

EFFECTO DE LA ELECTROPORACIÓN SOBRE LA CAPACIDAD DE DESARROLLO EMBRIONARIO DE OVOCITOS Y CIGOTOS PORCINOS

Effect of electroporation on the embryonic development capacity of porcine oocytes and zygotes

Torregrosa-Fuentes, M*.; García-Cánovas, M.; Gil, M.A.; Cuello, C.

Departamento de Medicina y Cirugía Animal, Facultad de Veterinaria, Universidad de Murcia.

Autor de correspondencia: Marcos Torregrosa Fuentes, m.torregrosafuentes@um.es

Tipo de artículo: Trabajo Fin de Grado (Veterinaria)

Recibido: 16/09/2025

Aceptado: 25/09/2025

RESUMEN

El objetivo del presente trabajo fue evaluar los efectos de la electroporación de ovocitos maduros y cigotos sobre su posterior desarrollo embrionario. Se emplearon 3485 ovocitos porcinos madurados *in vitro*, algunos se electroporaron antes de la fecundación *in vitro* (FIV). Algunos ovocitos maduros electroporados no se fecundaron para estudiar si la electroporación produce activación partenogenética. Un grupo de cigotos se electroporó a las 2 horas después de la FIV y otros 5 horas después. La electroporación se realizó con dos voltajes diferentes (25 y 30 V) en medio OPTIMEM. En día 2 de cultivo *in vitro* se evaluó la tasa de división embrionaria y en día 7 el desarrollo hasta blastocisto. El grupo control fueron cigotos no electroporados y cultivados hasta día 7. La electroporación de ovocitos maduros afectó negativamente a todos los parámetros de desarrollo embrionario estudiados. Además, indujo activación partenogenética, mostrando los partenotes un desarrollo hasta blastocisto similar a los ovocitos maduros electroporados y fecundados. La electroporación de los cigotos 2 horas después de la FIV sólo tuvo efecto negativo a 30 V, con un descenso significativo de la formación de blastocistos en relación con el total de ovocitos cultivados ($28,08 \pm 2,10\%$; $p < 0,05$). Por el contrario, la electroporación de cigotos 5 horas después de la FIV, independientemente del voltaje empleado, no tuvo efectos sobre el desarrollo embrionario, mostrando este grupo resultados similares al control. En conclusión, la electroporación de cigotos a las 5 horas (tanto a 25 como 30 V) y 2 horas (usando 25 V) después de la FIV mantuvo un desarrollo embrionario similar al

presentado por los controles. De forma contraria, la electroporación de ovocitos maduros afectó negativamente a su potencial de desarrollo e indujo su activación partenogenética.

Palabras clave: Electroporador, embrión, blastocisto, cerdo, cultivo *in vitro*.

SUMMARY

The aim of this study was to evaluate the impact of electroporation on *in vitro* matured (MII) oocytes and *in vitro* produced zygotes (ZG) at 2- and 5-hours post *in vitro* fertilization (IVF). Oocytes collected from prepubertal gilts were matured *in vitro*. A total of 3485 MII oocytes were used in this study. Electroporation was performed in Opti-MEM 1 medium without gene editors using either 25 or 30 V. The first group of MII was electroporated at the end of the maturation period, half of them were subjected to IVF, while the other half was incubated in IVF medium without sperm to assess parthenogenesis. The remaining oocytes were electroporated either 2 h (ZG-2) or 5 h (ZG-5) after the onset of sperm co-incubation. Controls were non-electroporated oocytes subjected to IVF. Presumptive zygotes from all groups were cultured for 7 days. On day 2 of *in vitro* culture the embryonic cleavage rate and the rate of degenerated oocytes were assessed. At day 7 of IVC the blastocyst formation rate and the efficiency were calculated. The total cell number and apoptosis index of day 7 blastocysts were assessed. The electroporation produced an increased ($p<0.05$) percentage of degenerated oocytes. Electroporation induced the parthenogenetic activation of MII resulting in similar embryonic development to that of their fertilized counterparts. The electroporation of ZG-2-30 showed a decrease ($p<0.05$) in the blastocyst formation rate, while the other groups of zygotes kept comparable results to controls ($40.90 \pm 2.80\%$). In conclusion, electroporation of zygotes at 5 h (either with 25 or 30 V) and at 2 h (using 25 V) after IVF supports similar embryo development to that of controls. In contrast, electroporation of MII oocytes impairs developmental potential and induces parthenogenetic activation, resulting in developmental outcomes like those of fertilized oocytes.

Keywords: Electroporator, embryo, blastocyst, pig, *in vitro* culture.

INTRODUCCIÓN

El cerdo es una especie estrechamente relacionada con la sociedad, lo que ha despertado un creciente interés en distintos ámbitos de la investigación. Más allá de su importancia en ganadería, su uso se ha extendido a diferentes ramas de la Biomedicina (Hamze et al., 2025). Gracias a las similitudes anatómicas, fisiológicas y genéticas que los cerdos comparten con el ser humano, actualmente se consideran la mejor especie para generar biomodelos de enfermedades (Perleberg et al., 2018), la producción de biomoléculas con fines farmacológicos y la obtención de tejidos y órganos para xenotransplantes (Hryhorowicz et al., 2020). Todas estas aplicaciones biomédicas requieren la edición génica de ovocitos y/o cigotos. En este contexto, la producción *in vitro* (PIV) de embriones porcinos adquiere un papel fundamental, pues es el único medio capaz de proporcionar, de

forma fácil y económica, un gran número de cigotos para su edición.

Actualmente, son múltiples las estrategias para la obtención de cerdos genéticamente modificados, la más empleada es la edición directa de ovocitos y/o cigotos mediante el complejo CRISPR/Cas 9 (Hamze et al., 2025). Este actúa como una nucleasa, induciendo cortes en la doble hebra de ADN, permitiendo la eliminación de genes concretos (*knock outs*) o la incorporación de genes exógenos (*knock-in*) (Hillary & Ceasar, 2023). Para que esto ocurra, es indispensable que el complejo CRISPR/Cas9 penetre en el interior del ovocito o cigoto, siendo la microinyección el método más empleado hasta el momento (Ratner et al., 2021).

La electroporación ha surgido recientemente como un método alternativo a la microinyección (Ratner et al., 2021). Se trata de un procedimiento físico que crea, de manera transitoria, pequeñas brechas en la membrana citoplasmática al someter

a las células a una corriente eléctrica pulsátil (Navarro-Serna et al., 2022). Tanihara et al. (2016) emplearon esta técnica por primera vez para la edición de cigotos porcinos y establecieron como condiciones óptimas de electroporación un total de 5 pulsos de 1 ms de duración a 30 V. Posteriormente otros investigadores han aplicado con éxito la electroporación para la edición de embriones porcinos (Piñeiro-Silva & Gadea, 2024).

A pesar de que la electroporación, hasta el momento, ha aportado resultados prometedores en la edición de ovocitos y cigotos porcinos (Ratner et al., 2021), se conoce muy poco acerca de su impacto sobre el posterior desarrollo embrionario y la calidad de los blastocistos obtenidos. Por otro lado, es necesario estudiar en profundidad la capacidad de generar partenogénesis cuando se aplica a ovocitos maduros.

Por todo ello, el objetivo del presente trabajo fue evaluar los efectos de la electroporación, a 25 y 30 V, de ovocitos porcinos maduros y cigotos 2 y 5 horas después de la fecundación *in vitro* (FIV), sobre su posterior desarrollo embrionario y la calidad de los blastocistos obtenidos. Además, se evaluó la activación partenogénica de los ovocitos maduros electroporados.

MATERIAL Y MÉTODOS

1. Medios y reactivos químicos

Salvo que se indique lo contrario, todos los productos químicos empleados en este estudio provienen de Sigma-Aldrich Co. (Alcobendas, Madrid, España). A continuación, se describen los medios empleados en las diferentes fases de este experimento.

La PIV de los embriones requiere de una gran variedad de medios. El transporte de los ovarios se realizó en una solución salina (0,9 mg/mL NaCl en agua) enriquecida con 70 µg/mL de kanamicina. Como medio de recogida de los complejos cúmulus-ovocito (COCs), se empleó el medio de Tyrode con lactato suplementado con 10 mM de HEPES y 0,1 mg/mL de alco-

hol polivinílico (TL-HEPES-PVA; Martínez et al., 2014). La maduración *in vitro* (MIV) de los COCs se llevó a cabo en el medio TCM-199 (Gibco Life Technologies S.A., Barcelona, España) suplementado con 0,55 mM de glucosa, 0,9 mM de piruvato sódico, 75 µg/mL de penicilina, 50 µg/mL de estreptomicina, 1 mg/mL de PVA, 0,57 mM de cisteína y 10 ng/mL de factor de crecimiento epidérmico. La FIV se realizó en medio tampón Tris modificado (TBMm; Abeydeera & Day, 1997), suplementado con 2 mM de cafeína y 0,3 mg/mL de albúmina sérica bovina (BSA). El medio empleado para el CIV de los embriones fue el *North Carolina State University* (NCSU)-23 (Petters & Wells, 1993), suplementado con 0,3 mg/mL PVA y 100 ng/mL de factor plaquetario 4 (Cambra et al., 2020). Los embriones se cultivaron durante dos días en medio NCSU-23 enriquecido con 0,3 mM de piruvato sódico y 4,5 mM de lactato y, posteriormente, en medio de cultivo con 5,5 mM de glucosa durante cinco días adicionales.

El medio utilizado en la electroporación de ovocitos y cigotos fue el Opti-MEM 1 (Gibco Life Technologies S.A., Barcelona, España).

2. Condiciones para la incubación y el equilibrio de las placas

Las incubaciones de ovocitos y embriones, así como el equilibrio previo de las placas, se realizaron en un Multi-incubador CUBO (Astec bio; USA), en una atmósfera controlada con un 5% de CO₂ en aire, humedad a saturación y una temperatura de 38,5°C. Las placas de lavado y de cultivo se cubrieron con una capa de aceite de parafina. Todas las manipulaciones de ovocitos y embriones se realizaron en una cabina de flujo laminar (L126, Telstar; España).

3. Recolección y maduración *in vitro* de complejos cúmulus-ovocito

Los ovarios se obtuvieron de cerdas prepuberales sacrificadas en un matadero co-

mercial (El Pozo S.A., Murcia, España) y se transportaron al laboratorio a 35 °C. Los ovarios se lavaron 3 veces en solución salina y se seccionaron con un bisturí los folículos de 3-6 mm de diámetro. Los COCs se recogieron en medio TL-HEPES-PVA. Se seleccionaron aquellos COCs que presentaron varias capas de células del cúmulus, así como un citoplasma uniforme (Figura 1A-B-C) y se lavaron por triplicado en 500 µL de medio de MIV previamente equilibrado en el incubador. Finalmente, grupos de 70-80 COCs se colocaron en gotas de MIV de 500 µL en placas de cuatro pocillos. La MIV de los ovocitos se realizó en dos fases. Las primeras 22 horas en medio suplementado con 10 UI/mL de gonadotropina coriónica equina (eCG) y 10 UI/mL de gonadotropina coriónica humana (hCG). Las siguientes 22 horas, en el mismo medio en ausencia de hormonas.

4. Fecundación *in vitro*

Finalizado el proceso de maduración, los COCs fueron desnudados mediante agitación mecánica a 1660 ciclos/min durante 2 minutos en medio TL-HEPES-PVA suplementado con 0,1 mg/mL de hialuronidasa (Figura 1D-E). Inmediatamente después, los ovocitos se lavaron tres veces en medio de MIV, seguidos por otros tres lavados en el medio de FIV. Se descartaron aquellos ovocitos con alteraciones morfológicas. La FIV se realizó siguiendo el protocolo rutinario de nuestro laboratorio (Martínez et al., 2019).

Brevemente, grupos de 40 ovocitos se colocaron en gotas de 50 µL de medio para su coincubación con los espermatozoides. En cada replicado se emplearon dos pajuelas de semen congelado (Martínez et al., 2019), descongeladas durante 20 segundos a 37°C. El semen (200 µL) se lavó por triplicado en solución tampona-

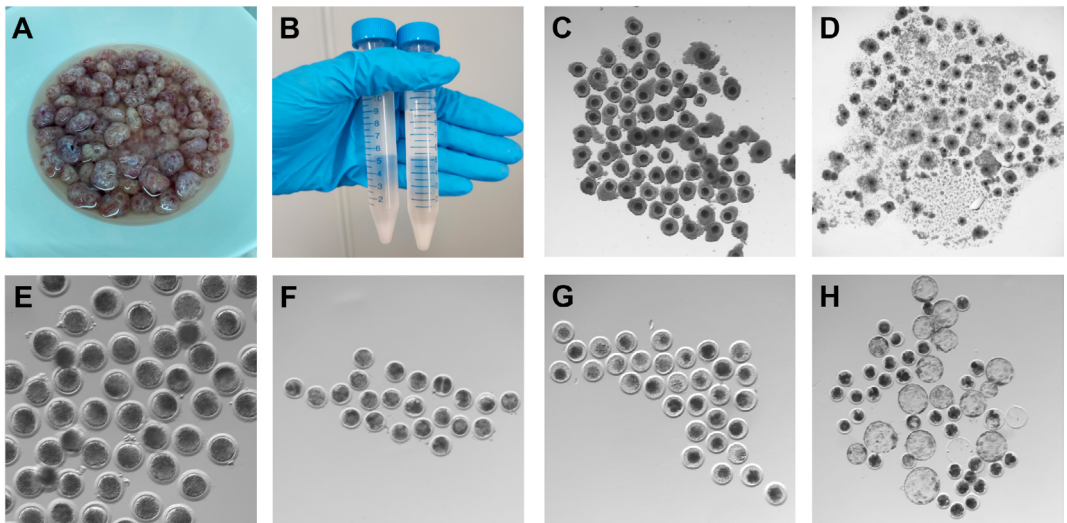


Figura 1. Proceso de producción de embriones porcinos *in vitro*. (A) Ovarios de cerdas prepuberales sacrificadas en matadero. (B) Tubos de lavado. (C) Ovocitos seleccionados para la maduración *in vitro*. (D) Ovocitos a las 44 horas de la maduración *in vitro*. (E) Ovocitos maduros desnudados. (F) Embriones en estadio de 2-4 células y ovocitos no divididos en día 2 de cultivo. (G) Ovocitos degenerados en día 2 de cultivo. (H) Blastocistos en día 7 de cultivo.

da con fosfato de Dulbecco (PBSD; Martínez et al., 2015) mediante centrifugado a 1900 revoluciones por 3 minutos. Finalmente, el sedimento obtenido se resuspendió en medio de FIV, de manera que al añadir 50 μ L de esta suspensión a los ovocitos la ratio de espermatozoide/ovocito fuera de 2000. La coincubación de los gametos se realizó durante 5 horas.

5. Cultivo de los embriones

Una vez transcurrido el tiempo de coincubación, los presuntos cigotos se lavaron tres veces en medio de CIV y se eliminaron los espermatozoides adheridos a la zona pelúcida mediante pipeteo manual. Posteriormente se colocaron en grupos de 40-50 embriones en gotas de 500 μ L de medio de CIV y realizó el cultivo secuencial hasta el día siete como se ha descrito anteriormente.

6. Electroporación de ovocitos madurados o presuntos cigotos

La electroporación se realizó en portaobjetos de vidrio con dos electrodos de alambre redondo separados entre sí por un espacio de 1 mm, colocados dentro de una placa Petri (BTX Glass Microslides; USA) y conectados a través de cables al electroporador (Multiporator-Eppendorf; Alemania). Grupos de 80 ovocitos maduros o presuntos cigotos, se lavaron tres veces en solución Opti-MEM 1 y se colocaron entre ambos electrodos en 10 μ L de medio de electroporación. Los ovocitos y/o cigotos fueron sometidos a 5 pulsos de 25 o 30 V (según el diseño experimental) de 1 ms de duración en un intervalo de 100 ms.

7. Evaluación del desarrollo embrionario

El grado de desarrollo embrionario de los presuntos cigotos se determinó en los días 2 y 7 de CIV mediante observación en un estereomicroscopio. Así pues, el día 2 se evaluó

tanto la tasa de división embrionaria, definida como el número de embriones en un estadio de 2-4 células (Figura 1F) sobre el total de ovocitos fertilizados; como la tasa de degenerados, definida como el número de embriones con la membrana plasmática desintegrada (Figura 1G) sobre el total de ovocitos fertilizados. Mientras que en el día 7, se determinó la tasa de formación de blastocistos (Figura 1H), definida como el número de blastocistos formados en relación al número de embriones divididos en el día 2. También se calculó la eficiencia, definida como la tasa de formación de blastocistos sobre el total de cigotos cultivados.

8. Evaluación de la tasa de apoptosis y número total de células mediante la tinción TUNEL

El estudio de la tasa de apoptosis de los blastocistos de día 7 se realizó mediante la técnica TUNEL (*Terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP Nick end labeling*; Brison & Schultz, 1997) modificada (Gonzalez-Plaza et al., 2022), utilizando un kit comercial (A23210; Thermo Fisher Scientific). Los blastocistos se fijaron en paraformaldehído al 4% en PBS durante 20 minutos a temperatura ambiente (25°C). Posteriormente se permeabilizaron (PBS + 1,5% *Tritón X-100* + 0,15% *Tween 20*) durante toda la noche dentro una cámara fría (4-6°C).

Antes de proceder con la reacción TUNEL, los blastocistos se lavaron en medio PBS con 3 mg/mL de BSA (PBS-BSA) a temperatura ambiente durante 10 minutos. Los controles positivos se incubaron con una solución de DNAsa I (10 μ g/mL en PBS-BSA) durante 20 minutos a 39°C. A partir de este punto, se procesaron igual que el resto de los grupos experimentales. Tras lavar los blastocistos permeabilizados en PBS-BSA con 0,5% de Tween (10 minutos), se incubaron en la solución de marcaje (10 μ L de tampón, 0,75 μ L de enzima TdT, 8 μ L de BrdUTP y 31,25 μ L agua MiliQ refiltrada) durante 1 hora a 38°C. En el caso de los controles

negativos se empleó solución de marcaje sin encima TdT. Finalizado el tiempo de incubación, todos los blastocistos se lavaron por triplicado, 5 minutos en PBS-BSA, y se incubaron en la solución de anticuerpo (5 μ L *Alexa Fluor 488-ani BrdU* + 95 μ L tampón de lavado) durante 30 minutos a temperatura ambiente.

Finalmente, los blastocistos se montaron entre porta y cubreobjetos en Vectashiel con Hoechst 33342 (10 μ g/mL). Las muestras se observaron al microscopio de fluorescencia a 465–495 nm y 330–380 nm de frecuencia para observar la fluorescencia verde y azul, respectivamente. Se evaluó el número total de núcleos que mostraban fluorescencia azul (teñidos con el Hoechst) y los núcleos apoptóticos que emitían fluorescencia verde (Figura 2). La tasa de apoptosis fue definida como el porcentaje de células apoptóticas respecto al total de células de cada blastocisto. Esta evaluación se realizó con ayuda del software ImageJ 1.54g (Wayne Rasband and contributors National Institutes of Health; USA).

9. Diseño experimental

En este estudio se emplearon un total de 3485 ovocitos madurados *in vitro*, de los cuales un grupo (CONTROL, n=429) no fue electro-

porado, sino que se sometió a fecundación y posterior cultivo. El resto de los ovocitos se electroporaron a distintos tiempos bien a 25 o 30 V, tal y como se representa en la Figura 3.

Algunos ovocitos se electroporaron a 25 o 30 V inmediatamente después de completar su maduración. Estos ovocitos se dividieron en dos grupos, uno de ellos se incubó en medio de FIV en ausencia de espermatozoides durante 5 horas (MII-PG-25, n=382; MII-PG-30, n=329) y se destinó al estudio de la partenogénesis, mientras que el otro se fecundó con normalidad (MII-25, n=423; MII-30, n=419). Los ovocitos restantes se electroporaron después de la FIV. Uno de ellos, fue electroporado pasadas 2 horas desde el inicio del cocultivo espermatozoides-ovocitos (CG-2-25, n=383; CG-2-30, n=330), y posteriormente los cigotos se incubaron en medio de FIV en ausencia de espermatozoides hasta completar las 5 horas de incubación. Los ovocitos restantes se electroporaron pasadas 5 horas desde el inicio del cocultivo (CG-5-25, n=453; CG-5-30, n=337) y posteriormente se cultivaron. Se evaluaron en todos los grupos los parámetros de desarrollo embrionario, así como el número total de células y niveles de apoptosis en los blastocistos de día 7, tal y como se ha descrito anteriormente.

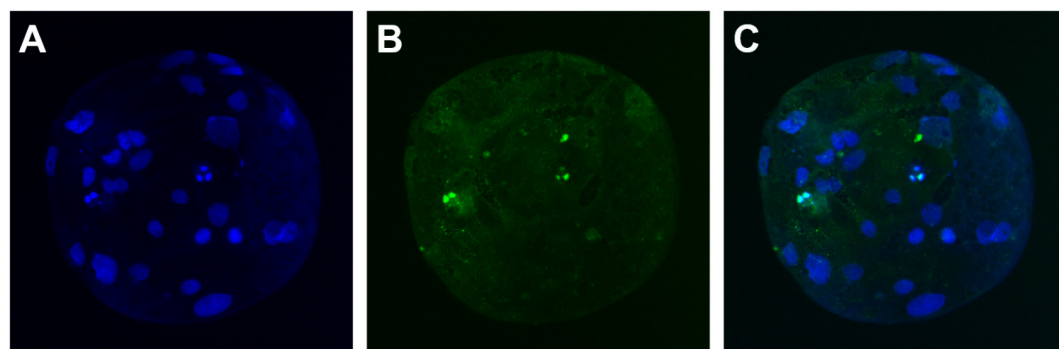


Figura 2. Imágenes de un blastocisto de día 7 de cultivo *in vitro* teñido con la técnica TUNEL para la evaluación de apoptosis. (A) Núcleos teñidos con Hoechst 33342. (B) Núcleos apoptóticos marcados por la tinción TUNEL. (C) Superposición de las imágenes A y B.

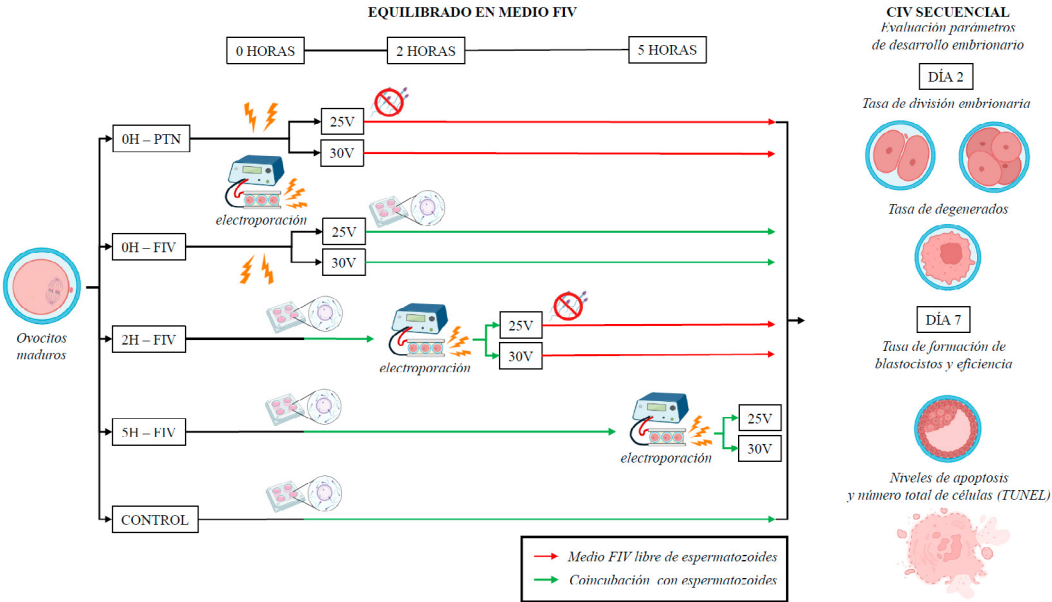


Figura 3. Diseño experimental. FIV: fecundación *in vitro*; CIV: cultivo *in vitro*.

10. Análisis estadístico

El análisis estadístico de los resultados se realizó con el programa informático SPSS (IBM Corp., Armonk, NY, EEUU) versión 28.0.1.1. Se analizó el efecto del grupo (ocho grupos experimentales y un control, descritos en el diseño experimental) sobre los parámetros de desarrollo embrionario (tasa de división, tasa de ovocitos degenerados, tasa de formación de blastocistos y eficiencia), número total de células y tasa de apoptosis. Los datos se expresaron en medias $\pm$ error estándar de la media. La normalidad de los datos se comprobó mediante la prueba de Shapiro-Wilk. Los datos relativos a tasa de formación de blastocistos y eficiencia, siguieron una distribución normal, por lo que se analizaron mediante una prueba ANOVA de un factor. Los datos correspondientes a tasa de división embrionaria, porcentaje de ovocitos degenerados, número total de células y tasa de apoptosis no siguieron una distribución normal

según la prueba Shapiro-Wilk ($p < 0,01$) por lo que se analizaron mediante la prueba no paramétrica de Kruskal-Wallis. En todos los casos, se consideraron diferencias estadísticamente significativas para un valor de p inferior a 0,05.

RESULTADOS

En la Figura 4 se representan los resultados de desarrollo embrionario de los ovocitos maduros electroporados en comparación con el grupo control. La electroporación afectó ($p < 0,05$) negativamente a la capacidad de desarrollo embrionario de los ovocitos, con independencia del voltaje empleado (25 o 30 V). Con respecto a las tasas de división embrionaria y ovocitos degenerados, se observaron diferencias significativas ($p < 0,05$) entre los ovocitos electroporados a 25 y 30 V. La tasa de división descendió de manera evidente ($p < 0,01$) en los grupos electroporados a 30 V (MII-PG-30 y MII-30), mientras que los grupos electropora-

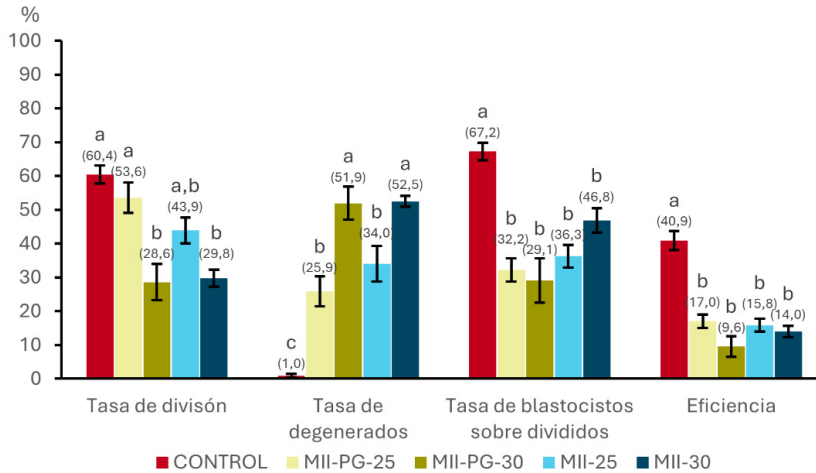


Figura 4. Parámetros de desarrollo embrionario obtenidos con ovocitos maduros electroporados. MII-25 y MII-30: ovocitos maduros electroporados a 25 y 30 V, respectivamente y fecundados después de la electroporación. MII-PG-25 y MII-PG-30: ovocitos maduros electroporados a 25 y 30 V, respectivamente y cultivados sin fecundar. CONTROL: ovocitos maduros no electroporados, fecundados y cultivados. Los resultados se expresan en media $\pm$ error estándar. ^{a,b,c}. Superíndices distintos indican diferencias significativas. Entre paréntesis se indica el porcentaje.

dos a 25 V (MIÍ-PG-25 y MII-25) mantuvieron valores similares al control. Por otro lado, los grupos de electroporación presentaron un mayor ($p<0,05$) porcentaje de ovocitos degenerados que el control, en el que apenas alcanzó un 1%. Los grupos de 30 V mostraron los mayores ($p<0,05$) porcentajes de ovocitos degenerados, en torno al 50%, mientras que los grupos de 25 V presentaron valores intermedios.

La electroporación de ovocitos maduros no fecundados (MIÍ-PG) indujo su activación partenogénica y desarrollo hasta blastocistos, presentando los partenotes resultados similares a los ovocitos fecundados (MIÍ). En la Figura 4, se representan los datos de desarrollo embrionario observados en los grupos de electroporados, destaca la eficiencia alcanzada en los dos grupos de MII-PG ($9,56 \pm 3,02\%$ y $17,03 \pm 1,98\%$) que fue similar a la de los MII ($13,99 \pm 1,64\%$ y $15,85 \pm 1,91\%$).

En la Figura 5 se representa la tasa de ovocitos degenerados de todos los grupos experimentales sometidos a FIV. Se observa que únicamente los cigotos electroporados a las 5 horas (CG-5-25 y CG-5-30) mostraron resultados similares al control. Los cigotos electroporados a las 2 horas (CG-2-25 y CG-2-30) y los ovocitos maduros electroporados con 25 V (MIÍ-25) mostraron unos porcentajes de ovocitos degenerados intermedios y similares entre sí, mientras que el grupo MII-30 presentó una tasa de ovocitos degenerados significativamente ($p<0,05$) superior al resto de grupos experimentales.

La tasa de división embrionaria (Figura 6) mostró cómo los grupos de ovocitos maduros (MIÍ) se vieron afectados negativamente ($p<0,05$) por la electroporación, presentando los ovocitos electroporados a 30 V el menor ($p<0,01$) porcentaje de división respecto al control. Sin embargo,

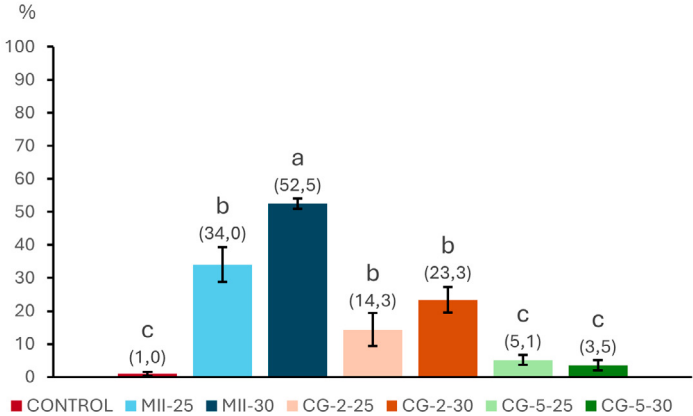


Figura 5. Tasa de degeneración obtenida a partir de ovocitos maduros y cigotos electroporados. MII-25 y MII-30: ovocitos maduros electroporados a 25 y 30 V, respectivamente y fecundados después de la electroporación. CG-2-25, CG-2-30, CG-5-25 y CG-5-30: cigotos electroporados a las 2 horas (CG-2) y 5 horas (CG-5) después de la fecundación a 25 y 30 V. CONTROL: ovocitos maduros no electroporados, fecundados y cultivados. Los resultados se expresan en media $\pm$ error estándar. ^{a,b,c}. Superíndices distintos indican diferencias significativas. Entre paréntesis se indica el porcentaje.

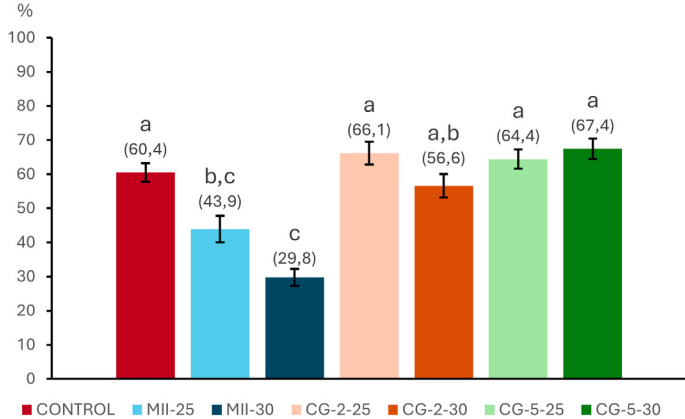


Figura 6. Tasa de división embrionaria obtenida a partir de ovocitos maduros y cigotos electroporados. MII-25 y MII-30: ovocitos maduros electroporados a 25 y 30 V, respectivamente y fecundados después de la electroporación. CG-2-25, CG-2-30, CG-5-25 y CG-5-30: cigotos electroporados a las 2 horas (CG-2) y 5 horas (CG-5) después de la fecundación a 25 y 30 V. CONTROL: ovocitos maduros no electroporados, fecundados y cultivados. Los resultados se expresan en media $\pm$ error estándar. ^{a,b,c}. Superíndices distintos indican diferencias significativas. Entre paréntesis se indica el porcentaje.

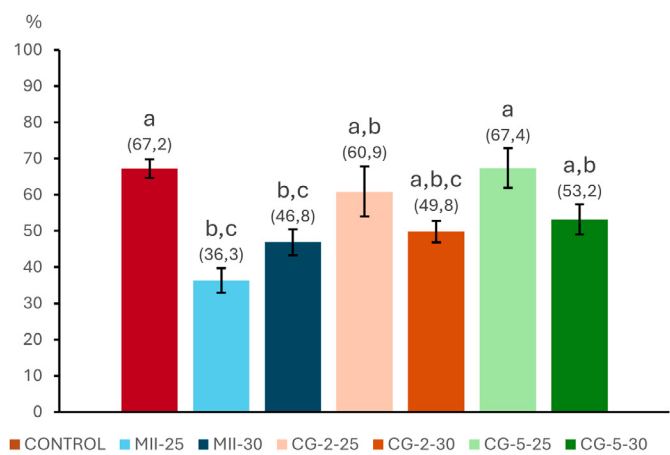


Figura 7. Tasa de formación de blastocitos obtenida a partir de ovocitos maduros y cigotos electroporados. MII-25 y MII-30: ovocitos maduros electroporados a 25 y 30 V, respectivamente y fecundados después de la electroporación. CG-2-25, CG-2-30, CG-5-25 y CG-5-30: cigotos electroporados a las 2 horas (CG-2) y 5 horas (CG-5) después de la fecundación a 25 y 30 V. CONTROL: ovocitos maduros no electroporados, fecundados y cultivados. Los resultados se expresan en media $\pm$ error estándar. ^{a,b,c}. Superíndices distintos indican diferencias significativas. Entre paréntesis se indica el porcentaje.

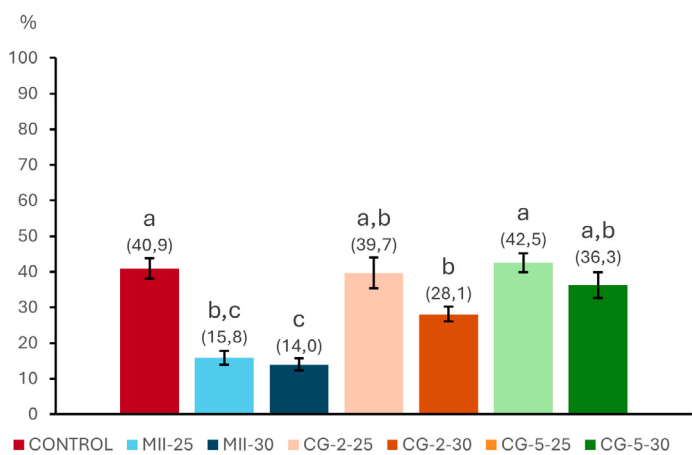


Figura 8. Eficiencia obtenida a partir de ovocitos maduros y cigotos electroporados. MII-25 y MII-30: ovocitos maduros electroporados a 25 y 30 V, respectivamente y fecundados después de la electroporación. CG-2-25, CG-2-30, CG-5-25 y CG-5-30: cigotos electroporados a las 2 horas (CG-2) y 5 horas (CG-5) después de la fecundación a 25 y 30 V. CONTROL: ovocitos maduros no electroporados, fecundados y cultivados. Los resultados se expresan en media $\pm$ error estándar. ^{a,b,c}. Superíndices distintos indican diferencias significativas. Entre paréntesis se indica el porcentaje.

la electroporación de los cigotos no afectó a su tasa de división embrionaria.

La tasa de formación de blastocistos en día 7 de CIV (Figura 7) sigue una tendencia similar a la tasa de división embrionaria. Se observó un descenso ($p<0,05$) en la tasa de formación de blastocistos en los grupos de ovocitos electroporados. Por otro lado, los cigotos electroporados a las 2 horas (25 y 30 V) y 5 horas después de la FIV con 30 V presentaron valores intermedios.

El impacto de la electroporación fue evidente en la eficiencia (Figura 8). Los grupos CG-2-25, CG-5-25 y CG-5-30 mostraron valores similares al control, mientras que los ovocitos electroporados y los cigotos electroporados a 30 V a las 2 horas sí que presentaron un descenso significativo ($p<0,05$).

En la Tabla 1 se representan el número total de células y la tasa de apoptosis de los blastocistos obtenidos en cada uno de los grupos en el día 7 de CIV. No se observaron diferencias significativas para ninguno de los dos parámetros en ningún caso.

DISCUSIÓN

Los parámetros de desarrollo embrionario *in vitro* (tasa de división, formación de blastocistos y eficiencia) y los niveles de apoptosis en blastocistos de día 7 obtenidos en este estudio para el grupo control, fueron similares a los publicados previamente por el mismo grupo de investigación (García-Canovas et al., 2025). Estos resultados indican que el protocolo de PIV de embriones ha funcionado correctamente y, por tanto, los resultados fueron válidos para su análisis.

En el presente estudio se observó un descenso en la capacidad de desarrollo embrionario cuando la electroporación se realizó en ovocitos maduros antes de la FIV. Estos resultados difieren de aquellos obtenidos por Piñeiro-Silva y Gadea (2024) al electroporar ovocitos porcinos maduros a 30 V. Estos autores describen un aumento significativo en la tasa de división de los ovocitos electroporados respecto al grupo control. Las diferencias entre ambos estudios

Tabla 1. Número total de células y tasa de apoptosis de ovocitos maduros y cigotos electroporados a 25 y 30 V.

Grupo	n	nº total de células	Tasa de apoptosis (%)
CONTROL	21	47,00 ± 4,26	9,99 ± 1,94
MII-PG-25	33	45,12 ± 2,85	5,50 ± 1,09
MII-PG-30	12	44,25 ± 6,71	5,34 ± 1,61
MII-25	23	38,83 ± 2,92	4,58 ± 1,42
MII-30	42	44,88 ± 3,24	9,40 ± 1,91
CG-2-25	42	56,95 ± 4,12	7,08 ± 1,13
CG-2-30	40	43,03 ± 2,74	16,18 ± 3,06
CG-5-25	56	48,70 ± 2,42	13,71 ± 1,97
CG-5-30	36	43,28 ± 3,34	6,43 ± 1,00

MII-25 y MII-30: ovocitos maduros electroporados a 25 y 30 V, respectivamente y fecundados después de la electroporación. MII-PG-25 y MII-PG-30: ovocitos maduros electroporados a 25 y 30 V, respectivamente y cultivados sin fecundar. CG-2-25, CG-2-30, CG-5-25 y CG-5-30: cigotos electroporados a las 2 horas (CG-2) y 5 horas (CG-5) después de la fecundación a 25 y 30 V. CONTROL: ovocitos maduros no electroporados, fecundados y cultivados. Los resultados se expresan en media ± error estándar.

con relación a la tasa de división pueden deberse a las diferencias en los grupos controles. En el estudio de Piñeiro-Silva y Gadea (2024) el grupo control presentó una tasa de división baja ($48,94 \pm 3,27\%$), y menor que la descrita en este trabajo ($60,43 \pm 2,71\%$), lo que afecta a las comparaciones con los grupos experimentales. Sin embargo, resultados de este estudio coinciden con lo descrito por Hirata et al. (2019), quienes tras electroporar ovocitos maduros y cigotos observaron que, con independencia del número de pulsos empleados (3, 5 o 7 pulsos), la tasa de división de los ovocitos maduros fue significativamente menor respecto a su grupo control ($67,5 \pm 8,8\%$, $63,0 \pm 7,0\%$ y $52,6 \pm 5,7\%$ vs. $86,2 \pm 2,1\%$, respectivamente; $p < 0,05$), mientras que los cigotos mantuvieron valores similares a su respectivo control ($86,2 \pm 1,9\%$).

El porcentaje de ovocitos degenerados observados después de la electroporación de ovocitos maduros fue elevado, principalmente en los grupos de 30 V, lo que indica una elevada sensibilidad de los ovocitos maduros a este procedimiento. Por el contrario, Piñeiro-Silva y Gadea (2024) no hallaron diferencias en la tasa de ovocitos degenerados después de la electroporación a 30 V. Este hecho puede deberse, de nuevo, a que su grupo control cuenta con un mayor porcentaje de degeneración ($9,17 \pm 2,78\%$ vs. $0,95 \pm 0,53\%$), lo que puede camuflar el efecto de la electroporación, que sí se identifica en este trabajo. Otros aspectos que pueden explicar estas discrepancias son el empleo de diferentes protocolos de PIV, la aplicación de cuatro pulsos en vez de cinco y/o la incorporación del complejo CRISPR/Cas9 durante la electroporación en el estudio de Piñeiro-Silva y Gadea (2024).

Los resultados obtenidos en el grupo de ovocitos maduros electroporados y no fecundados han confirmado, tal y como describen Piñeiro-Silva y Gadea (2024), que la electroporación induce activación partenogenética de los ovocitos. Observándose además cómo los ovocitos fecundados (MII) y los partenotes (MII-PG) responden de forma similar a la

electroporación, presentando tasas de desarrollo embrionario *in vitro* hasta día 7 semejantes. Ahora bien, a diferencia de estos autores, en el presente trabajo no se ha evaluado la tasa de activación partenogenética en el resto de los grupos experimentales, pues se da por hecho que la activación de los ovocitos es consecuencia de su fecundación y no de la electroporación. Sin embargo, de cara a futuras investigaciones, sería de gran interés, determinar cuántos de los blastocistos resultantes en todos los grupos son de origen partenogenético con el fin de conocer el auténtico impacto de la electroporación en la formación de partenotes.

Los resultados de desarrollo embrionario observados indican que los ovocitos maduros muestran una mayor sensibilidad a la electroporación, y que los cigotos electroporados 5 horas después de la FIV son más resistentes a la electroporación con 30 V que los electroporados a las 2 horas. Estos resultados coinciden con lo descrito por Nishio et al. (2017), quienes tras electroporar posibles cigotos 13 horas después de la FIV, con 25 y 30 V, observaron que no se afectaban ni la tasa de división ni la eficiencia. Por otro lado, Piñeiro-Silva y Gadea (2024) tampoco describen un efecto negativo de la electroporación en cigotos 7 horas después de la FIV.

Los índices de apoptosis de este estudio son muy similares a los descritos por Nishio et al. (2017), aunque ellos sí observaron un incremento significativo en la tasa de apoptosis al emplear 30 V en lugar de 25 V. La elevada varianza de nuestros resultados puede estar impidiendo la identificación de diferencias significativas. Por lo que sería recomendable incrementar el número de blastocistos evaluados en futuras investigaciones.

El efecto perjudicial de la electroporación sobre los ovocitos maduros puede deberse a lesiones descritas en diferentes tipos celulares tras la electroporación, tales como alteraciones de la membrana citoplasmática, aumento intracelular de Ca^{2+} , disrupción mitocondrial, depleción de ATP e inducción de estrés oxidativo entre otras

(Batista Napotnik et al., 2021). Sin embargo, identificar cual de estas vías es la responsable resulta muy complejo. La diferente sensibilidad a la electroporación de ovocitos maduros y posibles cigotos, así como entre cigotos de 2 y 5 horas después de la FIV, puede deberse a la especificidad celular (Batista Napotnik et al., 2021), ya que no en todas las células la electroporación produce los mismos efectos. Igualmente, los distintos voltajes y número de pulsos pueden afectar de forma diferente a ovocitos y cigotos (Hirata et al., 2019).

Este estudio pone de manifiesto los efectos de la electroporación sobre la capacidad de desarrollo embrionario de ovocitos maduros y cigotos, así como sobre la activación partenogenética de los ovocitos. Son necesarias más investigaciones para conocer en profundidad las consecuencias de esta tecnología con el fin de desarrollar protocolos más eficientes.

CONCLUSIONES

A partir de los resultados obtenidos en el presente trabajo se puede concluir que la electroporación de ovocitos maduros porcinos a 25 y 30 V induce su activación partenogenética, presentando los partenotes resultantes tasas de desarrollo embrionario similares a las de ovocitos fecundados. La electroporación de los ovocitos afectó negativamente a su capacidad de desarrollo embrionario, lo que implica que los ovocitos muestran una mayor sensibilidad a la electroporación que los cigotos. Por otro lado, los cigotos electroporados a las 5 horas de la FIV con 25 y 30 V presentan una capacidad de desarrollo embrionario similar al control no electroporado, mientras que la electroporación de cigotos a las 2 horas después de la FIV con 30 V produce un descenso en la eficiencia de formación de blastocistos. Por último, se concluye que la electroporación no presenta efectos directos sobre la calidad de los blastocistos en día 7 en términos de número total de células y la tasa de apoptosis.

FINANCIACIÓN

Este trabajo ha sido financiado por el proyecto PID2022-138666OB-100 del Ministerio de Ciencia, Innovación y Universidades.

REFERENCIAS

1. Abeydeera, L. R., & Day, B. N. (1997). In vitro penetration of pig oocytes in a modified Tris-buffered medium: Effect of BSA, caffeine and calcium. *Theriogenology*, 48(4), 537–544. [https://doi.org/10.1016/S0093-691X\(97\)00265-2](https://doi.org/10.1016/S0093-691X(97)00265-2)
2. Batista Napotnik, T., Polajžer, T., & Miklavčič, D. (2021). Cell death due to electroporation: A review. *Bioelectrochemistry*, 141, 107871. <https://doi.org/10.1016/j.bioelechem.2021.107871>
3. Brison, D. R., & Schultz, R. M. (1997). Apoptosis during mouse blastocyst formation: Evidence for a role for survival factors including transforming growth factor alpha. *Biology of Reproduction*, 56(5), 1088–1096. <https://doi.org/10.1095/biolreprod56.5.1088>
4. Cambra, J. M., Martínez, C. A., Maside, C., Rodríguez-Martínez, H., Martínez, E. A., Gil, M. A., & Cuello, C. (2020). The cytokine platelet factor 4 successfully replaces bovine serum albumin for the in vitro culture of porcine embryos. *Theriogenology*, 148, 201–207. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2020.03.033>
5. García-Cánovas, M., López-Jara, A., González-Plaza, A., Parrilla, I., Rodríguez-Martínez, H., Cuello, C., Martínez, E. A., & Gil, M. A. (2025). Interleukin-6 supplementation during in vitro maturation improves developmental competence of in vitro fertilized porcine oocytes. *Theriogenology*, 244, 117483. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2025.117483>
6. González-Plaza, A., Cambra, J. M., Parrilla, I., Gil, M. A., Martínez, E. A., Martínez, C.

- A., & Cuello, C. (2022). The open Cryo-top system is effective for the simultaneous vitrification of a large number of porcine embryos at different developmental stages. *Frontiers in Veterinary Science*, 9, 936753. <https://doi.org/10.3389/fvets.2022.936753>
7. Hamze, J. G., Cambra, J. M., Navarro-Serna, S., & Martinez-Serrano, C. A. (2025). Navigating gene editing in porcine embryos: Methods, challenges, and future perspectives. *Genomics*, 117(2), 111014. <https://doi.org/10.1016/j.ygeno.2025.111014>
 8. Hillary, V. E., & Ceasar, S. A. (2023). A review on the mechanism and applications of CRISPR/Cas9/Cas12/Cas13/Cas14 proteins utilized for genome engineering. *Molecular Biotechnology*, 65(3), 311–325. <https://doi.org/10.1007/s12033-022-00637-4>
 9. Hirata, M., Tanihara, F., Wittayarat, M., Hirano, T., Nguyen, N. T., Le, Q. A., Namula, Z., Nii, M., & Otoi, T. (2019). Genome mutation after introduction of the gene editing by electroporation of Cas9 protein (GEEP) system in matured oocytes and putative zygotes. *In Vitro Cellular & Developmental Biology – Animal*, 55(4), 237–242. <https://doi.org/10.1007/s11626-019-00339-5>
 10. Hryhorowicz, M., Lipiński, D., Hryhorowicz, S., Nowak-Terpiłowska, A., Ryzek, N., & Zeyland, J. (2020). Application of genetically engineered pigs in biomedical research. *Genes*, 11(6), 670. <https://doi.org/10.3390/genes11060670>
 11. Martinez, E. A., Angel, M. A., Cuello, C., Sanchez-Orsorio, J., Gomis, J., Parrilla, I., Vila, J., Colina, I., Diaz, M., Reixach, J., Vazquez, J. L., Vazquez, J. M., Roca, J., & Gil, M. A. (2014). Successful non-surgical deep uterine transfer of porcine morulae after 24-hour culture in a chemically defined medium. *PLOS ONE*, 9(8), e104696. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0104696>
 12. Martinez, C. A., Nohalez, A., Cuello, C., Vazquez, J. M., Roca, J., Martinez, E. A., & Gil, M. A. (2015). The use of mineral oil during in vitro maturation, fertilization, and embryo culture does not impair the developmental competence of pig oocytes. *Theriogenology*, 83(4), 693–702. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2014.11.015>
 13. Martinez, C. A., Cambra, J. M., Maside, C., Cuello, C., Roca, J., Martinez, E. A., Parrilla, I., & Gil, M. A. (2019). High pre-freezing sperm dilution improves monospermy without affecting the penetration rate in porcine IVF. *Theriogenology*, 131, 162–168. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2019.03.021>
 14. Navarro-Serna, S., Dehesa-Etxebe, M., Piñeiro-Silva, C., Romar, R., Lopes, J. S., López de Munaín, A., & Gadea, J. (2022). Generation of Calpain-3 knock-out porcine embryos by CRISPR-Cas9 electroporation and intracytoplasmic microinjection of oocytes before insemination. *Theriogenology*, 186, 175–184. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2022.05.027>
 15. Nishio, K., Tanihara, F., Nguyen, T. V., Kunihara, T., Nii, M., Hirata, M., Takemoto, T., & Otoi, T. (2018). Effects of voltage strength during electroporation on the development and quality of in vitro-produced porcine embryos. *Reproduction in Domestic Animals*, 53(2), 313–318. <https://doi.org/10.1111/rda.13100>
 16. Perleberg, C., Kind, A., & Schnieke, A. (2018). Genetically engineered pigs as models for human disease. *Disease Models & Mechanisms*, 11(1), dmm030783. <https://doi.org/10.1242/dmm.030783>
 17. Petters, R. M., & Wells, K. D. (1993). Culture of pig embryos. *Journal of Reproduction and Fertility. Supplement*, 48, 61–73.
 18. Piñeiro-Silva, C., & Gadea, J. (2024). Optimizing oocyte electroporation for genetic modification of porcine embryos: Evaluation of the parthenogenetic activation. *Theriogenology*, 218, 126–136. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2023.12.019>

19. Ratner, L. D., La Motta, G. E., Briski, O., Salamone, D. F., & Fernandez-Martin, R. (2021). Practical approaches for knock-out gene editing in pigs. *Frontiers in Genetics*, 11, 617850. <https://doi.org/10.3389/fgene.2020.617850>
20. Tanihara, F., Takemoto, T., Kitagawa, E., Rao, S., Do, L. T., Onishi, A., Yamashita, Y., Kosugi, C., Suzuki, H., Sembon, S., Suzuki, S., Nakai, M., Hashimoto, M., Yasue, A., Matsuhisa, M., Noji, S., Fujimura, T., Fuchimoto, D., & Otoi, T. (2016). Somatic cell reprogramming-free generation of genetically modified pigs. *Science Advances*, 2(9), e1600803. <https://doi.org/10.1126/sciadv.1600803>