

Transgenesis y clonación en porcinos

Daniel F Salamone

Laboratorio Biotecnología Animal. FA-Universidad de Buenos Aires, Argentina.

Introducción

La transgénesis que significa la introducción de ADN exógeno en el genotipo de un animal es una herramienta importante tanto para la agricultura, como para la farmacología, la biomedicina y la biotecnología. Una gran variedad de métodos han sido desarrollados para introducir ADN, pero solo algunos de ellos han sido utilizados en el cerdo, entre ellos la inyección de ADN en embriones y la transfección de células somáticas seguidas del trasplante nuclear o clonación. En el presente artículo se describirá algunos de los aspectos generales de la clonación animal (para una revisión detallada recomendamos los artículos de Renard et al., 2002 y Dinnyés et al., 2002), luego se detallarán algunas de nuestras experiencias en el terreno de la clonación y transgénesis bovina y finalmente describiré las posibilidades y limitaciones de la clonación y transgénesis en el cerdo.

El principio básico de la clonación por trasplante o transferencia nuclear consiste en remover el núcleo de un ovocito maduro no fertilizado (ovoplasto recipiente) y transferirle un núcleo o una célula entera (núcleo o célula donante).

Las células somáticas se reproducen in vitro con gran facilidad y como toda célula diploide no reproductiva de un individuo tiene la misma información genética, por lo que mediante el trasplante nuclear teóricamente se pueden producir tantos animales idénticos como se deseen. Este grupo de animales idénticos se denomina clón y el procedimiento para generarlos clonación.

La extracción del núcleo del ovocito se realiza generalmente por micromanipulación y aspiración con pipetas de vidrio, controladas por equipos de movimiento de precisión denominados micromanipuladores. El núcleo del ovocito madurado in vitro, normalmente se detiene después de la primera división meiótica en el estadio de metafase II, hasta el momento de ser fecundado por un espermatozoide. Después de la fecundación será el espermatozoide mediante un proceso denominado “activación” quien inicia una serie de sucesivas duplicaciones del ADN y divisiones celulares. En la clonación la activación debe ser realizada artificialmente por la aplicación de diversos métodos químicos o físicos.

La tecnología básica para la clonación por trasplante nuclear en mamíferos fue desarrollada en el ratón en los años 80 usando como donante células de embriones (blastómeros), pero los resultados en esta especie fueron desalentadores. Sin embargo, Willadsen (1986), usando como donante blastómeros de embriones tempranos produjo los primeros corderos clonados. Un año después Robl et al., (1987) con el mismo tipo de células donante produjeron los primeros terneros clonados. El primer clon de cerdo obtenido a partir de embriones de 4 células fue reportado en 1989 (Prather et al.) pero no se pudieron alcanzar resultados similares hasta 10 años después (Li et al., 2000).

La técnica de clonado con células embrionarias no logro tener gran aceptación a los entre investigadores y profesionales debido a numerosos factores. Entre ellos el hecho que se debía trabajar con células embrionarias cuyo mérito genético era desconocido, además los embriones tempranos tienen un reducido número de células. Sumando a esto las bajas tasas de preñez y dificultades en el parto producidas por el excesivo peso de las crías no se promovió la aplicación comercial de la técnica. El entusiasmo inicial fue disminuyendo y prácticamente ninguna compañía estaba usándola comercialmente hasta 1997. En este año Wilmut et al. (1997) publican el nacimiento de la oveja Dolly la cual fue producida por clonación de células provenientes de un animal adulto.

Como inicialmente los resultados de clonación con células donantes adultas eran poco eficientes, se considero la posibilidad de usar células fetales como células donantes. Los grupos del Instituto de Roslin (Schnieke et al., 1997) y de la Universidad de Massachusetts (Cibelli et al., 1998) produjeron los primeros ovinos y bovinos respectivamente clonados y transgénicos. Se demostró que la técnica de trasplante nuclear es extremadamente eficiente para producir animales modificados genéticamente. Las células fetales pueden multiplicarse in vitro por periodos mas prolongados que las adultas, lo que permite introducir e incluso eliminar genes y además obtener un mayor número de clones a término y una mayor supervivencia después del nacimiento que las obtenidas a partir de células adultas (Heyman et al. 2002).

Los telómeros (la parte extrema de los cromosomas) de la primera oveja clonada (Dolly) eran mas cortos y no correspondían su edad real, sino con la edad de la célula donante (Ashworth et al., 1998). En otras palabras, sus telómeros eran los de una oveja varios años más vieja que la que correspondía a la edad de Dolly. Los telómeros se van acortando cada vez que las células se dividen llegando hasta un determinado tamaño, a partir del cual las células no se dividen más. Normalmente este mecanismo protege al organismo de que se multipliquen en exceso células potencialmente peligrosas. Sin embargo investigadores de la compañía ACT con base en Massachusetts han demostrado exactamente lo contrario (Lanza et al., 2000), y por clonación podrían elongarse los telómeros y en términos celulares rejuvenecer las células.

Algunos de los grandes problemas de la clonación, inicialmente descriptos en los trabajos de neozelandeses y japoneses (Wells et al., 1999; Kato et al., 1999), siguen siendo actuales, como son las numerosas pérdidas durante la preñez y la alta mortandad perinatal, obligando ésta ultima a realizar cuidados intensivos en los recién nacidos. La causa aparente de este problema, al menos en parte, se debe a anomalías placentarias. Una de las hipótesis es que la expresión de los genes de los animales clonados es incorrecta y que la célula donante fue reprogramada ineficientemente por el ovocito enucleado.

A continuación describimos algunos experimentos que si bien los realizamos en bovinos, nos describen algunas de las variables a considerar para la producción de animales clonados y transgénicos en otras especies.

Experimento 1: Clonación de células adultas y sistema de cultivo

En un primer experimento destinado a incrementar la tasa de supervivencia de los embriones clonados a partir de animales adultos, comparamos diferentes sistemas de cultivo embrionario y diferentes tipos de células somáticas donantes. El objetivo de este experimento fue establecer las condiciones mas adecuadas para producir embriones clonados, en paralelo, se realizaban experiencias de transfección con células fetales.

Células de la granulosa y fibroblastos provenientes de animales adultos fueron utilizadas como células donantes al comparar diferentes sistemas de cultivo embrionario. Después del trasplante nuclear, fusión y activación, tres sistemas de cultivo se utilizaron, cuando las células donantes fueron fibroblastos adultos: TCM-199+5% FCS o Menez+5% FCS (ambos con células Vero como co-cultivo y atmósfera con 5 % de CO₂ en aire) y SOF sin co-cultivo pero con una baja concentración de 5 % O₂, 5% CO₂, y 90 % de N₂. Para las células de la granulosa, los embriones producidos solo se cultivaron con Menez+5% FCS y células Vero como co-cultivo y 5 % de CO₂ en aire.

Los resultados de este experimento se describen en la tabla 1. El grupo tratamiento SOF obtuvo clivaje y desarrollo hasta blastocisto en mayor proporción que los otros tratamientos, además se simplifico el trabajo de laboratorio dado que entre otras ventajas no se necesitaba preparar la línea celular para el co-cultivo, por lo que se decidió su utilización en el siguiente experimento. Sin embargo el único animal que llego a término fue producido a partir de TC199 + VERO, pero murió durante el parto.

Tabla 1. Experimento 1: Clonación con células adultas

Tratamiento	n	Clivaje (%)	Blastocito (%)	Preg. (%)	Nacimientos
Granulosa					
C199+VERO	92	59 a	26 (28)b	11 (12)	0
Fibroblasto					
TC199+VERO	294	53.9 a	22 (7.5)a	5 (38.4)	1
Fibroblasto					
Menez+VERO	324	72.3 bc	29 (8.9)a	5 (29.4)	0
			24		
Fibroblasto SOF	108	75.0 bc	(22.2)b	5 (45.4)	0

abc Porcentajes dentro columnas con diferente letras son diferentes (P<0.05)

Experimento 2: Clonación de células fetales transgénicas y ovoplasto tratados con roscovitina

En un segundo experimento se comparo el desarrollo de embriones bovinos producido de líneas fetales no transfectadas y transfectadas, en este último grupo se utilizo ovoplastos tratados con roscovitina o no. Esta droga permite inhibir la

Tratamiento	n	Clivaje (%)	Blastocito (%)	Implantes	Preñez	Nacidos
F. no transfectado	197	122 (62)	33 (16.7)	16	5 (31)	1
F. transfectado	646	476 (74)	128 (19.8)	56	25 (44.6)	7
F. transfectado roscovitina	228	191 (84)	51 (22.3)	30	16 (53.3)	6

maduración por un periodo de 24 horas lo que favorece la posibilidad de ir un día al matadero y trabajar 2 días diferentes. Nuestra hipótesis era también que la roscovitina eventualmente puede mejorar la viabilidad del embrión producido. La técnica utilizada con algunas modificaciones fue descripta previamente (Salamone et al., 2001).

Los embriones producidos en los todos los tratamientos fueron cultivados en SOF sin co-cultivo pero con una atmósfera de 5% de O₂, 5 % de CO₂ y 90 % de N₂. Se utilizaron como célula donante fibroblastos fetales, transfectados o no. Para la línea transfectada también se determino si la roscovitina podía incrementar la disponibilidad de ovocitos recipientes a lo largo de la semana y o incrementar su viabilidad.

Los resultados se describen en la tabla 2. No se observaron diferencias entre los tratamientos. La transfección no afecto la capacidad de desarrollo de los animales clonados, tampoco afecto el tratamiento de la receptora con roscovitina, sorprendentemente con este último tratamiento se observo una tendencia positiva en el desarrollo. Se produjeron trece animales transgénicos en menos de un año de trabajo lo que demuestra el potencial de clonación en la transgénesis de animales de granja.

Tabla 2. Experimento 2: Clonación utilizando como células donantes fibroblasto (F.) fetales transgénicas y recipientes tratados con roscovitina.

Utilizando células donantes adultas se observo que un solo feto prospero hasta la fecha de parto a pesar de haber producido numerosas preñeces (ver Tabla 1). Esto coincide con otros autores (Wells et al., 1999; Kato et al., 1999). Estos autores describen alta mortandad perinatal de los terneros producidos por clonado, en nuestra experiencia el único animal producido muere en el parto demostrando la necesidad de incrementar los cuidados intensivos del recién nacidos.

A diferencia de otros autores la transgénesis no indujo una reducción en la capacidad de desarrollo de los embriones clonados (Forsberg et al., 2002). En tanto que el tratamiento con roscovitina no solo no redujo la viabilidad sino que permitió observar un tendencia positivo en el desarrollo embrionario. La roscovitina es un inhibidor de MPF y MAPK, dos complejos reguladores de la maduración ovocitaria. Después de iniciada la maduración normal todos los eventos son regulados por un rápido incremento en MPF y MAPK citosólicos. Los cuales previenen la reconstrucción de la membrana nuclear y la entrada del núcleo en fase de síntesis de ADN hasta la fertilización o activación. La maduración nuclear se puede detener con roscovitina dado

que mantiene MPF y MAPK bajos. Esto permite retrasar la maduración 24 horas. La combinación del uso o no uso de esta droga posibilita trabajar por 2 días después de una sola visita al matadero. Si no se tratan los ovocitos con roscovitina 24 hs después se tendrán numerosas metafases II para enucleación y el trasplante nuclear. Por el contrario, si son tratadas con roscovitina recién podrá realizarse el trasplante nuclear 48 hs después, dado que las primeras 24 hs en roscovitina inhiben la maduración manteniendo el ovocito como vesícula germinal y luego se requiere 24 horas mas para llegar a metafase II.

En la Argentina se han adoptado muchas de las llamadas “Biotecnologías de la Reproducción” con relativa rapidez, tanto por la acción de profesionales de la actividad privada como la realizada por investigadores de organismos oficiales. Prueba de esto es la realización en 1978 de las primeras transferencias quirúrgicas de embriones por el doctor Rodríguez Dubra y colaboradores, los primeros nacimientos por fertilización in vitro (Salamone et al. 1995), las preñeces (Salamone et al. 2003) y el nacimiento de terneras por clonación y transgénesis (presente artículo). Todos estos hechos fueron producidos pocos años después de generadas estas tecnologías en los países desarrollados y pionera en relación a otros países del tercer mundo. Lo que nos permite ser optimistas respecto a las posibilidades futuras para el desarrollo y aplicación de estas técnicas en nuestro país.

El clonado ha tenido un progreso tan vertiginoso y un interés general tan grande que ha sido fácil seguir su evolución por los medios de divulgación masiva. Sin embargo, ha prevalecido el enfoque alarmista debido a su potencial aplicación en humanos. Por el contrario es nuestra opinión que esta técnica ayudará a generar conocimientos básicos para descubrir las bases de la totipotencialidad celular y la rediferenciación de los tejidos, permitiendo su aplicación terapéutica, para regenerar tejidos lesionados, incluyendo el tejido nervioso, y el pancreático entre otros.

Clonación y transgénesis en porcinos

Después de la exitosa clonación de ovinos, bovinos y caprinos numerosos laboratorios intentaron clonar cerdos. A pesar de los esfuerzos, en esta especie los resultados no fueron buenos inicialmente. Esto motivo que numerosos grupos hayan continuado con la producción de cerdos transgénicos por microinyección pronuclear. Así se han generado cerdos con un incremento de la conversión alimenticia, originados por la introducción de la construcción compuesta por metalotioneina + hormona del crecimiento (Nottle et al., 1999). Recientemente también se han obtenido cerdos destinados a aumentar la asimilación del fósforo y reducir la concentración de este elemento en las heces, mediante la expresión de la fitasa bacteriana en la glándula salivar de cerdos, esto tendría beneficios al reducir la polución ambiental. La fitasa es una enzima que desdobra el ácido fítico liberando el fósforo del mismo (Golovan et al., 2001). También se ha alterado la leche de los cerdos para incrementar la salud y el desarrollo de los lechones esto se ha logrado sobreexpresando alfa-globulina bovina (Wheeler et al 2001). Estas técnicas de modificación genética se realizaron en estos trabajos basadas en la introducción del DNA foráneo por microinyección en la cigotas.

Esta metodología es altamente ineficiente (1-2% de inserción estable) y produce un alto grado de mosaicismismo debido a la inserción tardía durante el desarrollo embrionario temprano.

El primer cerdo producido por clonación de células somáticas fue producido en el año 2000 (Polejaeva et al) desde esta fecha se han hecho importantes progresos. Entre ellos la producción de los primeros cerdos por incorporación de genes al azar (Park et al., 2000; Lai et al., 2001 y 2002). Si bien esta modificación aumenta la eficiencia en la obtención de animales transgénicos, la integración del transgen continúa siendo al azar, por lo cual la expresión del mismo es esencialmente impredecible. Para solucionar este problema hemos estado reclonando los animales con expresión adecuada (Salamone et al., 2004) para tener animales de producción predecible, pero aun son necesarias futuras mejoras.

La técnica de recombinación homóloga permite la modificación precisa de los genes existentes, evita los problemas derivados de los efectos posicionales y de inactivación por inserción y permite además la inactivación de genes específicos así como el reemplazo de un gen por otro. La utilización de la técnica de recombinación homóloga permite aplicaciones sumamente atractivas en el campo de la producción animal (Piedrahita, 2000).

En cerdos la transgénesis en sitio específico o recombinación homóloga ha sido lograda exitosamente (Day et al., 2002; Lai et al., 2002; Ramsoondar et al., 2003; Sharma et al., 2003).

Los cerdos son fisiológicamente similares a humanos y ha habido intenso interés en utilizarlo para trasplante de órganos, así como, para modelo de enfermedades. La producción de órganos y tejidos animales humanizados para ser utilizados en trasplante ha despertado también un interés enorme. Esto implicará la expresión de ciertas proteínas humanas y el silenciamiento de algunas proteínas de origen animal. Esto puede lograrse creando cerdos por recombinación homóloga mediante el llamado "knockout de la alfa-1,3-galactosiltransferasa". Para obtener producto para trasplante es probable que se requieran sucesivas modificaciones genéticas.

La expresión de proteínas de valor biológico especialmente de interés farmacológico usando como biorreactores animales transgénicos ha demostrado ser un sistema muy eficiente de producción en numerosas especies. Las limitaciones han sido el nivel de expresión, modificaciones post-transcripcionales y el efecto biológico de la proteínas exógenas sobre el animal que las produce. Una vez que el animal fundador ha sido obtenido también es una limitante llegar a tener un buen número de animales a escala comercial. En el porcino se ha seleccionado las vesículas seminales como órgano de expresión de dichas moléculas. Las ventajas que tiene dichas glándulas incluyen el hecho que el semen luego de producida la pubertad es generado constantemente y por lo tanto también el fluido seminal, además se puede colectar en una forma no invasiva, no dolorosa y que no requiere gran entrenamiento. Un cerdo transgénico puede producir por muchos años y ser reemplazado por reproducción simple en forma no muy costosa. El plasma seminal es una secreción externa y una vez producida no es reabsorbida, es mas, el exceso de secreción prostática es eliminada por

uretra a través de la orina. Esto permitiría expresar moléculas con fuerte actividad biológica y estaría ofreciendo ventajas frente a la glándula mamaria donde ya se ha observado la reabsorción linfática de proteínas secretadas. Por otro lado ha sido demostrado que en ratones a los que se le incorporo el transgen de la hormona del crecimiento para ser expresado en vesículas seminales, no se incrementan los niveles en sangre de dicha hormona cuando se llega a la pubertad. Incluso cuando se expresan niveles de 500 ug/ml en el fluido seminal (Sirad et al., 2002). Además los espermatozoides son muy sensibles a cambios de pH y a las proteasas y el fluido seminal esta preparado para proteger a los espermatozoides a través de anti-proteasas, esto es interesante porque probablemente sería posible aprovechar esta característica para preservar proteínas frágiles. Las proteínas están en el plasma seminal en forma soluble y no forman miscelas como en la leche donde las proteínas pueden ser atrapadas en las mismas. Los espermatozoides pueden ser centrifugados y el plasma seminal diluido y purificado usando todo tipo de columnas sin problemas de formación de coagulos.

Los cerdos son una especie con una eficiencia reproductiva importante, un macho heterocigoto puede inseminar unas 50 cerdas por mes utilizando inseminación artificial y cada una de estas puede dar origen a 10 lechones, 5 de los cuales serán machos y 2-3 transgénicos, originando un grupo de 150 lechones en 5 meses, por lo que al año habría un numero suficiente de machos para empezar a producir a escala industrial

A la pregunta ¿cuales serán sus aplicaciones agropecuarias en nuestro sistema de producción? La respuesta es que nuestra capacidad de imaginación e innovación es insuficiente. La aplicación más inmediata será la multiplicación de animales de elite. La utilización de animales clonados facilitara la producción y difusión de animales transgénicos. Por ejemplo, existe interés en Europa en reemplazar el gen PrP que torna a los bovinos susceptibles al virus de la vaca loca por otro que le otorgue mayor resistencia. Numerosas compañías ya han producidos animales transgénicos y clonados especialmente expresando nuevas proteínas en leche de valor farmacéutico (Baguisi *et al.*, 1999, Salamone et al. 2005). Hay proyectos que intentan producir cerdos modificados genéticamente para producir semen de un solo sexo, o utilizar cerdos como modelo para enfermedades humanas como la arteriosclerosis, etc. (Forsberg, 2005). Todo esto indica la enorme potencialidad de esta técnica y el futuro desarrollo que pueda alcanzar en la especie porcina.

Agradecimientos

A la empresa Biosidus por la financiación total del proyecto y facilidades para realizar los experimentos mencionados. A los integrantes de Munar y asociados por la colaboración en las transferencias embrionarias. A Jorge Artuzo por el cuidado de los terneros y Dr G Berra por su ayuda durante los nacimientos.

Bibliografía

Ashworth D, Bishop M, Campbell K, Colman A, Kind A, Schnieke A, Blott S, Griffin H, Haley C, McWhir J and Wilmut I. (1998). DNA microsatellite analysis of Dolly [letter] [see comments]. *Nature* 394, 329.

Baguisi A, Behboodi E, Melican DT, Pollock JS, Destremes MM, Cammuso C, Williams J L, Nims SD, Porter CA, Midura P, Palacios MJ, Ayres SL, Denniston RS, Hayes ML, Ziomek CA, Meade HM., Godke RA., Gavin WG, Overstrom EW and Echelard Y. (1999). Production of goats by somatic cell nuclear transfer. *Nat Biotechnol* 17, 456-61.

Cibelli JB, Stice SL, Golueke PJ, Kane JJ, Jerry J, Blackwell C, Ponce de Leon FA and Robl JM. (1998). Cloned transgenic calves produced from nonquiescent fetal fibroblasts [see comments]. *Science* 280, 1256-8.

Dai YF, Vaught TD, Boone J, Chen SH, Phelps CJ, Ball S, Monahan JA, Jobst PM, McCreath KJ, Lamborn AE, Cowell-Lucero JL, Wells KD, Colman A, Polejaeva IA, Ayares DL. (2002). Targeted disruption of the alpha 1,3-galactosyltransferase gene in cloned pigs. *Nature Biotechnology* 20:251–255.

Dinnyés A, De Sousa P, King T and Wilmut I. (2002). Somatic Cell Nuclear Transfer: Recent Progress and Challenges *Cloning and Stem Cells* 4: 81-90.

Forsberg EJ, Strelchenko NS, Augenstein ML, Betthauser JM, Childs LA, Eilertsen KJ, Enos JM, Forsythe TM, Golueke PJ, Koppang RW, Lange G, Lesmeister TL, Mallon KS, Mell GD, Misica PM, Pace MM, Pfister-Genskow M, Voelker GR, Watt SR, y. Bishop. (2002). Production of Cloned Cattle from In Vitro Systems *Biol Reprod* 67, 327–333 .

Forsberg ej. Commercial application of nuclear transfer cloning: three examples. (2005). *Reprod Fert and Develop* 17:59-68.

Golovan SP, MeidengerRG Ajakaiye A, Cottrill M, et al.(2001) Pigs expressing salivary phytase produce low phosphorus manure. *Nat Biotechnol* 19: 741-745.

Heyman Y, Chavatte-Palmer P, LeBourhis D, Camous S, Vignon X and Renard JP. (2002). Frequency and Occurrence of Late-Gestation Losses from Cattle Cloned Embryos

Biol Reprod 66: 6-13.

Lai LX, Tao T, Machaty Z, Kuhholzer B, Sun QY, Park KW, Day BN, Prather RS. (2001). Feasibility of producing porcine nuclear transfer embryos by using G2/M-stage fetal fibroblasts as donors. *Biology of Reproduction* 65:1558–1564.

Lai LX, Park KW, Cheong HT, Kuhholzer B, Samuel M, Bonk A, Im GS, Rieke A, Day BN, Murphy CN, Carter DB, Prather RS. (2002). Transgenic pig expressing the enhanced green fluorescent protein produced by nuclear transfer using colchicine-treated fibroblasts as donor cells. *Molecular Reproduction & Development* 62:300–306. [PubMed]

Lai LX, Kolber-Simonds D, Park KW, Cheong HT, Greenstein JL, Im GS, Samuel M, Bonk A, Rieke A, Day BN, Murphy CN, Carter DB, Hawley RJ, Prather RS.

(2002). Production of alpha-1,3-galactosyltransferase knockout pigs by nuclear transfer cloning. *Science* 295:1089–1092.

Lanza RP, Cibelli JB, Blackwell C, Cristofalo VJ, Francis MK, Baerlocher GM, Mak J, Schertzer M, Chavez EA, Sawyer N, Lansdorp PM and West M. D. (2000). Extension of cell life-span and telomere length in animals cloned from senescent somatic cells. *Science* 288, 665-9.

Li GP, Tan JH, Sun QY, Meng QG, Yue KZ, Sun XS, Li ZY, Wang HB, Xu LB. (2000). Cloned piglets born after nuclear transplantation of embryonic blastomeres into porcine oocytes matured in vitro. *Cloning*;2:45–52.

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

Park KW, Cheong HT, Lai LX, Im GS, Kuhholzer B, Bonk A, Samuel M, Rieke A, Day BN, Murphy CN, Carter DB, Prather RS. (2001). Production of nuclear transfer-derived swine that express the enhanced green fluorescent protein. *Animal Biotechnology*;12:173–181.

Piedrahita,JA. (2000). Targeted modification of the domestic animal genome. *Theriogenology* 53, 105-116.

Polejaeva IA, Chen SH, Vaught TD, Page RL, Mullins J, Ball S, Dai YF, Boone J, Walker S, Ayares DL, Colman A, Campbell KHS. (2000). Cloned pigs produced by nuclear transfer from adult somatic cells. *Nature* 407:86–90.

Polejaeva I, Chen SH., Vaught T, Jobst P, Ball S & Ayares D. (2002) Efficiency of porcine somatic cell nuclear transfer: in vivo system versus in vitro *Transgenic Research* 11: 77.

Prather RS, Sims MM, First NL. (1989). Nuclear transplantation in early pig embryos. *Biology of Reproduction*;41:414–418

Nottle MB, Nagashima H, Verma PJ, Du ZT and Grupen CG et al. (1999) Production and analysis of transgenic pigs containing a metallothionein porcine growth hormone gene construct. In *transgenic Animals in Agriculture*. Eds Murray JD, Anderson GB, Oberbauer AM, McGloughlin) pp 145-156.

Ramsoondar JJ, Machaty Z, Costa C, Williams BL, Fodor WL, Bondioli KR. (2003). Production of {alpha}1,3-Galactosyltransferase-Knockout Cloned Pigs Expressing Human {alpha}1,2-Fucosyltransferase. *Biology of Reproduction*;69:437–445.

Renard JP, Zhou Q, LeBohurgis D, Chavatte-Palmer, I Hue, Y Heyman and Vignon X. (2002). Nuclear Transfer Technologies:Between successes and doubts *Theriogenology* 57: 203

Robl JM, Prather R, Barnes F, Eyestone W, Northey D, Gilligan B and First NL. (1987). Nuclear transplantation in bovine embryos. *J Anim Sci* 64, 642-7.

Salamone DF, Valdez A Baraño JL. (1995). Producción de los Primeros Terneros Nacidos en la Argentina Por Maduración Y Fertilización In Vitro de Ovocitos

Recuperados de Animales Sacrificados para Consumo. Seminario Internacional de Embriones Biotecnología y Tecnologías Avanzadas. 4-5 Mayo Montevideo. Uruguay.

Salamone DF, Adams GP and Mapletoft RJ. (1999). Changes in Bovine Cumulus-Oocyte Complex Morphology and Oocyte Developmental Competence in Subordinate Follicles During the Different Phases of Follicle Wave. *Theriogenology*, (52)4: 549-561.

Salamone DF, Damiani P, Fissore RA, Robl JM and Duby RT. (2001). Ooplasmic and Nuclear Maturation of Calf Oocytes: Assessment By Biochemical And Nuclear Transfer Approach. *Biology of Reproduction*, Junio, 64:1761-1768

Salamone DF, Santos CB, Baraño JL, Bussmann L, Artuso J, Valdez A, Munar C, Werning C and Melo C. (2003). Effect of different culture systems, donor cell origin and roscovitin treatment of recipient oocytes in bovine cloning. *Theriogenology* 59: 285.

Salamone DF, Santos CB, Baraño JL, Bussmann L, Artuso J, Mujica I, Munar C, Berra G. and Melo C. (2004). Effect of Calf Recloning on Embryo and Fetal Survival. *Reprod Fert and Develop* 16:158.

Salamone DF, Baraño JL, Santos CB, Bussmann L, Artuso J, Carboneto C, Paupuchado M Criscuolo M, Munar C, Berra G. and Melo C. (2005). High level of expression of biactive human recombinant growth hormone in milk. *Reprod Fert and Develop* 17:317.

Schnieke AE, Kind AJ, Ritchie WA, Mycock K, Scott AR, Ritchie M, Wilmut I, Colman A, and Campbell KH. (1997). Human factor IX transgenic sheep produced by transfer of nuclei from transfected fetal fibroblasts. *Science* 278, 2130-3.

Sirard MA, Pothier F, Dyck M and Lacroix D. (2002). Pharmaceutical production in the semen of transgenic pigs. *Transgenic Research* 11: 74,.

Sharma A, Naziruddin B, Cui C, Martin MJ, Xu H, Wan H, Lei Y, Harrison C, Yin J, Okabe J, Mathews C, Stark A, Adams CS, Houtz J, Wiseman BS, Byrne GW, Logan JS. (2003). Pig cells that lack the gene for alpha 1-3 galactosyltransferase express low levels of the gal antigen. *Transplantation*;75:430-436.

Susko-Parrish JL, Leibfried-Rutledge ML, Northe DL, Schutzhus V, First NL. (1994). Inhibition of protein kinase after an induced calcium transient causes transition of bovine oocytes to embryonic cycles without meiotic completion. *Dev Bio*; 166:729-739.

Wells DN, Misica PM and Tervit HR. (1999). Production of cloned calves following nuclear transfer with cultured adult mural granulosa cells. *Biol Reprod* 60, 996-1005.

Wilmut I, Schnieke AE, McWhir J, Kind AJ and Campbell KH. (1997). Viable offspring derived from fetal and adult mammalian cells [see comments] [published erratum appears in *Nature* 1997 Mar 13;386(6621):200]. *Nature* 385, 810-3.

Wheeler MB, Bleck GT and Donovan.(2001) Transgenic alteration of sow milk to improve piglet growth and health. *Reprod Suppl* 58:313-324.