

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 usadas 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 pretenden aportar una contribución parcial al campo de la producción *in vitro* de embriones de porcino.

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) de 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 incrementó 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.