

Edición genética en porcino: una herramienta clave para enfermedades humanas y animales

JOAQUÍN GADEA, CELIA PIÑEIRO-SILVA, SERGIO NAVARRO-SERNA, M^a DOLORES BARCELÓ, ARMANDO QUINTERO, SARA CRESPO, RAFAEL MARTÍNEZ Y CARMEN MATÁS

Departamento de Fisiología. Facultad de Veterinaria. Universidad de Murcia. Campus de Espinardo. 30100 Murcia

Introducción

Imagina poder corregir un error en el ADN de un animal, como si se tratara de editar una letra mal escrita en un texto. Esto es exactamente lo que permite la edición genética, y los cerdos (*Sus scrofa*) se han convertido en protagonistas de esta revolución científica.

El cerdo es un modelo animal muy valioso en investigación biomédica debido a sus similitudes con los seres humanos, tanto en el plano genético como en el anatómico y fisiológico¹. Estas características hacen que muchos

La llegada de la tecnología CRISPR/Cas ha revolucionado el proceso de generación de animales genéticamente modificados. Esta herramienta permite la edición precisa, rápida y eficiente de genes, superando ampliamente los métodos tradicionales. Gracias a ella, los cerdos se han convertido en un recurso esencial para la investigación básica, el estudio de enfermedades humanas y el desarrollo de xenotrasplantes en el ámbito biomédico².

Sin embargo, la edición genética no se limita al laboratorio. También tiene aplicaciones en produc-

te porcina clásica o la influenza porcina³⁻⁵. Esto abre nuevas posibilidades para mejorar la salud animal, la eficiencia productiva y el bienestar de los cerdos en granjas y sistemas de producción.

En este contexto, la edición genética en cerdos representa una de las herramientas más prometedoras para conectar la investigación experimental con aplicaciones prácticas en medicina y producción animal.

En este artículo se revisan las bases metodológicas de la edición genética en porcino, así como sus principales aplicaciones y los retos futuros. Asimismo, se incluye la experiencia del grupo de investigación en Fisiología de la Reproducción de la Universidad de Murcia en este campo.

“Analogía fácil: editar el genoma es como corregir una letra mal escrita en un texto, donde un solo cambio puede alterar todo el significado de una palabra o frase.”

¿En qué consiste la edición genética?

La edición genética permite realizar cambios precisos en el ADN de los organismos, modificando, eliminando o añadiendo pares de bases en regiones concretas del genoma. Entre las distintas herra-

estudios realizados en cerdos **tengan una mayor capacidad de trasladarse a la práctica clínica**, además de complementar los modelos experimentales tradicionales basados en roedores.

ción animal, ya que permite crear animales más resistentes o menos susceptibles a enfermedades víricas de gran importancia, tales como el síndrome respiratorio reproductivo porcino (PRRS), la pes-

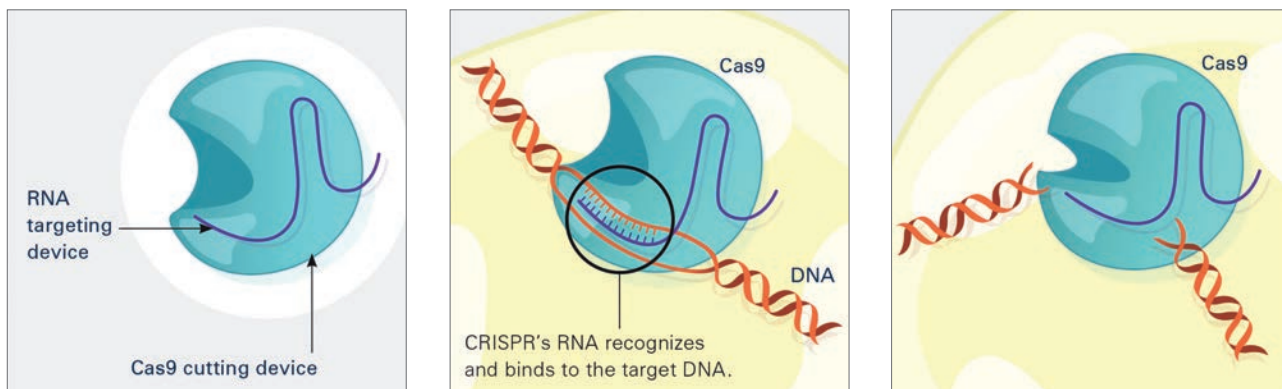


Figura 1. Representación esquemática del sistema CRISPR/Cas9. A. Se muestran los dos componentes del sistema CRISPR: una enzima llamada Cas9 capaz de cortar una doble cadena de ADN y una pequeña cadena de ARN programada para buscar una secuencia de ADN específica. B. El sistema CRISPR/Cas9 localiza la secuencia de ADN objetivo. C. La enzima Cas9 corta ambas cadenas del ADN. Fuente: National Institute of General Medical Sciences. <https://nigms.nih.gov/image-gallery/7036>

mientas disponibles, la tecnología CRISPR/Cas9 se ha convertido en la más utilizada debido a su precisión, rapidez y relativa facilidad de uso, lo que ha revolucionado la generación de animales genéticamente modificados.

El sistema CRISPR/Cas9 se basa en dos componentes fundamentales. Por un lado, una guía de ARN, una pequeña secuencia de unas veinte bases complementaria a la región del ADN que se desea modificar. Por otro, la enzima Cas9, una nucleasa que actúa como "tijeras moleculares" capaces de cortar ambas cadenas de ADN en el punto exacto indicado por la guía (Figura 1).

Una vez producido el corte, la célula activa sus propios mecanismos de reparación del ADN. El más frecuente es la unión de extremos no homólogos (NHEJ), un proceso que puede introducir pequeñas inserciones o deleciones en el sitio de corte (Figura 2). Estas modificaciones pueden alterar el marco de lectura del gen, provocando cambios en la proteína codificada o incluso su pérdida completa de función.

Conviene recordar que las proteínas están formadas por cadenas de aminoácidos codificadas

por tripletes de bases (codones). Cuando se altera el marco de lectura, cambia la secuencia de codones, lo que puede generar proteínas defectuosas o truncadas. Este mecanismo explica cómo

de los efectos derivados de su ausencia. Además, no implica la introducción de ADN de otras especies, por lo que estos animales no se consideran transgénicos.

“CRISPR/Cas9 es una herramienta que permite cortar y modificar el ADN con una precisión nunca antes alcanzada, como si se editara una palabra dentro de un texto.”

pequeñas modificaciones en el ADN pueden tener efectos biológicos significativos.

Tipos de modificaciones: knock-out y knock-in

Dependiendo del resultado buscado, la edición genética puede dar lugar a distintos tipos de modificaciones. Los animales knock-out (KO) se generan cuando se introduce una alteración que inactiva un gen, impidiendo la producción de una proteína funcional. Este tipo de modificación es especialmente útil para estudiar la función génica mediante la observación

Un ejemplo relevante es el de los cerdos resistentes al virus del PRRS. Este virus necesita unirse al receptor CD163 para infectar las células. Cuando este receptor se elimina o modifica mediante edición genética, el virus no puede entrar en la célula, lo que confiere resistencia al animal⁶.

Por su parte, los animales knock-in (KI) se generan cuando se introduce una secuencia específica de ADN en el genoma mediante un mecanismo de reparación más preciso, conocido como recombinación dirigida por homología (HDR, Figura 2). Esta estrategia permite corregir mutaciones, introducir cambios concretos o añadir nuevas funciones.



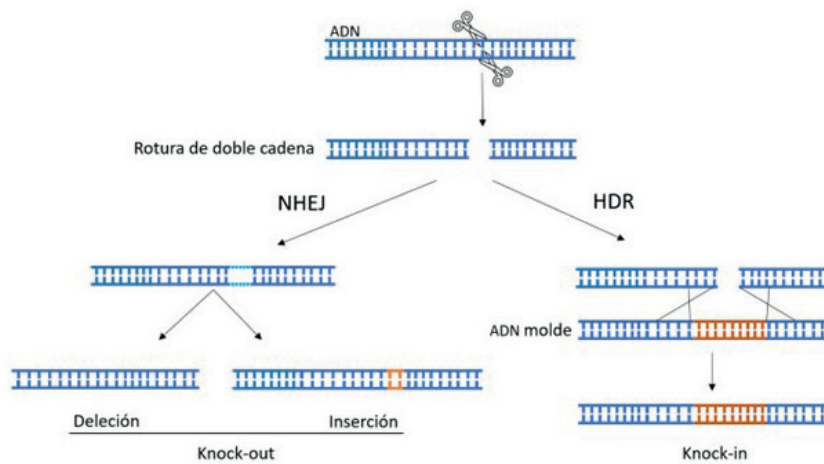


Figura 2. Esquema de la actuación del sistema CRISPR/Cas9 y la posibilidad de generación de knock-out y knock-in, mediante los sistemas de reparación celular de los cortes en el ADN mediante la unión de extremos no homólogos (NHEJ) y recombinación dirigida por homología (HDR).

Un animal knock-in solo se considera transgénico si el ADN introducido procede de otra especie. En caso contrario, se trata de una modificación dirigida dentro del propio genoma.

Un ejemplo de esta aproximación es la introducción del gen UCP1 de origen murino en cerdos, por lo tanto, un animal transgénico, que mejora la regulación de la temperatura corporal, reduce la acumulación de grasa y aumenta el porcentaje de magro de la canal ⁷.

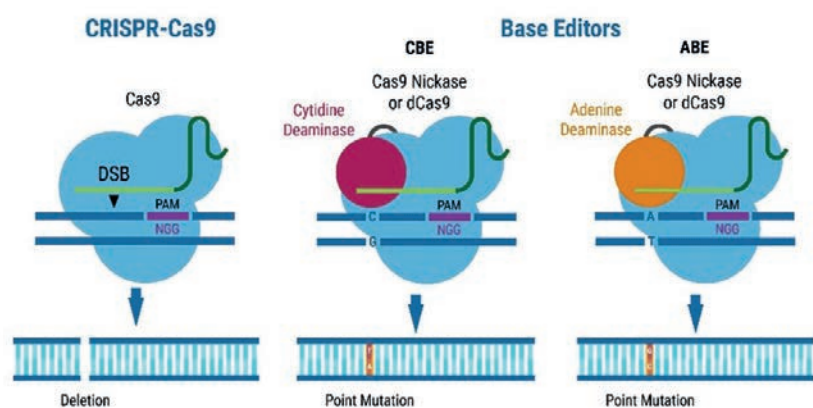
Nuevas herramientas: editores de bases

En los últimos años han surgido nuevas tecnologías que permiten una edición aún más precisa. Entre ellas destacan los editores de pares de bases (Figura 3), que permiten modificar nucleótidos individuales sin necesidad de generar roturas en la doble hélice del ADN.

Estas herramientas reducen el riesgo de errores durante la reparación y son especialmente útiles para corregir mutaciones pun-

tuales. Su aplicación en modelos porcinos de enfermedades humanas y en futuras terapias génicas representa una de las líneas más prometedoras del campo.

Mediante la implementación de esta tecnología, hemos logrado la generación de embriones porcinos editados en el gen GJB2. Este modelo podría servir en el futuro para avanzar en el estudio y tratamiento de la sordera congénita humana asociada a la alteración de la proteína Conexina 26 ⁸.



Reproduced via license: Creative Commons Attribution 4.0 International

Figura 3. Sistema CRISPR /Cas9 y editores de bases. Fuente: www.labroots.com

¿Cómo se genera un cerdo editado genéticamente?

La generación de un cerdo editado genéticamente es un proceso dirigido que comienza con la obtención de un embrión en el que se han introducido modificaciones específicas en su ADN, ya sea mediante la eliminación, adición o cambio de secuencias concretas. Una vez editados, estos embriones son transferidos al aparato reproductor de una cerda receptora, con el objetivo de obtener una camada de lechones portadores de la modificación genética y que transmitirán a su descendencia, siguiendo las leyes de Mendel.

Existen dos estrategias principales para introducir dichos cambios en el genoma. La primera consiste en la edición directa de ovocitos o embriones en fases muy tempranas del desarrollo, generalmente en estadio de cigoto. El segundo método implica la edición de células somáticas en cultivo, seguida de la generación de embriones mediante técnicas de clonación por transferencia nuclear.

En la edición directa, los componentes del sistema CRISPR/Cas

deben introducirse en el interior del ovocito o del embrión temprano para que puedan alcanzar el núcleo y modificar el ADN. Para ello, se emplean distintas técnicas como la microinyección, la electroporación o la lipofección de ovocitos o cigotos.

La microinyección es un procedimiento que permite la introducción directa de los componentes del sistema CRISPR/Cas en el interior del ovocito antes de la fecundación o en el cigoto mediante sistemas de micromanipulación bajo microscopio (Figura 4). Si bien se trata de una técnica altamente precisa, es importante destacar que requiere de equipamiento especializado, así como de personal con alta capacitación y experiencia, ya que se considera un procedimiento laborioso.



Figura 4. Microinyección de un ovocito maduro porcino. Imagen: Grupo Fisiorep. Universidad de Murcia®

Como alternativa, la electroporación permite tratar grupos de ovocitos o embriones simultáneamente mediante pulsos eléctricos que generan poros transitorios en la membrana celular, facilitando la entrada del material de edición (Figura 5). Por su parte, la lipofección utiliza vesículas lipídicas (liposomas) para transportar los componentes de edición al interior de la célula. Estas metodologías resultan más rápidas y menos exigentes desde el punto de vista técnico, lo que supone una ventaja en términos de eficiencia y productividad.

Una limitación significativa de la edición directa es que no todos los embriones son modificados de manera uniforme, por lo que pueden generarse embriones con mosaicismos, entendido como la presencia de células genéticamente distintas dentro del mismo organismo.

Ciertamente, la principal ventaja de este enfoque estriba en que los embriones generados son genéticamente idénticos a la célula editada, lo que evita el mosaicismos y garantiza la uniformidad genética. No obstante, es pertinente mencionar que se trata de una técnica más compleja y con me-

“ El cerdo es el modelo animal más parecido al humano en tamaño, fisiología y genómica que los roedores.”

Nuestro grupo de investigación se ha centrado en la implementación y optimización de dichas técnicas de modificación directa de ovocitos y cigotos y su aplicación a diversos tipos y números de genes⁹⁻¹³.

La segunda estrategia implica la edición de células somáticas en cultivo, normalmente fibroblastos fetales, la selección de aquellas que presentan la modificación deseada y su utilización como donantes de núcleo en un proceso de clonación (transferencia nuclear de células somáticas, SCNT). En este caso, el núcleo de la célula editada se transfiere a un ovocito previamente enucleado, que posteriormente se activa para iniciar el desarrollo embrionario.

nor eficiencia en la producción de embriones viables, lo que limita su aplicación práctica.

Independientemente de la estrategia empleada para la obtención de animales modificados genéticamente, los embriones editados pueden ser cultivados *in vitro* hasta alcanzar el estadio idóneo para su transferencia a una cerda receptora. Para garantizar el éxito de la gestación, es imperativo sincronizar adecuadamente el estado del embrión con el ciclo reproductivo de la hembra receptora.

La transferencia embrionaria puede llevarse a cabo mediante técnicas quirúrgicas, ya sean laparotomías o laparoscopias, o bien de manera no quirúrgica



Figura 5. Detalle del proceso de electroporación de ovocitos porcinos. Imagen: Grupo Fisiorep. Universidad de Murcia®

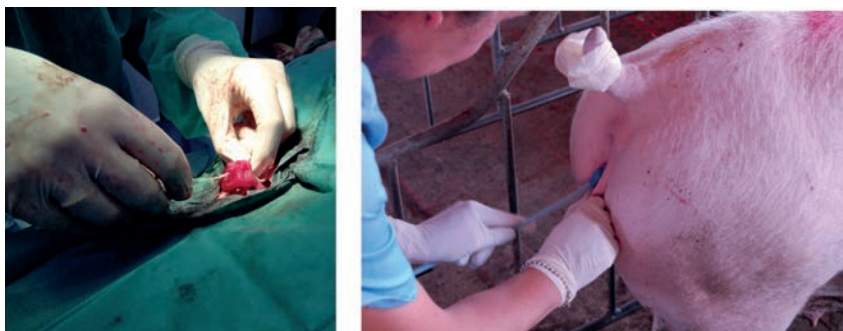


Figura 6. Transferencias embrionarias quirúrgicas y no quirúrgicas a cerdas receptoras. Imagen: Grupo Fisiorep. Universidad de Murcia®.

(Figura 6). Este paso es de suma importancia, ya que la viabilidad de los embriones puede verse comprometida por los procesos de manipulación y edición previos, así como por la correcta adaptación al entorno uterino que determinarán el establecimiento y mantenimiento de la gestación.

Aplicaciones de los cerdos editados genéticamente

Actualmente, los cerdos editados genéticamente tienen aplicaciones en tres grandes ámbitos: la investigación básica, la biomedicina y la producción animal (Figura 7). Su versatilidad, sumada a su notable similitud con el ser humano, los ha posicionado como una herramienta fundamental en diversas disciplinas científicas.

Investigación básica

En el ámbito de la investigación básica, la edición genética ha permitido profundizar en el conocimiento de los mecanismos que regulan la expresión génica y el desarrollo de los organismos.

Por ejemplo, se han desarrollado modelos porcinos para investigar el desarrollo embrionario y la formación de órganos durante las primeras etapas de la vida. La inactivación de genes espe-

cíficos ha facilitado una mejor comprensión de su función en la organogénesis, proporcionando información adicional que complementa los datos obtenidos en modelos tradicionales, como el ratón ¹⁴.

En este contexto, nuestro grupo ha contribuido generando modelos porcinos mediante la inactivación del gen TPC2 ⁹, implicado en

la regulación de la señalización intracelular del calcio. Este modelo permitirá avanzar en el conocimiento de procesos celulares fundamentales y complementar estudios realizados en otros sistemas experimentales.

Aplicaciones en biomedicina

El campo de la biomedicina es, sin duda, uno de los que más se ha beneficiado del desarrollo de la edición genética en cerdos. Sus aplicaciones principales incluyen el desarrollo de modelos de enfermedad humana, el avance en xenotrasplantes y la producción de productos biológicos.

Modelos de enfermedades humanas

Los cerdos editados genéticamente facilitan la reproducción de enfermedades humanas con gran precisión, lo que permite el estudio de su progresión y el desarrollo de nuevas terapias. A diferencia de los modelos murinos, presentan una mayor similitud anatómica y fisiológica con el ser humano, lo que mejora la traslación de los resultados a la práctica clínica.

En cardiología, estos modelos se emplean para el estudio de enfermedades como la cardiomiopatía o la aterosclerosis, permitiendo además la aplicación de técnicas diagnósticas similares a las utilizadas en pacientes humanos, tales como la resonancia magnética o el cateterismo.

En oncología, los modelos porcinos han demostrado una no-

“La edición genética acelera la investigación biomédica, permitiendo modelos fieles de enfermedades humanas.”

table utilidad para el estudio del desarrollo tumoral y la evaluación de nuevas terapias. Su mayor tamaño permite analizar la progresión de los tumores y probar intervenciones quirúrgicas y tratamientos de forma más realista que en modelos de pequeño tamaño.

En neurología, las similitudes estructurales y funcionales entre el sistema nervioso central de los humanos y los cerdos han facilitado el desarrollo de modelos de enfermedades como la distrofia muscular, el Parkinson y el Alzheimer. Esto ha permitido estudiar dichas patologías y buscar nuevas estrategias terapéuticas.

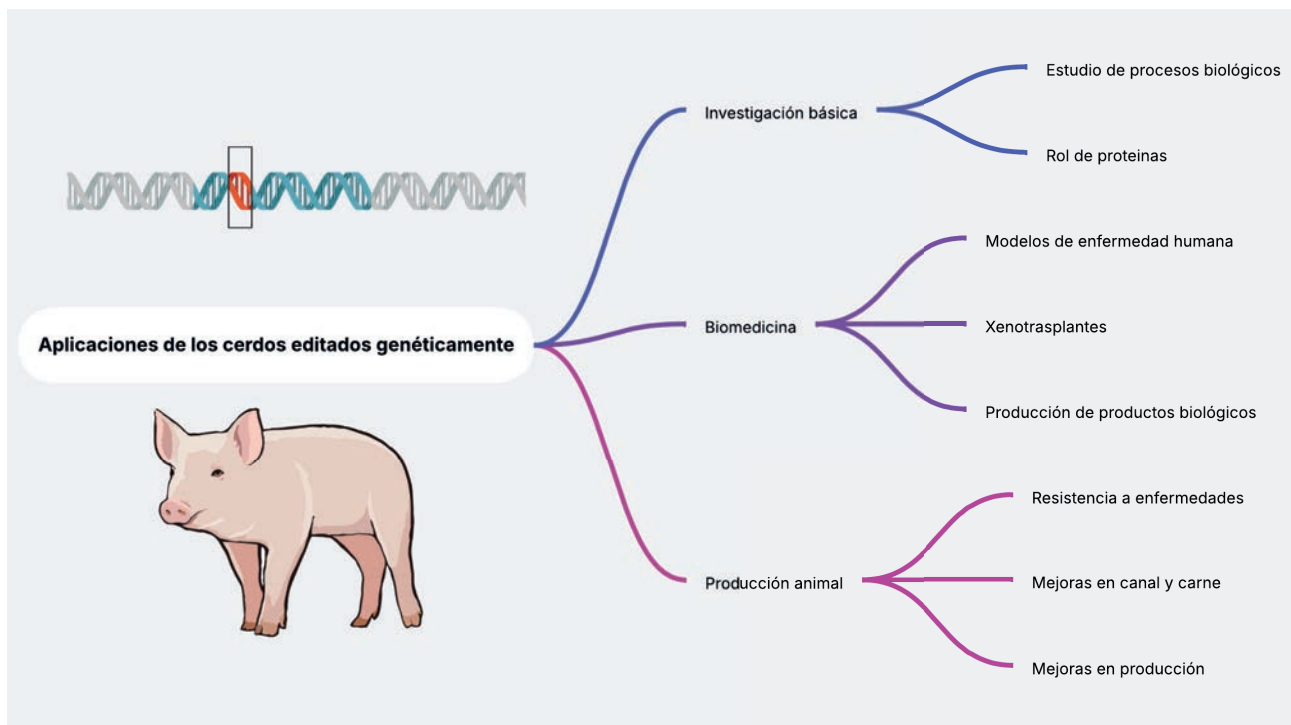


Figura 7.- Aplicaciones de los cerdos editados genéticamente.

En la actualidad, nuestro grupo está trabajando en la generación de modelos porcinos para enfermedades neuromusculares y neurodegenerativas, así como en modelos de sordera congénita. El objetivo principal es la creación de modelos relevantes para patologías humanas y avanzar hacia su aplicación clínica.

Xenotrasplantes

Una de las aplicaciones más prometedoras de la edición genética en cerdos es su uso en xenotrasplantes, es decir, como donantes de órganos para humanos. Este enfoque busca dar respuesta a la escasez de órganos disponibles para trasplante, un problema de gran relevancia en la medicina actual.

Para lograr este objetivo, es necesario modificar genéticamente a los cerdos con el fin de reducir el rechazo inmunológico y mejorar la compatibilidad con el organismo humano. Este procedimiento implica la eliminación de genes

responsables del rechazo hiperauto y la introducción de genes humanos implicados en procesos como la coagulación o la respuesta inflamatoria.

Se han logrado avances significativos, incluyendo trasplantes experimentales en primates y casos clínicos en humanos, lo que ha marcado el inicio de una nueva era en el campo de la medicina.

En este campo, nuestro grupo ha logrado la edición simultánea de embriones porcinos de varios genes implicados en el rechazo inmunológico y el tamaño corporal¹², demostrando el potencial de estas tecnologías para el desarrollo de modelos porcinos aplicables a xenotrasplantes.

Producción de productos biológicos

Otra aplicación relevante es el uso de cerdos como biorreactores vivos para la producción de proteínas de interés biomédico. Mediante edición genética, estos

animales pueden producir en su leche o en otros tejidos proteínas humanas, como factores de coagulación o albúmina.

Este enfoque podría ofrecer una alternativa más eficiente y escalable a los métodos tradicionales de producción de fármacos. Sin embargo, a pesar de los avances logrados, estas aplicaciones aún se encuentran en fases tempranas y deben superar importantes desafíos técnicos y regulatorios antes de su implantación clínica.

Un ejemplo es la línea de cerdos GalSafe, en la cual se eliminó el gen GGTA1, responsable de producir el azúcar alfa-1,3-galactosa en las células del cerdo. Como resultado, estos animales carecen de un antígeno implicado en reacciones alérgicas y en el rechazo inmunológico, lo que amplía significativamente sus posibles aplicaciones tanto en el ámbito biomédico como en el alimentario. Estos animales fueron aprobados por la FDA en Estados Unidos en 2020.



Aplicaciones en el sector productivo

La edición genética ofrece un gran potencial en el ámbito de la producción animal, ya que permite mejorar características de interés zootécnico de forma precisa y dirigida. Entre sus aplicaciones más relevantes, cabe destacar la resistencia a enfermedades y la optimización de características productivas, con implicaciones directas sobre la rentabilidad, el bienestar animal y la sostenibilidad de las explotaciones.

“ En producción animal, la edición puede crear animales resistentes a enfermedades, reduciendo antibióticos y mejorando bienestar.”

Resistencia a enfermedades

Una de las aplicaciones más prometedoras de la edición genética es la generación de animales con resistencia genética frente a enfermedades infecciosas. A diferencia de las estrategias tradicionales, basadas en vacunación, tratamientos farmacológicos o las medidas de bioseguridad, la modificación genética permite intervenir directamente en los mecanismos que los patógenos utilizan para infectar al hospedador.

En el ámbito del porcino, la resistencia al PRRS se erige como el paradigma más avanzado. Tal y como se ha descrito con anterioridad, el virus requiere de un proceso de unión al receptor CD163 para lograr la infección de las células. La supresión o modificación de este receptor a través de la edición genética impide la infección, generando animales completamente resistentes. Este enfoque no solo mitiga las pérdidas económicas asociadas a

la enfermedad, sino que también contribuye a reducir el uso de antibióticos y a mejorar el bienestar animal.

Además del PRRS, se están investigando estrategias similares para otras enfermedades víricas de gran impacto, como la influenza porcina o la peste porcina clásica. En este sentido, nuestro grupo ha generado animales con doble mutación en los genes CD163 y TMPRSS2, que determinan la resistencia simultánea al PRRS y a la influenza porcina¹⁵. Estos

avances abren nuevas posibilidades para el estudio y control de las enfermedades víricas.

Mejoras en la producción

Más allá de la sanidad, la edición genética permite optimizar las características productivas con un grado de precisión difícilmente alcanzable mediante los programas de selección tradicionales.

Uno de los objetivos prioritarios es mejorar la eficiencia alimentaria y la composición corporal. La modificación de genes implicados en el metabolismo puede dar lugar a animales con mayor proporción de tejido magro y menor acumulación de grasa, lo que incrementa el valor comercial de la canal.

La edición genética también puede contribuir al bienestar animal al eliminar características indeseables. Un ejemplo es la supresión de genes asociados al olor sexual en machos, lo que permitiría evitar la castración quirúrgica.

En resumen, estas herramientas ofrecen la posibilidad de avanzar hacia sistemas de producción más sostenibles. La generación de animales que utilicen los nutrientes de manera más eficiente —por ejemplo, que utilicen mejor el fósforo de la dieta— contribuye a reducir la excreción de compuestos contaminantes y, en consecuencia, el impacto medioambiental de la producción porcina.

Marco regulatorio: un factor determinante

No todos los animales genéticamente modificados son equivalentes desde el punto de vista técnico ni regulatorio. Resulta fundamental diferenciar entre animales editados genéticamente y animales transgénicos, ya que sus implicaciones legales, sociales y comerciales son sustancialmente distintas.

En la actualidad, muchas legislaciones restringen el uso y la comercialización de organismos transgénicos. Sin embargo, existe un debate creciente sobre la necesidad de establecer marcos regulatorios diferenciados para los animales editados genéticamente, especialmente en aquellos casos en los que las modificaciones no implican la introducción de ADN exógeno y podrían asemejarse a mutaciones naturales.

En Estados Unidos, la FDA ha autorizado el cerdo GalSafe (GGTA1 KO) y, más recientemente, la línea de cerdos CD163 KO, resistente al PRRS. En la Unión Europea, el debate sobre las nuevas técnicas genómicas (NGT) en el ámbito vegetal ya se ha iniciado con la revisión de estas técnicas. No obstante, en el caso de los animales, la regulación continúa siendo restrictiva e incluye a estos animales dentro del

marco normativo de los organismos modificados genéticamente (OMG), lo que limita significativamente su desarrollo y potencial aplicación. No obstante, recientemente, un informe de la Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria (EFSA) afirma que las técnicas de edición genética (no transgénesis) tienen un riesgo equivalente al de la cría natural de animales domésticos ¹⁶.

La evolución de este marco regulatorio será un factor determinante para definir en qué medida estas tecnologías podrán trasladarse desde el ámbito experimental a la práctica clínica y productiva, condicionando no solo su implementación, sino también su aceptación social y su viabilidad económica.

Conclusiones y perspectivas de futuro

El uso de cerdos genéticamente editados se ha consolidado como una de las herramientas más prometedoras y versátiles en la investigación biomédica actual. Gracias al desarrollo de tecnologías como CRISPR/Cas9 y otras metodologías emergentes, es posible generar modelos porcinos con un grado de precisión genética sin precedentes, lo que ha acelerado de forma notable los avances en investigación básica, medicina traslacional y biotecnología.

A lo largo de este trabajo se han revisado las principales aplicaciones de estos modelos, que abarcan desde el estudio de la función génica hasta la modelización de enfermedades humanas complejas, incluyendo su uso en xenotrasplantes y en la producción de compuestos biológicos de interés médico. Este amplio espectro de aplicaciones sitúa al cerdo como

“¿Por qué la edición genética importa al veterinario? Los veterinarios serán actores clave en la implementación de animales editados genéticamente: en reproducción, sanidad, bioseguridad y bienestar.”

un modelo clave en la intersección entre la investigación experimental y la práctica clínica.

En este escenario, la contribución de grupos de investigación nacionales, como el nuestro, demuestra que es posible desarrollar líneas de trabajo competitivas en ámbitos altamente especializados, como los modelos de enfermedades neuromusculares, la sordera hereditaria o la generación de embriones editados para xenotrasplantes. Estos avances ponen de manifiesto la importancia de las redes colaborativas internacionales y del uso estratégico de tecnologías innovadoras.

De cara al futuro, el campo de la edición genética continuará evolucionando rápidamente. La aparición de nuevas herramientas, como los editores de bases y los editores *prime*, permite introducir modificaciones aún más precisas en el genoma sin necesidad de generar roturas de doble cadena. Esto podría reducir los efectos no deseados (*off-target*), disminuir el mosaicismo y mejorar la seguridad de estas técnicas. Asimismo, el desarrollo de modelos porcinos humanizados amplía las posibilidades para el estudio de enfermedades, la validación de terapias avanzadas y el desarrollo de nuevos fármacos.

En conjunto, los cerdos editados genéticamente están llamados a desempeñar un papel cada vez más relevante tanto en la medicina del futuro como en la producción animal. En el ámbi-

to productivo, el desarrollo de líneas genéticas resistentes a enfermedades, como en el caso del PRRS, representa una de las aplicaciones con mayor potencial a corto y medio plazo, con un impacto directo sobre la sanidad animal, la reducción del uso de antimicrobianos y la sostenibilidad de las explotaciones. El progreso en este campo dependerá no solo del avance tecnológico, sino también de la capacidad para integrar conocimientos multidisciplinares y de la existencia de marcos regulatorios y de financiación que permitan trasladar estos desarrollos desde el laboratorio hasta su aplicación real en biomedicina y producción animal.

Agradecimientos:

A todas las personas e instituciones que con su trabajo y apoyo han permitido el desarrollo de esta línea de investigación, a la Fundación Séneca-Agencia de Ciencia y Tecnología de la Región de Murcia por financiar los proyectos 22065/PI/22, 22545/PDC/24; 3031/GERM/25 y FSRM/10.13039/100007801.

Referencias

1. Joshi, K., T. Katam, A. Hegde, et al., *Pigs: Large Animal Preclinical Cancer Models*. World J Oncol, 2024. 15(2): p. 149-168.
2. Navarro-Serna, S., C. Piñeiro-Silva, R. Romar, et al., *Generation of Gene Edited Pigs, in Sustainable Agriculture Reviews 57: Animal Biotechnology for Livestock Production 2*, V.K. Yata, A.K. Mohanty, and E. Lichtfouse, Editors. 2022, Springer International Publishing: Cham. p. 71-130.
3. Burkard, C., T. Opriessnig, A.J. Mileham, et al., *Pigs Lacking the Scavenger Receptor Cysteine-Rich Domain 5 of CD163 Are Resistant to Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Virus 1 Infection*. J Virol, 2018. 92(16).
4. Kwon, T., B.L. Artiaga, C.D. McDowell, et al., *Gene editing of pigs to control influenza A virus infections*. Emerg Microbes Infect, 2024: p. 2387449.
5. Crooke, H., S. Schwindt, S.L. Fletcher, et al., *DNAJC14 gene-edited pigs are resistant to classical pestivirus-es*. Trends in Biotechnology, 2025.
6. Nesbitt, C., L. Galina Pantoja, B. Beaton, et al., *Pigs lacking the SRCR5 domain of CD163 protein demonstrate heritable resistance to the PRRS virus and no changes in animal performance from birth to maturity*. Front Genome Ed, 2024. 6: p. 1322012.
7. Zheng, Q., J. Lin, J. Huang, et al., *Reconstitution of UCP1 using CRISPR/Cas9 in the white adipose tissue of pigs decreases fat deposition and improves thermogenic capacity*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2017. 114(45): p. E9474-E9482.
8. Piñeiro-Silva, C., P. Bermejo-Álvarez, F.J. García-Purriños, et al., *Generation of GJB2 Gene-Edited Porcine Embryos as a Model for Human Congenital Deafness via CRISPR/Cas9 and Cytosine base editors*. PRE-PRINT (Version 1) available at Research Square 2025.
9. Navarro-Serna, S., A. Hachem, A. Canha-Gouveia, et al., *Generation of Nonmosaic, Two-Pore Channel 2 Biallelic Knockout Pigs in One Generation by CRISPR-Cas9 Microinjection Before Oocyte Insemination*. CRISPR J, 2021. 4(1): p. 132-146.
10. Navarro-Serna, S., M. Dehesa-Etxebeste, C. Piñeiro-Silva, et al., *Generation of Calpain-3 knock-out porcine embryos by CRISPR-Cas9 electroporation and intracytoplasmic microinjection of oocytes before insemination*. Theriogenology, 2022. 186: p. 175-184.
11. Piñeiro-Silva, C., S. Navarro-Serna and J. Gadea. *Generación de embriones porcinos editados para la resistencia simultánea a los virus de PRRS e influenza porcina*. in XX Jornadas sobre Producción Animal 2023. Zaragoza. Spain Asociación Interprofesional para el Desarrollo Agrario (AIDA).
12. Navarro-Serna, S., C. Pineiro-Silva, I. Fernandez-Martin, et al., *Oocyte electroporation prior to in vitro fertilization is an efficient method to generate single, double, and multiple knockout porcine embryos of interest in biomedicine and animal production*. Theriogenology, 2024. 218: p. 111-118.
13. Pineiro-Silva, C. and J. Gadea, *Optimization of lipofection protocols for CRISPR/Cas9 delivery in porcine zona pellucida intact oocytes: A study of coincubation duration and reagent efficacy*. Theriogenology, 2024. 230: p. 121-129.
14. Sheets, T.P., K.E. Park, C.H. Park, et al., *Targeted Mutation of NGN3 Gene Disrupts Pancreatic Endocrine Cell Development in Pigs*. Sci Rep, 2018. 8(1): p. 3582.
15. Piñeiro-Silva, C., A. Quintero Montero, M.D. Barceló, et al. *Generation of CD163 and TMPRSS2 Double-Knock-out Pigs for Enhanced Resilience to PRRS and Swine Influenza Using CRISPR/Cas9 Technology*. . in 16th European Symposium of Porcine Health Management. 2025. Bern (Switzerland).
16. EFSA GMO Panel (Efsa Panel on Genetically Modified Organisms), J. Casacuberta, F. Barro, et al., *New developments in biotechnology applied to animals: An assessment of the adequacy and sufficiency of current EFSA guidance for animal risk assessment*. EFSA J, 2025. 23(8): p. e9566.