



**ACADEMIA DE CIENCIAS
DE LA REGION DE MURCIA**

**HORIZONTES EN BIOTECNOLOGÍA
DE LA REPRODUCCIÓN ANIMAL**

Discurso de ingreso leído por el Académico electo

Ilmo. Sr. D. Juan M^a Vázquez Rojas

en el acto de la Sesión Solemne de su Toma de Posesión como
Académico de Número, celebrada el día 10 de febrero de 2010

Murcia, 2010

ÍNDICE

DISCURSO DE INGRESO: HORIZONTES EN BIOTECNOLOGÍA DE LA REPRODUCCIÓN ANIMAL

Prólogo	1
1. Introducción	9
1.1. La Necesidad de un Nuevo Modelo Productivo Sostenible de Alimentos	11
1.2. Nuevas Aplicaciones en Biomedicina Asociadas a nuevas Biotecnologías en Reproducción Animal	15
2. Evolución Histórica de la Biotecnología en Reproducción Animal	19
3. Biotecnologías Asociadas a la Reproducción Animal	27
3.1. Inseminación Artificial con Bajo o Muy Bajo Número de Espermatozoides	29
3.2. Criopreservación de Gametos y Embriones	39
3.3. Preselección del Sexo por Separación de Espermatozoides	51
3.4. Clonación y Producción de Animales Transgénicos	63
4. Una Visión de Futuro	77
5. Bibliografía	85

PRÓLOGO

Excelentísimo señor Presidente,
Ilustrísimo señor Secretario,
Ilustrísima señora e Ilustrísimos señores Académicos,
Excelentísimas e Ilustrísimas Autoridades,
Señoras y Señores,

"Si he visto más lejos es porque estoy sentado sobre los hombros de gigantes". Estas palabras escritas en 1675 por Isaac Newton en una carta a Robert Hooke, es la frase que, en mi opinión, identifica el progreso científico con mayor claridad. Palabras a las que también asociaría las que escuchaba en el año 1993 en la Royal Society of Medicine de Londres, cuando en una sesión con estudiantes, el Profesor Jones del Babraham Institute decía *"no pierdan ustedes años de laboratorio si lo pueden resolver en 15 minutos en una biblioteca. Solamente de este modo podrán contribuir al progreso científico"*. El sentido del acervo científico, esto es, el conjunto de conocimientos que ha logrado reunir a lo largo de la historia un privilegiado grupo de hombres y mujeres que trabajan diariamente aportando sus resultados para que nuestra sociedad progrese y donde se alcance realmente y para todos, el estado del bienestar. Por tanto, quiero comenzar este discurso manifestando mi más profundo respeto y agradecimiento tanto a nuestros predecesores como a aquellos que nos sucederán en esta continúa construcción de *"los hombros del gigante"*.

Me siento extraordinariamente honrado porque la Academia de Ciencias de la Región de Murcia, formada por un grupo de ilustres científicos, haya aprobado con generosidad, reconocerme y aceptarme entre sus Académicos de Número, distinción a la que espero corresponder como de mí se espera. Recibo esta distinción con el orgullo de saberme miembro de este cuerpo de científicos que, desde las distintas ramas del saber, contribuyen al avance de las ciencias con el objetivo de alcanzar una sociedad mejor. Quiero manifestar públicamente mi agradecimiento y compromiso y, desde mi especialidad en las ciencias veterinarias, poner toda mi dedicación para alcanzar los nobles objetivos de esta docta Academia.

Quiero, asimismo, agradecer a los Académicos que avalaron generosamente mi candidatura, los Académicos Pablo Artal, José Luis Iborra y, muy especialmente, al Académico Manuel Vidal quién, además, ha tenido la generosidad de escribir y dictar a continuación el discurso de contestación. De todo corazón, muchas gracias. Quiero destacar, igualmente, el respaldo recibido de los Académicos al conocer mi candidatura y, particularmente, del Académico José María Ruiz quien ha estado apoyándome desde el comienzo.

Sirva esta introducción, previa a mi discurso, para recordar con profunda gratitud a cuantos en mi recorrido vital me han ayudado y permitido alcanzar este día que a buen seguro recordaré toda la vida. Sé que desde este momento quedaré en deuda con personas y circunstancias imposibles de enumerar a los que quiero agradecer su ayuda y hacerlos partícipes de este momento, ya que

una parte de lo que uno es y alcanza pertenece a todos aquellos que han contribuido a su consecución.

No podría empezar sin mirar hacia mis primeros años junto a mis padres y hermano en mi Águilas natal. Debo agradecer a mis padres muchas cosas, pero especialmente en un día como éste, el haberme dejado ser curioso. La curiosidad como elemento del sustrato en el que debe crecer la vocación de un científico. Curiosidad, sacrificio, generosidad, responsabilidad, compromiso.... palabras que aprendí de mis padres y que siempre he intentado tenerlas presentes en mi vida. Debo reconocerles que el ejemplo de mi hermano José Luis, incansable cirujano e investigador, ha contribuido a mantener firme estos principios. Y junto a ellos, sería injusto por mi parte no traer en estos momentos del preámbulo a mis profesores preuniversitarios que estimularon mi vocación científica, y que con gran entusiasmo impartían su magisterio en un entorno en el que la imaginación solventaba en muchas ocasiones los escasos medios materiales disponibles.

Mi pasión por la investigación científica creció al tiempo que discurrían mis estudios universitarios en una recién nacida Facultad de Veterinaria en la Universidad de Murcia y que me permitió compartir como alumno interno el quehacer de las Cátedras de Anatomía y Embriología, Fisiología Animal y Reproducción y Obstetricia, dirigidas por los Profesores Francisco Moreno, Antonio Ramírez y Emilio Martínez, respectivamente. Ellos me transmitieron, desde diferentes disciplinas, una única visión de compromiso con la Universidad que va mucho más allá de una simple ocupación laboral. La generosidad y confianza depositada en mí por el Prof. Martínez,

permitió mi incorporación a la Cátedra de Reproducción Animal tan pronto como fue posible al finalizar mis estudios.

Si tuviera que destacar un hecho que ha marcado afortunadamente mi vida como investigador, y al que le hago responsable de mis éxitos, ha sido el de formar parte de un equipo, un grupo cohesionado de trabajo que ha sabido adaptarse a la necesidad de cada momento y alinearse en los momentos fáciles y también en los difíciles, en el entendimiento que solo la vida del grupo permite acelerar los logros personales. Por este motivo, cuando el grupo de investigación de Reproducción Animal de la Universidad de Murcia está próximo a alcanzar sus “bodas de plata”, me resulta complicado encontrar las palabras precisas para abordar estas líneas al enfrentarme a un crisol de sentimientos y sensaciones. Porque entre unas paredes que contenían un microscopio y un arcón congelador en el año 1986 a la de unos modernos laboratorios e instalaciones donde poder realizar nuestras investigaciones, además de 25 años de trabajo con periodos de bonanza pero también de adversidad, ha existido mucho trabajo y compromiso con la ciencia y la biotecnología en reproducción animal. Veinticinco años de enriquecedoras discusiones científicas, de diseñar proyectos, de largas horas de trabajo en el laboratorio y en la granja, sustentadas todas en unas relaciones personales que nos han permitido crear una verdadera familia. Y si alguien ha sido catalizador de esta familia, éste ha sido el Prof. Emilio Martínez García, un amigo y un maestro. Porque el valor de palabras como generosidad, cercanía, entrega, visión, compartir, equipo o excelencia se entiende mucho mejor estando con él. En la figura del profesor Martínez veo el mejor de los ejemplos de las palabras de Ortega y Gasset *“Sólo cabe progresar cuando se piensa en grande, sólo es posible avanzar cuando se mira*

lejos". Junto al Profesor Martínez, quiero resaltar la figura de un amigo, el Prof. Jordi Roca, compañero incondicional y con quien, gracias a la fortuna de trabajar con él, he podido disfrutar de experiencias en el ámbito profesional y personal que recordaré toda mi vida. Junto a ellos comencé hace más de 20 años y junto a ellos sigo compartiendo el placer y la satisfacción de investigar y de descubrir.

Quiero expresamente agradecer y reconocer a las Dras, Xiomara Lucas, María Antonia Gil, Inmaculada Parrilla y Cristina Cuello por su compromiso por el grupo, su rigor y logros científicos y por hacer que la labor cotidiana se transforme en extraordinaria cada día. Quiero traer también a este prólogo a los doce doctores a los que he tenido la oportunidad de dirigir sus memorias, especialmente por lo que he aprendido de ellos en las largas sesiones de trabajo, compartiendo preguntas sin respuestas y pasión por la ciencia. Mi gratitud también a todos los que, a lo largo de estos años, profesores, investigadores y estudiantes, españoles o extranjeros, han compartido experiencias, tiempo y filosofía de ser y hacer con el grupo de investigación "Reproducción Animal" de la Universidad de Murcia. Un ser y hacer que compartimos con un gran número de colegas y amigos de universidades y centros de investigación en lugares como Albacete, León, Cáceres, Barcelona, Madrid, Zaragoza, Gijón o Valencia, entre otros. Una vida de ciencia compartida, de emociones compartidas, porque en palabras de Severo Ochoa *"lo que sí puedo decirles es que el descubrimiento científico, el encontrar algo que uno de momento se da cuenta que es el primero que lo ve.....Yo no conozco nada que produzca más emoción"*.

Y junto a la entidades públicas y privadas que con carácter regional, nacional o internacional han confiado en nosotros y financiado con generosidad nuestra investigación, no quisiera dejar de mencionar y reconocer a nuestros colegas que realizan su actividad en laboratorios extranjeros con los que he tenido oportunidad de desarrollar proyectos y trabajos de investigación a lo largo de estos años, algunos de ellos consecuencia de la convicción de la necesidad de ampliar y consolidar mi formación investigadora y la mayoría de ellos fruto del encuentro de intereses comunes en el ámbito del estudio de las biotecnologías en reproducción animal. Entre ellos, quiero expresar mi gratitud a aquellos con quien he tenido la fortuna de compartir etapas de mi vida o tiempos de investigación inolvidables en Cambridge, Londres, Silsoe y Sheffield en Reino Unido, en Columbia, Beltsville, St. Louis o College Station en Estados Unidos de América, en Sydney en Australia, en Uppsala en Suecia, Nouzilly en Francia o Mariensee en Alemania. La ciencia ha logrado crear una tupida red que sobrepasa en ocasiones los intereses científicos para constituir un grupo cosmopolita de amigos.

No puedo terminar este proemio sin agradecer a quien me confió el Vicerrectorado de Investigación de la Universidad de Murcia. Una tarea que me ha ocupado los últimos años en un intento de combinar querer, poder y hacer desde un absoluto compromiso con el progreso de la ciencia y la tecnología en la Universidad de Murcia. Mi profunda gratitud a José Antonio Cobacho, Rector Magnífico de la Universidad de Murcia, por su arriesgada apuesta al confiar en quien casi no conocía y que me ha permitido conocer el “otro lado del espejo”, donde no avanzar es retroceder. Quiero asimismo agradecer la acogida y amistad que me dispensó el equipo de dirección de la Universidad de Murcia y tener la oportunidad de

compartir los desvelos de quienes tienen la responsabilidad de dirigir la Universidad en tiempos difíciles. Asimismo, quiero agradecer a todos con quienes he compartido ilusiones y proyectos en el Vicerrectorado de Investigación, porque al tiempo que hacían posible lo cotidiano, se han implicado de un modo extraordinario en todas y cada una de las nuevas iniciativas propuestas.

Por último, y antes de comenzar con mi discurso, permítanme que sea mi familia quien cierre este prólogo. Con ellos comparto diariamente alegrías pero también preocupaciones y desvelos con la seguridad de que el mañana será mejor que el ayer y que sólo con la acción permanente se vencen las adversidades. Ellos son la razón de ser de lo demás. Con mi esposa María Jesús y mis hijos Miguel y Lucía comparto desde lo más profundo este día como también hago partícipes a mi madre junto a la memoria de mi padre, mi hermano, mi familia política y a cuantos siempre confían y alientan constantemente mi trabajo como investigador.

Cuando pensé en el discurso de ingreso, finalmente decidí combinar bajo el título de “Horizontes en Biotecnología de la Reproducción Animal” una serie de aspectos que me han ocupado toda mi vida científica, analizando algunos de los retos con los que se enfrenta la humanidad en los próximos años, la respuesta necesaria desde la ciencia y la tecnología para la consecución de estos retos, el papel que representan las biotecnologías asociadas a la reproducción animal, con especial énfasis en nuestras aportaciones, para terminar con una visión personal de lo que las biotecnologías pueden aportar en un futuro próximo y las amenazas con las que se enfrentan. Y con este discurso que a continuación expongo, cumplo con la grata

obligación en este acto solemne de ingreso en la Academia de Ciencias de la Región de Murcia.

1.- Introducción

La longevidad y la calidad de vida han supuesto, probablemente desde el origen de la humanidad, una de las principales preocupaciones y por lo tanto su mejora ha sido un objetivo al que se han destinado grandes inversiones e innumerables horas de trabajo a lo largo de diferentes generaciones. Aunque los avances del siglo XX han conseguido que la esperanza de vida casi se duplicara en los países desarrollados y aumentara en la mayoría de los países, los retos siguen siendo numerosos. Entre los grandes retos identificados para continuar alcanzando este objetivo y a los que la ciencia y la tecnología deben dar respuesta, se encuentran la producción sostenible de alimentos saludables así como los avances médicos que permitan abrir nuevas vías terapéuticas y repercutir en un incremento de esperanza y calidad de vida como una fuente de bienestar en los diferentes países del mundo.

Entre los sistemas productivos de alimentos, los procedimientos destinados a la obtención de alimentos de origen animal requieren de cambios que los transformen en sistemas sostenibles con producciones más eficientes, más seguras y aceptadas por los consumidores. Estos sistemas deben ofrecer, además, respuesta a las demandas que se prevén desde terceros países y que van a incrementar el consumo mundial de carne y leche de forma extraordinaria en los próximos años.

Por otro lado, los avances en la investigación biomédica están siendo extraordinarios en los últimos años, propiciando métodos diagnósticos y terapéuticos que han incrementado la esperanza de vida al tiempo que han mejorado sustancialmente la calidad de la misma. Nuevos modelos basados en especies domésticas, están llamados a convertirse en nuevas fuentes terapéuticas de proteínas y órganos que permitan paliar la escasez de los mismos en otros contextos. Asimismo, el desarrollo de nuevas tecnologías que permitan desarrollar modelos experimentales que nos ayuden a entender mejor las enfermedades y a realizar los ensayos terapéuticos necesarios, se constituirá como un elemento estructural de la investigación biomédica.

Estas urgencias que inquietan a la sociedad actual, tanto en lo que respecta a la limitación en los recursos relacionados con la producción de alimentos de origen animal como en las nuevas aplicaciones en el ámbito de la biomedicina, han hecho que la investigación y el desarrollo tecnológico asociados a procedimientos en reproducción animal se encuentren, en estos momentos, entre las prioridades de un gran número de instituciones científicas en todo el mundo. En este sentido, las tecnologías y biotecnologías asociadas con la reproducción animal son, sin lugar a dudas, procedimientos que desde el conocimiento, han cambiado, están cambiando y cambiarán sustancialmente los modelos productivos en las granjas así como las aplicaciones relacionadas con la salud humana, como tendré oportunidad de describir a lo largo de este texto.

1.1.- La Necesidad de un Nuevo Modelo Productivo Sostenible de Alimentos.

El consumo de leche y especialmente la demanda de carne han aumentado de forma exponencial en los últimos años. La carne ha pasado de ser un ingrediente de bajo consumo en muchas familias hasta el pasado siglo (aún lo sigue siendo en muchas regiones del mundo), a ser un elemento imprescindible en los hogares de países desarrollados, como ya anunció que así iba a suceder Upton Sinclair, ganador del Premio Pulitzer, en su libro *La Jungla* publicado en 1906.

El consumo de carne de una persona que vive en un país desarrollado es de unos 30 kilogramos al año, siendo los grandes productores mundiales de carne China, Estados Unidos de América (EEUU) y Brasil. Entre la carne producida, la de cerdo es la de mayor abundancia, seguida por las aves y el vacuno. En Europa, Alemania, Francia y España son los países de mayor producción de carne, con unos consumos también importantes. Por ejemplo, según los resultados para el año 2008 del Ministerio de Medio Ambiente, Medio Rural y Marino, en España se consumen 50'5 kilogramos de carne por persona y año, siendo el alimento en el que más se invierte en la cesta de la compra (325'5 € por persona y año), representando la industria cárnica española un sector de gran trascendencia económica. Un producto asociado, además, con un consumidor cada vez más exigente con relación a la calidad y la seguridad alimentaria de la carne consumida.

Además, existe una clara tendencia mundial alcista en el consumo de carne. Se calcula para el periodo 1993-2020 un crecimiento en el consumo del 14% en los países desarrollados, y superior al 50% en China y el sureste asiático (*Pinstrup-Andersen y Pandey-Lorch, 1999*). Con esta tendencia de crecimiento en el consumo de carne junto al crecimiento esperado de la población mundial, se necesitaría para el año 2020 un incremento del 40% en la producción de cereal con relación a la actual producción, sólo para elaborar alimentos de animales.

Ante esta situación es necesario el establecimiento de un nuevo modelo productivo que se combine con acciones complementarias encaminadas a proponer, por ejemplo, nuevas tendencias en la dieta que conlleven una disminución en el consumo de carne, el incremento en el consumo de proteínas procedentes de producciones animales alternativas (p.e. acuicultura) o incluso opciones más alejadas de las tendencias culturales actuales de consumo, como es la producción *in vitro* de carne. Estas acciones complementarias deben acompañar a un nuevo modelo productivo que incremente la eficiencia de las actuales granjas destinadas a la producción animal.

Hasta ahora, y para responder a esta demanda en el consumo, se ha producido en los pasados años un aumento en la producción de las granjas, principalmente asociada a un aumento en el número de animales reproductores y, consiguientemente, productores. Sin embargo, esta estrategia que a nivel local o regional puede ser efectiva, es claramente ineficiente a nivel global, con unos techos de producción marcados por diferentes factores, entre los que se

incluyen los dependientes de las necesidades de los propios procesos productivos así como de los consumidores y el medio ambiente. Un incremento en la producción incide proporcionalmente en un mayor consumo de recursos y de este modo, un limitante mayor viene derivado del consumo (por la cantidad necesaria y precio) de alimento, principalmente cereales, necesario para mantener la producción animal. Cereales que, además de ser necesarios para la alimentación, se utilizan actualmente en otros procesos productivos como es la fabricación de biodiesel, hecho que ha provocado un incremento importante en el precio de los mismos y su repercusión en el precio de los piensos destinados a alimentación animal. Por otro lado se encuentran, por ejemplo, los problemas derivados de los efluentes contaminantes producidos en un sistema productivo al que se exige cada vez más producción en menos espacio.

El objetivo principal en ganadería es conseguir la máxima producción en cantidad y calidad, de un modo aceptable para el consumidor, optimizando los recursos productivos y respetando el medio ambiente. De este modo, la mejora actual de los sistemas productivos en algunos países se traduce en que la mitad de la carne de cerdo del mundo procede de países cuyo censo porcino no alcanza el 30% del total mundial (*Roppa, 2006*). En los países desarrollados, durante el último siglo, se estima que se ha duplicado la eficiencia productiva de cada animal, resultados que contrastan con la situación en otros países en los que teniendo un número importante de animales, su producción es poco eficiente, creando un desequilibrio entre animales reproductores, consumo y producción de carne y leche.

Durante el pasado siglo XX, la mejora en la nutrición y el manejo de los animales, el control de las enfermedades, la selección genética y la inseminación artificial tradicional han supuesto los factores más importantes en el incremento en los rendimientos de las producciones animales. En este sentido, las tecnologías y biotecnologías de la reproducción animal están llamadas a ocupar en los próximos decenios el centro de las estrategias a desarrollar para incrementar la eficiencia en el ámbito productivo. En el año 2001, se publicó el resultado de un estudio en el que se identificaban técnicas y tecnologías asociadas a la reproducción animal de gran interés tanto para los productores como para los inversores y que debían formar parte del nuevo modelo productivo buscado (Roberts, 2001). Entre ellas, se encuentran la preselección de sexo por separación de espermatozoides, la criopreservación de gametos y embriones, las mejoras en las tecnologías de inseminación artificial, el control hormonal de la reproducción, el diagnóstico precoz de gestación, la selección asistida por biomarcadores, la transgénesis y la clonación animal. Algunas de estas biotecnologías serán abordadas más adelante.

1.2.- Nuevas Aplicaciones en Biomedicina asociadas a nuevas Biotecnologías en Reproducción Animal.

Las nuevas biotecnologías asociadas a la reproducción animal, especialmente la transgénesis y la clonación, están constituyendo una nueva dimensión tanto en biomedicina relacionada con la generación de nuevos productos biológicos con implicaciones terapéuticas, cuya producción es limitada o inexistente mediante otros procedimientos, como en el desarrollo de nuevos biomodelos que permitan replicar y estudiar enfermedades del ser humano.

Probablemente uno de los usos más importantes actualmente y con un claro horizonte es la producción de animales transgénicos para su empleo como biofactorías farmacéuticas. El término inglés “*pharming*” como “*la producción de fármacos a partir de plantas y animales modificados genéticamente*” define una actividad que permite obtener recursos terapéuticos inimaginables hace unos años. En la actualidad, hasta 17 proteínas con potencial uso terapéutico en humanos se producen en vacas, cabras, ovejas y cerdas y 10 de ellas son capaces de ser producidas a niveles comerciales y tienen ya realizados ensayos clínicos (Vajta, 2007). Estas proteínas pueden dar respuesta a tratamientos que no es posible ofrecer con otras metodologías.

Otra de las aplicaciones que tendría una gran repercusión en medicina humana es la utilización de animales modificados

genéticamente como donantes de órganos y tejidos. El xenotransplante es el trasplante de órganos, tejidos o células de una especie a otra. Es decir, la utilización de órganos de animales para su implantación en humanos, con el objeto de paliar la escasez de órganos de donante humano que existe actualmente y que hace que las listas de espera crezcan de forma progresiva y aumente el número de pacientes que fallecen a la espera de órganos siempre escasos, incluso en países como España que tiene una alta tasa de donantes y en el que entre 150.000 y 200.000 enfermos han recibido implantes de tejidos o células en los últimos 25 años, según datos del 2009 del Ministerio de Sanidad y Política Social. Aunque desde 1960 se han implantado en humanos miles de válvulas procedentes de cerdos y bovinos, el gran reto actual es poder trasplantar órganos de animales compatibles con el objetivo de evitar el fallecimiento del paciente en patologías agudas, como por ejemplo el fallo hepático fulminante (Ramírez *et al.*, 2009). En palabras del Coordinador de Trasplantes de la Región de Murcia, el Prof. Pablo Ramírez, uno de los referentes nacionales en trasplantes junto al Prof. Pascual Parrilla, y publicadas en medios de comunicación a comienzos de este año “*si conseguimos trasplantar órganos de animales, los problemas habrán terminado*”.

Aunque en ocasiones la investigación en biomedicina humana no ha reconocido suficientemente el empleo de animales domésticos, hasta 17 Premios Nobeles han utilizado en sus modelos experimentales vacas, cerdos, ovejas, cabras, caballos y pollos (Foundation for Medical Research, Nobel Prizes). Estos premios fueron destinados en su origen a distinguir aquellos investigadores que contribuían con sus investigaciones al bienestar y salud de la humanidad. El conocimiento de determinadas enfermedades humanas y la estrategia terapéutica para solventarlas requiere de

modelos de investigación en ámbitos no bien resueltos en muchas ocasiones al utilizar roedores o lepóridos en experimentación. La aplicación de biotecnologías asociadas a la reproducción animal puede ayudar a resolver estos inconvenientes mediante el desarrollo de modelos en animales domésticos para su empleo en investigación biomédica. Ahora, se pueden “diseñar” modelos transgénicos en animales domésticos específicos para poder estudiar enfermedades como la diabetes o la fibrosis quística.

2.- Evolución histórica de la Biotecnología en Reproducción Animal.

Los grandes y pequeños avances a lo largo de la historia de las biotecnologías asociadas a la reproducción animal, así como su implementación en otras especies han permitido abordar una serie de importantes cuestiones que permiten, por un lado, conocer cada vez mejor los mecanismos fisiológicos de la gametogénesis, la fecundación o el desarrollo embrionario y por otro, establecer procedimientos que permitan establecer sistemas productivos más seguros y eficientes, así como abordar aplicaciones biotecnológicas con una repercusión directa sobre la salud humana.

La aplicación de procesos encaminados a controlar la función reproductiva es tan antigua como la propia domesticación de los animales durante el neolítico con el asentamiento de las poblaciones tras la finalización de la última era glacial. Procesos que se basaban, en los mejores casos, en la observación e interpretación de la naturaleza. Sin embargo, la gran mayoría de procedimientos empleados para controlar la función reproductiva se basaban en la mitología, danzas, ritos, brebajes, supersticiones, y otros procedimientos nada científicos. De este modo se describen, por ejemplo, que para controlar el sexo de la descendencia hay que beber vino y sangre de león en tiempo de luna llena.

Sin embargo, otros procesos derivados del conocimiento empírico, llevaron a algunos pueblos a realizar metodologías similares, al menos conceptualmente, a las que se utilizan hoy en día, como fueron los sumerios con la inseminación artificial en ovino y los árabes con la inseminación artificial en equino. Es más, está documentado a principios del siglo XIV, algún episodio entre tribus árabes rivales de sustracción de espermatozoides, y por consiguiente de la línea genética que estos portaban. Sustracción basada en la colocación clandestina de paños en el interior de la vagina de las yeguas rivales en épocas reproductivas que se extraían por la noche, tras la monta de los caballos, para ser depositados posteriormente en sus propias yeguas.

Puede considerarse el final del siglo XVII, un momento en la historia que marcó un antes y un después en el conocimiento y consiguiente control de la función reproductiva. En noviembre de 1677, la Royal Society (Academia de Ciencias del Reino Unido) recibe una carta del holandés Antonie Van Leeuwenhoek, en la que describe que su asistente Hamm y él mismo, han visto lo que denominan “animalcula” (pequeños animales) en el líquido seminal del perro y del hombre. Por cierto, una carta escrita en holandés, lo que constituía una alteración de los patrones científicos de la época, ya que se utilizaba solo el latín para este tipo de comunicaciones (Foote, 2002). La posibilidad de la observación de estos “pequeños animales” se debía a que Leeuwenhoek había sido capaz de desarrollar lentes que permitían generar hasta 270 aumentos y de este modo hacer visible lo que hasta entonces no lo era. Algunos de los miembros de la Royal Society insistían en que se trataba de parásitos, ya que el propio Leeuwenhoek también los había descrito al observar un raspado de dientes. En años posteriores, otros holandeses como

Christiaan Huygens y Nicolas Hartsoeker publican observaciones relacionadas con “animales parecidos a los renacuajos” en el líquido seminal del perro o de “anguilas pequeñas” en el líquido seminal del gallo. En alguna de estas descripciones se atribuían rasgos de los adultos a estos animalculas comenzando la corriente de los “espermistas”, aquellos que defendían que cada uno de los espermatozoides contenía un “pequeño adulto” y que la inseminación no era más que “una transferencia de embriones”. Los enfrentamientos entre “espermistas” y “ovistas” fueron significativos en ambientes científicos de la época durante muchos años.

En la segunda mitad del siglo XVIII, el sacerdote católico italiano Lazzaro Spallanzani, profesor en las Universidades de Reggio y Pavia, obtiene la primera camada de perros nacidos por inseminación artificial. En un experimento simple, que consistió en introducir con una jeringuilla el semen de un perro en el interior del sistema reproductor de una perra demostró, por primera vez, la importancia de los espermatozoides en el proceso de la fecundación. Asimismo, también describió lo que probablemente haya sido el primer ensayo de fecundación in vitro, utilizando gametos de ranas, así como ensayos de conservación de gametos en nieve.

Habría que esperar a finales del siglo XIX, cuando se crea en Cambridge un centro de referencia mundial para estudios de la reproducción en el que se empezaron a establecer las bases científicas de la moderna ciencia en reproducción animal, obteniéndose descendencia tras la inseminación artificial de conejas, yeguas y perras. Simultáneamente, Rusia se constituyó como un país que impulsó definitivamente la inseminación artificial, comenzando

con los primeros experimentos en inseminación artificial en perras, zorras, conejas, yeguas y ovejas entre otros. Algunos de estos resultados obtenidos a lo largo de 25 años, fueron publicados en inglés en 1922 en la revista *Journal of Agriculture Science* (Ivanoff, 1922). Según las primeras descripciones, la inseminación artificial permitía, por un lado, controlar las enfermedades de transmisión sexual y por otro, incrementar la eficiencia de los mejores machos al poder inseminar diferentes hembras a partir de un solo eyaculado frente a una sola hembra en la monta natural. Sin embargo, la técnica se enfrentaba a diferentes retos entre los que se encontraba la necesidad de desarrollar un procedimiento que permitiera la supervivencia extracorpórea de los espermatozoides, es decir, la conservación espermática. Para ello, el propio Ivanoff, en Rusia, diseñó los primeros diluyentes espermáticos, medios que permiten, por un lado, incrementar el volumen del eyaculado y de este modo poder realizar numerosas inseminaciones manteniendo volúmenes fisiológicos y, por otro lado, la supervivencia de los espermatozoides durante un tiempo limitado fuera del testículo o del epidídimo.

Desde Rusia y Reino Unido la tecnología se extendió y Japón, rápidamente, comenzó a desarrollar nuevos procedimientos de inseminación artificial, y en Polonia se obtuvieron las primeras gestaciones tras el envío de semen durante 48 horas entre lugares distantes. Durante la primera mitad del siglo XX, países como Dinamarca, Suecia y Estados Unidos incorporaron la técnica y miles de hembras de diferentes especies animales fueron inseminadas sistemáticamente con el beneplácito, la participación y compromiso de las más relevantes organizaciones ganaderas de la época. En 1943, y en un análisis comparativo realizado en Estado Unidos, con 574 toros se habían inseminado artificialmente 182.524 vacas, mientras

que para cubrir con monta natural 41.487 vacas, fueron necesarios 1.230 toros. Años más tarde el Presidente estadounidense Truman la identificaba como una tecnología que había sido capaz de transformar la economía agraria en EEUU.

A finales de 1949 un joven veterinario e investigador inglés de 23 años, Chris Polge, ensayaba sin éxito un protocolo que le permitiera congelar y conservar por tiempo indefinido gametos masculinos. Un error provocó que utilizara glicerol en vez de la solución de fructosa que empleaba en sus ensayos. El proceso permitió, por primera vez, “devolver a la vida” a espermatozoides que habían alcanzado temperaturas de -79°C . La publicación de estos ensayos en la revista *Nature (Polge et al., 1949)*, tuvo continuidad con el nacimiento del primer ternero tras la inseminación artificial con espermatozoides que habían sido previamente congelados. Desde entonces millones de terneros y animales de otras especies, han nacido gracias a la inseminación artificial con espermatozoides congelados-descongelados.

A partir de este momento, una rápida y eficiente dispersión y uso de la técnica, acompañada con detallados estudios del comportamiento espermático durante el proceso de congelación y descongelación y del uso del nitrógeno líquido como sistema de conservación (permite alcanzar -196°C , temperatura en la que las actividades metabólicas que conducen al envejecimiento y muerte celular están en la práctica detenidas), han permitido una implementación de esta tecnología en un número elevado de especies celulares como embriones, ovocitos, fibroblastos, tejidos, células madre, etc.

Desde el descubrimiento de Polge, probablemente sea el nacimiento de crías tras someter a los gametos a un proceso de fecundación in vitro, el avance más importante obtenido en las biotecnologías asociadas a la reproducción animal. Esta técnica que fue originalmente ideada para atender patologías asociadas a las obstrucciones tubáricas en la especie humana, tuvo y sigue teniendo una amplia repercusión en ganadería. En 1982 nace en EEUU el primer ternero tras fecundación in vitro y transferencia de embriones (*Brackett et al., 1982*), solo cuatro años después del nacimiento de la primera “niña probeta”, Louise Brown. Posteriormente, se han conseguido nacimientos en otras especies aunque es probablemente en el ganado vacuno donde existe un mayor interés en esta tecnología ya que son miles los animales nacidos tras fecundación in vitro.

En 1989 nacen en Beltsville (EEUU) la primeras camadas de conejos cuyo sexo había sido previamente preseleccionado gracias al desarrollo de un procedimiento basado en la citometría de flujo que permite la separación de los espermatozoides según sean portadores de un cromosoma X o Y (*Johnson et al., 1989*). De esta manera, la combinación de la ciencia y la tecnología permitía lo que hasta entonces había sido un anhelo para muchas civilizaciones, elegir el sexo de la descendencia.

Finalmente, el último gran hito en biotecnología de la reproducción animal fue la oveja Dolly (*Wilmot et al., 1997*), que nacida en el Reino Unido en 1996 fue el primer clon de un animal doméstico adulto obtenido mediante la transferencia y la

reprogramación de un núcleo de una célula somática diferenciada. Avance que abre un nuevo campo científico, especialmente para la replicación de animales transgénicos, individuos de indudable valor en biomedicina y también en producción animal, como abordaré más adelante.

3.- Biotecnologías asociadas a la Reproducción Animal.

El número de técnicas y biotecnologías asociadas a la reproducción animal utilizadas actualmente son numerosas. Desde la inseminación artificial tradicional a los últimos anuncios de obtención de espermatozoides desde células madre, se han desarrollado varias decenas de biotecnologías durante los últimos años, entre las que se encuentran la inseminación artificial, la crioconservación de gametos y embriones, la transferencia de embriones, la determinación del sexo por manipulación de espermatozoides y embriones, la producción in vitro de embriones, la transferencia nuclear o la microinyección de construcciones de ADN. Además, también se contemplan procedimientos que incluyen el análisis del genoma (secuenciación, mapeado, determinación de polimorfismos, etc.), la selección asistida por biomarcadores genéticos, el diagnóstico molecular en la identificación de características relacionadas con la reproducción, identidad genética y/o biodiversidad, la genética funcional y las modificaciones transgénicas tanto en la incorporación como en la pérdida de funciones.

De entre todo este abanico de biotecnologías, he decidido traer a este discurso cuatro de ellas, una selección que se ha basado en nuestra propia experiencia desde el grupo de investigación Reproducción Animal de la Universidad de Murcia así como en mi percepción personal de que serán, probablemente, las cuatro

biotecnologías que influirán de forma decisiva sobre la producción animal y la biomedicina humana en los próximos años. Estas son:

- Inseminación con bajo y muy bajo número de espermatozoides
- Criopreservación de gametos y embriones
- Selección de sexo por separación de espermatozoides X e Y
- Clonación y producción de animales transgénicos

3.1 Inseminación Artificial con Bajo o Muy Bajo Número de Espermatozoides

La gran ventaja que ha aportado la inseminación artificial a la ganadería ha sido el poder utilizar los mejores reproductores machos para inseminar a un número de hembras extraordinariamente alto cuando se compara con la monta natural bajo condiciones fisiológicas. A modo de ejemplo y empleando técnicas de inseminación artificial estándar, de un eyaculado de toro pueden obtenerse hasta 500 dosis de inseminación que permiten inseminar hasta 500 vacas, en vez de a una sola vaca como ocurría bajo condiciones naturales. En otra especie como el porcino, de un eyaculado se pueden realizar unas 20 inseminaciones. Si sólo se utilizan los mejores reproductores de entre la población de machos existentes, es obvio que las características de la descendencia, así como la fertilidad y prolificidad en las hembras inseminadas serán superiores a las que se obtendrían si se utilizara la totalidad de la población de machos. Del mismo modo, errores en la selección de los reproductores machos a utilizar (por ejemplo, por la errónea selección de portadores de una alteración genética o con baja capacidad fecundante), conllevaría la transmisión de defectos a la descendencia o una pérdida en la eficiencia reproductiva, con la consiguiente amplificación respecto a lo que hubiera ocurrido con la monta natural.

A modo de ejemplo, gracias a la inseminación artificial y la selección de los mejores machos reproductores, entre 1940 y 1995 se

pasó en el ganado lechero en EEUU de producir algo más de 2.000 litros por vaca y año a producir más de 7.000 litros. De tener una cabaña de casi 25 millones de vacas lecheras a necesitar algo más de 10 millones, a pesar del sustancial incremento de la población consumidora de leche (*Roberts, 2001*). Un ejemplo que generó un gran debate en España fue la compra del toro “Sultan” por el gobierno cántabro hace unos años, un ejemplar de la raza Frisona de origen canadiense y de elevado precio. Gracias a la inseminación artificial, este toro produjo más de 70.000 dosis para inseminación artificial en su corta vida reproductiva en España, lo que supuso un incremento de la calidad de la ganadería cántabra así como de la cantidad de leche producida por vaca y año. Hay que tener en cuenta que nacieron más de 20.000 vacas a partir de estas dosis. Además, sus hijos transmiten unas características productivas excepcionales a la descendencia, por lo que la elevada inversión realizada quedó amortizada a los pocos meses.

En el ganado porcino, la inseminación artificial y la selección genética han provocado un incremento importante en los rendimientos productivos de las explotaciones (casi el doble de kilos de carne producidos por explotación), así como una homogeneidad en las características fenotípicas de los animales nacidos, previamente seleccionadas acorde a las tendencias del consumidor y de las necesidades de la cadena de transformación.

Si fuera posible inseminar más hembras a partir de un solo eyaculado, el número de reproductores machos podría ser aún menor y, de este modo, la selección que podríamos realizar para escoger los mejores reproductores sería mayor. Por tanto, el poder

incrementar los rendimientos de la inseminación, con relación al número de dosis obtenidas por eyaculado, es uno de los aspectos más demandados por el sector productivo y uno de los grandes retos para los investigadores, al tener que resolver aspectos científicos y tecnológicos relacionados con el propio proceso de la fecundación así como por la necesidad de desarrollar dispositivos no invasivos que permitan aproximarnos a una situación en la que el número de espermatozoides a inseminar sea el mínimo posible.

Además, los avances obtenidos en otras biotecnologías asociadas al espermatozoide obligan a nuevos desarrollos en los procedimientos de inseminación, ya que el número de espermatozoides disponibles es limitado, como es el caso de espermatozoides separados en función del cromosoma sexual, espermatozoides usados como vectores en la producción de animales transgénicos o tras tratamientos para eliminar patógenos asociados al eyaculado.

Para tratar de buscar nuevos desarrollos, es necesario partir del concepto de que la fecundación es un hecho de probabilidad y su éxito radica en que lleguen un número suficiente de espermatozoides al sitio de fecundación, en la ampolla oviductal, en el momento en el que allí se encuentren los ovocitos. Porque, al final, el número de espermatozoides a inseminar podría ser tan bajo como un espermatozoide por ovocito, pues para que se forme un embrión solo es necesario que un espermatozoide penetre al interior del ovocito.

En condiciones fisiológicas, el macho deposita en la hembra miles de millones de espermatozoides. Tras la inseminación, ante la presencia de plasma seminal y espermatozoides, el útero de la hembra, que puede llegar a medir más de 1'5 metros en algunas especies domésticas, provoca una rápida respuesta inflamatoria en la mayoría de las especies. Espermatozoides y plasma seminal activan en las células epiteliales del endometrio la síntesis de citoquinas proinflamatorias, entre las que se encuentran factores estimulantes de colonia de macrófagos y granulocitos (GM-CSF), interleuquinas (6 y 8) y proteínas quimiotácticas. Este pico de producción de citoquinas provoca la liberación de leucocitos entre los que se incluyen macrófagos, células dendríticas y granulocitos que desde el torrente sanguíneo se extravasan y se acumulan en el estroma subepitelial. Cuando se realizan estudios inmunocitoquímicos con anticuerpos monoclonales se observa una gran actividad en CD45. Durante la primera fase, una gran población de neutrófilos migra a través de la superficie epitelial y efluye dentro de la cavidad luminal pudiéndose observar en tiempos tan cortos como 30 minutos tras la inseminación. Junto a los neutrófilos, también pueden observarse macrófagos y células dendríticas. Este proceso, que se produce en un estado en el que los niveles de estrógenos son elevados, provoca que un porcentaje muy alto de los espermatozoides quede atrapado, se elimine y no tenga posibilidad de alcanzar la ampolla oviductal, donde tiene lugar la fecundación (*Rodríguez-Martínez et al., 2005*).

Consecuentemente, el proceso fisiológico de la inseminación debe considerarse como un proceso ineficiente, aunque hay que tener en cuenta que la hipotética ineficiencia podría estar también relacionada con un proceso estricto de selección espermática para

que sólo los mejores espermatozoides alcancen el lugar de la fecundación.

El número de espermatozoides que necesitan ser inseminados artificialmente depende, por un lado, de la capacidad fecundante de los espermatozoides y, por otro, del lugar concreto en el interior del aparato reproductor de la hembra donde han sido depositados. La capacidad fecundante, además de por factores inherentes a los propios espermatozoides, puede verse alterada por las manipulaciones o el tiempo y sistema de conservación a los que se les someta. A medida que estas transgresiones debiliten a las poblaciones espermáticas, más espermatozoides deberán depositarse para asegurar la fecundación. De este modo, el desarrollo de técnicas que identifiquen, *in vitro*, la capacidad fecundante de los espermatozoides y que, por lo tanto, ayuden a predecir su potencial fértil son de gran interés (Parrilla *et al.*, 2009).

Por otro lado, el lugar de deposición seminal en el aparato reproductor femenino condiciona el éxito de la fecundación, siendo mayor éste cuando más profunda es la deposición. Consecuentemente, es necesario desarrollar procedimientos que acorten la distancia entre el lugar de deposición y el lugar de fecundación (Vázquez *et al.*, 2005). Uno de los más novedosos sistemas de inseminación, de entre los desarrollados recientemente, es el denominado inseminación intrauterina profunda, un sistema de inseminación que permite depositar los espermatozoides, por vía no quirúrgica, en la profundidad de un cuerno uterino. Profundidad en la deposición seminal que se puede alcanzar de modo sencillo en bovino o en el caso del equino mediante histeroscopia o sistemas

similares debido a la escasa longitud de los cuernos uterinos. Sin embargo, el caso del porcino es diametralmente opuesto por la extraordinaria longitud del cuerno uterino. El primer procedimiento que permitió realizar una inseminación intrauterina profunda en la cerda fue descrito en nuestro laboratorio en 1999 y patentado por la Universidad de Murcia (*Martínez et al., 2001*). Los principales obstáculos anatómicos que presenta el aparato reproductor de la cerda para realizar una inseminación profunda son la rigidez de los pliegues cervicales y la longitud y naturaleza curva de los cuernos uterinos. Para poder depositar los espermatozoides en la profundidad de un cuerno uterino (*Figura 1*), fue necesario diseñar un catéter de 1'80 metros de longitud y 4 milímetros de diámetro que permitía alcanzar la posición deseada del cuerno uterino sin dañarlo al combinar, dicho catéter, propiedades de rigidez para su empuje a través del cuello uterino y de flexibilidad para adaptarse al cuerno uterino. Esta tecnología permite aumentar entre 8 y 20 veces los rendimientos de inseminación ya que posibilita una importante reducción en el número de espermatozoides por dosis de inseminación, incrementando así el número de cerdas inseminadas a partir de un solo eyaculado, sin afectar el porcentaje de partos aunque con una ligera afectación del número de lechones nacidos por camada (*Martínez et al., 2001*). Estos resultados se han repetido en diferentes países del mundo, entre ellos España, Chile, Australia o EEUU. Entre los diferentes factores que podrían relacionarse con la ligera disminución en el número de lechones nacidos por camada se encuentran, por un lado, el incremento en las fecundaciones unilaterales (*Martínez et al., 2006*), así como un menor número de espermatozoides unidos a las zonas pelúcidas de los cigotos obtenidos tras la fecundación, lo cual sugiere que el número de espermatozoides que alcanzan el oviducto en algunas cerdas puede

ser insuficiente existiendo, además, una gran variabilidad entre cuernos uterinos. Entre los factores que pueden influir en esta variabilidad se encuentran diferencias entre hembras con relación a la contractibilidad miometrial o el grado de fagocitosis, lo cual podría repercutir sobre la incidencia de las inseminaciones unilaterales. Afortunadamente, este hecho no ocurre cuando el número de espermatozoides inseminados es de 600 millones dosis todavía 5 veces inferior a una dosis convencional de inseminación (*Martínez et al., 2006*).

Un hecho pendiente de conocer en profundidad en el uso de esta tecnología es el patrón de transporte de los espermatozoides entre los cuernos ya que la inseminación se realiza en la profundidad de un solo cuerno y, en la mayoría de los casos, los ovocitos presentes en ambos oviductos son fecundados. Basado en nuestra propia experiencia, podemos adelantar que los espermatozoides pueden alcanzar el cuerno contralateral mediante una vía intrauterina, en la gran mayoría de los casos, aunque en un porcentaje pequeño y probablemente debido a las condiciones anatómicas y fisiológicas en el momento de la ovulación, los espermatozoides son capaces de alcanzar el oviducto contralateral por migración transoviductal a través de la cavidad peritoneal (*Vázquez et al., 2005*).

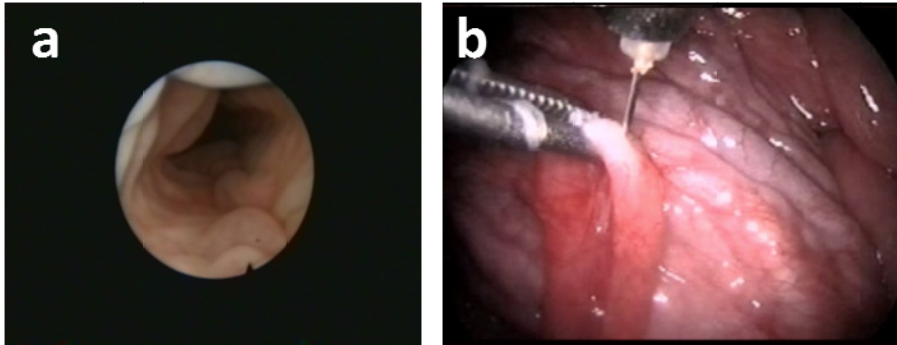


Figura 1. Procedimientos de inseminación con bajo o muy bajo número de espermatozoides en porcino. a) Imagen del interior del cuerno uterino en la posición donde se realiza la inseminación intrauterina profunda. b) inseminación laparoscópica en el oviducto.

Debido a que el número de espermatozoides a inseminar está en relación directa con la distancia existente entre el lugar de deposición y el lugar de fecundación, si es posible depositar los espermatozoides en las proximidades del oviducto o en el propio oviducto, el número de espermatozoides a inseminar puede reducirse drásticamente. Aunque con la inseminación intrauterina profunda, es posible reducir sensiblemente el número de espermatozoides por dosis de inseminación, es posible reducirlo aun más mediante la inseminación laparoscópica. La inseminación laparoscópica es una técnica mínimamente invasiva utilizada habitualmente en ovino por la dificultad de atravesar el cuello uterino pero raramente empleada en otras especies. Esta técnica puede permitir la deposición de los espermatozoides en el oviducto

de modo que puede disminuirse extraordinariamente el número de espermatozoides inseminados (*Figura 1*). Esta tecnología incrementaría extraordinariamente la eficiencia en la inseminación de espermatozoides especialmente tratados, como es el caso de espermatozoides seleccionados en base a su cromosoma sexual y cuya producción es muy limitada.

Actualmente, la laparoscopia es la única vía para inseminar un número muy bajo de espermatozoides en especies como el porcino. Nuestra experiencia demuestra que, en la metodología que desarrollamos en 2005 para la inseminación laparoscópica en el porcino y patentado por la Universidad de Murcia, con tan solo 0'3 millones de espermatozoides por oviducto se pueden obtener camadas muy numerosas y solo cuando se insemina con 1 millón, aparece un fenómeno indeseado denominado polispermia, que se caracteriza por la presencia de más de un espermatozoide en el interior del ovocito, produciendo la degeneración del embrión en sus primeros estadio de desarrollo (*Vázquez et al., 2008*). Utilizando este protocolo, hemos obtenido nacimientos tras la inseminación de espermatozoides separados por citometría de flujo en base al cromosoma sexual (*Vázquez et al., 2009*).

Uno de los aspectos más interesante que afecta a los resultados de esta técnica es la extraordinaria fisiología que compete al oviducto y consecuentemente al fluido oviductal donde tiene lugar el encuentro entre ovocitos y espermatozoides, la fecundación, la formación del cigoto y el desarrollo embrionario en sus primeros estadios. El estado en el desarrollo de los folículos ováricos y su efecto sobre el nivel de hormonas esteroideas presentes en el

oviducto es capaz de modular la penetración espermática de los ovocitos. Asimismo, hemos observado cómo la presencia de espermatozoides y/o de ovocitos, capaces de activar y desactivar determinados genes en las células endoteliales del oviducto, modulan los niveles de determinadas proteínas relacionadas con la fecundación (Georgiou *et al.*, 2007). Al menos en el caso de la cerda, y probablemente en hembras de otras especies, se produce una señalización específica cuándo los espermatozoides alcanzan los oviductos, provocando la liberación de proteínas que protegen a los espermatozoides y facilitan una fertilización correcta. Estas observaciones que obtuvimos en el 2007 junto a colegas de la Universidad de Sheffield, pueden ayudar a entender mejor el proceso de fertilización en las diferentes especies, así como a mejorar los sistemas de fecundación *in vitro*. De 32 proteínas reguladas por los gametos, al menos 19 duplicaban su concentración en presencia de las células espermáticas, proteínas que, además, son capaces de incrementar la vida fértil de los espermatozoides en el oviducto. Estas proteínas, que afectan directamente a la viabilidad de los espermatozoides, son complementarias a las que tienen unidas los espermatozoides a la membrana plasmática, la mayoría de ellas procedentes del plasma seminal y en algunos casos, como en las espermadhesinas en porcino, se ha demostrado su papel como estabilizadoras de la membrana plasmática frente a otras, que también proceden del plasma seminal como las HBP (Heparin-Binding-Proteins), las cuales inducen procesos de desestabilización espermática (Caballero *et al.*, 2008).

3.2. Criopreservación de Gametos y Embriones

Conservar gametos y embriones que retengan adecuadamente en el tiempo su potencial fértil y de desarrollo, respectivamente, ha sido y sigue siendo uno de los grandes retos de la ciencia. Aunque hoy en día dicha posibilidad existe en una serie de especies gracias a protocolos adecuados de criopreservación, en otras especies, por diferentes motivos, no ha sido posible aun desarrollar una metodología adecuada. La criopreservación es un proceso diseñado para conservar células o tejidos a muy bajas temperaturas, generalmente a -196°C , temperatura a la que el nitrógeno líquido, medio en el que se conservan las células o tejidos, alcanza el punto de ebullición. Las células o tejidos correctamente congelados y mantenidos a -196°C , ven disminuido su metabolismo, encontrándose en un estado de vida suspendida por tiempo indefinido. A esas bajas temperaturas, cualquier actividad biológica, incluidas las reacciones bioquímicas que producirían la muerte de una célula, quedan detenidas. Una vez descongeladas, las células o tejidos son capaces de recuperar su actividad biológica. En este sentido existen resultados de nacimientos procedentes de dosis espermáticas o embriones conservados en congelación durante decenas de años.

La importancia de la criopreservación en gametos y embriones en especies animales responde a varios propósitos que se definen en tres áreas importantes: la producción animal, la implantación de las denominadas nuevas biotecnologías

reproductivas y la conservación de la diversidad genética (Roca et al., 2006a).

En cuanto a la producción animal, el uso de espermatozoides y embriones criopreservados permite rentabilizar al máximo todas y cada una de las posibilidades que ofrece la inseminación artificial y la transferencia de embriones como herramientas para mejorar los rendimientos productivos tanto en las granjas de producción como en aquellas destinadas a la mejora genética. La criopreservación de gametos y embriones permite 1) cubrir las limitaciones inherentes que tiene la técnica cuando se utiliza con semen y embriones frescos así como rentabilizar al máximo los reproductores de gran valor genético; 2) la creación de bancos de germoplasma y/o embriones, fomentando el comercio internacional y la introducción de nuevas líneas genéticas con un mínimo riesgo de transmisión de enfermedades; 3) responder a las necesidades de las explotaciones ganaderas en aquellas situaciones en las que se prohíbe la movilidad de los animales, situaciones desgraciadamente frecuentes y normalmente relacionadas con brotes infecciosos.

Con relación a la implantación de las nuevas biotecnologías reproductivas, la criopreservación de gametos y embriones juega hoy en día un papel fundamental en el desarrollo aplicativo de diferentes biotecnologías emergentes, tales como la preselección y la selección del sexo de la descendencia. Finalmente, y respecto a la conservación de la diversidad genética, actualmente existen diversas opciones, y de entre ellas la criopreservación es el único procedimiento que permite conservar germoplasma y embriones durante largos periodos de tiempo, probablemente incluso por periodos ilimitados,

lo que la convierte en una herramienta indispensable en la conservación de especies en peligro de extinción.

Aunque históricamente las primeras aportaciones a la criobiología de gametos las realizara el italiano Lázaro Spallanzani, quién en 1776 demostrara que los espermatozoides enfriados en nieve eran capaces de sobrevivir cuando se calentaban, no es hasta mediados del siglo XX cuando se publican los primeros protocolos de criopreservación espermática. Entre ellos, el descubrimiento del glicerol como crioprotector en el proceso de congelación, supuso uno de los principales avances de la técnica (*Polge et al., 1949*). Este avance dio lugar a que ya en 1951 nacieran los primeros terneros procedentes de vacas inseminadas con semen congelado-descongelado, nacimientos que han ido sucediéndose hasta el punto que hoy en día y a nivel mundial, la práctica totalidad de las vacas de producción lechera, se reproducen por inseminación artificial con semen criopreservado.

Desgraciadamente la buena respuesta mostrada por los espermatozoides de vacuno al proceso de criopreservación, no ha podido ser todavía alcanzada en otras especies, incluidas aquellas que tienen también gran interés zootécnico. Esta diferente realidad entre especies ha sido y es todavía uno de los grandes enigmas que encierra la criobiología, no solo para los espermatozoides sino también para los ovocitos y embriones. Los intentos para elucidar ésta y otras cuestiones relacionadas con la criopreservación de gametos y embriones fueron resueltos parcialmente por el criobiólogo estadounidense Peter Mazur, quién debe ser considerado uno de los padres de la criobiología celular, al desarrollar importantes

principios físicos que explican la respuesta celular al proceso de congelación y descongelación, un claro ejemplo de que, solo mediante la generación de conocimiento en proyectos de investigación básica es posible aplicarlos de un modo eficiente y seguro. Es particularmente relevante su teoría de los dos factores (Two-factors hypothesis) con la que demuestra la importancia de las velocidades de congelación y descongelación para la posterior supervivencia celular (*Mazur, 1984*). Teoría que, en síntesis, pone en evidencia que una inadecuada velocidad de congelación es nociva para la célula, bien porque induce la formación intracelular de cristales de hielo, cuando es muy rápida, o bien porque provoca un efecto tóxico por la elevada concentración intracelular de solutos, cuando es demasiado lenta. Los estudios de Mazur y de otros eminentes criobiólogos demuestran que hay diferencias biofísicas significativas entre los espermatozoides de las diferentes especies, especialmente relevantes tanto en el área y volumen celular como en la permeabilidad de sus membranas. Actualmente, y gracias a los conocimientos biofísicos y también a los bioquímicos, se pueden desarrollar protocolos de criopreservación ajustados a las características específicas de los espermatozoides de cada especie animal. En este sentido, los espermatozoides de cerdo son especialmente sensibles a la criopreservación, hecho relacionado con la peculiar composición lipídica de sus membranas, composición caracterizada por un bajo contenido en colesterol y una elevada proporción de ácidos grasos polinsaturados (*Parks y Lynch, 1992*). Con el objetivo de mejorar la crio-resistencia de los espermatozoides de porcino se han desarrollado y se siguen desarrollando numerosas investigaciones todas ellas dirigidas hacia tres aspectos fundamentales: 1) optimizar los protocolos de criopreservación, 2) conocer y minimizar las diferencias de crio-sensibilidad espermática

entre reproductores y 3) diseñar estrategias eficientes para un uso rentable de los espermatozoides criopreservados en los programas comerciales de inseminación artificial.

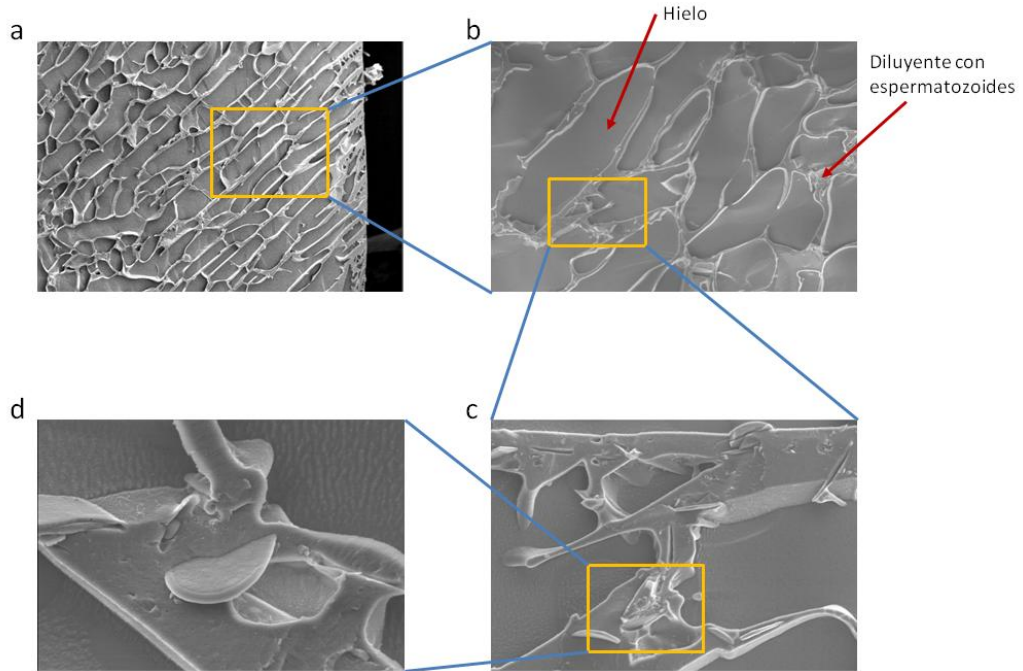


Figura 2. Imágenes de espermatozoides de porcino congelados en pajuelas de 0'5 ml obtenidas por crio-microscopía electrónica en las que podemos observar un corte de la pajuela congelada (a), destacando los lagos de hielo (b) y las venas con el diluyente y los espermatozoides (c y d). (en colaboración con la Universidad de Uppsala, Suecia).

En los últimos años se han obtenido importantes avances en los protocolos de criopreservación que han permitido mejorar la calidad espermática post-descongelación. La estandarización de curvas de congelación adecuadas al perfil biofísico y bioquímico de

espermatozoides en diferentes especies, junto con la incorporación de envases más funcionales para empaquetar las dosis espermáticas o la utilización de biocongeladores programables han sido avances que han contribuido a mejorar notablemente la crioresistencia espermática, particularmente en especies muy sensibles como los espermatozoides de porcino (*Rath et al., 2009*). En este sentido, avances tales como que: 1) la velocidad de descongelación puede tener una mayor implicación que la de congelación en explicar el criostrés sufrido por los espermatozoides, 2) que largos periodos de incubación de los espermatozoides antes de la congelación con su propio plasma seminal pueden mejorar su crioresistencia, 3) que los envases de 0'5 ml posibilitan una congelación homogénea de espermatozoides de porcino, al conseguir en todo su volumen una distribución proporcional de los lagos de hielo y de las venas espermáticas (*Figura 2*) o, 4) que la adición de antioxidantes mejora la calidad de los espermatozoides postdescongelación han sido algunas de nuestras aportaciones a la mejora de los protocolos de criopreservación (*Roca et al., 2006b*).

Es común en todas las especies domésticas la existencia de diferencias individuales en la respuesta de los espermatozoides al proceso de criopreservación (*Holt et al., 2005*). Este fenómeno, conocido como criosensibilidad individual, se caracteriza porque los eyaculados de diferentes sementales, con características aparentemente similares al realizar el espermiograma antes de la congelación, y criopreservados bajo las mismas condiciones, exhiben diferencias significativas en la calidad espermática postdescongelación. Esta variabilidad individual, junto al hecho que los espermatozoides de los diferentes eyaculados de un mismo semental muestran casi siempre una misma criosensibilidad, permite clasificar

objetivamente a los reproductores como “buenos”, “moderados” o “malos” criopreservadores espermáticos. En los verracos, junto con los sementales equinos, es particularmente relevante este fenómeno. Nuestro grupo de investigación ha demostrado que el verraco, como individuo, es el principal factor que explica la importante variabilidad entre eyaculados en la congelabilidad espermática observada en la especie porcina como también sucede en fecundación in vitro (Gil *et al.*, 2008); y que dicha condición, ser un buen o mal criopreservador espermático, suele mantenerse constante a lo largo de la vida productiva del verraco (Roca *et al.*, 2006c). También hemos contribuido a cuantificar la incidencia de “malos” criopreservadores espermáticos entre los verracos presentes en los centros de inseminación artificial, condición que poseen entre el 20 y el 30% del total y que podemos fácilmente identificar con un test de congelabilidad (Roca *et al.*, 2006a, 2006b, Hernández *et al.*, 2007b). Entre las razones que pueden explicar esta variabilidad se encuentran diferencias genéticas entre los sementales que muestran una persistente buena y mala congelabilidad espermática. Mediante la utilización de marcadores AFLP (Amplified Fragment Length Polymorphism), se han identificado en la especie porcina un total de 16 marcadores AFLP ligados a genes que se correlacionan con la criosupervivencia espermática (Thurston *et al.*, 2002). Estos marcadores señalan la existencia de polimorfismos en regiones específicas del genoma porcino que se correlacionan con la variación en la supervivencia espermática a la descongelación. Estas diferencias genéticas podrían verse reflejadas tanto por una distinta composición lipídica o proteica de las membranas espermáticas así como por variaciones en la composición del plasma seminal. Respecto a esta última posibilidad, hemos observado que el plasma

seminal condiciona la respuesta de los espermatozoides de porcino a la criopreservación (*Hernández et al., 2007a*).

La inseminación artificial con semen congelado presenta una gran variabilidad en los resultados dependiendo de la especie. Esta circunstancia se traduce en que los espermatozoides criopreservados son muy utilizados en inseminación artificial en especies como el vacuno, como se ha descrito anteriormente, y apenas utilizados en otras, como el porcino, debido a sus bajos rendimientos y resultados. La criopreservación produce cambios bioquímicos en los espermatozoides, dependiendo de la especie, que limitan su funcionalidad y capacidad fecundante, situación que puede amplificarse por la estructura y longitud del aparato reproductor femenino. Un estudio realizado en EEUU hace más de 30 años (*Pursel et al., 1978*) demostraba que los espermatozoides criopreservados de porcino colonizaban el reservorio oviductal en una proporción de 1 a 4 con relación a los frescos tras la inseminación tradicional, es decir, tras la deposición de los espermatozoides en el cuello uterino. A pesar de esta realidad, las mejoras introducidas desde entonces en los protocolos de criopreservación, junto con la mejor calidad espermática alcanzada a la descongelación gracias a la selección de verracos buenos congeladores, han contribuido significativamente en la mejora de los resultados de fertilidad y prolificidad del semen criopreservado de porcino empleado en los programas comerciales de inseminación artificial. Como ejemplo, eyaculados criopreservados en nuestro laboratorio, posteriormente exportados al Canadá y empleados en programas de inseminación para mejora genética, alcanzaron tasas de partos superiores al 85% con más de 12 lechones nacidos por camada, resultados similares a los que se obtendrían con

espermatozoides no criopreservados, si bien utilizando una dosis de 6 mil millones de espermatozoides.

Uno de los principales aspectos que ha contribuido al desarrollo e inicio de la implantación de esta metodología en las granjas ha sido su empleo conjunto con sistemas de inseminación intrauterina profunda. Utilizando este sistema de inseminación es posible obtener altas tasas de fertilidad y prolificidad inseminando con un reducido número de espermatozoides. Así, con tan sólo 1.000 millones de espermatozoides congelados-descongelados se pueden obtener porcentajes de partos del 75-80% con camadas de más de 10 lechones (*Roca et al., 2003*) aunque existe una gran variabilidad en función del tiempo de inseminación y momento de ovulación así como de la estación (*Bolarin et al., 2006, 2009*). Esta enorme reducción de espermatozoides por dosis de inseminación (de 6.000 a 1.000 millones) sin una afectación significativa para la fertilidad y prolificidad, permite una eficiente rentabilidad de los machos reproductores, condición indispensable para el empleo rentable de los espermatozoides criopreservados en los programas comerciales de inseminación artificial.

Junto a la congelación de espermatozoides, la congelación de embriones representa otra de las biotecnologías de gran importancia en reproducción animal. En 1973, *Wilmot y Rowson* obtuvieron la primera gestación tras la transferencia de embriones bovinos congelados y descongelados. Desde entonces, se han realizado numerosas investigaciones con el fin de optimizar esta tecnología y adaptarla a diferentes especies habiéndose conseguido descendencia viva tras la transferencia de embriones criopreservados en muchas

de ellas. Sin embargo, mientras que en algunas especies de animales domésticos la congelación de embriones es hoy en día un procedimiento que se emplea de forma rutinaria en los programas de transferencia de embriones, la aplicación de esta tecnología en otras especies, como es el caso del porcino, es muy limitada. Los embriones de cerdo, al igual que los espermatozoides, presentan una elevada sensibilidad al frío, limitando su capacidad para soportar la mayoría de los métodos convencionales de criopreservación (*Martinat-Botté et al., 2006*). Muchas investigaciones se han centrado sobre el elevado contenido lipídico de los embriones porcinos y su relación con la sensibilidad hipotérmica de los mismos, utilizando metodologías complejas de extracción de lípidos del interior del ovoplasma. Se han realizado diferentes estudios sobre la supervivencia de los embriones porcinos sometidos a los programas convencionales de congelación (congelación lenta), pero en ninguno de ellos se ha obtenido una eficiencia similar a la alcanzada en otras especies. En los últimos años la vitrificación se presenta como una alternativa a los métodos tradicionales de criopreservación con resultados muy interesantes.

Desde un punto de vista físico, la vitrificación es la solidificación de una solución a bajas temperaturas, no por la cristalización del agua sino por la extrema elevación de la viscosidad del medio durante el enfriamiento. El medio forma una especie de vidrio amorfo como consecuencia del rápido enfriamiento que se obtiene al sumergir directamente los embriones en nitrógeno líquido. Así, los embriones no se exponen al daño físico asociado a la formación de cristales de hielo. Para conseguir esto, es necesario emplear una alta concentración de crioprotectores, cuyo efecto tóxico es atenuado por la adición de sacarosa y por el corto tiempo

que transcurre entre la adición del crioprotector y la congelación. La vitrificación clásica se efectúa en pajuelas estándar de inseminación (0'25 ml) y permite una velocidad de enfriamiento de 2.500°C/min (Mazur *et al.*, 1992). En 1997 se publicó una técnica que permite vitrificar a los embriones en un reducido volumen de medio (2 µl) y conseguir una velocidad de enfriamiento de 18.000°C/min muy superior al procedimiento clásico. Este método se ha utilizado con éxito para vitrificar ovocitos y embriones en bovino y se han alcanzado altas tasas de supervivencia *in vitro* tras la vitrificación de embriones de otras especies, incluyendo la especie porcina. La mayor velocidad de enfriamiento parece ser la clave que protege a los embriones porcinos de los efectos del frío, siendo una técnica eficiente en estadio de mórulas, blastocisto e incluso estadios más tempranos de desarrollo (Cuello *et al.*, 2007) y que permite obtener lechones viables después de la vitrificación y transferencia de embriones. Desde nuestro grupo de investigación hemos contribuido al desarrollo de esta tecnología mediante el estudio de diferentes velocidades de congelación sobre la supervivencia de los embriones. Asimismo, se ha desarrollado un procedimiento de descongelación directa en combinación con la transferencia no quirúrgica de los embriones y se han obtenido los primeros lechones nacidos a partir de embriones vitrificados y descongelados en una sola etapa (Cuello *et al.*, 2005). Sin embargo, aunque la criopreservación de los embriones porcinos es hoy una realidad y alguna de las aplicaciones de esta tecnología se pueden utilizar en la actualidad (banco de genes), se necesitan realizar más investigaciones para aumentar los rendimientos del procedimiento en términos de fertilidad y prolificidad, principalmente asociadas al desarrollo de sistemas de transferencia de embriones a las hembras receptoras por vía no quirúrgica (Martinez *et al.*, 2004).

3.3. Preselección del Sexo por Separación de Espermatozoides

La posibilidad de elegir el sexo de la descendencia, antes de la concepción, ha sido uno de los objetivos más perseguidos dentro del campo de la tecnología de la reproducción, ya que supone poder controlar una serie de situaciones que de otra manera dependen únicamente del azar (*Maxwell et al., 2004*). Entre estas aplicaciones se encuentran la mejora genética y la optimización de la producción en las explotaciones ganaderas (por ejemplo en producción de vacuno de leche), el control de enfermedades hereditarias ligadas al cromosoma sexual o el manejo de especies en cautividad y la recuperación de animales salvajes. Además, esta tecnología tiene una gran aplicación asociada a otras biotecnologías como es la transgénesis (*Seidel 2007*).

Realizar la determinación del sexo antes de la concepción (preselección del sexo) es, sin duda alguna, el método más eficiente para obtener descendencia del sexo deseado. El modo en el que se produce la determinación sexual y consecuentemente el número de machos y hembras que nacen en una población es dependiente de las especies. En ocasiones la dotación homocigótica está vinculada al macho mientras que en otras especies está vinculada a la hembra. Además de otras posibilidades de combinaciones cromosómicas en la determinación del sexo, éste puede incluso ser dependiente de las condiciones medioambientales y poblacionales. Estas características determinan el porcentaje de animales con sexo masculino y animales

con sexo femenino. En mamíferos, teniendo en cuenta que la dotación cromosómica haploide del ovocito está siempre ligada al cromosoma X, resulta evidente que la determinación sexual del individuo depende del espermatozoide que fecunde ese ovocito, de tal manera que si el espermatozoide es portador de un cromosoma X, dará lugar a una hembra (XX) y si es portador del cromosoma Y, a un macho (XY).

Por consiguiente, la separación de los espermatozoides desde la población original (que contiene, aproximadamente, un 50% de espermatozoides X y otro 50% de espermatozoides Y) en dos subpoblaciones, cada una de ellas solo con espermatozoides con uno de los dos cromosomas (X o Y), determinaría que todos los animales nacidos tras la inseminación de cada una de las subpoblaciones tendrían el sexo de las subpoblaciones empleadas. Para ello, se han descrito numerosos procedimientos de separación basados en posibles diferencias en las características físicas como el tamaño, la forma, la densidad o en características proteicas diferenciales de la membrana plasmática entre los espermatozoides X e Y, o incluso en diferencias inmunológicas. Sin embargo, y debido a que estas diferencias son difíciles de cuantificar con exactitud, no se han conseguido procedimientos de separación satisfactorios. En la actualidad, el único método reproducible para predeterminar el sexo de la descendencia se fundamenta en la separación de los espermatozoides que cuentan en su dotación cromosómica con el cromosoma X de aquellos que tienen el cromosoma Y mediante técnicas de citometría de flujo que identifican la cantidad de ADN presente y permiten su posterior separación en función de la misma.

La existencia de los cromosomas sexuales era conocida desde principios del siglo XX. Sin embargo, la posibilidad de diferenciar los espermatozoides en función del cromosoma sexual que presentan no fue posible hasta finales de los años 70 cuando se demostró, mediante la observación de los cariotipos, la existencia en los mamíferos de diferencias evidentes en cuanto a la cantidad de ADN presente entre los espermatozoides portadores del cromosoma X y los portadores del cromosoma Y. Esta diferencia se debe al mayor tamaño que presenta el cromosoma X en relación al Y, siendo la única diferencia cuantificable y válida, a día de hoy, como base para la separación efectiva de los espermatozoide X e Y. La diferencia de ADN entre un espermatozoides X e Y, que no es igual entre las especies, es de un 7'5% en el caso de las chinchillas y de, solamente un 2'8% en el caso de los espermatozoides humanos. Las especies de interés productivo se encuentran entre estos dos límites siendo de un 3'6% en el caso del verraco, 3'7% para caballos, 3'8% para toros y 4'2% para moruecos (*Seidel, 2007*).

Los citómetros de flujo con separadores celulares son instrumentos capaces de identificar y separar células en base a determinadas características que las diferencien, como puede ser la cantidad de ADN presente en la célula e identificada mediante el empleo de fluorocromos específicos. Sin embargo, el análisis del contenido de ADN de los espermatozoides de la mayoría de los mamíferos domésticos mediante citometría de flujo resulta más complicado que en otros tipos celulares debido al elevado grado de compactación de la cromatina y a la morfología plana que presenta la cabeza espermática.

Las características morfológicas de los espermatozoides determinan una gran variabilidad en las señales emitidas por los mismos cuando son teñidos con determinados fluorocromos y excitados por el impacto de un láser, dando lugar a distribuciones de fluorescencia irregulares que se corresponden con coeficientes de variación más elevados (superiores al 5%) que la propia diferencia en el contenido de ADN. En el año 1982, Pinkel et al. demostraron que las poblaciones de espermatozoides X e Y podían ser identificadas utilizando un citómetro de flujo capaz de controlar la posición de los espermatozoides durante el análisis. Para ello, hubo que realizar una serie de modificaciones sobre un citómetro separador estándar, basadas en cambios en los detectores de fluorescencia que permitieran el análisis simultáneo de fluorescencia de células aplanadas complejas como son los espermatozoides y, en segundo lugar, la instalación de dispositivos que permitieran orientar la posición de las células en el momento del análisis (agujas especiales que posteriormente fueron sustituidos por cámaras orientadoras) (Garner y Seidel, 2008).

El desarrollo de esta tecnología y el hecho de que el fluorocromo Hoechst 33342 fuera capaz de atravesar fácilmente la membrana de los espermatozoides vivos produciendo una fluorescencia proporcional al contenido de ADN, sin afectar a la motilidad de los mismos, permitió en 1989 separar espermatozoides vivos y la obtención de camadas a partir de los espermatozoides separados, tanto portadores del cromosoma X, como portadores del cromosoma Y (Johnson et al., 1989).

El proceso de separación de espermatozoides X e Y incluye, en primer lugar, la tinción de los espermatozoides con Hoechst 33342, un fluorocromo no intercalante de ADN, a concentraciones en las que se ha demostrado que no genera ningún efecto citotóxico ni mutagénico sobre los espermatozoides (Parrilla *et al.*, 2004). Las células teñidas son transportadas entonces, en el citómetro de flujo, en el interior de un chorro de fluido continuo, hacia un punto en el que les impacta, individualmente, un haz de láser ultravioleta (351-364 nm) a 175 mW. La fluorescencia emitida por los espermatozoides es medida entonces por los fotodetectores y analizada electrónicamente para la identificación de espermatozoides X e Y. Tan pronto como los espermatozoides son analizados dentro de un chorro continuo (unos 20.000 espermatozoides por segundo), el chorro es roto en pequeñas gotas que deben contener, cada una, un espermatozoide identificado como portador de un cromosoma X o un cromosoma Y. Las gotas son cargadas eléctricamente y separadas por atracción eléctrica al pasar por unas placas deflectoras de alto voltaje y posteriormente recogidas en tubos. En estos momentos es posible separar unos 6.000 espermatozoides por segundo con una pureza superior al 90% cuando se evalúa la pureza mediante técnicas de hibridación *in situ* (Parrilla *et al.*, 2003) (Figura 3). La dificultad de la separación de espermatozoides X e Y radica en su complejidad morfológica así como en la diferencia en la cantidad de ADN entre ambos tipos de espermatozoides, factores dependientes en ambos casos de la especie.

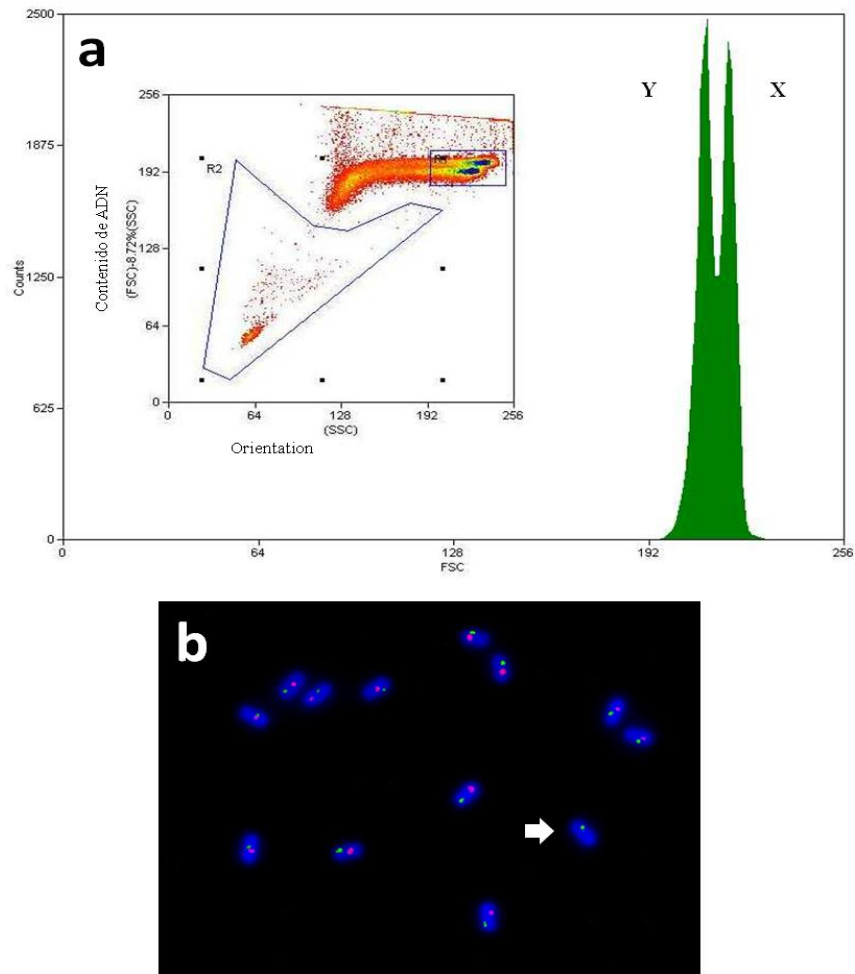


Figura 3. Separación de espermatozoides X e Y mediante citometría de flujo. a) Análisis mediante citometría de flujo (dot-plot e histograma) de poblaciones de espermatozoides X e Y; b) Hibridación in situ de espermatozoides separados mediante citometría de flujo con sondas para cromosoma 1 (verde) y cromosoma X (rosa). La flecha indica el único espermatozoide Y (ausencia de sonda rosa).

Tras la inseminación con espermatozoides separados por citometría de flujo en base al cromosoma sexual, se ha obtenido descendencia en más de una decena de especies animales incluyendo, además de la humana, especies domésticas tales como bovina, porcina, cunícola, équina, ovina o felina y animales no domésticos como búfalos, ciervos o delfines. En nuestro laboratorio, hemos obtenido descendencia de sexo deseado en cerdos y en la actualidad se encuentran gestantes varias ciervas inseminadas con espermatozoides sexados y congelados posteriormente para su almacenamiento y transporte.

Sin embargo, la separación de espermatozoides mediante citometría de flujo presenta todavía una serie de inconvenientes que en estos momentos están siendo abordados por diferentes laboratorios del mundo incluido el nuestro. Entre las etapas más críticas en el proceso se encuentra la tinción de los espermatozoides, su exposición a un láser de alta potencia, las altas presiones en el sistema de separación o el alto grado de dilución (>1:20.000) que inducen a los espermatozoides a un lavado celular que les provoca un estado similar al de capacitación espermática (*Maxwell et al., 1999*). Estos cambios provocan una cadena de acontecimientos que incluyen la reacción acrosómica espontánea, con la consecuente pérdida de capacidad fecundante y, finalmente, la muerte celular. Gran parte de estos efectos adversos se deben a la pérdida de factores proteicos decapacitantes y estabilizadores presentes en la membrana plasmática de los espermatozoides y procedente del plasma seminal que implican modificaciones en los patrones de motilidad, viabilidad e integridad funcional de los espermatozoides separados (*Caballero et al., 2008*). El restablecimiento de la estabilidad de los espermatozoides separados puede alcanzarse, al menos

parcialmente, mediante la adición de plasma seminal o proteínas estabilizadoras de la membrana plasmática de los espermatozoides como son las espermadhesinas PSP-I/PSP-II en el caso de espermatozoides de cerdo (*Caballero et al., 2009*).

A pesar del incremento en el número de espermatozoides separados por unidad de tiempo alcanzado en los últimos años, dicho número es todavía muy bajo, siendo el factor limitante para el empleo comercial de los espermatozoides separados en los programas de inseminación artificial en la especie porcina. Por este motivo se pensó que, si se desarrollaba un procedimiento adecuado de fecundación in vitro y posterior transferencia de los embriones producidos, éste podría ser el método más eficiente para obtener descendencia de sexo deseado. La producción in vitro de embriones es posible hoy en día, bien a través de técnicas convencionales de fecundación in vitro, bien a través de técnicas de inyección intracitoplasmática de un espermatozoide (ICSI). Los primeros resultados con espermatozoides sexados se obtuvieron en 1993 en bovinos, con una buena tasa de nacimientos tras la transferencia (*Garner y Seidel, 2008*). Esta tecnología se sigue utilizando en bovinos, aunque en condiciones muy concretas como es el caso de algunas vacas de alto valor genético. En otras especies, los rendimientos de la producción in vitro de embriones son muy bajos, como es el caso del porcino, debido a la alta tasa de polispermia que presentan los sistemas de fecundación in vitro (*Martinez et al., 2005*) aunque se han obtenido nacimientos experimentales tanto por fecundación in vitro convencional como por ICSI.

No cabe duda que el método ideal de utilización práctica de los espermatozoides separados sería el que empleara la inseminación artificial al tiempo que necesitara un muy bajo número de espermatozoides, consiguiendo altos porcentajes de gestaciones. Para ello, hay que desarrollar nuevas estrategias y protocolos. En el ganado vacuno, la inseminación artificial de espermatozoides sexados es una técnica de la que se tiene abundante información en cuanto a que son varias decenas de miles las vacas inseminadas con semen separado con un sistema de comercialización consolidado, especialmente en EEUU. Los resultados obtenidos en esta especie con espermatozoides sexados y, posteriormente congelados, muestran que se pueden obtener unos porcentajes de gestaciones prácticamente similares a cuando se insemina con espermatozoides no sexados, depositando 2 millones de espermatozoides (*De Vries et al., 2008*). Los productores de vacuno en EEUU y en algunos otros países pueden ya adquirir comercialmente dosis de espermatozoides sexados procedentes de toros de la mejor genética para los programas de la inseminación a desarrollar en sus propias ganaderías. Recientemente, los medios de comunicación han publicado el efecto que está suponiendo la utilización de esta tecnología en EEUU ya que ha incrementado significativamente el número de vacas lecheras altamente productoras, lo que ha provocado, junto a otros factores, una inestabilidad temporal del mercado de leche pero que, sin duda, generará una producción más eficiente en los próximos años.

En el resto de las especies los resultados son aun experimentales, si bien es probable que se obtengan procedimientos adecuados para su empleo comercial en un futuro próximo. Con relación al ganado porcino y debido a que las inseminaciones

convencionales se realizan con 3 mil millones de espermatozoides, conseguir una dosis de inseminación con tan alto número de espermatozoides mediante citometría de flujo requeriría 15 días de trabajo ininterrumpido. Tras el desarrollo en nuestro laboratorio del procedimiento de inseminación intrauterina profunda anteriormente descrito, se empezaron a realizar en el año 2002 las primeras inseminaciones con espermatozoides separados mediante citometría de flujo, alcanzándose, por primera vez en el mundo, gestaciones y partos por vía no quirúrgica en cerdas con ovulación inducida inseminadas utilizando, tan sólo, 70 millones de espermatozoides (Vázquez *et al.*, 2003). Posteriormente y utilizando la misma metodología, se han descrito nacimientos de lechones de sexo deseado en otros países (Johnson *et al.*, 2005).

Sin embargo, el número de espermatozoides, aunque extraordinariamente bajo comparado con el de una dosis de inseminación convencional, es todavía extraordinariamente alto para la capacidad actual de separación de los citómetros. Frente a la inseminación intrauterina profunda, la inseminación mediante laparoscopia en el oviducto es una alternativa para incrementar la eficiencia en el uso de los espermatozoides sexados, al menos en especies como la porcina. La laparoscopia es un procedimiento mínimamente invasivo y que desde el año 2005 venimos desarrollando mediante el ensayo de protocolos que permitan su empleo en el ganado porcino inseminando con tan sólo 300.000 espermatozoides (una dosis 10.000 veces inferior a la convencional) (García *et al.*, 2007). Tras la obtención de los primeros partos con carácter experimental (Vázquez *et al.*, 2009), en la actualidad estamos asistiendo al nacimiento de más de 100 lechones hembras obtenidos mediante este procedimiento, demostrando el potencial

uso comercial de esta biotecnología en porcino, siendo, en nuestra opinión, el único procedimiento para inseminar con un número muy bajo de espermatozoides.

En ocasiones se ha descrito una reducción en las tasas de gestación así como en los tamaños de camadas. La causa principal de esta reducción en la fertilidad de los espermatozoides separados todavía debe ser determinada aunque, evaluando el intercambio de cromátidas hermanas y las roturas cromosómicas, no se han detectado hasta el momento daños en el ADN (Parrilla et al., 2003). El aumento en la pérdida de embriones en estadios tempranos de la gestación observado ocasionalmente podría estar relacionado con el momento de la inseminación en relación con el momento de la ovulación o con la reducida vida funcional de los espermatozoides separados en el tracto genital femenino, al menos, en especies polísticas como la especie porcina.

Finalmente, la criopreservación de espermatozoides sexados es un éxito en especies como el vacuno. Es más, recientemente se han descrito técnicas que permiten separar por citometría de flujo espermatozoides congelados-descongelados y, después de la separación volverlos a congelar de nuevo (Maxwell et al., 2007). Sin embargo, en el caso de otras especies, como el porcino, poder congelar espermatozoides sexados es todavía un reto. La combinación de un procedimiento de inseminación con bajo número de espermatozoides y la criopreservación de espermatozoides sexados permitirá aproximar esta biotecnología al mundo productivo al poder disociar temporal y espacialmente los laboratorios de separación celular de los centros de inseminación artificial, donde se

recogen los eyaculados, y de las granjas de producción, donde deben realizarse las inseminaciones.

3.4. Clonación y Producción de Animales Transgénicos

Dependiendo de la edad del diccionario, la definición de clonación biológica ha variado sustancialmente y se ha ido adaptando a los avances biotecnológicos acaecidos en los últimos tiempos. Hoy, en general, se acepta que un clon es una réplica genética exacta de una molécula de ADN, de una célula, tejido u órgano, o de un organismo animal o vegetal. También se considera un clon al organismo que presenta el mismo genoma nuclear que aquel del cual procede. En condiciones naturales se producen células genéticamente idénticas por división mitótica a partir de una célula original. En condiciones naturales, en muchas especies de mamíferos se producen gemelos idénticos como consecuencia de la partición o fragmentación de un embrión temprano. Un caso comúnmente referido es el del armadillo, donde el nacimiento de cuatro gemelos procedentes de un único embrión es un hecho bastante frecuente. Sin embargo, estos gemelos, que son genómicamente idénticos entre sí, no son idénticos a sus progenitores por lo que este proceso recibe el nombre de gemelación natural y no el de clonación en sentido estricto.

Como los animales superiores no se reproducen asexualmente, la única forma de lograr la obtención dirigida de copias genéticamente idénticas es mediante métodos artificiales. Existen tres métodos para lograr dichas copias: la separación de blastómeros de un embrión en estadio de 2-8 células, la bisección de blastocistos y la transferencia nuclear. Mediante las dos primeras

técnicas se obtienen descendientes genéticamente iguales entre sí pero, como en el caso del armadillo, diferentes a sus padres. Por tanto, más que técnicas de clonación se consideran técnicas de gemelación artificial.

La transferencia nuclear consiste en introducir un núcleo procedente de la célula donante en el interior de un ovocito enucleado. Si las células donantes son de origen embrionario o fetal, se obtendrán individuos idénticos entre sí e idénticos al embrión o feto del que proceden. Como el embrión o feto donante, es decir el progenitor, se suele destruir, el proceso se denomina paraclonación. Se considera la clonación verdadera a la transferencia de núcleos de células pertenecientes a individuos ya nacidos al interior de un ovocito enucleado. Este proceso resulta en individuos con un genoma nuclear idéntico al progenitor. Mediante este método de clonación a partir de células adultas nació la famosa oveja Dolly (*Willmut et al., 1997*) hecho que representó el fin de un dogma biológico aceptado hasta entonces: una célula somática diferenciada, adulta, no puede inducir el desarrollo embrionario *de novo*. Cada célula embrionaria durante los primeros estadios de desarrollo embrionario tiene capacidad para desarrollar un individuo completo, es decir son células totipotentes. La primera evidencia de diferenciación celular ocurre en el estadio de blastocisto donde existen dos tipos de células: el trofoblasto, que dará lugar a las envolturas fetales, y las células de la masa celular interna que se diferenciarán en todas las células del embrión, feto y del organismo adulto. Estas células se denominan pluripotentes porque aunque no pueden originar el desarrollo de la placenta fetal, son capaces todavía de generar un organismo completo. Hasta la realización de la experiencia que dio lugar al nacimiento de Dolly, se asumía que, en los mamíferos, sólo era

posible obtener núcleos totipotentes o pluripotentes a partir de células embrionarias. Sin embargo, en el experimento de Dolly se pudo comprobar que cuando una célula adulta (procedente de la glándula mamaria) totalmente diferenciada, se inducía a un estado de quiescencia, toda la información genética de ese núcleo podía ser reprogramada por factores citoplasmáticos del ovocito receptor. Por tanto, parece evidente que la diferenciación celular refleja cambios en la expresión de los genes más que la pérdida de regiones específicas de los cromosomas (*Wilmot et al., 1997*). Desde la publicación del nacimiento de Dolly en el año 1997, la transferencia nuclear de células somáticas se ha aplicado con éxito en roedores, lepóridos, hurones, bovinos, ovinos, caprinos, porcinos, equinos y en animales de compañía como el perro y el gato, utilizando varios tipos celulares (*Wilmot et al., 2009*).

La clonación de animales por transferencia nuclear ofrece numerosas aplicaciones en investigación básica y aplicada, en ganadería, en conservación genética y en medicina humana. Sin embargo, para lograr alcanzar su verdadero potencial es necesario desarrollar una metodología simple y eficaz. La producción de animales por transferencia nuclear implica múltiples etapas (*Campbell et al., 2007*): 1) La obtención de los ovocitos maduros, 2) la extracción de los cromosomas del ovocito (enucleación), 3) la transferencia de los núcleos celulares obtenidos del animal que se quiere clonar dentro del ovocito enucleado, 4) la fusión y activación del nuevo embrión formado para iniciar su desarrollo embrionario, 5) el cultivo in vitro de los embriones reconstruidos y 6) la transferencia de dichos embriones al útero de las hembras receptoras.

Utilizando esta misma tecnología nuestro grupo de investigación ha dado recientemente a conocer la primera camada de lechones clonados en España a partir de células fetales diferenciadas (*Figura 4*). En esta investigación utilizamos fibroblastos fetales como células donantes y ovocitos madurados *in vitro* procedentes de ovarios de hembras prepuberales sacrificadas en el matadero. Tras la enucleación de los ovocitos y la transferencia de las células donantes al espacio perivitelino, los ovocitos fueron sometidos a los procesos de electrofusión y activación. A continuación, los embriones reconstruidos se transfirieron al oviducto de hembras receptoras encargadas de desarrollar la gestación a término. En nuestro estudio transferimos 125 embriones reconstruidos a cada una de las tres cerdas receptoras utilizadas. Dos de ellas quedaron gestantes y una mantuvo la gestación hasta el momento del parto. Nacieron cuatro lechones, tres vivos y uno muerto. El análisis genético de 26 microsatélites confirmó que los cuatro lechones eran clónicos entre sí y clones de la línea de células donantes utilizada. Uno de estos clones ha sobrevivido y acaba de cumplir los seis meses y medio de vida, presentando un aspecto morfológico normal. Este hecho representa el nacimiento de los primeros animales domésticos clonados en España y supone un avance a nivel nacional de suma trascendencia por las aplicaciones potenciales que de esta tecnología pueden derivarse.

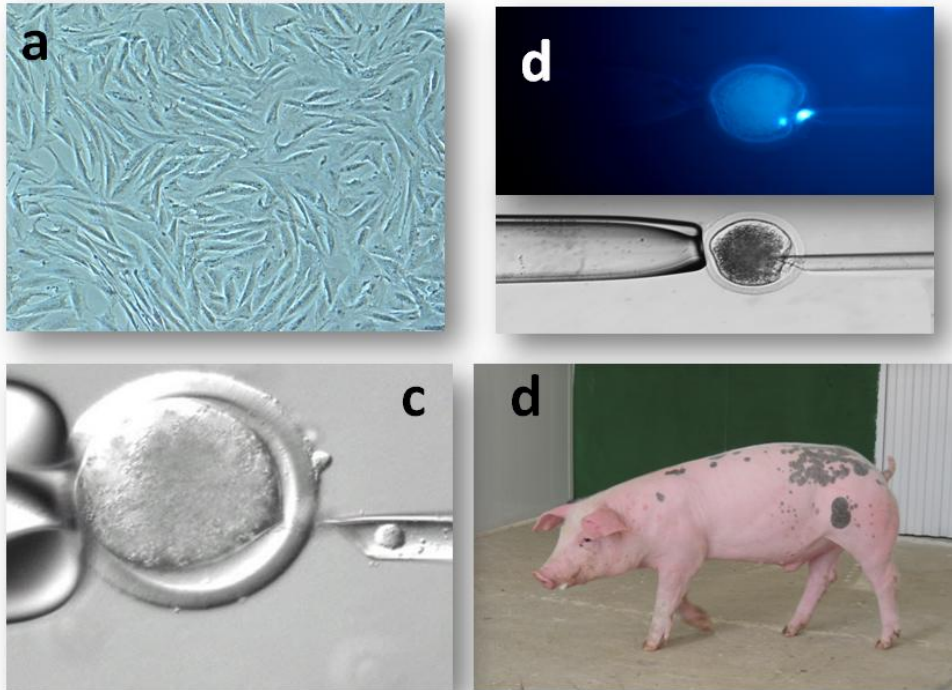


Figura 4. Metodología de clonación en mamíferos. a) Fibroblastos del cerdo donante; b) enucleación de un ovocito maduro; c) microinyección del núcleo de un fibroblasto en el ovocito enucleado; d) Kaka, primer animal doméstico clonado en España.

Las técnicas necesarias para completar cada una de las etapas implicadas en la transferencia nuclear varían entre especies. Pero más importante aún, la eficiencia de cada etapa también varía entre especies y afecta a las dificultades encontradas para clonar un animal de una especie determinada. En cualquier caso, la eficiencia total del

proceso, relación entre el número de embriones reconstruidos y el número de descendientes obtenidos, es en la actualidad muy baja (en torno al 1-6%) (Vatja *et al.*, 2007). Además de la especie, existen numerosos factores que probablemente contribuyan a esta ineficiencia, tales como el laboratorio, la procedencia de los ovocitos receptores y su calidad y el tipo de la célula donante utilizada (embrionaria, fetal o adulta). Además, un número significativo de embriones clonados mueren durante su desarrollo post-implantacional y un número importante de los animales nacidos mueren durante los primeros días de su vida por distintas alteraciones funcionales, incluyendo defectos del tracto urogenital, alteraciones respiratorias y cardiovasculares, etc. Esto se acentúa cuando se utilizan núcleos procedentes de células fetales o adultas, indicando, probablemente, una reprogramación incompleta del núcleo donante. Sin embargo, las causas permanecen sin ser identificadas aunque las mejoras incluidas en las metodologías utilizadas han disminuido el porcentaje de estas incidencias (Laible y Alonso-González, 2009).

Además de la escasa efectividad de la técnica de clonación, existen otros aspectos que pueden suponer obstáculos más o menos importantes, según la aplicación que se busque, para el desarrollo de este procedimiento. Efectivamente, como se ha mencionado anteriormente, aunque los clones son genéticamente idénticos, pueden existir diferencias morfológicas importantes entre ellos debido a fenómenos epigenéticos no mutacionales que varían la expresión de un gen sin que exista un cambio en la secuencia del ADN. Estas alteraciones epigenéticas originan cambios morfológicos importantes entre los clones y sus progenitores que determinan en numerosas ocasiones un parecido físico escaso.

El primer objetivo a alcanzar en las investigaciones sobre clonación animal ha sido desarrollar un método para copiar animales de elevado valor *per se*, como animales de renta con un alto valor genético, animales de compañía con un valor afectivo importante, y animales de razas o especies en peligro de extinción (*Vajta, 2007*). En este sentido ya existen varios laboratorios en diferentes partes del mundo que ofrecen comercialmente la clonación reproductiva de animales de compañía.

Uno de los intereses de la clonación animal en ganadería radica en la propagación rápida de los animales de mayor valor genético. Esto se lleva persiguiendo desde hace muchas décadas y se han utilizado técnicas reproductivas como la inseminación artificial o la transferencia de embriones para mejorar los índices productivos de nuestros animales. La propagación de clones de animales de élite repercutiría en una mayor producción de leche, mejor calidad de carne y mayor velocidad de crecimiento. Esta aplicación es de suma importancia principalmente en el ganado vacuno, donde el intervalo generacional es largo y la tasa reproductiva baja. Con la clonación, los productores podrían adquirir embriones clonados de las vacas más productivas de los rebaños de elite, con lo que incrementarían la genética de sus rebaños en tan sólo una generación. La clonación para esta aplicación concreta ha conducido al temor de producir una reducida diversidad genética y una mayor susceptibilidad a determinadas enfermedades. Sin embargo, una preocupación similar se observó cuando la inseminación artificial comenzó a ser ampliamente utilizada en las vacas de leche hace muchos años. Se ha visto que esos temores eran infundados debido al cuidadoso uso y

distribución de la genética de élite. En el caso de la clonación, esto se podría evitar restringiendo la venta de un número limitado de clones de cada genotipo a cada productor.

Por otro lado, la clonación en un futuro más o menos próximo podrá ser una herramienta fundamental en los programas de conservación de razas o especies en peligro de extinción. Adelantándose a esta posibilidad, varias organizaciones han comenzado a construir bancos genéticos con tejidos de animales salvajes en peligro de extinción conservados a bajas temperaturas (Frozen Zoo Project). Una vez que la técnica de clonación sea perfeccionada, será posible recuperar poblaciones diezmadas e incluso recuperar especies extintas a partir de estos bancos genéticos.

Una segunda razón, quizá la de mayor importancia, para desarrollar las técnicas de clonación radica en la obtención de animales genéticamente manipulados. Las células donantes pueden ser genéticamente manipuladas y obtener animales transgénicos de indudable interés para la ganadería y la medicina humana. Estos animales transgénicos podrían, a su vez, ser clonados por transferencia nuclear y establecer poblaciones clónicas a partir de los animales transgénicos previamente seleccionados (*Melo et al., 2007*).

Clásicamente, un animal transgénico se ha definido como aquel que contiene en su genoma ADN exógeno (transgén) el cual se introduce mediante manipulación experimental durante el estadio de

preimplantación embrionaria. Sin embargo, esta definición debe ampliarse para incluir a aquellos animales en los que la modificación genética se introduce durante la vida postnatal (terapia génica) o aquellos en los que una parte del ADN del propio animal es extraída o modificada, en vez de añadida. En la producción de animales transgénicos lo primero que se precisa es construir el transgen, es decir la secuencia de ADN que codifica la proteína que se desea expresar. Es fundamental que dicha construcción contenga una serie de elementos reguladores para expresarse en un momento determinado del desarrollo del animal, o para expresarse en un tejido concreto, o para insertarse en una determinada región de un cromosoma específico. Una vez que la construcción está lista, se inserta en el genoma del futuro animal transgénico. Aunque existen numerosas formas de insertar el transgén, tales como la microinyección pronuclear, la microinyección de células pluripotentes, el uso de vectores virales, la transfección de espermatogonias y espermatozoides, quizás, la técnica más prometedora para la obtención de animales transgénicos, sea la transferencia nuclear de células transfectadas. Con esta técnica se puede asegurar que la descendencia será transgénica ya que los núcleos donantes pueden ser examinados para expresión del transgén antes de la inserción. Otra ventaja adicional es que se puede preseleccionar el sexo de la descendencia. Finalmente se pueden clonar animales transgénicos existentes que hayan mostrado un alto nivel de expresión del transgen. Con este sistema nació Polly en el año 1998, la primera oveja transgénica obtenida por transferencia nuclear de células fetales previamente modificadas para la expresión de una proteína terapéutica humana (*Schnieke et al., 1997*). Desde entonces se han obtenidos vacas, cabras, ovejas y cerdos transgénicos utilizando la transferencia nuclear (*Wilmot et al., 2009*).

La tecnología transgénica se está desarrollando para distintos fines, tanto desde el punto de vista de la producción animal como de la salud humana. En producción animal se intenta utilizar la tecnología transgénica para mejorar determinados caracteres productivos, como el crecimiento muscular, la producción de lana o modificar la composición de la leche (Roberts *et al.*, 2009). Por ejemplo, basándose en varios experimentos en roedores, se han obtenido cerdos y ovejas transgénicos con el gen que expresa la hormona del crecimiento humana y bovina. Estos animales presentaron una reducción de la cantidad de grasa subcutánea, un aumento de la velocidad de crecimiento y un desarrollo muscular superior. Sin embargo, los elevados niveles de la hormona en sangre causaron importantes patologías conducentes en algún caso a la muerte del animal. Recientemente, se han obtenido cerdos transgénicos con la IGF-I (factor de crecimiento similar a la insulina, tipo I). La IGF-I es un factor de crecimiento normalmente presente en pequeñas cantidades en la mayoría de las células de los mamíferos, estimulando el desarrollo de los huesos, músculos, nervios y órganos. Estos cerdos transgénicos tuvieron menor grasa y mayor desarrollo muscular y no presentaron las graves alteraciones mencionadas anteriormente. La obtención de ovejas con mayor calidad y cantidad de lana, así como la obtención de animales transgénicos que produzcan mayor cantidad de caseína en la leche (la caseína es la proteína usada en la producción de quesos) o de animales en los que se induzca la alteración del gen que expresa la β -lactoglobulina (responsable de las alergias a la lactosa) son otras áreas prioritarias para los científicos. Además, en lo referente a la producción animal, se intentan obtener, mediante transgénesis, animales más resistentes a las enfermedades, aunque sin demasiado éxito hasta el

momento. Dos enfermedades con repercusiones en la salud humana, el scrapie en ovino y la encefalitis espongiforme bovina están siendo estudiadas desde un punto de vista transgénico. El gen PrP expresa en ovejas y vacas unas proteasas llamadas priones y una versión malformada de ellas es la responsable de dichas enfermedades. Se han producido animales transgénicos donde dicho gen ha sido alterado o eliminado completamente y se ha especulado con la posibilidad de producir ovejas y vacas libres de estas enfermedades. Otra importante aplicación en ganadería puede ser la creación de animales que produzcan anticuerpos en su leche, lo cual podría inmunizar a las crías lactantes frente a determinadas enfermedades como la gastroenteritis transmisible en el caso del cerdo. Por otro lado, como es sabido, uno de los principales problemas que determina el confinamiento en producción intensiva, como en el caso del ganado porcino, es el volumen y eliminación de purines. Ya que el cerdo no puede digerir el fósforo, grandes cantidades de este elemento son excretadas en los purines. Se han creado cerdos transgénicos con un gen que expresa la enzima fitasa en las glándulas salivares, de tal forma que estos animales producen purines con menos fósforo. También se han generado cerdos ricos en omega-3, un ácido graso que se aconseja para el consumo humano y que además, puede tener efectos positivos sobre la salud del propio animal transgénico (*Niemann y Kues, 2007*).

Otro uso de la tecnología transgénica es la utilización de animales genéticamente modificados como modelos de distintas enfermedades humanas que tienen un componente genético específico (*Roberts et al., 2009*). Se puede mutar o alterar el gen de interés antes de insertarlo en el genoma animal y así estudiar el origen, el desarrollo y la efectividad de distintos tratamientos.

Algunas enfermedades que se estudian mediante estos métodos son algunos tipos de arteriosclerosis vascular y diabetes, distintos tipos de cáncer y diferentes enfermedades neurodegenerativas. Aunque la mayoría de estas investigaciones se han desarrollado utilizando ratones, ahora se están intentando usar especies animales cuyos órganos y sistemas son más parecidos al hombre, entre las que destaca la especie porcina. Además, el modelo porcino es más apropiado que los roedores para investigar enfermedades humanas que requieren periodos largos de observación, como la mayoría de las enfermedades mencionadas anteriormente. En nuestra opinión la posibilidad de crear cerdos transgénicos con el gen responsable de una determinada enfermedad humana es una oportunidad única para aquellos grupos de investigación implicados en el campo de la medicina humana experimental pues el número de genes y de enfermedades es prácticamente ilimitado.

Los avances más importantes en el área de la transgénesis se han alcanzado a nivel de la industria farmacéutica mediante la producción de proteínas de alto valor en medicina humana a partir de la leche de varias especies ganaderas (*Goldman et al., 2009*). En la actualidad existen verdaderas granjas farmacéuticas de ovejas, cabras y vacas productoras de más de 20 proteínas que podrían ser utilizadas en el tratamiento de diferentes enfermedades humanas. Aunque el costo de cada animal transgénico es muy elevado, el mercado de estas proteínas en Estados Unidos se estimó en cerca de 30 billones de dólares en el año 2005. A pesar de las grandes expectativas de estas granjas farmacéuticas, la duración de la fase de desarrollo y el enorme desembolso económico requerido hace que sean pocas las empresas farmacéuticas dedicadas a este sector.

La aplicación en xenotrasplantes es otro de los objetivos perseguidos por la transgénesis. En los últimos 30 años, el trasplante de corazón y riñón ha llegado a realizarse casi de forma rutinaria. Sin embargo, existe un limitado número de órganos para trasplantar. El xenotrasplante implica la utilización de órganos animales para el trasplante de órganos en la especie humana. Para que los xenotrasplantes de órganos puedan llegar a ser una realidad se deben superar en primer lugar el rechazo hiperagudo que se produce en pocos minutos después del xenotrasplante, incluso cuando se utilizan animales anatómicamente y fisiológicamente similares a los humanos, como el cerdo (*Ramírez et al., 2009*).

Existen anticuerpos naturales del tipo IgG e IgM (xenoanticuerpos) en la sangre humana y de los primates. Estos anticuerpos reaccionan con los antígenos glicoproteicos de la superficie de las células endoteliales del órgano de cerdo trasplantado por lo que se activa la reacción del complemento que determina un cambio en la morfología de las células endoteliales del órgano donante y un cambio en su propiedad antiadherente. El endotelio pasa a un estado procoagulante, que origina rápidamente los fenómenos de trombosis y hemorragia que necrosan el órgano en pocos minutos. Hay dos formas de impedir el rechazo hiperagudo: 1) consiguiendo animales transgénicos que no tengan el gen y por tanto que no expresen la enzima alfa 1-3 galactosil transferasa (enzima que produce la síntesis de los antígenos glicoproteicos). Este gen no está presente en la especie humana ni en los primates del viejo mundo y por tanto en estas especies no existen esos antígenos glicoproteicos. Si se impide la presencia de esos antígenos, las posibilidades del

rechazo hiperagudo disminuirán ostensiblemente. 2) Regulando la activación del complemento. La activación del complemento se controla por proteínas reguladoras de la misma especie. Se han conseguido cerdos transgénicos que expresan una proteína reguladora del complemento humano llamada DAF que impide la activación del complemento (Cozzi *et al.*, 1995). Los primeros resultados utilizando corazón, hígado y riñón de cerdos transgénicos en trasplante a monos han ofrecido resultados esperanzadores ya que se ha evitado el rechazo hiperagudo. Sin embargo, aunque se consiga superar el rechazo hiperagudo quedarían por solucionar otros muchos aspectos como el rechazo vascular y celular, las barreras fisiológicas referentes a si los órganos porcinos asumirán correctamente las funciones de los órganos humanos y las barreras infecciosas. De este modo es importante determinar el riesgo real de transmisión de infecciones interespecie, del cerdo al hombre, mediante la actuación del órgano porcino trasplantado como vector de transmisión.

4.- Una visión de futuro

Los avances en el área de la biotecnología de la reproducción animal han sido muy importantes durante las dos últimas décadas fundamentados, principalmente, en grandes avances en el conocimiento que han contribuido de manera fundamental al desarrollo de nuevas tecnologías con un enorme potencial aplicativo tanto desde el punto de vista de la producción animal (p.e. preselección de sexo) como de la salud humana (p.e. transgénesis) debido al carácter dual de las especies domésticas.

Es de esperar que la aplicación de las biotecnologías asociadas a la reproducción animal ofrecerá en los próximos años, siempre que sean aceptadas por la sociedad y las regulaciones legales internacionales, nuevos modelos de producción que permitan producir más y con mayor calidad; biotecnologías que también se aplicarán en especies no productivas, principalmente en especies en peligro de extinción y especies de zoológico. De este modo, al igual que la aplicación de la inseminación artificial, como herramienta tecnológica unida a estrictos esquemas de selección genética, el empleo de las biotecnologías en reproducción animal ha provocado probablemente las mejoras más importantes en los últimos años en la rentabilidad productiva de las explotaciones ganaderas; técnicas que eran casi ficción hace pocos años, se han convertido en desarrollos experimentales y en ocasiones procedimientos comerciales. Cambios que están modificando el modo de abordar la

producción ganadera, orientándola hacia una producción más rentable, de mayor calidad y más segura. Biotecnologías como la transferencia de embriones, el empleo de espermatozoides sexados, o la criopreservación de gametos y embriones no sólo son posibles en estos momentos sino que, además, están destinadas a cambiar los patrones productivos y es por ello que son consideradas como imprescindibles por las grandes cooperativas y empresas ganaderas así como por los inversores para conseguir una producción competitiva en las próximas décadas. Sin embargo, como sucede en la incorporación de cualquier tecnología, la aplicación de estas nuevas biotecnologías será lenta y se aplicarán finalmente a nivel comercial sólo aquellas que presenten una relación baja en el coeficiente costo/beneficio y que al tiempo presenten una aceptación social adecuada.

Por otro lado, la clonación y la transgénesis junto a los avances en genómica funcional, la proteómica y metabolómica van a permitir el desarrollo de animales dedicados a nuevas producciones, inéditas hasta hace unos pocos años y en los que el catálogo de productos obtenidos se incrementará enormemente en los próximos años. La clonación y la transgénesis siguen siendo biotecnologías con una baja eficacia aunque los descubrimientos efectuados en los últimos años están desencadenando un progreso importante de esta tecnología, especialmente por la expresión de los transgenes en la glándula mamaria, además de estar solventándose algunos de los problemas detectados en los animales nacidos por clonación. Y a medida que se aumente el conocimiento sobre la regulación de los genes se acelerarán, sin duda, las aplicaciones en este tipo de biotecnologías. Recientemente se publicaba un informe en California (*Van Eenennaam, 2006*) en el que se auguraba que “*hacia la mitad*

del siglo actual, la mayoría de los animales en producción ganadera serán animales modificados genéticamente, y serán más eficientes que los actuales, produciendo alimentos saludables para el consumo y de modo poco agresivo para el medio ambiente". Se están desarrollando en la actualidad nuevos modelos productivos con potencial interés, como vacas productoras de leche con baja cantidad de lactosa, animales con resistencia a determinadas enfermedades o incluso producción de proteínas de la seda de las arañas a través de la leche de las cabras, materiales de extraordinarias propiedades de resistencia, biocompatibilidad y degradabilidad.

La implementación comercial de animales modificados genéticamente deberá ir inexorablemente unida a la aceptación social de los mismos. En este sentido, las encuestas realizadas en los consumidores, principalmente europeos, detectan que, mientras que las innovaciones biotecnológicas son aceptadas en medicina, no lo son tanto para agricultura, especialmente referido a la clonación y la transgénesis. Incluso en el ámbito médico se presenta cierto rechazo por parte de la sociedad. Con relación al consumo de productos de animales clonados, hay una negativa para que se apruebe el consumo desde el Grupo Europeo de Expertos sobre Bioética. Además, según una encuesta reciente del Eurobarómetro, la mayoría de los europeos (un 58% de la UE y un 44% entre los españoles) tiene una actitud negativa hacia la clonación de animales para producir carne o leche, a pesar de la inocuidad en el consumo manifestada por las agencias de seguridad alimentaria de diversos países. De este modo, la Unión Europea decidió en el 2009 mantener la situación existente en donde no existe ningún procedimiento de autorización específico para los alimentos obtenidos de animales clonados y no adoptar nuevas decisiones debido a que *"la clonación no se utiliza en Europa*

como un método para producir alimentos”, aunque está evaluando posibilidades que van desde imponer reglas sobre el etiquetado hasta establecer una prohibición a la clonación de ganado para producir alimentos y vetar la importación de carne o leche obtenida de animales clonados. En EEUU, existe una moratoria en la autorización del consumo de carne o leche de animales clonados y sus descendientes.

Esta perspectiva se ha proyectado hacia las entidades financiadoras mundiales que, junto a la percepción social, ha generado cierta atmósfera de suspicacia alrededor de los laboratorios que investigan en clonación y transgénesis y que probablemente han ralentizado sus desarrollos. Sin embargo, hay que recordar el rechazo que generó originalmente una biotecnología tan aceptada actualmente como es la inseminación artificial, cuyo uso es indiscutible a día de hoy. Las sociedades ganaderas la rechazaban en sus inicios por ser una biotecnología que afectaría a sus mercados y la percepción social era que la inseminación artificial solo supondría incrementar el número de las anomalías en los animales nacidos (*Foote, 2002*). Su aceptación, finalmente, fue consecuencia, entre otras causas, de mejorar la información a la sociedad en general acerca de sus objetivos dignos y cuyo empleo provocaría un cambio positivo que repercutiría en toda la sociedad. Objetivos dignos, desarrollo de conocimientos y métodos para aplicarlos y las consideraciones éticas que conlleva su empleo son los componentes esenciales que debe conocer la sociedad respecto a cualquier biotecnología que tenga que ser socialmente aceptada y que se diseñe para causar un impacto positivo sobre la sociedad y el medioambiente.

En los próximos años asistiremos asimismo a la consolidación en la producción de “nuevos animales” capaces de transformarse en biofactorías de proteínas de uso terapéutico o como donantes de órganos. A día de hoy, se han diseñado animales que producen varias decenas de proteínas de interés en salud humana, algunas de ellas en fase de ensayo clínico y una de ellas, la ATryn®, una forma recombinante de la antitrombina humana desarrollada por GTC Biotherapeutics, fue aprobada para su empleo en terapia en el año 2006 por la Agencia Europea del Medicamento y en el 2009 por la agencia norteamericana Food and Drug Administration. Asimismo, parece ilimitado el desarrollo de modelos animales para el estudio de enfermedades humanas mediante la producción de animales transgénicos; desarrollo solamente afectado por futuras directivas, especialmente en Europa, en experimentación animal si no se produce un cambio de tendencia ya que las corrientes contra la experimentación animal han focalizado su opinión exclusivamente en los aspectos negativos que causa la experimentación con animales en vez de identificar los avances logrados gracias al uso de los mismos.

No quisiera terminar sin traer a este discurso otra amenaza sobre el desarrollo futuro de las biotecnologías que está afectando sobremanera a países líderes en el desarrollo de las mismas como es EEUU. El pasado año, publicaba la revista *Science* en su número de 24 de abril (*Roberts et al., 2009*), un artículo en el que detalladamente se advertía de la disminución en los últimos años de los recursos públicos destinados a la investigación en ganadería sobre la base de que es una investigación aplicada, que debe ser principalmente financiada por la industria. Sin embargo, los grandes avances que se

han obtenido en las biotecnologías asociadas a la reproducción animal, han venido desde el conocimiento generado en investigación básica, una investigación de difícil financiación desde la industria. Por tanto, esta pérdida de financiación en la investigación básica en biotecnologías en reproducción animal amenaza los desarrollos biotecnológicos en un futuro próximo, más aun cuando la sociedad sigue cuestionando el empleo de estas biotecnologías.

Finalmente, se han publicado diferentes opiniones de carácter ético acerca de la aceptación de la manipulación de embriones animales. En mi opinión, determinadas biotecnologías asociadas a la reproducción animal simplemente intensifican el proceso evolutivo. Desde tiempos prehistóricos se ha regulado la naturaleza para el beneficio humano. La obtención de productos útiles al hombre, modificando organismos vivos, tampoco es ninguna novedad. Por tanto, no creo que existan demasiados argumentos en contra de la biotecnología animal, eso sí, siempre y cuando se destine a obtener un beneficio justificado para el hombre y se respete el bienestar del animal. A lo que hemos asistido en los últimos años ha sido a un nuevo proceso de “domesticación”, pero en este caso ha sido una domesticación de gametos y embriones en su sentido estricto, porque domesticación deriva del latín *domus*, que a su vez es el dominio del *dóminus*. *Domus* que se caracteriza porque el *dominus* se ha adueñado de ellos, sacándolo del estado salvaje y libre en que estaban para utilizarlo acorde a sus necesidades. Utilizamos espermatozoides, ovocitos y embriones de animales para que, respetando el bienestar de los animales, contribuyan al bienestar humano. Unos desarrollos que han permitido aplicaciones biotecnológicas que han cambiado la forma de ver la ganadería aunque, en palabras del Dr. Bonadona, “*el futuro requiere no gastar*

mucho tiempo soñando en el pasado”, un futuro que a buen seguro deparará progreso y bienestar tanto en el ámbito de la ganadería como de la salud humana. *“Un futuro manejable en una vida imparable”*, como finaliza el libro *“La Ciencia y la Vida”*, una serie de diálogos entre Valentín Fuster y José Luis Sampedro.

Sin embargo, como en cualquier ámbito de la ciencia y la tecnología, no hay que olvidar que toda acción destinada a un buen fin puede, en un momento determinado, aplicarse a situaciones distintas que incluso alteren la armonía humana, su bienestar y su entorno. Como Freeman Dyson analiza en su libro *“El Científico Rebelde”*, *“en el siglo XXI, la biotecnología será tan peligrosa como la tecnología nuclear en el siglo XX.....los peligros surgen del conocimiento.....conocimientos biológicos aplicados de manera irresponsable...”*. Para ello, la comunidad científica mundial deber ser garante de estos descubrimientos, propiciando foros de opinión y expresando recomendaciones hacia la sociedad a la que van destinados estos avances, a través de Sociedades y Academias Científicas como es la Academia de Ciencias de la Región de Murcia, en la que hoy tengo el honor de ingresar.

5.- Bibliografía

- Bolarín A, Roca J, Rodríguez-Martínez H, Hernández M, Vázquez J.M, Martínez EA. Dissimilarities in sows' ovarian status at the insemination time could explain differences in fertility between farms when frozen-thawed semen is used. *Theriogenology* 2006; 65:669-680.
- Bolarín A, Hernández M, Vazquez JM, Rodriguez-Martinez H, Martinez EA, Roca J. Use of frozen-thawed semen aggravates the summer-autumn infertility of artificially inseminated weaned sows in the Mediterranean region. *J Anim Sci*. 2009; 87:3967-75.
- Brackett BG, Bousquet D, Boice ML, Donawick WJ, Evans JF, Dressel MA. Normal development following in vitro fertilization in the cow. *Biol Reprod*. 1982; 27:147-58.
- Caballero I, Vazquez JM, García EM, Parrilla I, Roca J, Calvete JJ, Sanz L, Martínez EA. Major proteins of boar seminal plasma as a tool for biotechnological preservation of spermatozoa. *Theriogenology* 2008; 70:1352-5.
- Caballero I, Vazquez JM, Mayor GM, Almiñana C, Calvete JJ, Sanz L, Roca J, Martínez EA. PSP-I/PSP-II spermadhesin exert a decapacitation effect on highly extended boar spermatozoa. *Int J Androl*. 2009; 32:505-13.
- Campbell KHS, Fisher P, Chen WC, Choi I, . Kell, J-H. Lee RDW, Xhu J. Somatic cell nuclear transfer: Past, present and future perspectives. *Theriogenology* 2007; 68S:S214–S231.
- Cozzi E, Langford GA, Wright L, Tucker A, Yannoutsos N, Richards A, Rosengard A, Elsome K, Lancaster R, White DJ. Comparative analysis of human DAF expression in the tissues of transgenic pigs and man. *Transplant Proc*. 1995; 27:319-20.
- Cuello C, Berthelot F, Martinat-Botte F, Venturi E, Guillouet P, Vazquez JM, Roca J, Martínez EA. Piglets born after non-surgical deep intrauterine transfer of vitrified blastocysts in gilts. *Anim Reprod Sci* 2005; 85:275-286.

- Cuello C, Gil MA, Almiñana C, Sanchez-Osorio J, Parrilla I, Caballero I, Vazquez JM, Roca J, Rodriguez-Martinez H, Martinez EA. Vitrification of in vitro cultured porcine two-to-four cell embryos. *Theriogenology* 2007; 68:258-64.
- De Vries A, Overton M, Fetrow J, Leslie K, Eicker S, Rogers G. Exploring the impact of sexed semen on the structure of the dairy industry. *J Dairy Sci* 2008; 91:847-856.
- Foote, RH. The history of artificial insemination: Selected notes and notables. *J Anim Sci* 2002. 80:1-10.
- Fundation for Medical Research, Nobel Prizes. www.fbresearch.org/Education/Nobel/Prizes/tabid/427/Default.aspx.
- Garcia EM, Vazquez JM, Parrilla I, Calvete JJ, Sanz L, Caballero I, Roca J, Vazquez JL, Martinez EA. Improving the fertilizing ability of sex sorted boar spermatozoa. *Theriogenology* 2007; 68:771-778.
- Garner DL and Seidel Jr. GE. History of commercializing sexed semen for cattle. *Theriogenology* 2008; 69:886-895.
- Georgiou AS, Snijders APL, Sostaric E, Afaltonian, R, Vazquez JL, Vazquez, JM, Roca, J, Martinez EA, Wright PC, Fazeli A. Modulation of the oviductal environment by gametes. *J Proteome Res* 2007; 6:4656-4666.
- Gil MA, Almiñana C, Roca J, Vázquez JM, Martínez EA. Boar semen variability and its effects on IVF efficiency. *Theriogenology* 2008; 70:1260-8.
- Hernández M, Roca J, Calvete JJ, Sanz L, Muiño-Blanco T, Cebrián-Pérez JA, Vázquez JM, Martinez EA. Cryo-survival and in vitro fertilizing capacity post-thaw is improved when boar spermatozoa are frozen in the presence of seminal plasma from good freezer boars. *J. Androl* 2007a; 28:689-697.
- Hernández M, Roca J, Gil MA, Vázquez JM, Martinez EA. Adjustments on the cryopreservation conditions reduce the incidence of boar ejaculates with poor sperm freezability. *Theriogenology* 2007b; 67:1436-1445.
- Holt WV, Medrano A, Thurston LM and Watson PF. The significance of cooling rates and animal variability for boar sperm cryopreservation: insights from the cryomicroscope *Theriogenology* 2005; 63:370-382.
- Ivanoff EI. On the use of artificial insemination for zootechnical purposes in Russia. *The Journal of Agricultural Science* 1922; 12(03):244-256

- Johnson LA, Flook JP, Hawk HW. Sex preselection in rabbits: live births from X- and Y- sperm separated by DNA and cell sorting. *Biol. Reprod.* 1989; 41: 199-203.
- Johnson, LA, Rath D, Vázquez, JM, Maxwell, WMC, Dobrinsky JR. Pre-selection of sex in swine for production of offspring: an update on the process and application. *Theriogenology* 2005; 63:615-624.
- Niemann H, Kues WA. Transgenic farm animals: an update. *Reprod Fertil Dev.* 2007; 19:762-70.
- Laible G, Alonso-González L. Gene targeting from laboratory to livestock: current status and emerging concepts. *Biotechnol J.* 2009; 4(9):1278-92.
- Martinat-Botté F, Berthelot F, Plat M, Madec F. Cryopreservation and transfer of pig in vivo embryos: State of the art]. *Gynecol Obstet Fertil.* 2006; 34(9):754-9.
- Martinez EA, Vazquez JM, Roca J, Lucas X, Gil MA, Parrilla I, Vazquez JL, Day BN. 2001. Successful non-surgical deep intrauterine insemination with small numbers of spermatozoa in sows. *Reproduction* 2001; 122:289-96.
- Martínez EA, Caamaño JE, Gil MA, Rieke A, Mccauley TC, Cantley TC, Vázquez JM, Roca J, Vázquez JL, Didion B, Murphy CN, Prather RS, Day DN. Successful nonsurgical deep uterine embryo transfer in pigs. *Theriogenology* 2004; 61:137-146.
- Martínez EA, Vázquez JM, Roca J, Cuello C, Gil MA, Parrilla I, Vázquez JL. An update on reproduction Technologies with potencial short-term application in pig production. *Reprod. Dom. Anim.* 2005; 40:300-309. .
- Martinez EA, Vazquez JM, Parrilla I, Cuello C, Gil MA, Rodriguez-Martinez H, Roca J, Vazquez JL. Incidence of unilateral fertilizations after low dose deep intrauterine insemination in spontaneously ovulating sows under field conditions. *Reprod. Dom. Anim.* 2006; 41:41-47.
- Mazur P. Freezing of living cells: mechanisms and implications. *Am. J. Physiol.* 1984; 247(Cell Physiol. 16):C125-C142.
- Mazur P, Cole KW, Hall JW, Schreuders PD, Mahowald AP. Cryobiological preservation of *Drosophila* embryos. *Science* 1992; 18,258(5090):1932-5.
- Maxwell WMC, Johnson LA. Physiology of Spermatozoa at high dilution rates: the influence of seminal plasma. *Theriogenology* 1999; 52:1353-1362.

- Maxwell WMC, Evans G, Hollinshead FK, Bathgate R, de Graaf SP, Eriksson BM, Gillan L, Morton KM, O'Brien JK. Integration of sperm sexing technology into the ART toolbox. *Anim. Reprod. Sci.* 2004; 82/83:79-95.
- Maxwell WMC, Parrilla I, Caballero I, Garcia E, Roca J, Martinez EA, Vazquez JM, Rath D. Retained functional Integrity of bull spermatozoa after double freezing and thawing using Puresperm® density gradient centrifugation. *Reprod. Dom. Anim.* 2007; 42:489-494.
- Melo EO, Canavessi AM, Franco MM, Rumpf R. Animal transgenesis: state of the art and applications. *J Appl Genet.* 2007; 48:47-61.
- Parks JE, Lynch DV. Lipid composition and thermotropic phase behavior of boar, bull, stallion, and rooster sperm membranes. *Cryobiology* 1992; 29:255-266.
- Parrilla I, Vázquez JM, Oliver-Bonet M, Navarro J, Yelamos J, Roca J, Martínez EA. Fluorescence In Situ Hybridization in diluted and flow cytometrically sorted boar spermatozoa using specific DNA direct probes labelled by Nick Translation. *Reproduction* 2003; 126:317-325.
- Parrilla I, Vazquez JM, Cuello C, Gil MA, Roca J, Di Berardino D. 2004. Hoechst 33342 stain and UV laser exposure do not induce genotoxic effect in flow-sorted boar spermatozoa. *Reproduction* 2004; 128:615-621.
- Parrilla I, Vazquez JM, Caballero I, Gil MA, Hernandez M, Roca J, Lucas X, Martinez EA. Optimal characteristics of spermatozoa for semen technologies in pigs. *Soc Reprod Fertil Suppl.* 2009; 66:37-50.
- Pinkel D, Gledhill BL, Lake S, Stephenson D, Van Dilla MA. Sex preselection in mammals? Separation of sperm bearing Y and "O" chromosomes in the vole *Microtus oregoni*. *Science* 1982; 26,218(4575):904-6.
- Pinstrup-Andersen y Pandey-Lorch. Securing and sustaining adequate food production for the third millennium. En: *World Food Security and Sustainability: The impacts of biotechnology and industrial consolidation* 1999; 11:27-48
- Polge C, Smith Au, Parkes As. Revival of spermatozoa after vitrification and dehydration at low temperatures. *Nature* 1949; 15,164(4172):666.
- Pursel VG, Schulman LL, Johnson LA. Distribution and morphology of fresh and frozen-thawed sperm in the reproductive tract of gilts after artificial insemination. *Biol Reprod* 1978; 19:69-76.

- Ramírez P, Ríos A, Muñoz A y Parrilla P. Estado actual del xenotrasplante de órganos. En: Parrilla P, Ramirez P y Rios A. Manual Sobre Donacion y Trasplantes de organos. Editorial Aran, Madrid 2009.
- Roberts RM. The place of farm animals in the new genomics world of reproductive biology. *Biol. Reprod.* 2001; 64:409-417.
- Roberts RM, Smith GW, Bazer FW, Cibelli J, Seidel GE Jr, Bauman DE, Reynolds LP, Ireland JJ. Research priorities. Farm animal research in crisis. *Science.* 2009; 24, 324(5926):468-9.
- Roca J, Vázquez JM, Gil MA, Cuello C, Parrilla I, Martínez EA. Challenges in pig artificial insemination. *Reprod Dom Anim* 2006a; 41:43-53.
- Roca J, Carvajal G, Lucas X, Vazquez JM, Martinez EA. Fertility of weaned sows after deep intrauterine insemination with a reduced number of frozen-thawed spermatozoa. *Theriogenology* 2003; 60:77-87.
- Roca J, Rodríguez-Martínez H, Vázquez JM, Bolarín A, Hernández M, Saravia F, Wallgren M, Martínez EA. Strategies to improve the fertility of frozen-thawed boar semen for artificial insemination. In Ashworth CJ and Kraeling RR (eds), *Control of Pig Reproduction VII*, Nottingham University Press, Nottingham. 2006b, pp. 261-275.
- Roca J, Hernandez M, Carvajal G, Vazquez JM, Martinez EA. Factors influencing boar sperm cryosurvival. *J. Anim Sci* 2006c; 84:2692-2699.
- Rodríguez-Martínez H, Saravia F, Wallgren W, Tienthai P, Johannisson A, Vázquez JM, Martínez EA, Roca J, Sanz L, Calvete JJ Boar spermatozoa in oviduct. *Theriogenology* 2005; 63:514-535.
- Roppa, L. Producción global de carne porcina: enfrentando los desafíos en un mundo en transición. Vº Congreso de Producción Porcina del Mercosur, Río Cuarto. 2006.
- Schnieke AE, Kind AJ, Ritchie WA, Mycock K, Scott AR, Ritchie M, Wilmut I, Colman A, Campbell KH. Human factor IX transgenic sheep produced by transfer of nuclei from transfected fetal fibroblasts. *Science* 1997; 19,278(5346):2130-3.
- Seidel Jr. GE. Overview of sexing sperm. *Theriogenology* 2007; 68:443-446.
- Vajta G. Somatic cell nuclear transfer in its first and second decades: successes, setbacks, paradoxes and perspectives. *Reprod Biomed Online.* 2007; 15:582-90.

- Van Eenennaam. What is the future of animal biotechnology?. *California Agriculture*. 2006; 60(3):132-139.
- Vazquez JM, Martinez EA, Parrilla I, Roca J, Gil MA, Vazquez JL. Birth of piglets after deep intrauterine insemination with flow cytometrically sorted boar spermatozoa. *Theriogenology* 2003; 59:1509-1614.
- Vazquez JM, Martinez EA, Roca J, Gil MA, Parrilla I, Cuello C, Carvajal G, Lucas X, Vazquez JL. Improving the efficiency of sperm technologies in pigs: the value of deep intrauterine insemination. *Theriogenology* 2005; 63:536-47.
- Vazquez JM, Roca J, Gil MA, Cuello C, Parrilla I, Caballero I, Vazquez JL, Martinez EA. Low-Dose insemination in pigs: Problems and Possibilities. *Reprod Dom Anim* 2008; 43(Suppl, 2): 347-354.
- Vazquez JM, Parrilla I, Roca J, Gil MA, Cuello C, Vazquez JL, Martínez EA. Sex-sorting sperm by flow cytometry in pigs: issues and perspectives. *Theriogenology*. 2009; 71:80-8.
- Wilmut I, Rowson LE. Experiments on the low-temperature preservation of cow embryos. *Vet Rec* 1973; 30,92(26):686-90.
- Wilmut I, Schnieke AE, McWhir J, Kind AJ, Campbell KH. Viable offspring derived from fetal and adult mammalian cells. *Nature*. 1997; 27,385(6619):810-3.
- Wilmut I, Sullivan G, Taylor J. A decade of progress since the birth of Dolly. *Reprod Fertil Dev* 2009; 21(1):95-100