide, y una vez transferido el espermatozoide en el oocito, integrarse en el genoma del cigoto. La principal ventaja de este método reside en su simplicidad y bajo coste. Sin embargo, en porcino a pesar de que se ha conseguido producir animales transgénicos mediante esta técnica con una elevada eficiencia (más del 80% de la descendencia transgénica) (Lavitrano et al., 2002), y con menos casos de mosaicismo que los obtenidos mediante microinyección en pronúcleos (Kurome et al., 2006), los resultados no son muy reproducibles ni entre especies ni entre laboratorios.

El principal inconveniente son los problemas de integración del transgén transportado por los espermatozoides en el genoma huésped, el oocito en este caso.

Si bien en un principio se utilizaron los espermatozoides que presentaban adherido el transgén, para fecundar oocitos *in vitro* o *in vivo* mediante inseminación artificial; Perry y colaboradores propusieron en 1999 el uso de la ICSI, introduciendo directamente los espermatozoides con el transgén en los oocitos. Tras microinyectar oocitos de ratón con espermatozoides previamente incubados con ADN exógeno, consiguieron que un 20% de la descendencia expresara la integración del ADN exógeno (Perry et al., 1999). Sin embargo el limitado éxito de la ICSI en algunas especies ha dificultado la aplicación de la técnica a nivel global. Hasta la fecha la ICSI se ha utilizado con éxito para SMGT en porcino y ratón (Lai et al., 2001; Kato et al., 2004; Coy et al., 2005; Kurome et al., 2006; García-Vázquez et al., 2010; Moreira and Montoliu, 2014). La electroporación y la utilización de liposomas complementaron esta técnica, favoreciendo la unión del transgen a los espermatozoides (Smith and Spadafora, 2005). En este marco surge también una técnica alternativa de SMGT que consiste en transfectar células madre espermáticas y transplantarlas en los túbulos seminíferos (Nagano et al., 2001), o bien simplemente introducir el ADN exógeno o ADN unido a liposomas directamente en el testículo de los machos (Celebi et al., 2003). Esta última forma de SMGT se conoce como “*testis mediated gene transfer*” (TMGT), los espermatozoides captan los transgenes *in vivo* y pueden ser transferidos a las hembras mediante monta natural o por inseminación artificial. Estas técnicas se utilizaron en un principio en ratón y han sido probadas con éxito en porcino y en caprino (Honaramooz et al., 2002, 2003).

v. Transgénesis mediada por transferencia nuclear o clonación

La técnica de transferencia nuclear (TN) consiste en eliminar el ADN que contiene un oocito MII, proceso conocido como enucleación, y sustituirlo por el ADN de una célula donante. Este proceso también es conocido como clonación, ya que permite generar múltiples individuos genéticamente idénticos (a nivel nuclear) a partir de una misma fuente de células donantes. Los oocitos, una vez enucleados actuarán como receptor del núcleo donante. Recibirán el núcleo de una célula donante que puede proceder de un individuo adulto (clonación somática) (SCNT) o de un embrión (clonación embrionaria) (ECNT). El oocito reconstituido se activa entonces de manera artificial e inicia el proceso de desarrollo embrionario, y al ser transferido a una hembra receptora puede resultar en descendencia viable.

Cuando las células donantes han sido previamente MG hablamos de transgénesis mediada por TN. Las células donantes deben pues contener el transgén y pueden derivar de líneas de células madre pluripotentes inducidas (iPSC), células madre embrionarias (ESC), de tejidos adultos, fetales o embrionarios previamente transfectados; o bien de material biopsiado de animales transgénicos producidos por otros medios (p.e. microinyección en pronúcleos).

La transfección *in vitro* de las células donantes puede conseguirse utilizando técnicas estándar de transfección química (lípidos, fosfato cálcico), física (electroporación, inyección directa, biolística),

o transfección retroviral. Después de la transfección, estas células son seleccionadas en base a la integración del transgén en el genoma, antes de ser utilizadas para producir animales mediante TN.

Precisamente la posibilidad de analizar y seleccionar *in vitro* las células donantes transfectadas constituye la principal ventaja de este sistema, ya que con la selección y la detección apropiada de las células donantes, la mayoría de los animales transgénicos producidos deberían también expresar adecuadamente el transgén, reduciéndose significativamente el número de animales necesarios para producir una descendencia transgénica (Schnieke et al., 1997; Keefer et al., 2001).

Los aspectos técnicos de la TN se establecieron en la década de los 80 utilizando como células donantes blastómeros procedentes de embriones en los primeros estadios de desarrollo (Willadsen, 1986; Prather et al., 1987). Se asumió entonces que cuanto mayor fuera la sincronía temporal entre el donante de núcleo y el citoplasma receptor mayor sería el éxito de la TN. Esta teoría predominó hasta el nacimiento de Dolly en 1996 (Wilmut et al., 1997), la primera oveja clonada obtenida mediante TN de una célula somática de la glándula mamaria. Poco tiempo después se demostró que la transferencia de ADN a células somáticas, aunque laboriosa, era más eficiente que la microinyección clásica para obtener rumiantes transgénicos (Schnieke et al., 1997). La sustitución de genes en vacuno se consiguió un año más tarde utilizando la misma técnica (McCreath et al., 2000) y algo más tarde en porcino (Dai et al., 2002; Lai et al., 2002b).

Hasta el momento se han descrito diferentes protocolos de SCNT para la producción de descendencia clonada. Los utilizados con mayor frecuencia son: la clonación clásica, que precisa de sistemas de micro-manipulación (Willadsen, 1986; Wilmut et al., 1997) y la clonación manual o *hand-made cloning* (Peura et al., 1998; Vajta et al., 2001), donde todos los pasos se realizan de manera manual sin utilizar sistemas de micro-manipulación. La principal diferencia entre estos dos protocolos de SCNT reside en que el procedimiento para la clonación manual implica la eliminación de la zona pelúcida (ZP). Una vez reconstituidos los embriones sin ZP deben cultivarse *in vitro* en condiciones específicas hasta el estadio de blastocisto antes de ser transferidos a la hembra receptora. En la clonación clásica mediante sistemas de micromanipulación, cabe destacar en algunos protocolos la utilización de piezo-manipulador para la microinyección del núcleo donante, que se ha llevado a cabo con éxito en oocitos de porcino, equino, vacuno, conejo y ratón (Onishi et al., 2000; Choi et al., 2002; Galli et al., 2002; Gao, 2006; Du et al., 2009) (revisado en Niemann and Lucas-Hahn, 2012). En el caso del ratón y del caballo la utilización de piezo-manipulador presenta mejores resultados siendo con frecuencia el método de elección para estas especies.

El protocolo de clonación clásica técnicamente se basa en los siguientes pasos:

- Enucleación del oocito receptor. Se trata de un paso crucial para la eficiencia de la TN. Los receptores más apropiados para la producción de embriones clonados de mamíferos son los oocitos en estadio de metafase MII de la meiosis. La enucleación se lleva a cabo mediante

aspiración o extrusión de una pequeña porción del citoplasma, específicamente de aquella que se encuentra próxima al corpúsculo polar donde suelen situarse los cromosomas en MII. Para ello se han descrito y probado diferentes protocolos de enucleación, entre los comúnmente utilizados se encuentran, el uso de fluorocromos excitables mediante luz ultravioleta, el sistema Oosight® de microscopía que permite la formación cuantitativa de imágenes de alto contraste revelando la situación del huso meiótico sin necesidad de tinciones o marcajes exógenos; así como la enucleación química asistida en telofase.

- Transferencia nuclear. Tras la enucleación, la célula donante de núcleo se aísla de la placa de cultivo mediante un tratamiento con tripsina y se inyecta en el espacio peri-vitelino del oocito. La fusión con el citoplasto suele realizarse mediante electro-fusión, o bien se puede inyectar el núcleo donante dentro del citoplasto.
- Activación del complejo reconstruido. Puede realizarse ya sea por pulsos eléctricos o mediante breve exposición a sustancias químicas tales como ionomicina o dimetilaminopurina (DMAP), que regulan la entrada de calcio en los complejos citoplasto-núcleo donante, o bien mediante una combinación de ambos métodos químico y eléctrico. Establecer un método eficiente de activación partenogenética es un requisito crucial para establecer un sistema de SCNT que servirá tanto como para la producción de embriones control como para proporcionar una plantilla para la activación de los embriones reconstituidos.
- Cultivo *in vitro* de los embriones reconstituidos hasta estadio blastocisto. Es necesario evaluar su nivel de competencia en el inicio del desarrollo antes de transferirlos a la madre receptora.
- Transferencia de los embriones reconstituidos a una madre receptora o almacenamiento en nitrógeno líquido. La transferencia al oviducto o al útero de la madre receptora, en porcino se realiza normalmente por endoscopia o técnicas quirúrgicas.

La SCNT se ha aplicado con éxito en 16 especies (Niemann and Lucas-Hahn, 2012), aunque para la mayoría de ellas no existe mucha información sobre las tasas promedio de éxito, y lo que se ha publicado está en gran parte basado en experimentos pioneros. No obstante para vacuno y porcino se han recopilado un gran conjunto de datos que muestran claramente que la eficiencia de la clonación ha mejorado continuamente con el dominio de las habilidades técnicas y el conocimiento progresivo de los mecanismos subyacentes. El rendimiento de la clonación en porcino produce tasas de gestación de hasta el 80%, aunque el tamaño medio de cada camada es algo inferior si lo comparamos con las cifras comerciales de la cría convencional (6 vs 10,9 lechones), y el rendimiento medio de nacidos vivos por embrión transferido es del 5,3% (Petersen et al., 2008). Las técnicas de transferencia nuclear han sufrido un notable desarrollo a través del creciente número de estudios realizados logrando la estabilización de los resultados. Recientemente un meta-análisis sobre las

técnicas de manipulación *in vitro* de embriones de porcino (Liu et al., 2014) concluía que cuanto mayor es la manipulación embrionaria *in vitro*, menor es la eficiencia global para la producción de lechones.

Por otra parte, esta opción se presenta como la solución más efectiva a la hora de obtener animales MG que presenten múltiples modificaciones integradas. En efecto resulta más fácil la introducción o delección de genes en células cultivadas procedentes de un cerdo MG ya existente (Lai et al., 2002b), que generar *de novo* un cerdo transgénico que integre múltiples modificaciones.

Las opciones alternativas, como podrían ser el cruce entre diferentes líneas de cerdos transgénicos requieren mucho tiempo y esfuerzo teniendo en cuenta que los cerdos son animales de gran tamaño y ciclo reproductivo largo. Además, los cerdos portadores del transgén de interés pueden haber sido desarrollados en diferentes lugares del mundo, con lo que aumentarían las dificultades en cuanto a accesibilidad y cuarentena para realizar los cruces necesarios.

Siguiendo este enfoque, ya han sido clonados cerdos MG mediante el silenciamiento del gen de la α 1,3-galactosiltransferasa (α 3GT) (involucrada en la producción de oligosacáridos antigénicos responsables del rechazo inmunológico hiperagudo en xenotrasplantes) a partir de las células de un cerdo poli-transgénico que ya contaba con la integración de múltiples transgénos (Takahagi et al., 2005). La SCNT cuenta también con la ventaja de permitir la investigación de las características fenotípicas de los cerdos MG utilizando únicamente uno, o unos pocos de los clones resultantes. Este análisis puede utilizarse para decidir sobre las siguientes modificaciones genéticas que deberían realizarse en las siguientes generaciones.

Sin lugar a dudas es necesario dirigir las futuras investigaciones a mejorar las existencias de cerdos MG a través de la introducción de genes adicionales mediante SCNT. La generación de cerdos con tal multiplicidad de modificaciones genéticas se basa obviamente en la aplicación repetida de la clonación de células somáticas. Sin embargo, la acumulación de modificaciones epigenéticas y la reducción de la longitud de los telómeros han sido las principales preocupaciones con respecto a la clonación repetida. En este sentido, en ratones existe evidencia de reproducibilidad para la SCNT de hasta 25 generaciones de ratones clonados con éxito mediante esta técnica (Wakayama et al., 2013), lo que sugiere que, con las técnicas y eficiencias adecuadas sería posible re-clonar animales de forma indefinida. Cabe también destacar que, Kurome y colaboradores (2008) observaron que la longitud de los telómeros en los cerdos clonados no cambió después de repetir tres SCNT consecutivas. Por otra parte, se ha descrito la posibilidad de restablecer las modificaciones epigenéticas (Zhao et al., 2010), lo que en combinación con los avances en la tecnología de TN en los últimos años, sugiere que la clonación sucesiva de células somáticas puede ser más factible de lo previsto anteriormente. Las mejoras en la eficiencia de la producción y la salud de los cerdos clonados a partir de SCNT serán primordiales para futuras investigaciones.

4. Avances en biotecnología de la reproducción

En este momento la SCNT es el método de elección para introducir modificaciones genéticas dirigidas en especies domésticas incluyendo la especie porcina. Aunque el procedimiento en sí está considerado como ineficiente o ineficaz a pesar de una lenta y gradual mejora (Vajta and Callesen, 2012), el hecho de que casi la totalidad de las crías derivadas de embriones clonados a partir de donantes transgénicos contengan la misma modificación en todas sus células, incluyendo los gametos, hace que la fase *in vivo* del trabajo, a pesar de ser la más cara, sea cada vez más predecible y productiva.

En los próximos años, es previsible que una amplia gama de modificaciones genéticas sea factible en gran parte de las especies de animales domésticos. La derivación de células iPSC a partir de especies domésticas puede llegar a alcanzar el éxito equivalente al obtenido con la tecnología ESC en ratón. El desarrollo de métodos avanzados de ingeniería genética fundamenta este incipiente movimiento. La modificación genética requiere información detallada sobre la secuencia génica, su función, las variantes alélicas, y las integraciones gen a gen. La creciente secuenciación de genomas de diferentes especies y el análisis comparativo de datos de sus secuencias juega un papel decisivo en la identificación de la base genética de muchas características deseables, incluyendo la resistencia a enfermedades, la adaptación a las condiciones medioambientales, la función reproductiva y la calidad del producto. En este sentido, la reciente secuenciación completa del genoma porcino (Groenen et al., 2012) constituye un importante recurso para aumentar la especificidad de las modificaciones genéticas permitiendo reproducciones más fidedignas de las enfermedades humanas entre otras aplicaciones.

La principal ventaja de la SMGT y de la SCNT frente al resto de estrategias reside básicamente en que ambas nos permiten seleccionar la célula en cuanto a la integración del transgén previamente a su utilización para generar animales transgénicos.

Por otra parte la aparición de las técnicas de secuenciación masiva ha permitido reducir los costes de la secuenciación, y esto implica que cada vez que se produce un animal transgénico, su genoma, su epigenoma y transcriptoma órgano-específico pueden ser completamente analizados. Muchos de los caracteres deseables a nivel comercial están determinados por la expresión múltiple de genes, y la identificación de los *loci* responsables de los caracteres cuantitativos ha sido un aspecto muy importante en la mejora genética de especies de abasto durante muchos años. Hoy en día está bien establecido que los micro-ARNs (miARNs) están involucrados en el control de muchos procesos biológicos y que en muchos casos son miARNs individuales los que controlan la expresión de múltiples genes. En la medida en que aumente el conocimiento sobre la regulación de los miARNs, esto permitiría controlar redes de genes que escapan actualmente a la modificación dirigida.

OBJETIVOS

El objetivo principal de esta tesis doctoral consiste en optimizar los protocolos de inyección intracitoplasmática de espermatozoides (ICSI) y transferencia nuclear de células somáticas (SCNT) con el fin de mejorar la viabilidad de los embriones producidos en el marco de su posterior aplicación para la generación de embriones transgénicos en la especie porcina. Para ello se plantearon los siguientes objetivos parciales:

1. Mejorar la viabilidad de los embriones de porcino producidos mediante SCNT (Experimento 1), para ello se evaluó:

- a. el efecto de tres protocolos de activación artificial, basados en el tratamiento con ionomicina y 6-DMAP o pulsos eléctricos combinados o no con 6-DMAP, sobre el desarrollo de embriones partenogenotas.
- b. los beneficios de añadir suero al medio de maduración *in vitro* de los oocitos sobre los resultados de maduración nuclear y el posterior desarrollo embrionario hasta estadio de blastocisto, tanto de embriones partenogenotas, producidos mediante activación eléctrica, como de embriones producidos mediante SCNT.

2. Mejorar los resultados de la ICSI en porcino abordando los problemas de activación oocitaria y el fallo de descondensación del núcleo espermático (Experimentos 2 y 3), para ello se evaluó:

- a. el efecto de cuatro concentraciones diferentes de Ca^{2+} en el medio de microinyección sobre la activación oocitaria y el posterior desarrollo embrionario partenogenota de oocitos microinyectados sin espermatozoide (sham injection).
- b. el efecto del pre-tratamiento espermático con Triton X-100 (TX) sobre la formación pronuclear y el desarrollo embrionario.
- c. el efecto del pre-tratamiento espermático con TX y de la adición de cafeína al medio de cultivo *in vitro* durante 2h pos-ICSI sobre la formación pronuclear y el desarrollo embrionario.
- d. el efecto de pulsos eléctricos y de la adición de cafeína al medio de cultivo durante 2h pos-activación sobre la formación pronuclear de embriones partenogenotas.
- e. el efecto del pre-tratamiento espermático con TX, y de la adición de cisteína al medio de cultivo *in vitro* pos-ICSI, sobre la formación del pronúcleo masculino.

1. Oocyte activation procedures and influence of serum on porcine oocyte maturation and subsequent parthenogenetic and nuclear transfer embryo development.

E. García-Mengual¹, J. Alfonso², I. Salvador¹, C.C. Duque³ and M.A. Silvestre¹

¹Centro de Tecnología Animal. Instituto Valenciano de Investigaciones Agrarias (CITA-IVIA), Segorbe, Castellón, Spain.

²Instituto de Medicina Reproductiva (IMER), Valencia, Spain.

³H.U. La Fe de Valencia, Valencia, Spain.

Este artículo ha sido publicado en la revista "Zygote", 16, 2008:279-284.

Copyright © 2008 Cambridge University Press. doi:10.1017/S0967199408004796

Summary

The viability of SCNT embryos is poor, with an extremely low cloned piglet production rate. In the present work, we study the effect of three activation protocols based on ionomycin treatment (5 μ M ionomycin for 5 min and incubated in 2 mM 6-DMAP for 3.5 h) or electric stimuli (two square wave electrical DC pulses of 1.2 kV/cm for 30 μ s) combined or not with 6-DMAP on parthenogenetic embryo development. Oocytes activated by ionomycin plus 6-DMAP showed lower cleavage (47.2 vs. 78.5-81.5; $P<0.05$) and blastocyst rates (11.3 vs. 29.2-32.1; $P<0.05$) than those activated by electrical and electrical plus 6-DMAP treatments. Also, we study the effect of addition of serum to maturation medium (0% vs. 10%) on nuclear maturation and further parthenogenetic and SCNT embryo development. We observed in the parthenogenetic embryos that cleavage rates in the serum-free group were significantly higher than in the serum supplemented group (81.8 vs. 69.6% respectively; $P<0.05$), although these differences were not detected in blastocyst rates or blastocyst nuclei numbers. Regarding SCNT embryos, no significant differences were observed in cleavage or blastocyst rates between different experimental groups of SCNT embryos. In conclusion, electrical pulse followed or not by 6-DMAP was found to be an efficient procedure to artificially activate MII porcine oocytes. Moreover, the addition of serum to oocyte maturation media did not seem to improve parthenogenetic or SCNT porcine embryo development.

Introduction

Successful somatic cell nuclear transfer (SCNT) has been reported in several livestock species. However, in pigs the viability of SCNT embryos is poor, with an extremely low rate of cloned piglet production (Miyoshi *et al.*, 2006). Improvement in the quality of recipient oocytes and their activation methods would enhance the chance of successful cloning in the pig (Dinnyes *et al.*, 1999). Activation of metaphase II (MII) oocytes is one of the critical steps in improving porcine SCNT (Kim *et al.*, 2005). Activation is induced by an increase in intracellular free calcium levels induced by a wide variety of chemical and/or physical stimuli. The artificial activation methods mainly used are based on either the combination of calcium ionophore A23187 or ionomycin with protein phosphorylation or protein synthesis inhibitors (Funahashi *et al.*, 1994; Koo *et al.*, 2000; Betthausen *et al.*, 2000; Roh & Hwang, 2002; Silvestre *et al.*, 2007), or electric stimulation combined or not with these same inhibitors (Grupen *et al.*, 2002; Lee *et al.*, 2004; Kim *et al.*, 2005; Im *et al.*, 2006). In pig cloning, however, the best procedure for artificial activation is unclear and there are still controversial debates on the use of combined treatments with chemicals for effective development of SCNT embryos (Kim *et al.*, 2005).

Another critical factor affecting the development of porcine SCNT embryos is the *in vitro* oocyte maturation process (Hyun *et al.*, 2003; Mastromonaco *et al.*, 2004; Holker *et al.*, 2005). Recipient oocyte contains cytoplasmic factors that have accumulated during maturation critically involved in reprogramming of the transferred donor nucleus during SCNT. *In vitro* maturation (IVM) of pig oocytes has been successfully achieved, especially at nuclear level, although standard procedures are rather less efficient at cytoplasmic level (Abeydeera, 2002). In order to achieve *in vitro* matured porcine oocytes, media supplemented with serum or pFF have generally been used (Kishida *et al.*, 2004). Serum or pFF, however, contain many unknown factors and there is often considerable variability among sources or even among batches from the same source. Furthermore, there is a possibility that these fluids may contain hidden viruses (Stringfellow & Givens, 2000). In pigs, several reports have demonstrated that it is possible to replace serum or pFF with other defined compounds for maturation medium without reducing the efficiency on IVF or ICSI embryo development (Illera *et al.*, 1998; Abeydeera *et al.*, 2000; Kishida *et al.*, 2004). Recently, in bovine, a lack of serum during oocyte IVM resulted in significantly decreased SCNT embryo

development compared with embryos produced by IVF (Mastromonaco *et al.*, 2004). Serum was required, therefore, for IVM when bovine oocytes were to be used for SCNT, but not for IVF (Mastromonaco *et al.*, 2004). Few studies on the effect of IVM medium on pig SCNT embryo development were found in the reviewed literature (Hyun *et al.*, 2003; Song & Lee, 2007).

The aim of the present work was to study the effect of addition of serum to IVM medium on nuclear maturation and further parthenogenetic and SCNT embryo development. Previously, the effect of three activation protocols based on ionomycin treatment or electric stimuli combined or not with 6-DMAP on parthenogenetic embryo development was also evaluated.

Materials and methods

Culture Media

Unless otherwise stated, all chemicals were purchased from Sigma-Aldrich Química. Media with bicarbonate were covered with mineral oil and equilibrated overnight in a humidified atmosphere containing 5% CO₂ and 5% O₂ in air at 38.5°C. Handling medium (HM199) consisted of medium 199 supplemented with 25 mM Hepes, 8% (v/v) heat-inactivated foetal calf serum (FCS; Invitrogen) and antibiotics. Unless otherwise stated, maturation medium (MM199) consists of Medium 199 supplemented with 0.1% (w/v) polyvinyl alcohol (PVA), 0.57 mM cysteine and 10 ng/mL Epidermal growth factor (EGF) and antibiotics (Abeydeera *et al.*, 2000). Embryos were cultured in porcine zygote medium-3 (PZM-3; Yoshioka *et al.*, 2002) supplemented with 3 mg/ml BSA (Culture medium; CM).

***In vitro* maturation and embryo culture**

Ovaries were collected from prepuberal gilts at a local abattoir and transported within 45 minutes to the laboratory in 0.9% (w/v) NaCl supplemented with antibiotics at 37 °C. Cumulus Oocyte-Complexes (COCs) were obtained by antral follicle puncture (3-7 mm diameter) with an 18-gauge needle. Approximately 50-60 COCs were cultured in 500 µl medium in a 4-well multidish (Nunc) for 44 h. During the first 22 h of culture, COCs were incubated in MM199 supplemented with hormones: 0.1 IU/mL recombinant human-FSH, and -LH (Gonal-F and Luperis respectively, Serono, Spain; Silvestre *et al.*, 2007). Then, COCs were washed twice and cultured in hormone-free MM199 for an

additional 22 h. After different treatments (see below), presumptive zygotes were washed twice in CM medium and transferred to a Nunc 4-well multidish containing 500 μL of CM per well. Two per cent of FCS was added on culture medium at day 5 of culture. Both *in vitro* maturation and culture were performed at 38.5°C in an atmosphere of 5% O₂, 5% CO₂ and 100% relative humidity.

Artificial activation

In order to obtain parthenogenetic embryos, three different activation protocols were tested:

1. Chemical activation: MII oocytes were treated with 5 μM ionomycin for 5 min. After ionomycin treatment, oocytes were washed twice and incubated in 2 mM 6-DMAP for 3.5 h (Loi *et al.*, 1998; Silvestre *et al.*, 2007).
2. Electrical activation: oocytes were equilibrated in electropulsing medium (pH~7.0): 0.3M mannitol containing 1.0 mM CaCl₂·H₂O, 0.1 mM MgSO₄·6H₂O and 5.0 mM Hepes for 1 min before being placed in the electroporator chamber and aligned manually. Pulses were delivered with an electro-cell porator (Multiporator®, Eppendorf). Oocytes received one electrical set consisting of two square wave electrical DC pulses of 1.2 kV/cm for 30 μs each at 1 s apart in a chamber consisting of platinum wire electrodes 0.5 mm apart.
3. Electrical-chemical activation: After electrical activation, oocytes were incubated in 2 mM 6-DMAP for 3.5 h.

Somatic cell nuclear transfer

Donor cells

Pig ears were separated from adult approximately 6 months old animals at a local abattoir. Skin biopsies were obtained from the ears and very thin (0.25 to 1.0 mm²) tissue pieces were sliced using a scalpel in HM199. Tissue samples were seeded in a 2 h pre-equilibrated 75 cm² flask containing 10 mL Medium 199 supplemented with 15% (v/v) FCS and incubated in 5% CO₂ in air at 95% relative humidity and at 38.5°C. The culture medium was changed every 4 d. The donor cells used were between passages 1 to 6 of culture and were synchronised in presumptive G₀ by serum deprivation for 48h before nuclear transfer. A single cell suspension of donor cells was prepared by standard trypsination (Trypsin-EDTA solution) 1 h before nuclear transfer (Lai & Prather, 2003). The cells were pelleted and resuspended in hormone-free MM199 until their use.

Micromanipulation

Following Lai & Prather (2003) method with minor modifications, recipient MII oocytes were stained with 5 µg/mL bisbenzimidazole in North Carolina State University-23 medium supplemented with 4 mg/ml of BSA (NCSU23-BSA) for 30 min; for the last 10 minutes, oocytes were incubated in NCSU23-BSA containing 7.5 µg/ml CCB. Enucleation was performed by aspiration of the first polar body and one quarter of adjacent cytoplasm with the aid of UV light to visualise the MII plate. Enucleation was assessed checking enucleated oocyte under fluorescent microscopy. The maximum exposure time of oocytes to UV light was no more than 5-7 sec. After enucleation, oocytes were cultured in NCSU23-BSA for 40-60 min until the deposition of donor cell into the perivitelline space. Enucleated oocyte and donor cell complexes were aligned manually with the aggregation plane of the donor cell and recipient ooplasm parallel to the electrodes and received one electrical set (described above). Only those non-fused were pulsed again, 50 minutes after the first electrical set. Fused embryos were cultured in CM in the above culture conditions.

Experimental design

In Experiment 1, the effect of three artificial activation protocols (ionomycin plus 6-DMAP and electric pulse with or without an additional treatment of 6-DMAP) on cleavage and embryo development rate and nuclei number of blastocyst was examined. The three artificial activation protocols were described above.

Once the activation protocol was defined, in Experiment 2 the effect of the supplementation of 10% (v/v) heat-inactivated FCS in the maturation medium on nuclear maturation and parthenogenetic and SCNT embryo development rate and nuclei number was studied.

Assessment of nuclear maturation and embryo development.

After *in vitro* maturation, the cumulus-enclosed oocytes were briefly placed in HM199 supplemented with 1 mg/ml bovine testes hyaluronidase and then gently pipetted through a small-bore pipette. Oocytes were scored under stereoscopic vision for presence of the first polar body and therefore corresponding to nuclear matured oocytes. In all cases, cleavage and blastocyst rate were evaluated respectively at 48 and 168 h after activation under a stereomicroscope. Blastocyst quality was assessed by staining with 25 µg/mL bisbenzimidazole. Fixed and stained blastocysts were mounted onto a glass

microscope slide in a drop of glycerol and gently flattened with a coverslip. Cell counting was performed under an epifluorescence microscope.

Statistical Analysis

At least four replicates were performed per treatment. Nuclear maturation, cleavage or blastocyst rates were analysed by a chi-square test analysis. When a single degree of freedom was involved, the Yates' correction for continuity was carried out. Result of nuclei cells was analysed by the ANOVA test.

Results

Effect of several oocyte activation procedures

Results of three artificial activation treatments are shown in Table 1. Oocytes activated by ionomycin plus 6-DMAP showed lower cleavage (47.2 vs. 78.5-81.5; $p < 0.05$) and blastocyst rates (11.3 vs. 29.2-32.1; $p < 0.05$) than those activated by electrical and electrical plus 6-DMAP treatments. No differences in embryo development rates were observed between both electrical treatments with or without 6-DMAP. The total number of nuclei per blastocyst tended to be higher in both electrical groups than in the chemical group, but this difference was not statistically significant.

Table 1 Effect of different artificial activation treatment on parthenogenetic embryo development.

Activation treatment ^a	No. of MII oocytes	No. of cleaved embryos (%)	No. of blastocyst (%)	No. of nuclei/blastocyst \pm SE
Chemical	53	25 (47.2) ^c	6 (11.3) ^c	24.8 \pm 6.8
Electric + Chemical	81	66 (81.5) ^b	26 (32.1) ^b	29.8 \pm 3.0
Electric	65	51 (78.5) ^b	19 (29.2) ^b	35.2 \pm 3.5

^a Chemical: oocytes were treated with ionomycin for 5 min and 6-DMAP for 3.5 h. Electrical: MII oocytes received one electrical set consisted of two square wave electrical DC pulses of 1.2 kV/cm for 30 μ s each at 1 s apart. Electrical combined with chemical activation: after electrical activation, oocytes were incubated in 6-DMAP for 3.5 h.

^{b, c} Values with different superscript on the same column are significantly different ($p < 0.05$).

Effects of serum in maturation medium on nuclear oocyte maturation and subsequent parthenogenetic and SCNT embryo development

The effects of serum in maturation medium on *in vitro* oocyte maturation are presented in Table 2. We observed that the serum-free group showed higher nuclear maturation rate than the serum-supplemented group after 44 h of maturation (66 vs. 58%, $p < 0.05$). The cleavage and embryo development rates of parthenogenetic and NT embryos are shown in Table 3. Regarding parthenogenetic embryo development, serum-free group cleavage rates were significantly higher than those obtained in the serum-supplemented group (81.8 vs. 69.6% respectively; $p < 0.05$), although these differences were not detected in blastocyst rates or blastocyst nuclei number. Regarding SCNT embryos, no significant differences were observed in cleavage or blastocyst rates among the different experimental groups. However, the SCNT blastocysts obtained after serum-supplementation of IVM medium showed significantly higher nuclei numbers (37.4 vs 19.0 respectively; $p < 0.05$).

Table 2 Effect of serum addition on *in vitro* oocyte nuclear maturation.

Addition of Serum ^a	No. of COC	No. of MII oocytes (%)
+	802	463 (57.7) ^c
-	1061	696 (65.6) ^b

^a A 10% heat inactivated foetal calf serum was (+ group) or not supplemented (- group).

^{b,c} Values with different superscript on the same column are significantly different ($p < 0.05$).

Table 3 Effect of serum on *in vitro* parthenogenetic and nuclear transfer embryo development.

Embryo type	Addition of serum ^a	No. of activated MII oocytes	No. of cleaved embryos (%)	No. of blastocysts (%)	No. of nuclei/blastocyst \pm SE ^b
Parthenogenetic	+	191	133 (69.6) ^d	29 (15.2) ^c	27.9 \pm 3.1 ^{c,d}
	-	203	166 (81.8) ^c	22 (10.8) ^{c,d}	30.1 \pm 3.8 ^{c,d}
Nuclear Transfer	+	103	61 (59.2) ^d	5 (4.9) ^d	37.4 \pm 6.7 ^c
	-	94	65 (69.1) ^d	10 (10.6) ^{c,d}	17.5 \pm 4.7 ^d

^a A 10% heat inactivated foetal calf serum was (+ group) or not supplemented (- group).

^b Number of parthenogenetic blastocyst (+ group = 24, - group = 16).

^{c,d} Values with different superscript on the same column are significantly different ($p < 0.05$).

Discussion

When artificial activation is based on only one stimulus and, in order to avoid a fast restoration of the MPF activity and hence the MII arrest, an inhibition of protein kinase activity by 6-DMAP may be performed (Liu & Yang, 1999). However, the beneficial effect of 6-DMAP on activated porcine oocytes is still controversial. Though some authors have found that it enhanced the NT or parthenogenetic embryo development (Gruppen *et al.*, 2002; Kim *et al.*, 2005), other authors did not detect any significant effect of 6-DMAP on blastocyst rates after electrical activation (Roh & Hwang, 2002; Koo *et al.*, 2005; Kwon *et al.*, 2007; oocytes IVM at 44h). Moreover, when a 6-DMAP treatment was applied, a significant increase in chromosomal abnormalities in the NT or parthenogenetic embryos was observed in comparison with electric (Kim *et al.*, 2005) or ionomycin (Bhak *et al.*, 2006) treatments. Although we did not check 6-DMAP effects on chromosomes, we did not find a significant increase in parthenogenetic embryo development or embryo quality (cells/blastocyst) after 6-DMAP treatment, and so we decided to use only an electrical activation treatment for the following experiment.

In the present experiment demonstrated that the effect of serum supplementation of IVM medium on nuclear maturation and further parthenogenetic and SCNT embryo development was studied. Currently, little information on the effect of serum in IVM medium on oocyte viability is available and existing results are controversial. Protein supplementation of IVM medium had different effect on bovine IVF or NT blastocyst embryo development (Mastromonaco *et al.*, 2004). In the present study, we observed a lower nuclear maturation rate in the FCS-supplemented group compared with the FCS-free group. In fact, many studies have shown that the source of protein supplementation affects the kinetics of nuclear maturation and further embryo development (Ali & Sirard, 2002; Mastromonaco *et al.*, 2004; Krylov *et al.*, 2005). In addition, we observed a different effect of FCS on IVM medium depending on the type of embryo (parthenogenetic or SCNT). On the one hand, in parthenogenetic embryos we observed a detrimental effect of FCS on the cleavage rate after electrical activation, although this effect disappeared when embryos progressed to the blastocyst stage. According to this, Kishida *et al.* (2004) suggested that *in vitro* pig embryo development after ICSI was delayed after IVM in serum-free IVM medium. It has been reported that the presence of serum in IVM medium modified significantly several transcript levels, which could

affect further embryo viability (Watson *et al.*, 2000; Calder *et al.*, 2005). However, others did not detect any delay in bovine IVF embryo development, or differences on cleavage or blastocyst rates, the only significant effects being on blastocyst cell number in favour of the experimental group supplemented by serum (Sagirkaya *et al.*, 2006). On the other hand, in SCNT embryos, no effect of FCS was detected on cleavage or blastocyst rates, although the few blastocysts obtained in the FCS group presented a nuclei number significantly higher than free-FCS group. This great variability between different studies may be due partially to the evident differences among serum batches in some components that affected both cumulus expansion and oocyte maturation (Suzuki *et al.*, 2006).

In conclusion, electrical pulse followed or not by 6-DMAP was found to be an efficient procedure to artificially activate MII porcine oocytes. Moreover, the addition of serum to oocyte maturation media did not seem to improve parthenogenetic or NT porcine embryo development.

Acknowledgments

This work was partially supported by the Conselleria de Empresa, Universidad y Ciencia de la Generalitat Valenciana (GV05/212) and INIA (RTA2007-0110-00-00). E. García-Mengual was supported by a research grant from the Conselleria de Agricultura, Pesca y Alimentación. The authors would like to thank F. García-Ximénez and R. P. Cervera for their critical comments and advice on the manuscript, N. Macowan for revising the English version of this manuscript and the Mercavalencia Abattoir for their assistance in obtaining porcine ovaries.

References

- Abeydeera, L.R. (2002). *In vitro* production of embryos in swine. *Theriogenology*. **57**, 256-73.
- Abeydeera, L.R., Wang, W.H., Cantley, T.C., Rieke, A., Murphy, C.N., Prather, R.S. & Day, B.N. (2000). Development and viability of pig oocytes matured in a protein-free medium containing epidermal growth factor. *Theriogenology*. **54**, 787-97.

- Ali, A. & Sirard, M.A. (2002). Effect of the absence or presence of various protein supplements on further development of bovine oocytes during *in vitro* maturation. *Biol. Reprod.* **66**, 901-5.
- Beththausen, J., Forsberg, E., Augenstein, M., Childs, L., Eilertsen, K., Enos, J., Forsythe, T., Golueke, P., Jurgella, G., Koppang, R., Lesmeister, T., Mallon, K., Mell, G., Misica, P., Pace, M., Pfister-Genskow, M., Strelchenko, N., Voelker, G., Watt, S., Thompson, S. & Bishop, M. (2000). Production of cloned pigs from *in vitro* systems. *Nat. Biotechnol.* **18**, 1055-9.
- Bhak, J.S., Lee, S.L., Ock, S.A., Mohana, K.B., Choe, S.Y. & Rho, G.J. (2006). Developmental rate and ploidy of embryos produced by nuclear transfer with different activation treatments in cattle. *Anim. Reprod. Sci.* **92**, 37-49.
- Calder, M.D., Caveney, A.N., Sirard, M.A. & Watson, A.J. (2005). Effect of serum and cumulus cell expansion on marker gene transcripts in bovine cumulus-oocyte complexes during maturation *in vitro*. *Fertil. Steril.* **83** Suppl 1: 1077-85.
- Dinnyes, A., Hirao, Y. & Nagai, T. (1999). Parthenogenetic activation of porcine oocytes by electric pulse and/or butyrolactone I treatment. *Cloning* **1**, 209-16.
- Funahashi, H., Cantley, T.C., Stumpf, T.T., Terlouw, S.L. & Day, B.N. (1994). *In vitro* development of *in vitro*-matured porcine oocytes following chemical activation or *in vitro* fertilization. *Biol. Reprod.* **50**, 1072-7.
- Gruppen, C.G., Mau, J.C., McIlpatrick, S.M., Maddocks, S. & Nottle, M.B. (2002). Effect of 6-dimethylaminopurine on electrically activated *in vitro* matured porcine oocytes. *Mol. Reprod. Dev.* **62**, 387-96.
- Holker, M., Petersen, B., Hassel, P., Kues, W.A., Lemme, E., Lucas-Hahn, A. & Niemann, H. (2005). Duration of *in vitro* maturation of recipient oocytes affects blastocyst development of cloned porcine embryos. *Cloning Stem Cells.* **7**, 35-44.
- Hyun, S.H., Lee, G.S., Kim, D.Y., Kim, H.S., Lee, S.H., Kim, S., Lee, E.S., Lim, J.M., Kang, S.K., Lee, B.C. & Hwang, W.S. (2003). Effect of maturation media and oocytes derived from sows or gilts on the development of cloned pig embryos. *Theriogenology.* **59**, 1641-9.
- Illera, M.J., Lorenzo, P.L., Illera, J.C. & Petters, R.M. (1998). Developmental competence of immature pig oocytes under the influence of EGF, IGF-I, follicular fluid and gonadotropins during IVM-IVF processes. *Int. J. Dev. Biol.* **42**, 1169-72.

- Im, G.S., Seo, J.S., Hwang, I.S., Kim, D.H., Kim, S.W., Yang, B.C., Yang, B.S., Lai, L. & Prather, R.S. (2006). Development and apoptosis of pre-implantation porcine nuclear transfer embryos activated with different combination of chemicals. *Mol. Reprod. Dev.* **73**, 1094-101.
- Kim, Y.S., Lee, S.L., Ock, S.A., Balasubramanian, S., Choe, S.Y. & Rho, G.J. (2005). Development of cloned pig embryos by nuclear transfer following different activation treatments. *Mol. Reprod. Dev.* **70**, 308-13.
- Kishida, R., Lee, E.S. & Fukui, Y. (2004). *In vitro* maturation of porcine oocytes using a defined medium and developmental capacity after intracytoplasmic sperm injection. *Theriogenology*. **62**, 1663-76.
- Koo, D.B., Chae, J.I., Kim, J.S., Wee, G., Song, B.S., Lee, K.K. & Han, Y.M. (2005). Inactivation of MPF and MAP kinase by single electrical stimulus for parthenogenetic development of porcine oocytes. *Mol. Reprod. Dev.* **72**, 542-9.
- Koo, D.B., Kang, Y.K., Choi, Y.H., Park, J.S., Han, S.K., Park, I.Y., Kim, S.U., Lee, K.K., Son, D.S., Chang, W.K. & Han, Y.M. (2000). *In vitro* development of reconstructed porcine oocytes after somatic cell nuclear transfer. *Biol. Reprod.* **63**, 986-92.
- Krylov, V., Kren, R., Okada, K., Vackova, I., Tlapakova, T. & Fulka, J. (2005). Effect of protein supplement source on porcine oocyte maturation and subsequent embryonic development after parthenogenetic activation. *Folia Biol. (Praha)* **51**, 29-33.
- Kwon, D.J., Park, C.K., Yang, B.K., Kim, C.I. & Cheong, H.T. (2007). Effects of maturational age of recipient oocytes and activation conditions on the development of porcine fetal fibroblast nuclear transfer embryos. *Anim. Reprod. Sci.* **100**, 211-5.
- Lai, L. & Prather, R.S. (2003). Production of cloned pigs by using somatic cells as donors. *Cloning Stem Cells*. **5**, 233-41.
- Lee, J.W., Tian, X.C. & Yang, X. (2004). Optimization of parthenogenetic activation protocol in porcine. *Mol. Reprod. Dev.* **68**, 51-7.
- Liu, L. & Yang, X. (1999). Interplay of maturation-promoting factor and mitogen-activated protein kinase inactivation during metaphase-to-interphase transition of activated bovine oocytes. *Biol. Reprod.* **61**, 1-7.

- Loi, P., Ledda, S., Fulka, J., Jr., Cappai, P. & Moor, R.M., (1998). Development of parthenogenetic and cloned ovine embryos: effect of activation protocols. *Biol. Reprod.* **58**, 1177-87.
- Mastromonaco, G.F., Semple, E., Robert, C., Rho, G.J., Betts, D.H. & King, W.A. (2004). Different culture media requirements of IVF and nuclear transfer bovine embryos. *Reprod. Domest. Anim.* **39**, 462-7.
- Miyoshi, K., Sato, K. & Yoshida, M. (2006). *In vitro* development of cloned embryos derived from miniature pig somatic cells after activation by ultrasound stimulation. *Cloning Stem Cells.* **8**, 159-65.
- Roh, S. & Hwang, W.S. (2002). *In vitro* development of porcine parthenogenetic and cloned embryos: comparison of oocyte-activating techniques, various culture systems and nuclear transfer methods. *Reprod. Fertil. Dev.* **14**, 93-9.
- Russell, D.F., Baqir, S., Bordignon, J. & Betts, D.H. (2006). The impact of oocyte maturation media on early bovine embryonic development. *Mol. Reprod. Dev.* **73**, 1255-70.
- Sagirkaya, H., Misirlioglu, M., Kaya, A., First, N.L., Parrish, J.J. & Memili, E. (2007). Developmental potential of bovine oocytes cultured in different maturation and culture conditions. *Anim. Reprod. Sci.* **101**, 225-40..
- Silvestre, M.A., Alfonso, J., Garcia-Mengual, E., Salvador, I., Duque, C.C. & Molina, I. (2007). Effect of recombinant human follicle-stimulating hormone and luteinizing hormone on *in vitro* maturation of porcine oocytes evaluated by the subsequent *in vitro* development of embryos obtained by *in vitro* fertilization, intracytoplasmic sperm injection, or parthenogenetic activation. *J. Anim. Sci.* **85**, 1156-60.
- Song, K. & Lee, E. (2007). Modification of maturation condition improves oocyte maturation and *in vitro* development of somatic cell nuclear transfer pig embryos. *J. Vet. Sci.* **8**, 81-7.
- Stringfellow, D.A. & Givens, M.D. (2000). Infectious agents in bovine embryo production: hazards and solutions. *Theriogenology.* **53**, 85-94.
- Suzuki, M., Misumi, K., Ozawa, M., Noguchi, J., Kaneko, H., Ohnuma, K., Fuchimoto, D., Onishi, A., Iwamoto, M., Saito, N., Nagai, T. & Kikuchi, K. (2006). Successful piglet production by IVF of oocytes matured *in vitro* using NCSU-37 supplemented with fetal bovine serum. *Theriogenology.* **65**, 374-86.

- Thouas, G.A., Korfiatis, N.A., French, A.J., Jones, G.M. & Trounson, A.O. (2001). Simplified technique for differential staining of inner cell mass and trophectoderm cells of mouse and bovine blastocysts. *Reprod. Biomed. Online.* **3**, 25-9.
- Watson, A.J., De Sousa, P., Caveney, A., Barcroft, L.C., Natale, D., Urquhart, J. & Westhusin, M.E. (2000). Impact of bovine oocyte maturation media on oocyte transcript levels, blastocyst development, cell number, and apoptosis. *Biol. Reprod.* **62**, 355-64.
- Yoshioka, K., Suzuki, C., Tanaka, A., Anas, I.M. & Iwamura, S. (2002). Birth of piglets derived from porcine zygotes cultured in a chemically defined medium. *Biol. Reprod.* **66**, 112-9.

2. Viability of ICSI oocytes after caffeine treatment and sperm membrane removal with Triton X-100 in pigs.

E. García-Mengual^{a,e}, E. García-Roselló^b, J. Alfonso^{c,d}, I. Salvador^a, A. Cebrian-Serrano^a, M.A. Silvestre^a

^aCentro de Tecnología Animal. Instituto Valenciano de Investigaciones Agrarias (CITA-IVIA), Segorbe, Castellón, Spain.

^bUniversidad CEU-Cardenal Herrera. Facultad de Veterinaria, Moncada, Spain.

^cInstituto de Medicina Reproductiva (IMER), Valencia, Spain.

^dClínica GOBEST, Zaragoza, Spain.

^eSistemas Genómicos, Valencia, Spain.

Este artículo ha sido publicado en la revista "Theriogenology", 76, 2011: 1658–1666.

Copyright © 2011 Elsevier Inc. doi:10.1016/j.theriogenology.2011.06.030

Abstract

Non-adequate decondensation of injected sperm nucleus is one the main problems of intracytoplasmic sperm injection (ICSI) in porcine. With the aim of improving pronuclear formation, the effects on activation and embryo development rates of 0.1% Triton X-100 (TX) sperm pre-treatment for membrane removal and/or 5 mM Caffeine (CAF) addition in oocyte manipulating and culture medium for 2 h after ICSI or artificial activation were studied. The effects of 4 different Ca^{2+} concentrations contained in the injection medium on embryo development after sham injection were also analysed. In Experiment 1, no significant effect on cleavage or blastocyst rate was detected independently of Ca^{2+} concentration contained in the injection medium. In Experiment 2, oocytes injected with TX pre-treated sperm showed a significant higher rate of male pronuclear formation in comparison with oocytes from control group (2PN; 54.1 vs. 36.6%). However, no differences on *in vitro* embryo development, cleavage or blastocyst rates were observed. In Experiment 3, oocytes treated with CAF during and after micromanipulation and injected with sperm pre-treated with TX had a significantly lower oocyte activation rate than any other experimental groups (25.7 vs. 56.3-66.3%). No differences were observed in cleavage rates among different experimental groups. However, the CAF group showed a higher blastocyst rate significantly different from TX+CAF group (12.0 vs. 1.9%, respectively). In a second approach, the effect of electric field strengths and CAF treatments on oocyte activation was studied. In Experiment 4, oocytes submitted to 0.6 kV/cm showed significant higher activation rates than 1.2 kV/cm ones regardless of the caffeine treatment (83.7 vs. 55.9% and 75.7 vs. 44.3%; in control and caffeine groups, respectively). No effect of caffeine treatment was observed in any experimental group.

In conclusion, TX sperm treatment before ICSI without an additional activation procedure improved male pronuclear formation, but did not improve embryo development until blastocyst stage. No significant effect of caffeine was found when sperm was not treated with TX, although in membrane absence caffeine avoided oocyte activation and embryo development. Finally, caffeine had no effect on female pronuclear formation regardless of electric field strengths applied to the parthenogenetic activation.

Introduction

In spite of recent progress in the embryology area, *in vitro* production of porcine embryos has been limited, mostly by a high rate of polyspermy after conventional *in vitro* fertilisation [1-5]. In this sense, the intracytoplasmic sperm injection technique (ICSI) could be an alternative to produce *in vitro* monospermic zygotes. However, the rate of blastocysts obtained following ICSI remains low, limiting its application (revised in Garcia-Rosello *et al.* [6]). In porcine ICSI, one of the major problems is the failure of sperm nucleus decondensation and, consequently, the formation of a functional male pronucleus [7] after sperm injection into the oocyte.

Unlike IVF, in the ICSI process, the plasmatic membranes of injected sperm including the acrosome containing hydrolytic enzymes, are inserted in the oocyte, and it has been suggested that this may hinder male pronucleus formation [8]. In attempts to improve pronuclear formation after ICSI of bovine and porcine oocytes, several sperm pre-treatments have been tested, including immobilising sperm and damaging the sperm membrane by repeated freezing/thawing without cryoprotectant [9, 10] and treatment with Triton X-100 (TX) to eliminate membranes [10, 11], or dithiothreitol (DTT) to reduce disulfide bonds [12-15], or progesterone to trigger the acrosome reaction [16].

Another ICSI related factor that could participate in the oocyte activation would be the insertion of Ca^{2+} present in injection medium with the insertion of the micropipette into the oocytes. In fact, the mere process of oocyte injection without sperm (sham injection) is sufficient to activate the pig oocytes (and supposedly a decrease in MPF activity), promoting their development even up to blastocyst stage [17]. Commonly used media during micromanipulation in pigs contain different Ca^{2+} concentrations: PBS (~1.19mM, [18]) NCSU (~1.70mM [19]); TL-Hepes (~2.04 mM, [7, 20]) and M199 (~0.26 g/L [21]).

Another approach to improve male pronucleus formation could be to promote an adequate activity of M-phase or maturation promoting factor (MPF) at the moment of ICSI. Kim *et al.* suggested that MPF was critical for the transformation of sperm nuclei to metaphase chromosomes in maturing pig oocytes [22]. Thus, MPF is responsible for the adequate transformation of sperm head into male pronucleus [23]. Kawahara *et al.*, in nuclear transfer experiments, showed that cell injection (comparable with the sperm injection process) significantly decreased P34^{cdc2} kinase activity [24]. Moreover, when porcine oocytes were artificially pre-activated before ICSI, male pronucleus formation

was dramatically reduced [22]. One way used to regulate MPF activity consisted of modifying the phosphorylation status of p34^{cdc2} kinase by the ways Myt1/Wee1 and cdc25 [24]. So, the inhibition of Myt1/Wee1 activity, and therefore preservation of the MPF activity, could be achieved by the addition of caffeine to the culture medium [25], thus avoiding a drop in p34^{cdc2} kinase activity during or immediately after cell injection [24]. To date, no paper studying the effect of a caffeine treatment of the oocytes on ICSI procedure efficiency has been found in the literature.

We therefore proposed the hypothesis that an adequate exposure of sperm nucleus to oocyte cytoplasm by means of sperm membrane elimination before ICSI, or alternatively avoiding a premature decrease of MPF activity with a caffeine treatment, might improve male pronucleus formation and further embryo development after ICSI.

Materials and Methods

1. Culture Media

Unless otherwise stated, all chemical products were purchased from Sigma-Aldrich Quimica (Madrid, Spain). Handling medium (HM199) consisted of medium 199 supplemented with 25 mM Hepes (M7528), 7.4% (v/v) heat-inactivated foetal calf serum (FCS; Invitrogen, Barcelona, Spain) and antibiotics. Maturation medium (MM199) consisted of medium 199 (M4530) supplemented with 0.1% (w/v) polyvinyl alcohol (P8136), 0.57 mM cysteine and 10 ng/mL epidermal growth factor and antibiotics [26]. Presumptive zygotes were *in vitro* cultured in porcine zygote medium-3 (PZM-3;[27]) plus antibiotics (culture medium; CM). All media containing bicarbonate were covered with mineral oil and equilibrated overnight in the culture conditions.

2. In vitro maturation (IVM) and embryo culture

Ovaries of prepubertal gilts were collected at a local slaughterhouse and transported within approximately 1 h to the laboratory in 0.9% (w/v) NaCl solution supplemented with antibiotics at approximately 37°C. Then, cumulus oocyte-complexes (COCs) were obtained by puncture from antral follicles (3-7 mm diameter) with an 18-gauge needle connected to a 10-mL syringe. After washing, groups of approximately 50 to 60 COCs were cultured in 500 µl medium in a nunc 4-well multidish (Nunc, Roskilde, Denmark) for 44 h. During the first 22 h of culture, COCs were matured in MM199 supplemented

with hormones: 0.1 IU/mL recombinant human-FSH, and -LH (Gonal-F® and Luveris®, Merck Serono, Madrid, Spain [21]). Then, COCs were washed twice and cultured in hormone-free MM199 for an additional 22 h. After different treatments (see experimental design below), presumptive zygotes were washed twice in CM and cultured in a nunc 4-well multidish containing 500 µL of CM per well. Two per cent of FCS was added to wells containing embryos at day 5 of embryo culture. Both *in vitro* maturation and culture were performed at 38.5 °C in a humidified atmosphere of 5% O₂ and 5% CO₂.

3. Intracytoplasmic sperm injection and Sham injection

Semen was supplied by a porcine artificial insemination centre (Semen Cardona, Barcelona, Spain) and stored at 17°C. Semen sample was submitted to light centrifugation (50 g for 3 min) to eliminate foreign particles and dead cells. After the first wash, the cleanest fraction of semen was collected and put through a second centrifugation (1250 g for 4 min). Finally the pellet was re-suspended in HM199. For ICSI, metaphase II (MII) oocytes previously denuded were washed and transferred to HM199 drops. ICSI was conducted in an inverted microscope with attached micromanipulators as described by García-Roselló *et al.* [28] with minor modifications. Briefly, 6 microdrops containing MII oocytes were placed surrounding central drops containing spermatozoa in 10% polyvinylpyrrolidone solution. Microdrops were covered with mineral oil. One single sperm was immobilised by rubbing the midpiece with the injection pipette and aspirated by the tail. Oocytes were fixed by the holding pipette so that the first polar body was set in 6 or 12 o'clock position. Prior to sperm injection, a small amount of ooplasm was aspirated into the injection pipette. In addition, some MII oocytes (see experimental design below) were submitted to sham injection performed as described above for ICSI, except that there were no spermatozoa in the injection pipette. Temperature was maintained at 38.5°C throughout all micromanipulation process using a heated microscopic stage.

4. Oocyte parthenogenetic activation

Artificial oocyte activation was performed following Lai and Prather [29] with minor modifications. Briefly, several MII oocytes were placed between two platinum wire electrodes (0.5 mm apart) in a chamber filled with activation medium (pH ≈ 7.0; 280-300 mOsm) consisting of 0.3 M mannitol, 1.0 mM CaCl₂·2H₂O, 0.1 mM

MgCl₂·6H₂O and 0.5 mM Hepes [29]. Before being placed into the micro fusion chamber, MII oocytes were equilibrated in activation medium for 1 min. Then, oocytes were stimulated with one electrical set of two DC pulses (1-second interval) of 0.6 kV/cm or 1.2 kV/cm for 30 μs performed by an electro-cell porator (Multiporator® Eppendorf). The temperature was maintained at 38.5 °C throughout the activation procedure using a heated microscopic stage. After activation, oocytes were washed twice and cultured in CM.

5. Experimental design

In this study, four experiments were conducted.

In Experiment 1, to study parthenogenetic activation of oocyte submitted to sham ICSI, the effect of four microinjection medium Ca²⁺ concentrations on oocyte activation and embryo development was studied. To this end, injection medium consisted of PBS without CaCl₂·2H₂O and MgCl₂·6H₂O (D8537) plus different amounts (A: 0, B: 0.44, C: 0.88 and D: 1.77 mM) of CaCl₂·2H₂O and 0.49 mM MgCl₂·6H₂O plus 0.3% BSA.

In Experiment 2, the effect of a sperm pre-treatment with TX on pronuclear formation and embryo development was studied. To this end, MII oocytes were injected with sperm previously treated (TX) or not (C, control group) with Triton X-100. Sperm treatment with TX was performed as follows; upper fraction of control semen (with higher motile sperm rate) was set aside and 0.1% TX added for 1 min. Semen with TX was vortexed and washed with HM199, then centrifuged at 500g for 5 min, and the pellet was re-suspended in HM199.

In Experiment 3, we studied the effect of 5 mM caffeine (C8960) in the oocyte manipulating and culture medium for 2 h after sperm injection, on pronuclear formation and embryo development. Caffeine effect (CAF) was studied in combination with a sperm pre-treatment of TX on a complete 2 X 2 experimental design (TX, TX+CAF, C, C+CAF).

In Experiment 4, we studied the effect of 5 mM caffeine in the following 2 h post-activation treatment on pronuclear formation of parthenogenetic porcine oocytes. Caffeine effect (control: C, caffeine: CAF) was studied in combination with two different electric field strengths (0.6 kV/cm and 1.2 kV/cm) electrical activation procedures, on a complete 2 X 2 experimental design (C-0.6, C-1.2, CAF-0.6, CAF-1.2). For CAF treatment, after electrical activation presumptive zygotes were washed twice in CM and submitted to 2 h incubation in caffeine-supplemented CM.

6. *Assessment of nuclear maturation, pronuclear formation and embryo development*

After IVM, COCs were briefly incubated in HM199 supplemented with 1 mg/ml bovine testes hyaluronidase (H4272) and then gently pipetted. Oocytes with presence of the first polar body were classed as nuclear matured oocytes. To study pronuclear formation, presumptive zygotes were fixed and stained at 18 h after ICSI (Experiments 2 and 3), and 8 h after electrical activation (Experiment 4) in absolute ethanol with Hoechst 33342 (10 mg/mL in DPBS). Pronuclei were scored under an epifluorescence microscope. Injected oocytes were classified into 4 groups as follows: Activated, indicated oocytes resuming meiosis, with no metaphase plate visible and with at least one pronucleus; 2PN, oocytes with 2 pronuclei and no visible sperm; 1PN+sperm, oocytes with 1 pronucleus and one sperm; others, oocytes with other nuclear structures as more than 2 pronuclei or no analysable oocytes. Parthenogenetically activated oocytes were recognised by absence of visible metaphase plate and at least 1PN, 2PN, or greater presence. Cleavage and blastocyst rates were evaluated respectively at 48 and 168 h after ICSI under a stereomicroscope. Non-cleaved embryos were eliminated from *in vitro* culture. In order to examine embryos cell number, embryos developing to blastocyst stage were fixed and stained in absolute ethanol with Hoechst 33342 and cell nuclei were scored under an epifluorescence microscope.

7. *Statistical Analysis*

At least four replicates were performed per experiment. Pronuclear formation, cleavage or blastocyst rates were analysed by a Chi-square test analysis. When a single degree of freedom was involved, the Yates' correction for continuity was carried out. Results of nuclei cells were analysed by the ANOVA test.

Results

1. *Effect of different injection medium Ca^{2+} concentrations on oocyte activation after sham injection*

No significant effect on cleavage was detected regardless of Ca^{2+} concentration contained in the injection medium (ranging from 47.3% to 56.5%). Blastocysts were

obtained in almost all experimental groups after sham injection, although no significant difference among these groups was observed (Table 1).

Table 1. Effect of different injection medium Ca^{2+} concentrations on pig oocyte activation after sham injection

Experimental group*	No. of MII oocytes	No. of cleaved embryos (%)	No. of blastocyst (%)**
A	138	73 (52.9)	1 (1.4)
B	131	62 (47.3)	1 (1.6)
C	138	78 (56.5)	0 (0.0)
D	140	76 (54.3)	1 (1.3)

*Injection medium consisted of $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ free PBS plus different amounts (A: 0, B: 0.44, C: 0.88 and D: 1.77 mM) of $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ and 0.49 mM $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ plus 0.3% BSA.

**From cleaved embryos.

2. Effect of a TX sperm pre-treatment on pronuclear formation and embryo development.

Results of the effect of sperm membrane removal on pronuclear formation are shown in Table 2. No effect of sperm membrane removal with TX on oocyte activation rates was observed. However, oocytes injected with sperm previously treated with TX showed a significant higher rate of male pronuclear formation in comparison with oocytes from control group (2PN; 54.1% vs. 36.6%; $P < 0.05$). In the control group, a higher incidence of one female pronucleus plus intact sperm was observed than in the TX group (1PN+ sperm; 47.9% vs. 30.3%; $P < 0.05$). Regarding the effect of sperm pre-treatment on embryo development following ICSI, no differences in any parameters of *in vitro* embryo development, cleavage or blastocyst rate, were observed (Table 3). There was no significant difference in the number of cells per blastocyst (ranging from 28.5 to 33.8 nuclei/blastocyst).

3. Effects of TX and CAF treatments on pronuclear formation and further embryo development of sperm injected oocytes

Effects of TX and CAF treatment on pronuclear formation of sperm injected oocytes are shown in Table 4. Oocytes treated with CAF during and after micromanipulation and injected with sperm pre-treated with TX had a lower oocyte activation rate than any other experimental groups (25.7% vs. 56.3-66.3%; $P < 0.05$). Zygotes from TX+CAF group showed a higher rate of female pronucleus plus intact sperm than TX group (63.2% vs. 34.9%, respectively), although this difference was not statistically significant ($P = 0.064$). Concerning *in vitro* embryo development, no differences were observed in cleavage rates among different experimental groups ranging from 52.0% to 61.8% (Table 5). However, the C+CAF group showed the highest blastocyst rate, and this rate was significantly different from TX+CAF group (12.0% vs. 1.9%, respectively; $P < 0.05$). Quality of blastocysts expressed as number of cells per embryo was similar in all experimental groups (ranging from 28.8 to 36.1 nuclei/blastocyst).

4. *Effect of electric field strengths and CAF treatments on pronuclear formation of parthenogenetically activated oocytes*

Oocytes submitted to electric field strength of 0.6 kV/cm showed higher activation rates than 1.2 kV/cm ones independently of the caffeine treatment (83.7% vs. 55.9% and 75.7% vs. 44.3%; in control and caffeine treatments, respectively; $P < 0.05$). No effect of caffeine treatment was observed in any experimental group (Table 6).

Table 2. Effect of Triton X-100 sperm pre-treatment on pronuclear formation of sperm injected pig oocytes.

Sperm treatment [*]	No. of injected oocytes	No. of activated oocytes (%)	From activated oocytes ^{**}		
			2PN (%)	1PN+ Sperm (%)	Others ^{***}
C	192	142 (74.0)	52 (36.6) ^b	68 (47.9) ^a	22
TX	160	109 (68.1)	59 (54.1) ^a	33 (30.3) ^b	17

^{*} Sperm was treated (TX) or not (C) with solution of 0.1% Triton X-100.

^{**} Activated indicates oocytes resuming meiosis, with no metaphase plate visible and with at least one pronucleus; 2PN, oocytes with 2 pronuclei and no visible sperm; 1PN+sperm, oocytes with 1 pronucleus and one sperm; others: oocytes with other nuclear structures as 2 pronuclei and one sperm, 3 pronuclei or no analysable oocytes.

^{***} Data were not statistically analysed.

^{a,b} Values with different superscript on the same column are significantly different ($P < 0.05$).

Table 3. Effect of Triton X-100 sperm pre-treatment on pig embryo development following ICSI.

Sperm treatment*	No. of MII oocytes	No. of cleaved embryos (%)	No. of blastocyst (%)	Blastocyst cell number \pm SE
C	297	179 (60.3)	18 (10.1)	33.8 \pm 4.4
TX	229	136 (59.4)	8 (5.9)	28.5 \pm 6.4

* Sperm was treated (TX) or not (C) with solution of 0.1% Triton X-100.

Table 4. Effect of Triton X-100 and caffeine treatments on pronuclear formation of sperm injected pig oocytes.

Experimental Groups [*]	No. of injected oocytes	No. of activated oocytes (%)	From activated oocytes ^{**}		
			2PN (%)	1PN + Sperm (%)	Others ^{***}
C	98	65 (66.3) ^a	25 (38.5)	28 (43.1)	12 (18.5)
C+CAF	80	45 (56.3) ^a	19 (42.2)	22 (48.9)	4 (8.9)
TX	74	43 (58.1) ^a	22 (51.2)	15 (34.9)	6 (14.0)
TX+CAF	74	19 (25.7) ^b	5 (26.3)	12 (63.2)	2 (10.5)

^{*}Sperm was treated (TX) or not (C) with solution of 0.1% Triton X-100. In the experimental groups with “+CAF”, oocytes were submitted to 5 mM caffeine in the oocyte manipulating medium and culture medium for 2 h after sperm injection.

^{**} Activated indicates oocytes resuming meiosis, with no metaphase plate visible and with at least one pronucleus; 2PN, oocytes with 2 pronuclei and no visible sperm; 1PN+sperm, oocytes with 1 pronucleus and one sperm; Others, oocytes with other nuclear structures as 2 pronuclei and one sperm, 3 pronuclei or no analysable oocytes.

^{***}Data were not statistically analysed.

^{a,b} Values with different superscript on the same column are significantly different ($P < 0.05$).

Table 5. Effect of Triton X-100 and caffeine treatments on embryo development of sperm injected pig oocytes.

Experimental group*	No. of MII oocytes	No. of cleaved embryos (%)	No. of blastocyst (%)**	Blastocyst cell number \pm SE
C	131	81 (61.8)	8 (9.9) ^{ab}	36.1 \pm 4.3
C+CAF	129	75 (58.1)	9 (12.0) ^a	30.3 \pm 4.0
TX	120	71 (59.2)	4 (5.6) ^{ab}	28.8 \pm 6.1
TX+CAF	102	53 (52.0)	1 (1.9) ^b	32.0 \pm 0.0

*Sperm was treated (TX) or not (C) with solution of 0.1% Triton X-100. In the experimental groups with “+CAF”, oocytes were submitted to 5 mM caffeine in the oocyte manipulating medium and culture medium for 2 h after sperm injection.

**From cleaved embryos.

^{a,b} Values with different superscript on the same column are significantly different ($P < 0.05$).

Table 6. Effect of caffeine oocyte treatment on pronuclear formation of parthenogenetically activated pig oocytes by two different electric field strengths.

Experimental group	Activation Protocol (KV/cm) [*]	Caffeine treatment ^{**}	No. Total Treated oocytes	No. of activated oocytes ^{***} (%)
C 0.6	0.6	-	123	103 (83.7) ^a
C 1.2	1.2	-	136	76 (55.9) ^b
CAF 0.6	0.6	+	136	103 (75.7) ^a
CAF 1.2	1.2	+	122	54 (44.3) ^b

^{*}Oocytes were stimulated with one electrical set of two DC pulses of 0.6 or 1.2 kV/cm for 30 μ s.

^{**}After electrical activation, presumptive zygotes were submitted (+) or not (-) to 2h incubation in 5 mM caffeine supplemented CM.

^{***}Activated indicates oocytes resuming meiosis, with no metaphase plate visible and at least, with one pronucleus; 2PN, 3PN or more.

^{a,b}Values with different superscript on the same column are significantly different (P<0.05).

Discussion

Anomalies in the decondensation of sperm nucleus into a functional male pronucleus are perhaps the main problem affecting global efficiency in porcine ICSI [7]. In this work, we tried to solve this trouble by exposing the sperm nucleus to oocyte cytoplasm after removing sperm membrane before ICSI with Triton X-100, or avoiding a possible premature decrease of MPF activity (due to the injection process) with a caffeine treatment during and after ICSI, or a combination of both treatments.

Morozumi and Yanagimachi suggested that the success of ICSI could be improved if both sperm and acrosome membranes were removed before sperm injection [30]. Mouse and pig sperm treated with TX lost all components (acrosome and membranes), leaving only the nucleus and perinuclear materials [31-33], and these treated spermatozoa did not lose the ability to activate oocytes [34]. In the present work, TX treatment was also used to remove acrosome and membranes, and this treatment improved male pronuclear formation of injected sperm, but failed to improve blastocyst development. Our results agree with other authors using TX [10], but do not coincide with Lee and Yang [11], who showed a higher pig ICSI embryo development of TX group in comparison with the control group. In contrast with our work, in these latter papers, sperm injected oocytes were artificially activated with electrical pulses. If no additional oocyte activation treatment after ICSI was applied, sperm TX treatment did not improve blastocyst formation compared with the control group [11].

Morozumi *et al.* in 2006 developed an excellent discussion concerning the relationship between oocyte activation and sperm membrane disintegration. So, when an intact sperm is injected into the oocyte, sperm-borne oocyte-activating factor (SOAF) would not be exposed to the oocyte cytoplasm until the sperm plasma membrane is disintegrated [35]. The time required for sperm plasma membrane to dissolve in the oocyte after ICSI is not at all defined, since this factor could vary between mammalian species (membrane more or less resistant to lysolecithin) and individual oocytes [35]. Other work on somatic cell microinjection indicated that the greater part of the fluorescence stained membranes of the donor cells dissolved less than an hour after cell injection, although in some oocytes, the fluorescence stain was visible until 6 h [36]. In our work, we decided to maintain the sperm injected oocytes for 2 h in caffeine conditions to avoid a possible premature decrease of MPF activity. After bovine ICSI, either with or without an additional activation treatment, MPF activity decreased

apparently faster than IVF [37]. MPF activity decreased significantly to approximately 30% of the initial value of MII oocytes at 2 h after ICSI [37]. In mice, the extrusion of second polar body, as signal of oocyte activation, occurred approximately at 2-3 h after ICSI with intact membrane sperm [35, 38]. With porcine sperm, mouse oocyte activation (>80%) occurred approximately at 1.5 h after ICSI with demembrated sperm and at 3 h with untreated sperm [35]. In addition, when human sperm was treated with TX, injected oocytes resumed meiosis faster than non-treated sperm, but not with mouse sperm [34].

On one hand, Kawahara *et al.* suggested in their discussion that the influx of calcium ions inserted during the microinjection process could be avoided by performing manipulation in the Ca^{2+} ion-free medium [24]. In this way, we initially studied the effect of different micromanipulation media Ca^{2+} concentrations on oocyte activation after sham injection, but no differences were detected, even in PBS without calcium. It is possible that very low concentrations of Ca^{2+} in the medium are sufficient to activate oocytes. Moreover, no Ca^{2+} chelator was used in the manipulation medium, which consisted of PBS without calcium.

Kawahara *et al.* showed that cell microinjection significantly decreased p34^{cdc2} kinase activity and that this decrease was avoided adding 2.5 mM caffeine to medium [24]. In this way, in a recent porcine nuclear transfer study it was observed that oocytes treated for 2 h with caffeine after fusion maintained a significant high MPF activity in comparison with fused oocytes non-treated [39]. The level of H1K activity of matured oocytes would affect not only male pronuclear formation after sperm penetration but also subsequent early embryonic development [40]. Moreover, the sham injection process while ICSI is being performed is sufficient to activate pig oocytes, even developing up to blastocyst stage [17], in agreement with our results.

The effect of the presence of 5 mM caffeine on the manipulating and culture medium 2 h after sperm injection on pronuclear formation and embryo development was studied. No significant effect of caffeine was detected when sperm was not treated with TX. However, in the absence of membranes, caffeine was detrimental to oocyte activation and embryo development. It is possible that caffeine treatment maintained an elevated level of MPF activity for 2h after injection and this fact would negatively affect pronuclear formation of sperm with disintegrated membrane after TX treatment.

In the last experiment, we studied if the possible effect of caffeine could be affected by the intensity of oocyte activation expressed as different electric field strengths.

Caffeine had no effect on female pronuclear formation regardless of electric field strengths applied to the oocytes. No information about relationship between caffeine and voltage field strength was found. Concerning the differences observed in female pronuclear formation between the stimulus intensities, we would like to remark that in this case, the 0.6 kV/cm pulse setting was the most efficient on pronuclear formation, although the 1.2 kV/cm pulse setting has been used with excellent results in porcine blastocyst formation by other groups [41, 42] and in our laboratory [43, 44], even in comparison with other research groups [45]. In general, increasing pulse strength increased oocyte activation [46, 47]. More specifically, in porcine, an increase of field strength corresponded to an increase of mean of maximum levels of intracellular Ca^{2+} concentration [47]. In this sense, efficiency of cell transfection increased with field strength, but an excessive electrical stimulus could be detrimental in later cell viability [48]. It would be interesting to study embryo development after applying the lower field strength, but this was not the aim of the present work.

In conclusion, in our conditions sham injection can activate *in vitro* matured oocytes regardless of calcium concentration contained in micromanipulation medium. Moreover, TX sperm treatment before ICSI without an additional activation procedure improved male pronuclear formation, but did not improve embryo development until blastocyst stage. Moreover, no significant effects of caffeine were detected when sperm was not treated with TX, although in the absence of membrane caffeine prevented oocyte activation and embryo development. Finally, caffeine had no effect on female pronuclear formation regardless of electric field strengths applied to the parthenogenetic activation.

Acknowledgments

This work was partially supported by the Conselleria de Empresa, Universidad y Ciencia (GV05/212) and Educación (ACOMP/2009/072) of the Generalitat Valenciana as well as INIA (RTA2007-0110), FEDER and the Fondo Social Europeo. E. Garcia-Mengual and A. Cebrian-Serrano were supported by research grants from the Conselleria de Agricultura, Pesca y Alimentación. The authors would like to thank N. Macowan for revising the English version of this manuscript and the Mercavalencia abattoir for their assistance in obtaining porcine ovaries.

References

1. Niwa K. Effectiveness of *in vitro* maturation and *in vitro* fertilization techniques in pigs. *J Reprod Fertil Suppl* 1993; 48:49-59.
2. Wu J, Carrell D, Wilcox A. Development of *in vitro*-matured oocytes from porcine preantral follicles following intracytoplasmic sperm injection. *Biol Reprod* 2001; 65:1579-1585.
3. Lai L, Sun Q, Wu G, Murphy C, Kühholzer B, Park K, Bonk A, Day B, Prather R. Development of porcine embryos and offspring after intracytoplasmic sperm injection with liposome transfected or non-transfected sperm into *in vitro* matured oocytes. *Zygote* 2001; 9:339-346.
4. Coy P, Romar R. *In vitro* production of pig embryos: a point of view. *Reprod Fertil Dev* 2002; 14:275-286.
5. Kren R, Kikuchi K, Nakai M, Miyano T, Ogushi S, Nagai T, Suzuki S, Fulka J, Fulka J, Jr. Intracytoplasmic sperm injection in the pig: where is the problem? *J Reprod Dev* 2003; 49:271-273.
6. García-Roselló E, García-Mengual E, Coy P, Alfonso J, Silvestre M. Intracytoplasmic sperm injection in livestock species: an update. *Reprod Domest Anim* 2009; 44:143-151.
7. Lee J, Tian X, Yang X. 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* 2003; 68:1341-1347.
8. Katayama M, Koshida M, Miyake M. Fate of the acrosome in ooplasm in pigs after IVF and ICSI. *Human Reproduction* 2002; 17:2657-2664.
9. Kolbe T, Holtz W. Intracytoplasmic injection (ICSI) of *in vivo* or *in vitro* matured oocytes with fresh ejaculated or frozen-thawed epididymal spermatozoa and additional calcium-ionophore activation in the pig. *Theriogenology* 1999; 52:671-682.
10. Tian J, Wu Z, Liu L, Cai Y, Zeng S, Zhu S, Liu G, Li Y, Wu C. Effects of oocyte activation and sperm preparation on the development of porcine embryos derived from *in vitro*-matured oocytes and intracytoplasmic sperm injection. *Theriogenology* 2006; 66:439-448.
11. Lee J, Yang X. Factors affecting fertilization of porcine oocytes following intracytoplasmic injection of sperm. *Mol Reprod Dev* 2004; 68:96-102.

12. Perreault S, Barbee R, Elstein K, Zucker R, Keefer C. Interspecies differences in the stability of mammalian sperm nuclei assessed *in vivo* by sperm microinjection and *in vitro* by flow cytometry. *Biol Reprod* 1988; 39:157-167.
13. Rho G, Kawarsky S, Johnson W, Kochhar K, Betteridge K. Sperm and oocyte treatments to improve the formation of male and female pronuclei and subsequent development following intracytoplasmic sperm injection into bovine oocytes. *Biol Reprod* 1998; 59:918-924.
14. Suttner R, Zakhartchenko V, Stojkovic P, Müller S, Alberio R, Medjugorac I, Brem G, Wolf E, Stojkovic M. Intracytoplasmic sperm injection in bovine: effects of oocyte activation, sperm pretreatment and injection technique. *Theriogenology* 2000; 54:935-948.
15. Yong H, Hong J, Kang S, Lee B, Lee E, Hwang W. 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* 2005; 63:783-794.
16. Katayama M, Miyano T, Miyake M, Kato S. Progesterone treatment of boar spermatozoa improves male pronuclear formation after intracytoplasmic sperm injection into porcine oocytes. *Zygote* 2002; 10:95-104.
17. Yong H, Hong J, Pak S, Kang S, Lee B, Lee E, Hwang W. Effect of centrifugation and electrical activation on male pronucleus formation and embryonic development of porcine oocytes reconstructed with intracytoplasmic sperm injection. *Reprod Fertil Dev* 2005; 17:557-563.
18. García-Roselló E, Coy P, García Vázquez FA, Ruiz S, Matás C. Analysis of different factors influencing the intracytoplasmic sperm injection (ICSI) yield in pigs. *Theriogenology* 2006; 66:1857-1865.
19. Nakai M, Kashiwazaki N, Takizawa A, Hayashi Y, Nakatsukasa E, Fuchimoto D, Noguchi J, Kaneko H, Shino M, Kikuchi K. Viable piglets generated from porcine oocytes matured *in vitro* and fertilized by intracytoplasmic sperm head injection. *Biol Reprod* 2003; 68:1003-1008.
20. Kwon I, Park K, Niwa K. Activation, pronuclear formation, and development *in vitro* of pig oocytes following intracytoplasmic injection of freeze-dried spermatozoa. *Biol Reprod* 2004; 71:1430-1436.
21. Silvestre MA, Alfonso J, Garcia-Mengual E, Salvador I, Duque CC, Molina I. Effect of recombinant human follicle-stimulating hormone and luteinizing

- hormone on *in vitro* maturation of porcine oocytes evaluated by the subsequent *in vitro* development of embryos obtained by *in vitro* fertilization, intracytoplasmic sperm injection, or parthenogenetic activation. *Journal of Animal Science* 2007; 85:1156-1160.
22. Kim BK, Lee YJ, Cui XS, Kim NH. Chromatin and microtubule organisation in maturing and pre-activated porcine oocytes following intracytoplasmic sperm injection. *Zygote* 2002; 10:123-129.
 23. Abeydeera L, Niwa K, Okuda K. Maturation-promoting factor (MPF) is responsible for the transformation of sperm nuclei to metaphase chromosomes in maturing bovine oocytes *in vitro*. *J Reprod Fertil* 1993; 98:409-414.
 24. Kawahara M, Wakai T, Yamanaka K, Kobayashi J, Sugimura S, Shimizu T, Matsumoto H, Kim J, Sasada H, Sato E. Caffeine promotes premature chromosome condensation formation and *in vitro* development in porcine reconstructed embryos via a high level of maturation promoting factor activity during nuclear transfer. *Reproduction* 2005; 130:351-357.
 25. Kikuchi K, Ekwall H, Tienthai P, Kawai Y, Noguchi J, Kaneko H, Rodriguez-Martinez H. Morphological features of lipid droplet transition during porcine oocyte fertilisation and early embryonic development to blastocyst *in vivo* and *in vitro*. *Zygote* 2002; 10:355-366.
 26. Abeydeera L, Wang W, Cantley T, Rieke A, Murphy C, Prather R, Day B. Development and viability of pig oocytes matured in a protein-free medium containing epidermal growth factor. *Theriogenology* 2000; 54:787-797.
 27. Yoshioka K, Suzuki C, Tanaka A, Anas I, Iwamura S. Birth of piglets derived from porcine zygotes cultured in a chemically defined medium. *Biol Reprod* 2002; 66:112-119.
 28. Garcia-Rosello E, Matas C, Canovas S, Moreira PN, Gadea J, Coy P. Influence of sperm pretreatment on the efficiency of intracytoplasmic sperm injection in pigs. *Journal of Andrology* 2006; 27:268-275.
 29. Lai L, Prather RS. Production of cloned pigs by using somatic cells as donors. *Cloning Stem Cells* 2003; 5:233-241.
 30. Morozumi K, Yanagimachi R. Incorporation of the acrosome into the oocyte during intracytoplasmic sperm injection could be potentially hazardous to embryo development. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2005; 102:14209-14214.

31. Kuretake S, Kimura Y, Hoshi K, Yanagimachi R. Fertilization and development of mouse oocytes injected with isolated sperm heads. *Biol Reprod* 1996; 55:789-795.
32. Kimura Y, Yanagimachi R, Kuretake S, Bortkiewicz H, Perry A, Yanagimachi H. Analysis of mouse oocyte activation suggests the involvement of sperm perinuclear material. *Biol Reprod* 1998; 58:1407-1415.
33. Ajduk A, Yamauchi Y, Ward M. Sperm chromatin remodeling after intracytoplasmic sperm injection differs from that of *in vitro* fertilization. *Biol Reprod* 2006; 75:442-451.
34. Kasai T, Hoshi K, Yanagimachi R. Effect of sperm immobilisation and demembration on the oocyte activation rate in the mouse. *Zygote* 1999; 7:187-193.
35. Morozumi K, Shikano T, Miyazaki S, Yanagimachi R. Simultaneous removal of sperm plasma membrane and acrosome before intracytoplasmic sperm injection improves oocyte activation/embryonic development. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2006; 103:17661-17666.
36. Lee J, Wu S, Tian X, Barber M, Hoagland T, Riesen J, Lee K, Tu C, Cheng W, Yang X. Production of cloned pigs by whole-cell intracytoplasmic microinjection. *Biol Reprod* 2003; 69:995-1001.
37. Fujinami N, Hosoi Y, Kato H, Matsumoto K, Saeki K, Iritani A. Activation with ethanol improves embryo development of ICSI-derived oocytes by regulation of kinetics of MPF activity. *J Reprod Dev* 2004; 50:171-178.
38. Dozortsev D, Qian C, Ermilov A, Rybouchkin A, De Sutter P, Dhont M. Sperm-associated oocyte-activating factor is released from the spermatozoon within 30 minutes after injection as a result of the sperm-oocyte interaction. *Hum Reprod* 1997; 12:2792-2796.
39. You J, Lee J, Kim J, Park J, Lee E. Post-fusion treatment with MG132 increases transcription factor expression in somatic cell nuclear transfer embryos in pigs. *Mol Reprod Dev* 77:149-157.
40. Yamauchi N, Nagai T. Male pronuclear formation in denuded porcine oocytes after *in vitro* maturation in the presence of cysteamine. *Biology of Reproduction* 1999; 61:828-833.
41. Park KW, Lai L, Cheong HT, Im GS, Sun QY, Wu G, Day BN, Prather RS. Developmental potential of porcine nuclear transfer embryos derived from

- transgenic fetal fibroblasts infected with the gene for the green fluorescent protein: comparison of different fusion/activation conditions. *Biol Reprod* 2001; 65:1681-1685.
42. Naruse K, Quan YS, Kim BC, Lee JH, Park CS, Jin DI. Brief exposure to cycloheximide prior to electrical activation improves *in vitro* blastocyst development of porcine parthenogenetic and reconstructed embryos. *Theriogenology* 2007; 68:709-716.
 43. Garcia-Mengual E, Alfonso J, Salvador I, Duque CC, Silvestre MA. Oocyte activation procedures and influence of serum on porcine oocyte maturation and subsequent parthenogenetic and nuclear transfer embryo development. *Zygote* 2008; 16:279-284.
 44. Alfonso J, García-Rosello E, García-Mengual E, Salvador I, Silvestre MA. The use of R-roscovitine to fit the 'time frame' on *in vitro* porcine embryo production by intracytoplasmic sperm injection. *Zygote* 2009; 17:63-70.
 45. Cervera R, Silvestre M, Marti N, Garcia-Mengual E, Moreno R, Stojkovic M. Effects of Different Oocyte Activation Procedures on Development and Gene Expression of Porcine Pre-Implantation Embryos. *Reprod Domest Anim* 2009;
 46. Prochazka R, Kanka J, Sutovsky P, Fulka J, Motlik J. Development of pronuclei in pig oocytes activated by a single electric pulse. *J Reprod Fertil* 1992; 96:725-734.
 47. Sun FZ, Hoyland J, Huang X, Mason W, Moor RM. A comparison of intracellular changes in porcine eggs after fertilization and electroactivation. *Development* 1992; 115:947-956.
 48. Chang DC: Design of protocols for electroporation and electrofusion: selection of electrical parameters. In *Guide to electroporation and electrofusion* San Diego, USA: Academic Press; 1992: 429-456.

3. Male pronucleus formation after ICSI: effect of oocyte cysteine or sperm Triton X-100 treatments.

E. García-Mengual^{1, 3}, *M.A. Silvestre*^{1, 4}, *I Salvador*¹; *A. Cebrián-Serrano*^{1, 5}, *E. García-Roselló*²

¹Centre for Animal Technology Research, Instituto Valenciano de Investigaciones Agrarias, Segorbe, Spain

² Faculty of Veterinary Science, CEU-Cardenal Herrera University, Valencia, Spain

³ Reproductive Genetics Unit, Sistemas Genómicos S.L., Parque Tecnológico de Valencia, Paterna, Spain

⁴ Departament of Functional Biology and Physical Anthropology, University of Valencia, Valencia, Spain

⁵ Neurogenetics group, Center of Excellence Hearing4All, School of Medicine and Health Sciences, Carl von Ossietzky University Oldenburg, Germany

Este artículo ha sido publicado en la revista “Czech Journal of Animal Science”, 60, 2015 (6): 241–249. Copyright © 2015 Czech Academy of Agricultural Sciences. doi: 10.17221/8237-CJAS

Abstract

In pigs, intracytoplasmic sperm injection (ICSI) efficiency is still poor. The inadequate decondensation of the sperm chromatin, its transformation into male pronucleus (MPN) together with the subsequent inability to activate the oocyte, seems to be the main causes of the low ICSI efficiency. In order to improve the MPN formation we took two different approaches. On the one hand, the *in vitro* culture (IVC) medium post-ICSI was supplemented with 1.71 mM cysteine (CYS). Alternatively, the sperm membrane was digested with Triton X-100 (TX) before ICSI, to improve the exposure of the sperm chromatin to the oocyte cytoplasm. After 6 h post-ICSI, the activation rate was significantly higher in TX group (70.0%) compared with CYS and control groups (42.2% and 48.9%, respectively; $P < 0.05$). However, no significant differences between the three groups were observed in terms of number of pronuclei, 2PN (oocytes with 2 pronuclei and no visible sperm) and 1PN + sperm (oocytes with 1 pronucleus and one sperm head). At 22 h post-ICSI, the activation rates were similar in TX, CYS and control groups (73.1, 78.9 and 75.7%, respectively). In addition, we did not observe significant differences between TX, CYS and control groups for the number of pronuclei, 2PN (52.6, 56.7 and 50%, respectively) or 1PN+sperm (21.1, 33.3 and 32.1%, respectively). While no cleavage was observed in the CYS group, no significant differences in the cleavage rate were observed between control (21.3%) and TX (10.5%) groups.

In summary, and under our conditions, neither CYS supplement, nor sperm TX pre-treatment were able to improve MPN formation at 6 and 22 h post-ICSI. However, the sperm TX pre-treatment improved oocyte activation at 6 h post-ICSI, although such beneficial effect did not persist at 22 h.

Introduction

In porcine species, *in vitro* production (IVP) technologies have been widely applied and improved over the last four decades (Gruppen, 2014). The ability of porcine oocytes to adequately develop after *in vitro* maturation (IVM) and fertilization (IVF), leading to live piglets, has been largely demonstrated by several laboratories (Kikuchi et al., 2002; Yoshioka et al., 2002, 2003; Suzuki et al., 2004, 2006; Coy et al., 2005; García-Roselló et al., 2006a; Yong et al., 2006; Maehara et al., 2012; Kaneko et al., 2013). Despite this fact, the efficiency of *in vitro* production IVP of blastocysts after ICSI still remains low (García-Roselló et al., 2009). The frequently inadequate sperm chromatin decondensation and its transformation into the male pronucleus (MPN) together with a failure to activate the oocyte, seems to be the major causes behind the poor ICSI efficiency (Kren et al., 2003; Lee et al., 2003; Lee and Yang, 2004).

There are several oocyte and sperm factors as well as the conditions in which ICSI is performed, that could have a detrimental effect on the developmental ability of the resulting embryos (García-Roselló et al., 2006b; Alfonso et al., 2009; García-Mengual et al., 2011; Cheng et al., 2012b). Related to the oocyte factors, the cytoplasmic environment is crucial to ensure the decondensation of the sperm head and then the MPN formation (Nagai, 2001; Niemann and Rath, 2001). Therefore, having a proper IVM for pig oocytes may guarantee, not only nuclear, but also the cytoplasmic competence required for full-term development.

In this regard, several IVM approaches have been applied, such as oocyte co-culture with follicular cells (Zheng and Sirard, 1992; Ding and Foxcroft, 1994; Agung et al., 2010), or supplement addition to the IVM defined media with: porcine follicular fluid (Naito et al., 1988; Yoshida et al., 1992; Ka et al., 1997), follicular fluid meiosis-activating sterol (Faerge et al., 2006), bovine serum albumin (Zheng and Sirard, 1992), fetal bovine serum (Kishida et al., 2004), fetal calf serum (Naito et al., 1988), epidermal growth factor (EGF) (Ding and Foxcroft, 1994; Uhm et al., 2010), b-mercaptoethanol (Abeydeera et al., 1998), cysteine (CYS) (Yamauchi and Nagai, 1999; Yoshioka et al., 2003; Kobayashi et al., 2007; Choe et al., 2010), ascorbic acid (Tatemoto et al., 2001), leptin (Craig et al., 2005; Jin et al., 2009) or lycopene (Watanabe et al., 2010), among others.

Particularly interesting is the fact that the addition of CYS to IVM medium in pig oocytes results in increased glutathione (GSH, a derivative product of CYS) synthesis

by the pig oocyte (Yoshida et al., 1993), enhancing *in vitro* development after IVF (Grupen et al., 1995; Kishida et al., 2004). In addition, GSH synthesis during oocyte maturation is an important factor for promoting their ability to form a MPN after IVF (Yoshida et al., 1993; Sawai et al., 1997), and GSH is known to be a prerequisite to ensure sperm chromatin decondensation (Perreault et al., 1984). Accordingly, porcine IVM media has routinely been supplemented with CYS. However, and contrarily to what happens after IVF, MPN formation of porcine oocytes *in vitro* matured with CYS is not improved after ICSI. The persistence of an intact sperm acrosome, plasma membrane and perinuclear theca (Katayama et al., 2002a, 2005), which are normally removed during sperm penetration in IVF and natural fertilization (Yanagimachi, 1994), may be some of the factors causing an incorrect MPN formation in ICSI .

Regarding to embryo culture conditions, Katayama et al. (2007) observed improved fertilization rates after ICSI by increasing the CYS concentration in the *in vitro* culture (IVC) medium (up to 1.71mM, beyond the levels most commonly used concentration of 0.57 mM CYS (Yoshioka et al., 2002) (Petters and Wells, 1993)), for the first 3h to 12h post-ICSI. Therefore, our first efforts were focused on increasing the CYS levels in the IVC medium during the first 6 h post-ICSI.

Regarding to the strategies applied on the sperm to improve fertilization and embryo development rates after ICSI, several sperm pre-treatments have been tested to disrupt or even remove the plasma membrane and allow a more direct interaction with the oocyte cytoplasm. Amongst the mechanical pre-treatments, sonication (Kim et al., 1999) and repetitive freezing/thawing without cryoprotectants (Katayama et al., 2002b) have been reported to improve MPN formation after ICSI in porcine. With the same goal, chemical pre-treatments have also been tested, such as exposure to progesterone (Katayama et al., 2002b), incubation with Triton X-100 (TX) to induce membrane damage and dissolve nuclear proteins (Lee and Yang, 2004; Tian et al., 2006), or dithiothreitol treatment to reduce disulfide bonds (Yong et al., 2005; Cheng et al., 2009). Although in a previous work we observed an improvement in MPN formation after ICSI with TX pre-treated sperm (García-Mengual et al., 2011), the results on embryo *in vitro* development are controversial (Nakai et al., 2011). In particular, we observed an improvement in the MPN formation 18 h post-ICSI, however this effect was not observed on cleavage nor embryo development rates. Therefore in the present study we aim at deciphering the effects of sperm TX pre-treatment before ICSI on MPN formation, but this time assessing it at 6 and 22 h post-ICSI. We based our time to PN

formation assessing selection in a previous report (Jin et al., 2009), which assessed PN formation at 6 h post-ICSI and observed an acceleration in PN formation after leptin treatment. We then selected 22 h in order to ensure that all zygotes have had enough time to reach PN timing.

In summary, the present study was conducted to study the effect of CYS supplementation in the IVC medium post-ICSI on MPN formation. Alternatively, we also studied the effect of exposing the sperm chromatin to the oocyte cytoplasm by means of sperm membrane elimination with TX before ICSI.

Materials and Methods

In vitro maturation and embryo culture

Oocytes obtained by antral follicle puncture of ovaries collected from pre-pubertal gilts at local abattoir were IVM as described by Silvestre et al. (2007). Briefly, 50 to 60 cumulus oocyte complex (COCs) were cultured for 44 h in 500 μ L maturation medium (MM199) consisted of medium 199 (M4530) supplemented with 0.1% (w/v) polyvinyl alcohol (P8136), 0.57 mM CYS and 10 ng/mL EGF and antibiotics (all Sigma-Aldrich Quimica, Madrid, Spain) (Abeydeera et al., 2000), in a Nunc 4-well multidish (Nunc, Roskilde, Denmark). During the first 22 h, COCs were cultured in MM199 supplemented with hormones (0.1 IU/mL recombinant human FSH and LH (Naito et al., 1988); (Gonal-F and Luveris respectively, Serono, Madrid, Spain). After that, COCs were washed twice and cultured in hormone-free MM199 for an additional 22 h. After IVM and ICSI, embryos were cultured in porcine zygote medium-3 (PZM-3) (Yoshioka et al., 2002). Both oocyte IVM and zygote culturing took place in humidified atmosphere with 5% O₂ and 5% CO₂ at 38.5°C

Sperm pre-treatment

Sperm doses were supplied by a porcine artificial insemination center and stored at 17°C. Semen sample was washed with handling medium (HM199), consisted of medium 199 supplemented with 25 mM Hepes (M7528, Sigma-Aldrich Quimica, Madrid, Spain), supplemented with 7.4% (v/v) heat-inactivated foetal bovine serum (10108-157, GIBCO®, Life Technologies, Madrid, Spain) and antibiotics, and submitted to light centrifugation (50 g for 3 min). For TX sperm pre-treatment, the upper fraction of the semen was put aside and 0.1% TX (T8787, Sigma-Aldrich Quimica) was added (Tian et al., 2006; García-Mengual et al., 2011). Subsequently, the

semen with TX was vortexed and washed with HM199. Then, semen was centrifuged for 5 min and the resulting pellet was resuspended in HM199.

Intracytoplasmic sperm injection

ICSI was performed in an inverted microscope with attached micromanipulators as described by Alfonso et al. (2009). Briefly, metaphase II (MII) cumulus-denuded oocytes were distributed over 6 HM199 microdrops placed surrounding central drops containing spermatozoa in 10% polyvinylpyrrolidone solution, all covered with mineral oil (both Sigma-Aldrich Quimica). One single sperm was immobilized by rubbing the midpiece with the injection pipette and aspirated by the tail. Oocytes were fixed by the holding pipette so that the first polar body was set in 6 or 12 o'clock position. Prior to sperm injection, a small amount of ooplasm was aspirated into the injection pipette. Temperature was maintained at 38.5°C throughout all micromanipulation process using a heated microscopic stage.

Cysteine treatment

The presumptive zygotes were cultured in PZM-3 supplemented with 1.71 mM CYS (L-cysteine, Sigma-Aldrich Quimica) for the first 6 h of culture after sperm injection (Katayama et al., 2007).

Experimental design

After IVM, MII oocytes were randomly distributed into three experimental groups:

- CYS: oocytes were injected with control sperm (non pre-treated) and cultured in PZM-3 supplemented with CYS 1.71 mM for 6 h. Presumptive zygotes were then washed twice and cultured in PZM-3 until 22 h of culture.
- TX: oocytes were injected with TX pre-treated sperm, and cultured in PZM-3 until 22 h of culture.
- Control (C): oocytes were injected with control sperm and cultured in PZM-3 until 22 h of culture.

Assessment of nuclear maturation and pronuclear formation

After IVM, COCs were briefly incubated in HM199 supplemented with 1 mg/mL bovine testes hyaluronidase (H4272, Sigma-Aldrich Quimica) and then gently pipetted. Oocytes were evaluated under a stereomicroscope, and those with presence of the first polar body were classified as nuclearly matured oocytes. In order to assess the pronuclear formation, half of the cultured presumptive zygotes were fixed in absolute ethanol and stained with Hoechst 33342 (10 mg/mL in DPBS) (B2261,D8662; Sigma Aldrich Quimica) at 6 h post-ICSI, then mounted with glycerol on microscope slides.

The other half of the embryos remained in culture and was evaluated at 22 h post-ICSI. Pronuclei were scored under an epifluorescence microscope at 63x magnification.

Activation of injected oocytes was evaluated by the ability of the oocytes to resume meiosis, with no metaphase plate visible and with at least one pronucleus. The activated oocytes were classified into 4 groups based on our previous score (García-Mengual et al., 2011): 2PN -oocytes with 2 pronuclei and no visible sperm; Total 1PN + sperm - oocytes with 1 pronucleus and one sperm head (condensed or decondensed); Cleaved - 2-cell embryo stage; Others - oocytes with other nuclear structures as more than 2 pronuclei or non-analyzable oocytes.

Statistical analysis

Four replicates were performed per treatment. Activation and pronuclear formation rate were compared among the three groups using a Chi-square test analysis. Differences were considered statistically significant at $P < 0.05$. When a single degree of freedom was involved, the Yates' correction for continuity was carried out.

Results

The zygotes in TX group showed significantly higher activation rate after 6 h post-ICSI, (70.0%) than those treated with CYS and the control group (42.2% and 48.9%, respectively; $P < 0.05$, Table 1). However, no significant differences were observed in 2PN, and Total 1PN+sperm, nor 1PN + decondensed sperm rates between the three groups. Rates of 2PN from activated oocytes ranged from 13.6 to 21.4%, whereas Total 1PN+sperm rates varied from 60.7 to 81.8% and 1PN+decondensed sperm from 38.9 to 57.1% (Table 1).

When the activation rates were assessed at 22 h post-ICSI, the results were similar between all three groups (73.1, 78.9 and 75.7%, respectively, Table 2). In addition, we did not observe significant differences between TX, CYS and control groups for 2PN (52.6, 56.7 and 50%, respectively) nor for Total 1PN+sperm (21.1, 33.3 and 32.1%, respectively) and 1PN + decondensed sperm (50.0, 30.0 and 44.4 respectively, Table 2). The cleavage rate was not significantly different between control (21.3%) and TX (10.5%) groups, neither between TX and CYS groups. No cleaved embryos were observed in the CYS group. The cleavage rate in the control was higher than in the CYS group ($P < 0.05$, Table 2).

Table 1. Effect of cysteine oocyte treatment (CYS) and sperm Triton X-100 pre-treatment (TX) on pronuclear formation of sperm injected oocytes, assessed at 6 h post-intracytoplasmic sperm injection

Treatment	No. of injected oocytes	No. of activated oocytes ¹ (%)	Groups of activated oocytes (%) ¹				
			2PN	Total 1PN + Sperm	Decondensed Sperm ²	Cleaved	Others ³
TX	40	28 (70.0) ^a	6 (21.4)	17 (60.7)	8 (47.1)	0	5
CYS	45	19 (42.2) ^b	4 (21.1)	14 (73.7)	8 (57.1)	0	1
C	45	22 (48.9) ^b	3 (13.6)	18 (81.8)	7 (38.9)	0	1

2PN = oocytes with 2 pronuclei and no visible sperm, Total 1PN+sperm = oocytes with 1 pronucleus and 1 condensed or decondensed sperm head, Cleaved = 2-cell embryo stage, Others = oocytes with other nuclear structures as 2 pronuclei and one sperm, 3 pronuclei or no analysable oocytes

¹activated indicates oocytes resuming meiosis, with no metaphase plate visible and at least, with 1 pronucleus

²from Total 1PN + sperm (condensed + decondensed)

³data were not statistically analysed

^{a,b} values with different superscript on the same column are significantly different (chi square P<0.05)

Table 2. Effect of cysteine oocyte treatment (CYS) and sperm Triton X-100 pre-treatment (TX) on pronuclear formation of sperm injected oocytes, assessed at 22 h post-intracytoplasmic sperm injection

Treatment	No. of injected oocytes	No. of activated oocytes ¹ (%)	Groups of activated oocytes (%) ¹				
			2PN	Total 1PN + Sperm	Decondensed Sperm ²	Cleaved	Others ³
TX	26	19 (73.1)	10 (52.6)	4 (21.1)	2 (50.0)	2 (10.5) ^{ab}	3
CYS	38	30 (78.9)	17 (56.7)	10 (33.3)	3 (30.0)	0 (0) ^a	3
C	37	28 (75.7)	14 (50.0)	9 (32.1)	4 (44.4)	6 (21.3) ^b	2

2PN = oocytes with 2 pronuclei and no visible sperm, Total 1PN+sperm = oocytes with 1 pronucleus and 1 condensed or decondensed sperm head, Cleaved = 2-cell embryo stage, Others = oocytes with other nuclear structures as 2 pronuclei and one sperm, 3 pronuclei or no analysable oocytes

¹activated indicates oocytes resuming meiosis, with no metaphase plate visible and at least, with 1 pronucleus

²from Total 1PN + sperm (condensed + decondensed)

³data were not statistically analysed

^{a,b} values with different superscript on the same column are significantly different (chi square P<0.05)

Discussion

The developmental competence of zygotes generated by the ICSI technique in pigs is still low (García-Roselló et al., 2009). Specifically, the failure in MPN formation has been proposed as the main reason behind the low ICSI efficiency (Lee et al., 2003). Related to this, it has been suggested that the GSH may play an important role in fertilization but also in embryonic development (Maedomari et al., 2007). It is speculated that the GSH may exert a promoting effect on MPN formation by acting synergistically in the following ways: GSH promotes the disruption of the disulfide bond of the protamine in the sperm chromatin by shifting the oocyte cytoplasm into a redox state; and/or the GSH acts as a substrate of glutathione peroxidase and as a scavenger of free radicals in oocytes, enhancing their competence as a whole (Nagai, 1996). Also CYS is a critical amino acid of GSH, and which availability is crucial to ensure GSH synthesis (Meister and Tate, 1976).

Unfortunately, under our culture conditions, we observed that the addition of CYS did not significantly increase MPN formation as assessed neither at 6 h nor at 22 h post-ICSI. In a previous similar experiment, Katayama et al. (2007) hypothesized that the disassembly of the sperm plasma membrane in the ooplasm may be promoted by maintaining high levels of GSH in ooplasm, and this could be achieved by increasing the CYS supplement in the IVC medium. Despite they reported that the supplement of CYS in culture medium did not affect the intracellular levels of GSH in cumulus-free matured oocytes after the ICSI, they observed improved fertilization rates after *in vitro* culture of ICSI derived zygotes in 1.71 and 3.71 mM CYS for 3 to 12 h. In this sense, Li et al. (2014) observed significantly higher rates of cleavage (80.7%) and blastocyst formation (22.5%) in culture medium supplemented with 1.71 mM CYS than in other CYS-supplemented groups. Katayama et al., 2007 suggested that these improvements may be the result of better utilization of GSH by CYS-treated ICSI zygotes, which was consistent with improved MPN development as they could consume much of the ooplasmic GSH after fertilization. The discrepancy between our study and Katayama et al. (2007) in 2PN rate could lie in some technical details: while IVM medium and conditions were the same in both studies, and the IVC medium was supplemented with the same amount of CYS, 1.71 mM, we used PZM-3 (which also includes antioxidants (e.g. taurine and hypotaurine; Petters and Wells, 1993)). Also, the benefits induced by CYS reported by Katayama et al. (2007) may have been conditioned by combining CYS

with the use of piezo pulses for sperm-immobilization to disrupt the sperm plasma membrane, which it is known to improve the fertilization rates and the decondensation of the sperm chromatin after ICSI (Katayama et al., 2005). In our study, we have to highlight that we tested the CYS supplement alone, without any other sperm membrane disruptor than the sperm mid-piece rubbing step during ICSI (García-Mengual et al., 2011).

Triton X-100 is an anionic detergent widely applied to disrupt and remove the sperm membrane prior to ICSI with the purpose to expose the naked sperm chromatin to the oocyte cytoplasm and promote the MPN formation (Lee and Yang, 2004; Tian et al., 2006; García-Mengual et al., 2011). However our attempt to assist the sperm chromatin decondensation, by disrupting or even removing the sperm membrane using TX pre-treatment, did not result in a significant improvement in MPN formation. The significantly higher activation rate observed at 6 h post-ICSI in TX group suggests a “faster” oocyte activation and MPN formation. However this result did not translate in significantly higher *2PN* rate, nor *Total IPN+sperm* rate, nor *IPN+decondensed sperm* rate. When we assessed the activation rates at 22 h post-ICSI, TX and control groups showed similar results. On the other hand, the control group showed the highest cleavage rate, and this was similar to TX group and higher than CYS group. In bovine, the timing of the first cleavage is crucial to ensure further *in vitro* embryo development, giving the embryos that cleaved earlier more chance to reach blastocyst stage (Lonergan et al., 1999). In our previous experience (García-Mengual et al., 2011) when MPN formation was assessed at 18 h post-ICSI, oocytes injected with TX pre-treated sperm showed a significantly higher rate of MPN formation than the controls while no differences on *in vitro* embryo development, cleavage or blastocyst rates were observed. However, several reports showed that TX treatment did not improve *2PN* formation, nor embryo development (Szczygiel, 2002; Tian et al., 2006; Nakai et al., 2011). In this sense, (Parrilla et al., 2012) showed that ejaculate spermatozoa from individual boars can respond in a boar-dependent manner to different semen-processing techniques. It could be then hypothesized that different qualitative characteristics, such as DNA fragmentation index (López-Fernández et al., 2008) of sperm samples, could be compromising the TX pre-treatment reproducibility within different boar samples and could be the basis of the different fertilization rates obtained from different males, since DNA fragmentation in boar sperm has been correlated with poor fertility outcomes (Boe-Hansen et al., 2008; Didion et al., 2009).

Moreover, it should be interesting to study in further experiments the effect of this TX treatment in later embryo development stages.

In summary, in our conditions, neither the CYS supplementation on IVC medium, nor the sperm TX pre-treatment before ICSI improved MPN formation when assessed at 6 and 22 h post-ICSI. However, the sperm TX pre-treatment improved oocyte activation when assessed at 6 h post-ICSI, which could suggest different activation timing.

Acknowledgments

This work was partially supported by the INIA (RTA2007-0110) and Conselleria de Educació of the Generalitat Valenciana (ACOMP/2009/072) as well as, FEDER and The European Social Fund. A. Cebrián-Serrano was supported by a research grant from the Conselleria de Agricultura, Pesca y Alimentación. M.A. Silvestre was supported by funds from INIA-CCAA, Subprograma Ramón y Cajal (RYC-2011-08750) and the European Social Fund. The authors would like to thank Rita P. Cervera for the revision of the manuscript, the company Mercavalencia for their assistance in obtaining porcine ovaries, and Semen Cardona for the porcine sperm supply.

References

Abeydeera L.R., Wang W.H., Cantley T.C., Prather R.S., Day B.N. (1998): Presence of beta-mercaptoethanol can increase the glutathione content of pig oocytes matured *in vitro* and the rate of blastocyst development after *in vitro* fertilization. *Theriogenology*, 50, 747–756.

Abeydeera L.R., Wang W.H., Cantley T.C., Rieke A., Murphy C.N., Prather R.S., Day B.N. (2000): Development and viability of pig oocytes matured in a protein-free medium containing epidermal growth factor. *Theriogenology*, 54, 787–797.

Agung B., Piao Y., Fuchimoto D., Senbon S., Onishi A., Otoi T., Nagai T. (2010): Effects of oxygen tension and follicle cells on maturation and fertilization of porcine oocytes during *in vitro* culture in follicular fluid. *Theriogenology*, 73, 893–899.

Alfonso J., Garcia-Rosello E., Garcia-Mengual E., Salvador I., Silvestre M.A. (2009): The use of R-roscovitine to fit the “time frame” on *in vitro* porcine embryo production by intracytoplasmic sperm injection. *Zygote*, 17, 63–70.

Boe-Hansen G.B., Christensen P., Vibjerg D., Nielsen M.B.F., Hedeboe A.M. (2008): Sperm chromatin structure integrity in liquid stored boar semen and its relationships with field fertility. *Theriogenology*, 69, 728–736.

Cheng W.M., An L., Wu Z.H., Zhu Y.B., Liu J.H., Gao H.M., Li X.H., Zheng S.J., Chen D.B., Tian J.H. (2009): Effects of disulfide bond reducing agents on sperm chromatin structural integrity and developmental competence of *in vitro* matured oocytes after intracytoplasmic sperm injection in pigs. *Reproduction*, 137, 633–643.

Cheng W.M., Wu Z.H., Zhang X., Zhu Y.B., Pang Y.W., Guo M., Wang D., Tian J.-H. (2012): Effects of different activation regimens on pronuclear formation and developmental competence of *in vitro*-matured porcine oocytes after intracytoplasmic sperm injection. *Reproduction in Domestic Animals*, 47, 609–614.

Choe C., Shin Y.W., Kim E.J., Cho S.R., Kim H.J., Choi S.H., Han M.H., Han J., Son D.S., Kang D. (2010): Synergistic effects of glutathione and β -mercaptoethanol treatment during *in vitro* maturation of porcine oocytes on early embryonic development in a culture system supplemented with L-cysteine. *The Journal of Reproduction and Development*, 56, 575–582.

Coy P., Romar R., Ruiz S., Canovas S., Gadea J., Garcia Vazquez F. Matas C. (2005): Birth of piglets after transferring of *in vitro*-produced embryos pre-matured with R-roscovitine. *Reproduction*, 129, 747–755.

Craig J. a, Zhu H., Dyce P.W., Wen L., Li J. (2005): Leptin enhances porcine preimplantation embryo development *in vitro*. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 229, 141–147.

Didion B. a, Kasperson K.M., Wixon R.L., Evenson D.P. (2009): Boar fertility and sperm chromatin structure status: a retrospective report. *Journal of Andrology*, 30, 655–660.

Ding J., Foxcroft G.R. (1994): Epidermal growth factor enhances oocyte maturation in pigs. *Molecular Reproduction and Development*, 39, 30–40.

Faerge I., Strejcek F., Laurincik J., Rath D., Niemann H., Schellander K., Rosenkranz C., Hyttel P.M., Grøndahl C. (2006): The effect of FF-MAS on porcine cumulus-oocyte complex maturation, fertilization and pronucleus formation *in vitro*. *Zygote*, 14, 189–199.

Garcia-Mengual E., Garcia-Rosello E., Alfonso J., Salvador I., Cebrian-Serrano A., Silvestre M.A. (2011): Viability of ICSI oocytes after caffeine treatment and sperm membrane removal with Triton X-100 in pigs. *Theriogenology*, 76, 1658–1666.

Garcia-Rosello E., Matas C., Canovas S., Moreira P.N., Gadea J., Coy P. (2006a): Influence of sperm pretreatment on the efficiency of intracytoplasmic sperm injection in pigs. *Journal of Andrology*, 27, 268–275.

Garcia-Rosello E., Coy P., Garcia Vazquez F.A., Ruiz S., Matas C. (2006b): Analysis of different factors influencing the intracytoplasmic sperm injection (ICSI) yield in pigs. *Theriogenology*, 66, 1857–1865.

Garcia-Rosello E., Garcia-Mengual E., Coy P., Alfonso J., Silvestre M.A. (2009): Intracytoplasmic sperm injection in livestock species: an update. *Reproduction in Domestic Animals*, 44, 143–151.

Gruppen C.G. (2014): The evolution of porcine embryo *in vitro* production. *Theriogenology*, 81, 24–37.

Gruppen C.G., Nagashima H., Nottle M.B. (1995): Cysteamine enhances *in vitro* development of porcine oocytes matured and fertilized *in vitro*. *Biology of Reproduction*, 53, 173–178.

Jin Y.X., Cui X.S., Han Y.J., Kim N.H. (2009): Leptin accelerates pronuclear formation following intracytoplasmic sperm injection of porcine oocytes: Possible role for MAP kinase inactivation. *Animal Reproduction Science*, 115, 137–148.

Ka H.H., Sawai K., Wang W.H., Im K.S., Niwa K. (1997): Amino acids in maturation medium and presence of cumulus cells at fertilization promote male pronuclear formation in porcine oocytes matured and penetrated *in vitro*. *Biology of Reproduction*, 57, 1478–1483.

Kaneko H., Kikuchi K., Nakai M., Somfai T., Noguchi J., Tanihara F., Ito J., Kashiwazaki N. (2013): Generation of live piglets for the first time using sperm retrieved from immature testicular tissue cryopreserved and grafted into nude mice. *PloS One*, 8, e70989.

Katayama M., Koshida M., Miyake M. (2002a): Fate of the acrosome in ooplasm in pigs after IVF and ICSI. *Human Reproduction*, 17, 2657–2664.

Katayama M., Miyano T., Miyake M., Kato S. (2002b): Progesterone treatment of boar spermatozoa improves male pronuclear formation after intracytoplasmic sperm injection into porcine oocytes. *Zygote*, 10, 95–104.

Katayama M., Sutovsky P., Yang B.S., Cantley T., Rieke A., Farwell R., Oko R., Day B.N. (2005): Increased disruption of sperm plasma membrane at sperm immobilization promotes dissociation of perinuclear theca from sperm chromatin after intracytoplasmic sperm injection in pigs. *Reproduction*, 130, 907–916.

Katayama M., Rieke A., Cantley T., Murphy C., Dowell L., Sutovsky P., Day B.N. (2007): Improved fertilization and embryo development resulting in birth of live piglets after intracytoplasmic sperm injection and *in vitro* culture in a cysteine-supplemented medium. *Theriogenology*, 67, 835–847.

Kikuchi K., Onishi A., Kashiwazaki N., Iwamoto M., Noguchi J., Kaneko H., Akita T., Nagai T. (2002): Successful piglet production after transfer of blastocysts produced by a modified *in vitro* system. *Biology of Reproduction*, 66, 1033–1041.

Kim N.H., Jun S.H., Do J.T., Uhm S.J., Lee H.T., Chung K.S. (1999): Intracytoplasmic injection of porcine, bovine, mouse, or human spermatozoon into porcine oocytes. *Molecular Reproduction and Development*, 53, 84–91.

Kishida R., Lee E.S., Fukui Y. (2004): *In vitro* maturation of porcine oocytes using a defined medium and developmental capacity after intracytoplasmic sperm injection. *Theriogenology*, 62, 1663–1676.

Kobayashi M., Asakuma S., Fukui Y. (2007): Blastocyst production by *in vitro* maturation and development of porcine oocytes in defined media following intracytoplasmic sperm injection. *Zygote*, 15, 93–102.

Kren R., Kikuchi K., Nakai M., Miyano T., Ogushi S., Nagai T., Suzuki S., Fulka J. (2003): Intracytoplasmic sperm injection in the pig: where is the problem? *The Journal of Reproduction and Development*, 49, 271–273.

Lee J.W., Yang X. (2004): Factors affecting fertilization of porcine oocytes following intracytoplasmic injection of sperm. *Molecular Reproduction and Development*, 68, 96–102.

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. *Biology of Reproduction*, 68, 1341–1347.

Li X.X., Lee K.B., Lee J.H., Kim K.J., Kim E.Y., Han K.W., Park K.S., Yu J., Kim M.K. (2014): Glutathione and cysteine enhance porcine preimplantation embryo development *in vitro* after intracytoplasmic sperm injection. *Theriogenology*, 81, 309–314.

Lonergan P., Khatir H., Piumi F., Rieger D., Humblot P., Boland M.P. (1999): Effect of time interval from insemination to first cleavage on the developmental characteristics, sex ratio and pregnancy rate after transfer of bovine embryos. *Journal of Reproduction and Fertility*, 117, 159–167.

Lopez-Fernandez C., Perez-Llano B., Garcia-Casado P., Sala R., Gosalbez a, Arroyo F., Fernandez J.L., Gosalvez J. (2008): Sperm DNA fragmentation in a random simple of the Spanish boar livestock. *Animal Reproduction Science*, 103, 87–98.

Maedomari N., Kikuchi K., Ozawa M., Noguchi J., Kaneko H., Ohnuma K., Nakai M., Shino M., Nagai T., Kashiwazaki N. (2007): Cytoplasmic glutathione regulated by cumulus cells during porcine oocyte maturation affects fertilization and embryonic development *in vitro*. *Theriogenology*, 67, 983–993.

Maehara M., Matsunari H., Honda K., Nakano K., Takeuchi Y., Kanai T., Matsuda T., Matsumura Y., Hagiwara Y., Sasayama N. et al. (2012): Hollow fiber vitrification provides a novel method for cryopreserving *in vitro* maturation/fertilization-derived porcine embryos. *Biology of Reproduction*, 87, 133.

Meister A., Tate S.S. (1976): Glutathione and related gamma-glutamyl compounds: biosynthesis and utilization. *Annual Review of Biochemistry*, 45, 559–604.

Nagai T. (1996): *In vitro* maturation and fertilization of pig oocytes. *Animal Reproduction Science*, 42, 153–163.

Nagai T. (2001): The improvement of *in vitro* maturation systems for bovine and porcine oocytes. *Theriogenology*, 55, 1291–1301.

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., Ito J., Sato K.-I., Noguchi J., Kaneko H., Kashiwazaki N., Kikuchi K. (2011): Pre-treatment of sperm reduces success of ICSI in the pig. *Reproduction*, 142, 285–293.

Niemann H., Rath D. (2001): Progress in reproductive biotechnology in swine. *Theriogenology*, 56, 1291–1304.

Parrilla I., del Olmo D., Sijes L., Martinez-Alborcia M.J., Cuello C., Vazquez J.M., Martinez E.A., Roca J. (2012): Differences in the ability of spermatozoa from individual boar ejaculates to withstand different semen-processing techniques. *Animal Reproduction Science*, 132, 66–73.

Perreault S.D., Wolff R.A., Zirkin B.R. (1984): The role of disulfide bond reduction during mammalian sperm nuclear decondensation *in vivo*. *Developmental Biology*, 101, 160–167.

Petters R.M., Wells K.D. (1993): Culture of pig embryos. *Journal of Reproduction and Fertility. Supplement*, 48, 61–73.

Sawai K., Funahashi H., Niwa K. (1997): Stage-specific requirement of cysteine during *in vitro* maturation of porcine oocytes for glutathione synthesis associated with male pronuclear formation. *Biology of Reproduction*, 57, 1–6.

Silvestre M.A., Alfonso J., Garcia-Mengual E., Salvador I., Duque C.C., Molina I. (2007): Effect of recombinant human follicle-stimulating hormone and luteinizing hormone on *in vitro* maturation of porcine oocytes evaluated by the subsequent *in vitro* development of embryos obtained by *in vitro* fertilization, intracytoplasmic sperm injection, or. *Journal of Animal Science*, 85, 1156–1160.

Suzuki C., Iwamura S., Yoshioka K. (2004): Birth of piglets through the nonsurgical transfer of blastocysts produced *in vitro*. *The Journal of Reproduction and Development*, 50, 487–491.

Suzuki M., Misumi K., Ozawa M., Noguchi J., Kaneko H., Ohnuma K., Fuchimoto D., Onishi A., Iwamoto M., Saito N. et al. (2006): Successful piglet production by IVF of oocytes matured *in vitro* using NCSU-37 supplemented with fetal bovine serum. *Theriogenology*, 65, 374–386.

Szczygiel M. A. (2002): Combination of Dithiothreitol and Detergent Treatment of Spermatozoa Causes Paternal Chromosomal Damage. *Biology of Reproduction*, 67, 1532–1537.

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.

Tian J.H., Wu Z.H., Liu L., Cai Y., Zeng S.M., Zhu S.E., Liu G.S., Li Y., Wu C.X. (2006): Effects of oocyte activation and sperm preparation on the development of porcine embryos derived from *in vitro*-matured oocytes and intracytoplasmic sperm injection. *Theriogenology*, 66, 439–448.

Uhm S.J., Gupta M.K., Yang J.H., Chung H.-J., Min T.S., Lee H.T. (2010): Epidermal growth factor can be used in lieu of follicle-stimulating hormone for nuclear maturation of porcine oocytes *in vitro*. *Theriogenology*, 73, 1024–1036.

Watanabe H., Okawara S., Bhuiyan M., Fukui Y. (2010): Effect of lycopene on cytoplasmic maturation of porcine oocytes *in vitro*. *Reproduction in Domestic Animals*, 45, 838–845.

Yamauchi N., Nagai T. (1999): Male pronuclear formation in denuded porcine oocytes after *in vitro* maturation in the presence of cysteamine. *Biology of Reproduction*, 61, 828–833.

Yanagimachi R. (1994): Fertility of mammalian spermatozoa: its development and relativity. *Zygote*, 2, 371–372.

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.

Yong H.Y., Hao Y., Lai L., Li R., Murphy C.N., Rieke A., Wax D., Samuel M., Prather R.S. (2006): Production of a transgenic piglet by a sperm injection technique in which no chemical or physical treatments were used for oocytes or sperm. *Molecular Reproduction and Development*, 73, 595–599.

Yoshida M., Ishigaki K., Pursel V.G. (1992): Effect of maturation media on male pronucleus formation in pig oocytes matured *in vitro*. *Molecular Reproduction and Development*, 31, 68–71.

Yoshida M., Ishigaki K., Nagai T., Chikyu M., Pursel V.G. (1993): Glutathione concentration during maturation and after fertilization in pig oocytes: relevance to the ability of oocytes to form male pronucleus. *Biology of Reproduction*, 49, 89–94.

Yoshioka K., Suzuki C., Tanaka A., Anas I.M.K., Iwamura S. (2002): Birth of piglets derived from porcine zygotes cultured in a chemically defined medium. *Biology of Reproduction*, 66, 112–119.

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.

Zheng Y.S., Sirard M.A. (1992): The effect of sera, bovine serum albumin and follicular cells on *in vitro* maturation and fertilization of porcine oocytes. *Theriogenology*, 37, 779–790

DISCUSIÓN GENERAL

La activación de los oocitos MII es uno de los puntos críticos en la mejora de la SCNT en la especie porcina. Durante las últimas décadas el proceso de fecundación ha sido cuidadosamente estudiado y los conocimientos adquiridos han permitido el desarrollo de múltiples protocolos de activación artificial, que tratan de mimetizar los acontecimientos iniciados por el espermatozoide sin la necesidad de que este último intervenga. La mayoría de ellos se basan en la utilización de estímulos inductores del incremento del Ca^{2+} intracelular, que pueden ser mecánicos, químicos, eléctricos, o una combinación de éstos, que desencadenan una reducción inicial en los niveles de factor promotor de la maduración (MPF). Sin embargo, esta reducción suele ser temporal e insuficiente para conseguir la activación completa del oocito. Cuando la activación artificial está basada en un solo estímulo, es posible que una restauración demasiado rápida de la actividad del MPF devuelva al oocito al arresto en MII. Para evitarlo, se puede inducir la inhibición de la actividad de la proteína quinasa (PKA) mediante un tratamiento con 6-dimetilaminopurina (6-DMAP), que asegura el mantenimiento de la reducción de los niveles de MPF hasta la activación completa. En este sentido, nuestro primer experimento no mostró ninguna mejora tras el tratamiento con 6-DMAP, ni en el desarrollo, ni en la calidad (número de células/blastocisto) de los embriones partenogenotas producidos mediante un protocolo de activación eléctrica; por lo que decidimos continuar la segunda parte del primer experimento ciñéndonos a la utilización de un protocolo de activación eléctrica sin tratamiento posterior con 6-DMAP, agilizando de esta manera el trabajo de laboratorio. En esta misma línea, en un trabajo posterior pudimos comprobar que el tratamiento con 6-DMAP, independientemente del estímulo eléctrico previamente utilizado para la activación, resultó en la sobre-expresión del gen *Oct4* en el estadio blastocisto (Cervera et al., 2010), hecho que a su vez se había relacionado anteriormente con la diferenciación prematura en endodermo y mesodermo primitivo (Nichols et al., 1998; Niwa et al., 2000).

La MIV oocitaria es igualmente crucial para el posterior desarrollo de los embriones de porcino generados mediante SCNT. El oocito receptor contiene una serie de compuestos citoplasmáticos acumulados durante la maduración que están involucrados en la reprogramación del núcleo donado en el proceso de SCNT. Si bien es cierto que la MIV se ha llevado a cabo con éxito a nivel nuclear, los procedimientos estándar resultan ser bastante menos eficientes a nivel citoplasmático. Esto nos llevó a estudiar, en la segunda parte del Experimento 1, el efecto de un suplemento de suero en el medio de MIV, constatando en primer lugar que éste redujo significativamente la tasa de maduración nuclear. En segundo lugar, el efecto del suplemento de suero en el medio de MIV sobre el desarrollo embrionario resultó ser diferente en función del tipo de embrión (partenogenota o SCNT). En el caso de los embriones partenogenotas producidos mediante activación eléctrica el suplemento de suero tuvo un efecto perjudicial sobre la tasa de división, si bien este efecto no se observó una vez los embriones alcanzaron el estadio de blastocisto. Sin embargo, en los embriones procedentes de SCNT no se detectó ningún efecto del suplemento de

suero en la tasa de división ni en la de blastocistos, a pesar de que los blastocistos obtenidos en el grupo suplementado con suero presentaron un número de núcleos significativamente mayor que los procedentes del grupo control. En cuanto a los suplementos proteicos del medio de MIV, Mastromonaco y colaboradores (2004) observaron requerimientos diferentes para el desarrollo de embriones de vacuno en función de su origen (FIV o TN). Por otra parte la variabilidad existente entre los diferentes estudios publicados en torno a esta cuestión hace pensar que pueda deberse también en parte a las diferencias existentes entre diferentes lotes de suero que podrían afectar tanto a la expansión de las células del cúmulo como a la maduración oocitaria (Suzuki et al., 2006).

En el caso de la ICSI en porcino, si bien representa una alternativa a los problemas de polispermia de la FIV, muestra ciertas limitaciones a nivel de la activación oocitaria, la descondensación de la cromatina espermática y la formación del PN masculino, que comprometen el desarrollo embrionario posterior. Con el fin de profundizar en el estudio y la posible mejora de estos aspectos se llevaron a cabo los Experimentos 2 y 3.

Durante la ICSI el simple flujo de Ca^{2+} generado durante la inyección del espermatozoide y quizás la propia acción mecánica podría ser suficiente para activar el oocito. Sin embargo, cuando un espermatozoide intacto es inyectado en el oocito, el núcleo espermático no queda expuesto a la acción del citoplasma del oocito hasta que su membrana plasmática se desintegra. El tiempo necesario para que esto suceda no está bien establecido y puede variar entre especies de mamíferos (membranas más o menos resistentes a la liolecitina) y entre oocitos (dependiendo del grado de maduración citoplasmática).

Por ello en el Experimento 2, en primer lugar y para descartar esta posible pre-activación oocitaria, estudiamos el efecto de diferentes concentraciones de Ca^{2+} en el medio de micromanipulación sobre la activación de oocitos microinyectados sin espermatozoide. No detectamos diferencias significativas en ninguno de los grupos micromanipulados, ni siquiera en relación con el grupo PBS sin Ca^{2+} . Al no utilizar un quelante en el medio no podemos garantizar que este medio a base de PBS sin Ca^{2+} no presentase trazas de Ca^{2+} . Consecuentemente, el hecho de que una concentración mínima de Ca^{2+} en el medio sea capaz de activar al oocito explicaría los resultados obtenidos.

Por otra parte, para sincronizar en la medida de lo posible la exposición del núcleo espermático al citoplasma con la activación inducida durante la ICSI, se valoró el efecto de un pre-tratamiento con TX con el que pretendíamos liberar al núcleo espermático del acrosoma y la membrana espermática antes de la ICSI, facilitando así la exposición del núcleo espermático a los factores responsables de la activación y promotores de la formación del PN masculino presentes en el citoplasma oocitario. En el presente trabajo, si bien el pre-tratamiento espermático con TX mejoró las tasas de formación del PN masculino (valorado a las 18h pos-ICSI), no consiguió mejorar la tasa de

desarrollo embrionario hasta estadio blastocisto. En este sentido, Lee y Yang (2004) han descrito mejoras también en la tasa de formación de blastocisto, aunque cabe destacar que estas mejoras se observaron únicamente al someter a los oocitos a un protocolo de activación eléctrica adicional tras la microinyección.

Además, con el fin de evitar un posible descenso prematuro de la actividad MPF tras la ICSI, y dejar así un mayor margen de tiempo para la desintegración de la membrana espermática y la formación del PN masculino, decidimos microinyectar y mantener los oocitos durante 2h en un medio de cultivo suplementado con 5 mM de cafeína. Tras la microinyección de espermatozoides intactos no se observó efecto significativo del tratamiento con cafeína. Sin embargo, al microinyectar espermatozoides pre-tratados con TX, la cafeína resultó ser perjudicial para la activación oocitaria y el desarrollo embrionario. Es posible que el tratamiento con cafeína mantuviera un elevado nivel de la actividad MPF durante 2h después de la inyección, afectando negativamente a la formación PN de espermatozoides desprovistos de membrana una vez sometidos al pre-tratamiento con TX.

Finalmente estudiamos si el efecto de la cafeína podía verse modificado por la intensidad de la activación oocitaria exógena. En este sentido no se halló ninguna relación entre la cafeína y la intensidad de la activación en cuanto a la formación del PN femenino, independientemente del pulso eléctrico utilizado para la activación partenogenota.

Por último en nuestro tercer experimento, con el fin de profundizar en el estudio del problema de la formación del PN masculino, valoramos su formación a diferentes tiempos pos-ICSI (6 y 22h) y tras 2 tratamientos diferentes: i) un pre-tratamiento espermático con TX, o ii) suplementando el medio con cisteína, un precursor del glutatión del que se ha sugerido que ejerce un efecto promotor de la formación del PN masculino (Nagai, 1996). En un experimento similar, Katayama et al., (2007) observaron que el suplemento de cisteína mostraba mejores tasas de división. Bajo nuestras condiciones de cultivo no observamos ningún beneficio del suplemento de cisteína en la formación pronuclear. Las discrepancias entre nuestros resultados y los de Katayama y colaboradores (2007) podrían residir en algunos detalles técnicos ya que a pesar de que los medios de MIV y las condiciones del suplemento con cisteína fueron las mismas, los medios de cultivo in vitro fueron diferentes (el nuestro incluía antioxidantes), además cabe destacar que Katayama y colaboradores (2007) combinaron el tratamiento de cisteína con la aplicación de piezo pulsos eléctricos para la inmovilización espermática, mientras que en nuestro caso la inmovilización espermática se realizó de forma mecánica mediante un golpe en la cola con ayuda de la pipeta de ICSI.

En definitiva, en la especie porcina cada laboratorio trabaja con sus propios medios de cultivo y protocolos, no existe una estandarización de la metodología, algunos protocolos se consolidan y se estandariza su uso. Más adelante, a partir de ellos se prueban nuevos suplementos o

combinaciones y se consiguen algunas mejoras, pero a pesar de ello no siempre se implementan en todos los laboratorios lo que dificulta la comparación de resultados. Por otra parte, el efecto macho en la ICSI, podría justificar también la disparidad entre los resultados obtenidos en relación con el TX.

La recopilación y continuo desarrollo de tecnologías como las descritas en este trabajo contribuyen pues, a la formación de una sólida caja de herramientas, de la que podrán beneficiarse futuros trabajos de experimentación en la especie porcina.

CONCLUSIONES

CONCLUSIONES

Conclusiones del Experimento 1:

- El protocolo de activación eléctrica, seguido o no de un periodo de incubación en 6-DMAP resulta un protocolo eficiente de activación artificial para oocitos MII de porcino, en comparación con el protocolo de activación química basado en ionomicina y 6-DMAP.
- La adición de suero al medio de MIV disminuye la tasa de maduración nuclear, y no incrementa el desarrollo embrionario de los embriones partenogenotas, producidos mediante activación eléctrica, ni de aquellos producidos mediante transferencia nuclear.

Conclusiones del Experimento 2:

- La aspiración del citoplasma del oocito sin inyección espermática (sham injection) es capaz de activar oocitos madurados in vitro independientemente de la concentración de Ca^{2+} presente en el medio de micromanipulación.
- La concentración de Ca^{2+} en el medio de micromanipulación no influye en la tasa de división, ni en la de desarrollo de estos embriones partenogenotas.
- El pre-tratamiento espermático con TX, con o sin procedimiento de activación adicional pos-ICSI, aumenta la formación del PN masculino valorado a las 18h pos-ICSI, pero no incrementa el desarrollo embrionario hasta estadio de blastocisto.
- La adición de cafeína al medio de cultivo in vitro pos-ICSI no incrementa la formación pronuclear ni en el desarrollo embrionario posterior.
- La adición de cafeína al medio de cultivo in vitro pos-ICSI con espermatozoides pre-tratados con TX, reduce la activación oocitaria y el desarrollo embrionario.
- El tratamiento con cafeína no mejora la formación del PN de los embriones partenogenotas, independientemente de los pulsos eléctricos aplicados en el protocolo de activación.

Conclusiones del Experimento 3:

- El pre-tratamiento espermático con TX mejora la activación valorada a las 6h pos-ICSI, aunque este efecto beneficioso no se mantiene a las 22h pos-ICSI.
- La formación pronuclear no se vio incrementada por el pre-tratamiento espermático con TX ni por el tratamiento con cisteína, independientemente del momento de la evaluación estudiado.

BIBLIOGRAFÍA INTRODUCCIÓN Y DISCUSIÓN

Adams D.H., Kadner A., Chen R.H. and Farivar R.S. (2001): Human membrane cofactor protein (MCP, CD 46) protects transgenic pig hearts from hyperacute rejection in primates. *Xenotransplantation*, 8, 36–40.

Ahn K.S., Won J.Y., Park J.-K., Sorrell A.M., Heo S.Y., Kang J.H., Woo J.-S., Choi B.-H., Chang W.-K. and Shim H. (2010): Production of human CD59-transgenic pigs by embryonic germ cell nuclear transfer. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 400, 667–672.

Auchincloss H. and Sachs D.H. (1998): Xenogeneic transplantation. *Annual Review of Immunology*, 16, 433–470.

Bendixen E., Danielsen M., Larsen K. and Bendixen C. (2010): Advances in porcine genomics and proteomics—a toolbox for developing the pig as a model organism for molecular biomedical research. *Briefings in Functional Genomics and Proteomics*, 9, 208–219.

Bernstein A. and Breitman M. (1989): Genetic ablation in transgenic mice. *Molecular Biology & Medicine*, 6, 523–530.

Bleck G.T., White B.R., Miller D.J. and Wheeler M.B. (1998): Production of bovine alpha-lactalbumin in the milk of transgenic pigs. *Journal of Animal Science*, 76, 3072–3078.

Brackett B.G., Baranska W., Sawicki W. and Koprowski H. (1971): Uptake of heterologous genome by mammalian spermatozoa and its transfer to ova through fertilization. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 68, 353–357.

Celebi C., Guillaudoux T., Auvray P., Vallet-Erdtmann V. and Jégou B. (2003): The making of “transgenic spermatozoa”. *Biology of Reproduction*, 68, 1477–1483.

Cervera R.P., Silvestre M. a, Martí N., García-Mengual E., Moreno R. and Stojkovic M. (2010): Effects of different oocyte activation procedures on development and gene expression of porcine pre-implantation embryos. *Reproduction in Domestic Animals = Zuchthygiene*, 45, e12–e20.

Chan A.W., Homan E.J., Ballou L.U., Burns J.C. and Bremel R.D. (1998): Transgenic cattle produced by reverse-transcribed gene transfer in oocytes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 95, 14028–14033.

Cheng D., Li Z., Liu Y., Gao Y. and Wang H. (2012): Kinetic analysis of porcine fibroblast reprogramming toward pluripotency by defined factors. *Cellular Reprogramming*, 14, 312–323.

Cho B., Koo O.J., Hwang J.-I., Kim H., Lee E.M., Hurh S., Park S.J., Ro H., Yang J., Surh C.D. et al. (2011): Generation of soluble human tumor necrosis factor- α receptor 1-Fc transgenic pig. *Transplantation*, 92, 139–147.

Choi Y.H., Love C.C., Chung Y.G., Varner D.D., Westhusin M.E., Burghardt R.C. and Hinrichs K. (2002): Production of nuclear transfer horse embryos by Piezo-driven injection of somatic cell nuclei and activation with stallion sperm cytosolic extract. *Biology of Reproduction*, 67, 561–567.

Coy P., Romar R., Ruiz S., Cánovas S., Gadea J., García Vázquez F. and Matás C. (2005): Birth of piglets after transferring of in vitro-produced embryos pre-matured with R-roscovitine. *Reproduction (Cambridge, England)*, 129, 747–755.

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. et al. (2002): Targeted disruption of the alpha1,3-galactosyltransferase gene in cloned pigs. *Nature Biotechnology*, 20, 251–255.

Diamond L.E., Quinn C.M., Martin M.J., Lawson J., Platt J.L. and Logan J.S. (2001): A human CD46 transgenic pig model system for the study of discordant xenotransplantation. *Transplantation*, 71, 132–142.

Dieckhoff B., Petersen B., Kues W.A., Kurth R., Niemann H. and Denner J. (2008): Knockdown of porcine endogenous retrovirus (PERV) expression by PERV-specific shRNA in transgenic pigs. *Xenotransplantation*, 15, 36–45.

Du F., Xu J., Zhang J., Gao S., Carter M.G., He C., Sung L.-Y., Chaubal S., Fissore R.A., Tian X.C. et al. (2009): Beneficial effect of young oocytes for rabbit somatic cell nuclear transfer. *Cloning and Stem Cells*, 11, 131–140.

Fan N. and Lai L. (2013): Genetically modified pig models for human diseases. *Journal of Genetics and Genomics = Yi Chuan Xue Bao*, 40, 67–73.

Fodor W.L., Williams B.L., Matis L.A., Madri J.A., Rollins S.A., Knight J.W., Velandar W. and Squinto S.P. (1994): Expression of a functional human complement inhibitor in a transgenic pig as a model for the prevention of xenogeneic hyperacute organ rejection. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 91, 11153–11157.

Gadea J. and García-Vázquez F. a. (2010): Aplicaciones de los cerdos transgénicos en biomedicina y producción animal. *ITEA Informacion Tecnica Economica Agraria*, 106, 30–45.

Galli C., Lagutina I., Vassiliev I., Duchi R. and Lazzari G. (2002): Comparison of microinjection (piezo-electric) and cell fusion for nuclear transfer success with different cell types in cattle. *Cloning and Stem Cells*, 4, 189–196.

Gao S. (2006): Protocols for nuclear transfer in mice. *Methods in Molecular Biology (Clifton, N.J.)*, 325, 25–33.

García-Vázquez F. a, Ruiz S., Matás C., Izquierdo-Rico M.J., Grullón L. a, De Ondiz A., Vieira L., Avilés-López K., Gutiérrez-Adán A. and Gadea J. (2010): Production of transgenic piglets using ICSI-sperm-mediated gene transfer in combination with recombinase RecA. *Reproduction (Cambridge, England)*, 140, 259–272.

Garrels W., Ivics Z. and Kues W.A. (2012): Precision genetic engineering in large mammals. *Trends in Biotechnology*, 30, 386–393.

Golovan S.P., Meidinger R.G., Ajakaiye A., Cottrill M., Wiederkehr M.Z., Barney D.J., Plante C., Pollard J.W., Fan M.Z., Hayes M.A. et al. (2001): Pigs expressing salivary phytase produce low-phosphorus manure. *Nature Biotechnology*, 19, 741–745.

Gordon J.W. and Ruddle F.H. (1983): Gene transfer into mouse embryos: production of transgenic mice by pronuclear injection. *Methods in Enzymology*, 101, 411–433.

Gordon J.W., Scangos G.A., Plotkin D.J., Barbosa J.A. and Ruddle F.H. (1980): Genetic transformation of mouse embryos by microinjection of purified DNA. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 77, 7380–7384.

Groenen M.A.M., Archibald A.L., Uenishi H., Tuggle C.K., Takeuchi Y., Rothschild M.F., Rogel-Gaillard C., Park C., Milan D., Megens H.-J. et al. (2012): Analyses of pig genomes provide insight into porcine demography and evolution. *Nature*, 491, 393–398.

Hammer R.E., Pursel V.G., Rexroad C.E., Wall R.J., Bolt D.J., Ebert K.M., Palmiter R.D. and Brinster R.L. (1985): Production of transgenic rabbits, sheep and pigs by microinjection. *Nature*, 315, 680–683.

Hao Y.H., Yong H.Y., Murphy C.N., Wax D., Samuel M., Rieke A., Lai L., Liu Z., Durtschi D.C., Welbern V.R. et al. (2006): Production of endothelial nitric oxide synthase (eNOS) over-expressing piglets. *Transgenic Research*, 15, 739–750.

Hofmann A., Kessler B., Ewerling S., Weppert M., Vogg B., Ludwig H., Stojkovic M., Boelhaue M., Brem G., Wolf E. et al. (2003): Efficient transgenesis in farm animals by lentiviral vectors. *EMBO Reports*, 4, 1054–1060.

Honaramooz A., Megee S.O. and Dobrinski I. (2002): Germ cell transplantation in pigs. *Biology of Reproduction*, 66, 21–28.

Honaramooz A., Behboodi E., Blash S., Megee S.O. and Dobrinski I. (2003): Germ cell transplantation in goats. *Molecular Reproduction and Development*, 64, 422–428.

Izant J.G. and Weintraub H. (1985): Constitutive and conditional suppression of exogenous and endogenous genes by anti-sense RNA. *Science (New York, N.Y.)*, 229, 345–352.

Jaenisch R. and Mintz B. (1974): Simian virus 40 DNA sequences in DNA of healthy adult mice derived from preimplantation blastocysts injected with viral DNA. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 71, 1250–1254.

Jaenisch R., Fan H. and Croker B. (1975): Infection of preimplantation mouse embryos and of newborn mice with leukemia virus: tissue distribution of viral DNA and RNA and leukemogenesis in the adult animal. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 72, 4008–4012.

Katayama M., Rieke A., Cantley T., Murphy C., Dowell L., Sutovsky P. and Day B.N. (2007): Improved fertilization and embryo development resulting in birth of live piglets after intracytoplasmic sperm injection and in vitro culture in a cysteine-supplemented medium. *Theriogenology*, 67, 835–847.

Kato M., Ishikawa A., Kaneko R., Yagi T., Hochi S. and Hirabayashi M. (2004): Production of transgenic rats by ooplasmic injection of spermatogenic cells exposed to exogenous DNA: a preliminary study. *Molecular Reproduction and Development*, 69, 153–158.

Keefer C.L. (2004): Production of bioproducts through the use of transgenic animal models. *Animal Reproduction Science*, 82-83, 5–12.

Keefer C.L., Baldassarre H., Keyston R., Wang B., Bhatia B., Bilodeau A.S., Zhou J.F., Leduc M., Downey B.R., Lazaris A. et al. (2001): Generation of dwarf goat (*Capra hircus*) clones following nuclear transfer with transfected and nontransfected fetal fibroblasts and in vitro-matured oocytes. *Biology of Reproduction*, 64, 849–856.

Klose R., Kemter E., Bedke T., Bittmann I., Kelsner B., Endres R., Pfeffer K., Schwitzer R. and Wolf E. (2005): Expression of biologically active human TRAIL in transgenic pigs. *Transplantation*, 80, 222–230.

Klymiuk N., Böcker W., Schönitzer V., Bähr A., Radic T., Fröhlich T., Wünsch A., Keßler B., Kurome M., Schilling E. et al. (2012): First inducible transgene expression in porcine large animal models. *FASEB*

Journal □: Official Publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology, 26, 1086–1099.

Koike C., Katayama A., Kadomatsu K., Hiraiwa N., Hayashi S., Kobayashi T., Hayash S., Yokoyama I. and Takagi H. (1997): Reduction of alpha-Gal epitopes in transgenic pig by introduction of human alpha 1-2 fucosyltransferase. *Transplantation Proceedings*, 29, 894.

Kragh P.M., Nielsen A.L., Li J., Du Y., Lin L., Schmidt M., Bøgh I.B., Holm I.E., Jakobsen J.E., Johansen M.G. et al. (2009): Hemizygous minipigs produced by random gene insertion and handmade cloning express the Alzheimer's disease-causing dominant mutation APPsw. *Transgenic Research*, 18, 545–558.

Krimpenfort P., Rademakers A., Eyestone W., van der Schans A., van den Broek S., Kooiman P., Kootwijk E., Platenburg G., Pieper F. and Strijker R. (1991): Generation of transgenic dairy cattle using "in vitro" embryo production. *Biotechnology (Nature Publishing Company)*, 9, 844–847.

Kues W. a. and Niemann H. (2004): The contribution of farm animals to human health. *Trends in Biotechnology*, 22, 286–294.

Kurome M., Ueda H., Tomii R., Naruse K. and Nagashima H. (2006): Production of transgenic-clone pigs by the combination of ICSI-mediated gene transfer with somatic cell nuclear transfer. *Transgenic Research*, 15, 229–240.

Kurome M., Hisatomi H., Matsumoto S., Tomii R., Ueno S., Hiruma K., Saito H., Nakamura K., Okumura K., Matsumoto M. et al. (2008): Production efficiency and telomere length of the cloned pigs following serial somatic cell nuclear transfer. *The Journal of Reproduction and Development*, 54, 254–258.

Lai L., Sun Q., Wu G., Murphy C.N., Kühholzer B., Park K.W., Bonk A.J., Day B.N. and Prather R.S. (2001): Development of porcine embryos and offspring after intracytoplasmic sperm injection with liposome transfected or non-transfected sperm into in vitro matured oocytes. *Zygote (Cambridge, England)*, 9, 339–346.

Lai L., Park K.W., Cheong H.T., Kühholzer B., Samuel M., Bonk A., Im G.S., Rieke A., Day B.N., Murphy C.N. et al. (2002a): Transgenic pig expressing the enhanced green fluorescent protein produced by nuclear transfer using colchicine-treated fibroblasts as donor cells. *Molecular Reproduction and Development*, 62, 300–306.

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. et al. (2002b): Production of alpha-1,3-galactosyltransferase knockout pigs by nuclear transfer cloning. *Science (New York, N.Y.)*, 295, 1089–1092.

Lai L., Kang J.X., Li R., Wang J., Witt W.T., Yong H.Y., Hao Y., Wax D.M., Murphy C.N., Rieke A. et al. (2006): Generation of cloned transgenic pigs rich in omega-3 fatty acids. *Nature Biotechnology*, 24, 435–436.

Lavitrano M., Camaioni A., Fazio V.M., Dolci S., Farace M.G. and Spadafora C. (1989): Sperm cells as vectors for introducing foreign DNA into eggs: genetic transformation of mice. *Cell*, 57, 717–723.

Lavitrano M., Forni M., Varzi V., Pucci L., Bacci M.L., Di Stefano C., Fioretti D., Zoraqi G., Moioli B., Rossi M. et al. (1997): Sperm-mediated gene transfer: production of pigs transgenic for a human regulator of complement activation. *Transplantation Proceedings*, 29, 3508–3509.

Lavitrano M., Bacci M.L., Forni M., Lazzereschi D., Di Stefano C., Fioretti D., Giancotti P., Marfé G., Pucci L., Renzi L. et al. (2002): Efficient production by sperm-mediated gene transfer of human decay

accelerating factor (hDAF) transgenic pigs for xenotransplantation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 99, 14230–14235.

Lazzereschi D., Forni M., Cappello F., Bacci M.L., Di Stefano C., Marfé G., Giancotti P., Renzi L., Wang H.J., Rossi M. et al. (2000): Efficiency of transgenesis using sperm-mediated gene transfer: generation of hDAF transgenic pigs. *Transplantation Proceedings*, 32, 892–894.

Lee G.S., Kim H.S., Hyun S.H., Lee S.H., Jeon H.Y., Nam D.H., Jeong Y.W., Kim S., Kim J.H., Han J.Y. et al. (2005): Production of transgenic cloned piglets from genetically transformed fetal fibroblasts selected by green fluorescent protein. *Theriogenology*, 63, 973–991.

Lee H.J., Lee B.C., Kim Y.H., Paik N.W. and Rho H.M. (2011): Characterization of transgenic pigs that express human decay accelerating factor and cell membrane-tethered human tissue factor pathway inhibitor. *Reproduction in Domestic Animals = Zuchthygiene*, 46, 325–332.

Liu Y., Li J., Løvendahl P., Schmidt M., Larsen K. and Callesen H. (2014): In vitro manipulation techniques of porcine embryos: a meta-analysis related to transfers, pregnancies and piglets. *Reproduction, Fertility, and Development*, 27, 429–439.

Lo D., Pursel V., Linton P.J., Sandgren E., Behringer R., Rexroad C., Palmiter R.D. and Brinster R.L. (1991): Expression of mouse IgA by transgenic mice, pigs and sheep. *European Journal of Immunology*, 21, 1001–1006.

Lois C., Hong E.J., Pease S., Brown E.J. and Baltimore D. (2002): Germline transmission and tissue-specific expression of transgenes delivered by lentiviral vectors. *Science (New York, N.Y.)*, 295, 868–872.

Lorson M.A., Spate L.D., Samuel M.S., Murphy C.N., Lorson C.L., Prather R.S. and Wells K.D. (2011): Disruption of the Survival Motor Neuron (SMN) gene in pigs using ssDNA. *Transgenic Research*, 20, 1293–1304.

Luo Y., Li J., Liu Y., Lin L., Du Y., Li S., Yang H., Vajta G., Callesen H., Bolund L. et al. (2011): High efficiency of BRCA1 knockout using rAAV-mediated gene targeting: developing a pig model for breast cancer. *Transgenic Research*, 20, 975–988.

Luo Y., Lin L., Bolund L., Jensen T.G. and Sørensen C.B. (2012): Genetically modified pigs for biomedical research. *Journal of Inherited Metabolic Disease*, 35, 695–713.

Martin C., Plat M., Nerrière-Daguin V., Coulon F., Uzbekova S., Venturi E., Condé F., Hermel J.-M., Hantraye P., Tesson L. et al. (2005): Transgenic expression of CTLA4-Ig by fetal pig neurons for xenotransplantation. *Transgenic Research*, 14, 373–384.

Mastromonaco G.F., Semple E., Robert C., Rho G.J., Betts D.H. and King W. a. (2004): Different culture media requirements of IVF and nuclear transfer bovine embryos. *Reproduction in Domestic Animals*, 39, 462–467.

Matsunari H., Onodera M., Tada N., Mochizuki H., Karasawa S., Haruyama E., Nakayama N., Saito H., Ueno S., Kurome M. et al. (2008): Transgenic-cloned pigs systemically expressing red fluorescent protein, Kusabira-Orange. *Cloning and Stem Cells*, 10, 313–323.

Matsunari H., Kobayashi T., Watanabe M., Umeyama K., Nakano K., Kanai T., Matsuda T., Nagaya M., Hara M., Nakauchi H. et al. (2014): Transgenic Pigs with Pancreas-specific Expression of Green Fluorescent Protein. *Journal of Reproduction and Development*, 60, 230–237.

McCreath K.J., Howcroft J., Campbell K.H., Colman A., Schnieke A.E. and Kind A.J. (2000): Production of gene-targeted sheep by nuclear transfer from cultured somatic cells. *Nature*, 405, 1066–1069.

Melo E.O., Canavessi A.M.O., Franco M.M. and Rumpf R. (2007): Animal transgenesis: state of the art and applications. *Journal of Applied Genetics*, 48, 47–61.

Miyagawa S., Murakami H., Takahagi Y., Nakai R., Yamada M., Murase A., Koyota S., Koma M., Matsunami K., Fukuta D. et al. (2001a): Remodeling of the major pig xenoantigen by N-acetylglucosaminyltransferase III in transgenic pig. *The Journal of Biological Chemistry*, 276, 39310–39319.

Miyagawa S., Murakami H., Murase A., Nakai R., Koma M., Koyota S., Matsunami K., Takahagi Y., Fujimura T., Shigehisa T. et al. (2001b): Transgenic pigs with human N-acetylglucosaminyltransferase III. *Transplantation Proceedings*, 33, 742–743.

Moreira P.N. and Montoliu L. (2014): Intracytoplasmic sperm injection (ICSI)-mediated transgenesis in mice. *Methods in Molecular Biology (Clifton, N.J.)*, 1194, 141–156.

Müller M., Brenig B., Winnacker E.L. and Brem G. (1992): Transgenic pigs carrying cDNA copies encoding the murine Mx1 protein which confers resistance to influenza virus infection. *Gene*, 121, 263–270.

Murakami H., Nagashima H., Takahagi Y., Fujimura T., Miyagawa S., Okabe M., Seya T., Shigehisa T., Taniguchi N., Shirakura R. et al. (2000): Production of transgenic pigs expressing human DAF (CD55) regulated by the porcine MCP gene promoter. *Transplantation Proceedings*, 32, 2505–2506.

Nagai T. (1996): In vitro maturation and fertilization of pig oocytes. *Animal Reproduction Science*, 42, 153–163.

Nagano M., Brinster C.J., Orwig K.E., Ryu B.-Y., Avarbock M.R. and Brinster R.L. (2001): Transgenic mice produced by retroviral transduction of male germ-line stem cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 98, 13090–13095.

Nichols J., Zevnik B., Anastassiadis K., Niwa H., Klewe-Nebenius D., Chambers I., Schöler H. and Smith A. (1998): Formation of pluripotent stem cells in the mammalian embryo depends on the POU transcription factor Oct4. *Cell*, 95, 379–391.

Niemann H. and Kues W. a (2007): Transgenic farm animals: an update. *Reproduction, Fertility, and Development*, 19, 762–770.

Niemann H. and Lucas-Hahn a. (2012): Somatic Cell Nuclear Transfer Cloning: Practical Applications and Current Legislation. *Reproduction in Domestic Animals*, 47, 2–10.

Niwa H., Miyazaki J. and Smith A.G. (2000): Quantitative expression of Oct-3/4 defines differentiation, dedifferentiation or self-renewal of ES cells. *Nature Genetics*, 24, 372–376.

Onishi A., Iwamoto M., Akita T., Mikawa S., Takeda K., Awata T., Hanada H. and Perry A.C. (2000): Pig cloning by microinjection of fetal fibroblast nuclei. *Science (New York, N.Y.)*, 289, 1188–1190.

Oropeza M., Petersen B., Carnwath J.W., Lucas-Hahn A., Lemme E., Hassel P., Herrmann D., Barg-Kues B., Holler S., Queisser A.-L. et al. (2009): Transgenic expression of the human A20 gene in cloned pigs provides protection against apoptotic and inflammatory stimuli. *Xenotransplantation*, 16, 522–534.

Park K.W., Lai L., Cheong H.T., Im G.S., Sun Q.Y., Wu G., Day B.N. and Prather R.S. (2001): Developmental potential of porcine nuclear transfer embryos derived from transgenic fetal fibroblasts infected with the gene for the green fluorescent protein: comparison of different fusion/activation conditions. *Biology of Reproduction*, 65, 1681–1685.

Perry A.C., Wakayama T., Kishikawa H., Kasai T., Okabe M., Toyoda Y. and Yanagimachi R. (1999): Mammalian transgenesis by intracytoplasmic sperm injection. *Science (New York, N.Y.)*, 284, 1180–1183.

Petersen B., Lucas-Hahn A., Oropeza M., Hornen N., Lemme E., Hassel P., Queisser A.-L. and Niemann H. (2008): Development and validation of a highly efficient protocol of porcine somatic cloning using preovulatory embryo transfer in peripubertal gilts. *Cloning and Stem Cells*, 10, 355–362.

Petters R.M., Alexander C.A., Wells K.D., Collins E.B., Sommer J.R., Blanton M.R., Rojas G., Hao Y., Flowers W.L., Banin E. et al. (1997): Genetically engineered large animal model for studying cone photoreceptor survival and degeneration in retinitis pigmentosa. *Nature Biotechnology*, 15, 965–970.

Peura T.T., Lewis I.M. and Trounson A.O. (1998): The effect of recipient oocyte volume on nuclear transfer in cattle. *Molecular Reproduction and Development*, 50, 185–191.

Phelps C.J., Ball S.F., Vaught T.D., Vance A.M., Mendicino M., Monahan J.A., Walters A.H., Wells K.D., Dandro A.S., Ramsoondar J.J. et al. (2009): Production and characterization of transgenic pigs expressing porcine CTLA4-Ig. *Xenotransplantation*, 16, 477–485.

Prather R.S., Barnes F.L., Sims M.M., Robl J.M., Eyestone W.H. and First N.L. (1987): Nuclear transplantation in the bovine embryo: assessment of donor nuclei and recipient oocyte. *Biology of Reproduction*, 37, 859–866.

Pursel V.G., Pinkert C.A., Miller K.F., Bolt D.J., Campbell R.G., Palmiter R.D., Brinster R.L. and Hammer R.E. (1989): Genetic engineering of livestock. *Science (New York, N.Y.)*, 244, 1281–1288.

Pursel V.G., Suttrave P., Wall R.J., Kelly A.M. and Hughes S.H. (1992): Transfer of c-SKI gene into swine to enhance muscle development. *Theriogenology*, 37, 278.

Pursel V.G., Mitchell A.D., Bee G., Elsasser T.H., McMurtry J.P., Wall R.J., Coleman M.E. and Schwartz R.J. (2004): Growth and tissue accretion rates of swine expressing an insulin-like growth factor I transgene. *Animal Biotechnology*, 15, 33–45.

Ramsoondar J., Vaught T., Ball S., Mendicino M., Monahan J., Jobst P., Vance A., Duncan J., Wells K. and Ayares D. (2009): Production of transgenic pigs that express porcine endogenous retrovirus small interfering RNAs. *Xenotransplantation*, 16, 164–180.

Renner S., Fehlings C., Herbach N., Hofmann A., von Waldthausen D.C., Kessler B., Ulrichs K., Chodnevskaja I., Moskalenko V., Amselgruber W. et al. (2010): Glucose intolerance and reduced proliferation of pancreatic beta-cells in transgenic pigs with impaired glucose-dependent insulinotropic polypeptide function. *Diabetes*, 59, 1228–1238.

Roberts R.M., Yuan Y., Genovese N. and Ezashi T. (2015): Livestock models for exploiting the promise of pluripotent stem cells. *ILAR Journal / National Research Council, Institute of Laboratory Animal Resources*, 56, 74–82.

Robl J.M., Wang Z., Kasinathan P. and Kuroiwa Y. (2007): Transgenic animal production and animal biotechnology. *Theriogenology*, 67, 127–133.

Ross J.W., Fernandez de Castro J.P., Zhao J., Samuel M., Walters E., Rios C., Bray-Ward P., Jones B.W., Marc R.E., Wang W. et al. (2012): Generation of an inbred miniature pig model of retinitis pigmentosa. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, 53, 501–507.

Saeki K., Matsumoto K., Kinoshita M., Suzuki I., Tasaka Y., Kano K., Taguchi Y., Mikami K., Hirabayashi M., Kashiwazaki N. et al. (2004): Functional expression of a Delta12 fatty acid desaturase

gene from spinach in transgenic pigs. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 101, 6361–6366.

Scherer L.J. and Rossi J.J. (2003): Approaches for the sequence-specific knockdown of mRNA. *Nature Biotechnology*, 21, 1457–1465.

Schnieke A.E., Kind A.J., Ritchie W.A., Mycock K., Scott A.R., Ritchie M., Wilmut I., Colman A. and Campbell K.H. (1997): Human factor IX transgenic sheep produced by transfer of nuclei from transfected fetal fibroblasts. *Science (New York, N.Y.)*, 278, 2130–2133.

Sharma A., Okabe J., Birch P., McClellan S.B., Martin M.J., Platt J.L. and Logan J.S. (1996): Reduction in the level of Gal(alpha1,3)Gal in transgenic mice and pigs by the expression of an alpha(1,2)fucosyltransferase. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 93, 7190–7195.

Shimazono Y. (2007): The state of the international organ trade: a provisional picture based on integration of available information. *Bulletin of the World Health Organization*, 85, 955–962.

Smith K. and Spadafora C. (2005): Sperm-mediated gene transfer: applications and implications. *BioEssays*: News and Reviews in Molecular, Cellular and Developmental Biology, 27, 551–562.

Sommer J.R., Estrada J.L., Collins E.B., Bedell M., Alexander C.A., Yang Z., Hughes G., Mir B., Gilger B.C., Grob S. et al. (2011): Production of ELOVL4 transgenic pigs: a large animal model for Stargardt-like macular degeneration. *The British Journal of Ophthalmology*, 95, 1749–1754.

Suzuki M., Misumi K., Ozawa M., Noguchi J., Kaneko H., Ohnuma K., Fuchimoto D., Onishi A., Iwamoto M., Saito N. et al. (2006): Successful piglet production by IVF of oocytes matured in vitro using NCSU-37 supplemented with fetal bovine serum. *Theriogenology*, 65, 374–386.

Takahagi Y., Fujimura T., Miyagawa S., Nagashima H., Shigehisa T., Shirakura R. and Murakami H. (2005): Production of alpha 1,3-galactosyltransferase gene knockout pigs expressing both human decay-accelerating factor and N-acetylglucosaminyltransferase III. *Molecular Reproduction and Development*, 71, 331–338.

Uchida M., Shimatsu Y., Onoe K., Matsuyama N., Niki R., Ikeda J.E. and Imai H. (2001): Production of transgenic miniature pigs by pronuclear microinjection. *Transgenic Research*, 10, 577–582.

Umeyama K., Watanabe M., Saito H., Kurome M., Tohi S., Matsunari H., Miki K. and Nagashima H. (2009): Dominant-negative mutant hepatocyte nuclear factor 1alpha induces diabetes in transgenic-cloned pigs. *Transgenic Research*, 18, 697–706.

Vajta G. and Callesen H. (2012): Establishment of an efficient somatic cell nuclear transfer system for production of transgenic pigs. *Theriogenology*, 77, 1263–1274.

Vajta G., Lewis I.M., Hyttel P., Thouas G.A. and Trounson A.O. (2001): Somatic cell cloning without micromanipulators. *Cloning*, 3, 89–95.

Varmus H. (1988): Retroviruses. *Science (New York, N.Y.)*, 240, 1427–1435.

Wakayama S., Kohda T., Obokata H., Tokoro M., Li C., Terashita Y., Mizutani E., Nguyen V.T., Kishigami S., Ishino F. et al. (2013): Successful serial recloning in the mouse over multiple generations. *Cell Stem Cell*, 12, 293–297.

Webster N.L., Forni M., Bacci M.L., Giovannoni R., Razzini R., Fantinati P., Zannoni A., Fusetti L., Dalprà L., Bianco M.R. et al. (2005): Multi-transgenic pigs expressing three fluorescent proteins

produced with high efficiency by sperm mediated gene transfer. *Molecular Reproduction and Development*, 72, 68–76.

Wei J., Ouyang H., Wang Y., Pang D., Cong N.X., Wang T., Leng B., Li D., Li X., Wu R. et al. (2012): Characterization of a hypertriglyceridemic transgenic miniature pig model expressing human apolipoprotein CIII. *The FEBS Journal*, 279, 91–99.

Weiss E.H., Lilienfeld B.G., Müller S., Müller E., Herbach N., Kessler B., Wanke R., Schwinzer R., Seebach J.D., Wolf E. et al. (2009): HLA-E/human beta2-microglobulin transgenic pigs: protection against xenogeneic human anti-pig natural killer cell cytotoxicity. *Transplantation*, 87, 35–43.

Whitelaw C.B.A., Radcliffe P.A., Ritchie W.A., Carlisle A., Ellard F.M., Pena R.N., Rowe J., Clark A.J., King T.J. and Mitrophanous K.A. (2004): Efficient generation of transgenic pigs using equine infectious anaemia virus (EIAV) derived vector. *FEBS Letters*, 571, 233–236.

Whyte J. and Laughlin M.H. (2010): Placentation in the pig visualized by eGFP fluorescence in eNOS over-expressing cloned transgenic swine. *Molecular Reproduction and Development*, 77, 565.

Whyte J.J., Samuel M., Mahan E., Padilla J., Simmons G.H., Arce-Esquivel A.A., Bender S.B., Whitworth K.M., Hao Y.H., Murphy C.N. et al. (2011): Vascular endothelium-specific overexpression of human catalase in cloned pigs. *Transgenic Research*, 20, 989–1001.

Wilkie T.M., Brinster R.L. and Palmiter R.D. (1986): Germline and somatic mosaicism in transgenic mice. *Developmental Biology*, 118, 9–18.

Willadsen S.M. (1986): Nuclear transplantation in sheep embryos. *Nature*, 320, 63–65.

Wilmut I., Schnieke A.E., McWhir J., Kind A.J. and Campbell K.H. (1997): Viable offspring derived from fetal and adult mammalian cells. *Nature*, 385, 810–813.

Wobus A.M., Holzhausen H., Jäkel P. and Schöneich J. (1984): Characterization of a pluripotent stem cell line derived from a mouse embryo. *Experimental Cell Research*, 152, 212–219.

Yang D., Wang C.-E., Zhao B., Li W., Ouyang Z., Liu Z., Yang H., Fan P., O'Neill A., Gu W. et al. (2010): Expression of Huntington's disease protein results in apoptotic neurons in the brains of cloned transgenic pigs. *Human Molecular Genetics*, 19, 3983–3994.

Yang D., Yang H., Li W., Zhao B., Ouyang Z., Liu Z., Zhao Y., Fan N., Song J., Tian J. et al. (2011): Generation of PPAR γ mono-allelic knockout pigs via zinc-finger nucleases and nuclear transfer cloning. *Cell Research*, 21, 979–982.

Yang L., Guell M., Niu D., George H., Lesha E., Grishin D., Aach J., Shrock E., Xu W., Poci J. et al. (2015): Genome-wide inactivation of porcine endogenous retroviruses (PERVs). *Science*, 350, 1101–1104.

Yong H.Y., Hao Y., Lai L., Li R., Murphy C.N., Rieke A., Wax D., Samuel M. and Prather R.S. (2006): Production of a transgenic piglet by a sperm injection technique in which no chemical or physical treatments were used for oocytes or sperm. *Molecular Reproduction and Development*, 73, 595–599.

Zhao J., Whyte J. and Prather R.S. (2010): Effect of epigenetic regulation during swine embryogenesis and on cloning by nuclear transfer. *Cell and Tissue Research*, 341, 13–21.

Zhou C.-Y., McInnes E., Copeman L., Langford G., Parsons N., Lancaster R., Richards A., Carrington C. and Thompson S. (2005): Transgenic pigs expressing human CD59, in combination with human membrane cofactor protein and human decay-accelerating factor. *Xenotransplantation*, 12, 142–148.

