



UNIVERSIDAD DE MURCIA
FACULTAD DE VETERINARIA

Improving the efficiency of non-surgical deep uterine transfer with fresh embryos of purebred Duroc sows

Mejora de la eficiencia de la transferencia no quirúrgica de embriones frescos de raza pura Duroc

Miguel Ángel Ángel Miñarro

2014

TESIS DOCTORAL COMO COMPENDIO DE PUBLICACIONES

TESIS DOCTORAL POR COMPENDIO DE PUBLICACIONES

- 1. The effects of superovulation of donor sows on ovarian response and embryo development after nonsurgical deep-uterine embryo transfer (2014).** Angel MA, Gil MA, Cuello C, Sanchez-Osorio J, Gomis J, Parrilla I, Vila J, Colina I, Diaz M, Reixach J, Vazquez JL, Vazquez JM, Roca J, Martinez EA. *Theriogenology* 81(6):832-839.
- 2. An earlier uterine environment favors the *in vivo* development of fresh pig morulae and blastocysts transferred by a nonsurgical deep-uterine method (2014).** Angel MA, Gil MA, Cuello C, Sanchez-Osorio J, Gomis J, Parrilla I, Vila J, Colina I, Diaz M, Reixach J, Vazquez JL, Vazquez JM, Roca J, Martinez EA. *Journal of Reproduction and Development* 60 (5): (En prensa).
- 3. Successful non-surgical deep uterine transfer of porcine morulae after 24 hour culture in a chemically defined medium (2014).** Martinez EA, Angel MA, Cuello C, Sanchez-Osorio J, Gomis J, Parrilla I, Vila J, Colina I, Diaz M, Reixach J, Vazquez JL, Vazquez JM, Roca J, Gil MA. *PLoS ONE* 9(8): e104696. doi: 10.1371/journal.pone.0104696.



To whom it may concern

I have reviewed the work performed by Mr Miguel Ángel Angel Miñarro for his PhD thesis entitled "Improving the efficiency of non-surgical deep uterine transfer with fresh embryos of purebred Duroc sows". The thesis is of a coat-type built upon four articles published 2014 in international, ranked journals with peer-review system (Theriogenology, Journal of Reproduction and Development and PLoS One). The coat contains an introduction, a set of objectives, an extended summary that includes material and methods, experimental design and results followed by general conclusions, abbreviations and references. The coat is set up to harbour both an English and a Spanish version.

In his thesis, the Candidate has studied a topic which is extremely important in the field of reproductive techniques; the development of a commercial alternative for embryo transfer procedures using non-invasive techniques in pigs. The main objective of the studies included in the thesis was to improve the efficiency of the non-invasive deep deposition of embryos intra-uterus (NsDU-ET) as a technique for transfer of fresh and in vivo-derived pig morulae and blastocysts. Obviously, the candidate first tackled the effectiveness of the hormonal superovulation protocols to be used to improve the efficiency of embryo donors for commercial NsDU-ET programs; followed by the evaluation of the effects of cycle synchrony between the "embryonic" age of the "donor females" and the recipients with a focus on the reproductive performance achieved by the latter. Latest, he has evaluated the potentiality of the application of NsDU-ET with in vivo-derived morulae cultured 24 in liquid stage, as a preamble for future commercial applications.

The different papers, having the candidate as first author in two of them, document the rationale used in the thesis. The design of the different experiments was clear and allowed to answer the initial hypotheses. Data were correctly analysed, clearly presented and well-illustrated. The meanings and the implications of the results were clearly put in the context of the current literature and the findings were correctly discussed paper by paper, reaching relevant conclusions. Elegantly, the thesis covered the aspects intended in the objectives and provided with new questions for future studies, a classical consequence of scientific handlings which will hopefully lead the candidate into new areas of research for which he seems to be well-prepared for.

On the basis of the considerations above, I fully support the candidacy of the thesis presented by Mr Miguel Ángel Angel Miñarro to be considered as a European Doctorate.



Prof Dr Heriberto Rodríguez-Martínez
Dept of Clinical & Experimental Medicine
Linköping University, Sweden

September 3, 2014

Dear Sir/Madam

I have been asked to evaluate Mr **Miguel Ángel Ángel Miñarro** doctoral thesis entitled “Improving the efficiency of non-surgical deep uterine transfer with fresh embryos of purebred Duroc sows”. After examination of the thesis I can confirm that the candidate has carried out an original work to high standards, which is also demonstrated by the successful publication of three papers in high quality peer-reviewed international journals.

In his thesis, the candidate has studied a topic that is timely and up to date in the field of porcine embryo transfer. Traditionally, the need of a surgical procedure to perform the embryo transfers has hampered the use of embryo transfer in the pig breeding industry. In the last decade, the development of a non-surgical embryo transfer procedure has brought embryo transfer closer to commercial application. This thesis addresses important factors to optimize this technique: i) a reduction in the number of donors; ii) synchronization between the embryo stage and the recipient, and iii) short-term embryo storage.

In my opinion this thesis represents a cohesive scientific work that brings important and valuable contributions to the field in the pig breeding industry.

On the basis of the above considerations, I fully support Mr Miguel Ángel Ángel Miñarro’s candidacy to the European Doctorate

Yours faithfully,



Ignacio Caballero Posadas

*Departamento de Medicina y Cirugía Animal, Facultad de Veterinaria
Campus Regional de Excelencia Internacional "Campus Mare Nostrum"*

Universidad de Murcia

Instituto Murciano de Investigación Biosanitaria (IMIB), Murcia

Este trabajo ha sido financiado por MICINN-FEDER (AGL2009-12091; BES-2010-031511), MINECO-FEDER (AGL 2012-3862), CDTI/Selección Batallé (20090686), y la Fundación Séneca (GERM04543/07).

*A mis padres, Alonso y Ana María
y mis hermanos, Paco y Alonso*

A mi abuela Antonia

Agradecimientos

Agradecimientos

Esta Tesis Doctoral es el resultado de un gran trabajo llevado a cabo por un grupo de personas unidas por y para la investigación. Además de los avances científicos que ello pueda aportar, para mí supone haber alcanzado un objetivo muy importante en mi andadura por el mundo de la Ciencia. Compañeros, como no podía ser de otro modo debo transmitir mi más sincero agradecimiento por la ayuda prestada, en la medida que fuere, para sacar este proyecto adelante.

En primer lugar quiero dar las gracias a mis directores de Tesis, **Emilio Martínez** y **M^a Antonia Gil**, porque su complicidad en el trabajo hace que juntos formen un equipo perfecto, sólido e indestructible. Gracias a ello y a su persistente trabajo durante muchos años en la transferencia de embriones porcinos, hoy esta Tesis Doctoral es una realidad. Os estaré eternamente agradecido por vuestro apoyo, ayuda y enseñanza diaria.

Después de agradecer a mis directores tengo que hacer un agradecimiento muy especial al **Dr. Juan M^a Vazquez**, que desde antes de empezar mis estudios de Veterinaria me animó y me despertó el "gusanillo" de la Investigación. Sobre todo quiero destacar mi admiración por su capacidad de trabajo, su espíritu de lucha continua y su inmensa amabilidad.

Al **Dr. Jordi Roca**, por ser un ejemplo a seguir para mí de orden, disciplina y respeto. Además de estar siempre dispuesto a ayudarme.

A la **Dra. Cristina Cuello**, que me ha acompañado en este camino en todo momento tanto a nivel profesional en el laboratorio y en la granja, como a nivel personal aconsejándome y apoyándome día a día. Para mí eres un ejemplo a seguir y me siento muy orgulloso de haber podido trabajar contigo. Sólo te puedo decir que mil gracias por todo.

A las **doctoras Xiomara Lucas** e **Inmaculada Parrila**, ejemplos de superación y trabajadoras incansables. Echaré de menos vuestras charlas, aunque me llevo la mochila llena de consejos que seguro tendré que poner en práctica en más de una ocasión en mi vida.

He de hacer una mención especial a la **Dra. Carolina Maside**, que durante estos años que hemos compartido se ha convertido en la hermana mayor que nunca tuve. Con ella aprendía a dar mis primeros pasos en el campo de la embriología, al mismo tiempo que se iba afianzando nuestra amistad que ni Canadá, ni Brasil han podido romper. Tu valentía y tus ganas de trabajar harán que un día llegues a ser un referente en el mundo de la Investigación, como lo eres a día de hoy para mí.

No me puedo olvidar de mis compañeros "Vitrificadores", los **doctores Jonatán Sánchez-Osorio** y **Jesús Gomis**, ya que con vosotros he aprendido mucho y he disfrutado mucho trabajando. Tuve la una gran suerte de coincidir con vosotros en el departamento durante varios años y gracias a ello me llevo dos amigos.

A los **doctores Ignacio Caballero** y **Carmen Almiñana**, por su inestimable ayuda durante mis estancias en Sheffield. También me gustaría decir que he tenido la oportunidad de convivir con ellos y para mí además de dos grandes personas, hoy en día, son el ejemplo a seguir para ser investigador.

A mis amigos y compañeros de despacho **David** y **Diego**, con los que he compartido horas y horas de trabajo en un ambiente agradable lleno de compañerismo, risas y mucha Ciencia.

A **Carmen Rodenas**, por haberme aguantado desde el primer día que llegué al departamento y sobre todo por darme una lección de amistad que nunca olvidaré. Muchas gracias por estar siempre a mi lado.

A la nueva generación del departamento bautizada como "las niñas" (**Isabel, Cristina Patiño, Alicia y Cristina Martínez**) por animarme cada día y contagiarme de su optimismo. Espero que tengáis mucha suerte en vuestro camino hacia la Tesis y que dentro de unos años seáis todas Doctoras.

A **Tati, M^a José, Lola** y **Junwei Li**, por los momentos que hemos compartido en el "Depar".

Al **Ministerio de Ciencia e Innovación** por concederme la beca-contrato FPI y las dos estancias breves que he disfrutado.

A la empresa **Selección Batallé SA**, y especialmente a los trabajadores de la granja Serra Magra por su excelente predisposición a prestarnos su ayuda en todo lo que fuera necesario.

A todos mis amigos, **Mari Luz, Vero, Marina, Gema, Tere, Carol, Salvi, Ginés, Lidia, Vanesa, Fran, Jose, Inma y Toñi** que de algún modo me han acompañado en este camino escuchándome en los momentos difíciles y animándome siempre.

A **Julio y Raquel**, porque en esta dura etapa del final de la Tesis habéis sido un gran apoyo en mi día a día, haciendo posible que en cada momento que hemos compartido fuera capaz de desconectar de los problemas y llenarme de energía para continuar al día siguiente con más fuerza. Muchas gracias Equipo!

A mi familia, que me apoya incondicionalmente en cada paso que doy en la vida. Especialmente a mis padres **Alonso y Ana M^a** que cada día que amanece están pendientes de mí allá donde esté, así que, debo decirlos que os quiero mucho y gracias por hacerme la vida tan fácil. Junto a ellos, agradecer a mis hermanos **Paco y Alonso**, que siempre están dispuestos para lo que necesito y al llegar a casa con sus abrazos soy capaz de olvidarme de los problemas y recargar mis energías para seguir hacia delante. Y no podía olvidarme en este agradecimiento de mi querida abuela **Antonia**. Te he dejado para el final y no porque seas poco importante sino porque eres tan especial para mí que no tengo palabras para agradecer todo lo que haces diariamente por mí. Por eso voy a estar siempre a tu lado, escuchando tu sabias lecciones de la vida que cada noche me recuerdas cuando comentamos el día. Mil gracias a ti y al abuelo por estar siempre a mi lado.

La lectura de esta Tesis Doctoral pone fin a una etapa de 5 años, en los que he formado parte del **Grupo de Investigación de Reproducción Animal** de la Universidad de Murcia. A lo largo de estos años he colaborado y trabajado en multitud de estudios, que me han hecho evolucionar no solo a nivel profesional sino también en lo personal. Por todo esto, estoy y estaré muy agradecido y orgulloso de haber formado parte de este equipo de élite.

“Me esforzaré aún más para proseguir con esta investigación, una investigación que yo confío que no será meramente especulativa, sino de suficiente empuje para inspirar la agradable esperanza de que se convierta en algo esencialmente beneficioso para la humanidad”.

Edward Jenner,

investigador, médico rural y poeta inglés

(1749-1823)

INDEX/INDICE

INDEX/INDICE

<i>Introduction</i>	1
<i>Objetives</i>	7
<i>Extended Summary</i>	11
<i>Material and Methods</i>	13
<i>Experimental Design, Statistical Analysis and Results</i>	17
<i>Conclusions</i>	29
<i>Resumen General</i>	33
<i>Abbreviations</i>	59
<i>References</i>	63
<i>Articles</i>	69
<i>Article 1</i>	71
<i>Article 2</i>	75
<i>Article 3</i>	79

INTRODUCTION

INTRODUCTION

The use of porcine embryo transfer (ET) should play a critical role in pig production because it allows the movement of genetic resources with minimal risk of disease transmission, reduced transportation costs and no impact on animal welfare during transport. Although the first successful ET was reported more than 60 years ago, the commercial utilization of ET in pigs, unlike with other livestock, has been very limited due to complex anatomy of the porcine cervix and uterus. However, in the last decade, new perspectives have arisen with the development of a successful procedure for nonsurgical deep-uterine (NsDU) ET (reviewed in Martinez et al, 2004, 2013a,b). The procedure is simple, safe, and well tolerated by the recipients and during the first attempts of NsDU transfer using fresh embryos, an acceptable reproductive performance (71.4% farrowing rate and 6.9 piglets born) was achieved (Martinez et al, 2004). Nevertheless, as with the development of any new technology, it is necessary to reevaluate specific factors (such as the superovulation treatments of donors, the degree of synchrony between the stage of embryo development and the recipients and the effects of a short-term (24 h) culture of fresh embryos before NsDU ETs) that can affect the success rate of ET, since they were based on the use of surgical transfer or nonsurgical transfer into the uterine body.

Currently, a high number of fresh, good-quality embryos per transfer are necessary to achieve optimal reproductive performance in the porcine recipients. Although no studies have compared surgical and non-surgical ET procedures, it seems that the number of embryos that can be effectively transferred ranges between 15 and 23 for surgical transfers (Polge, 1982, Cameron et al, 1989, Martinat Botté et al, 1993) and between 24 and 30 for NsDU transfers (Martinez et al, 2004). Although ovulation rates in pigs vary greatly among breeds and among animals of different ages (gilts and sows) within a breed (Dyck, 1971, Cárdenas and Pope, 2002), 15-25 oocytes can be proposed as typical in this species. These data indicate that the embryos

collected from one donor would be enough to perform one embryo transfer with a donor:recipient ratio very close to 1:1. However, in practice, the situation is different and can be affected by several factors, such as pregnancy rate (not all donors become pregnant after insemination), fertilization rate (not all oocytes are fertilized), stage of embryonic development at time of collection (embryos are not always at the optimal stage of development when collected), embryo quality (not all embryos collected are transferable), and the recovery rate (some embryos are lost during collection). All these factors together cause the actual donor:recipient ratio to be closer to 2:1, resulting in a high cost per transferable embryo. To reduce this ratio, a lower number of embryos per transfer could be used, but this possibility has not yet been evaluated. Another possibility is the superovulation of the donors with equine chorionic gonadotrophin (eCG). However, when prepubertal gilts are used as donors, several problems have been associated with this treatment, including an inconsistent ovulatory response, high percentages of unfertilized oocytes, poor embryo quality (Holtz & Schlieper 1991) and embryonic mortality (Guthrie et al. 1974). For these reasons, the use of prepubertal gilts as embryo donors should be considered carefully. Mature gilts and sow donors can also be stimulated to increase their ovulation rate through the use of gonadotrophins after synchronization treatment or after weaning (reviewed in Brüssow et al. 2009). In addition to the high ovulatory response variability and the increased ovulation rate, it has been shown that the administration of eCG increases embryonic losses in gilts (Guthrie et al. 1974, Martinat-Botté et al. 2010) and sows (Longenecker et al. 1968) at Days 24 to 40 of pregnancy. A limited number of studies have investigated the quality of 5- to 6-day-old embryos collected from superovulated gilts (Rátky et al 2001) and sows (Hazeleger et al. 2000a) and the subsequent reproductive performance of recipients transferred with this type of embryos. Because these studies, and others using superovulation of the donors for ET, did not include a control (nonsuperovulated) group (Cameron et al. 1989, Rátky et al. 2001, Hazeleger et al. 2000a, Misumi et al. 2003, Cuello et al. 2004, Cameron et al. 2004, Beebe et al. 2005, Berthelot et al. 2007, Beebe et al. 2011, Matsunari et al. 2012, Ducro-Steeverink et al. 2004) making comparisons is impossible, and the efficacy of superovulation has not yet been clearly established.

On the other hand, the success of any ET program is significantly influenced by the quality of the embryos, the recipients and/or the interaction of both factors (Spell et al. 2001). Therefore, the degree of synchrony of the estrous cycle (or endometrial status) between the recipients and donors is crucial. Despite this fact, previous studies have yielded variable results, including variation among the species. Several trials involving surgical ET clearly demonstrated that higher pregnancy rates could be achieved when the transfers are performed on recipients that started estrus (24h or 48h) after the donors than those achieved using recipients that were in estrus before the donors (Polge 1982, Wilde et al. 1988, Blum-Reckow & Holtz 1991). In contrast, studies involving nonsurgical ET into the uterine body have shown that transfers into recipients ovulating 18 to 36 h after the donors resulted in reduced pregnancy rates compared with those performed on recipients that had ovulated within the range of 24 h before to 12 h after the donors (Hazeleger et al. 2000b). Differences in the transfer procedures used (surgical and nonsurgical), the small sample sizes used and the scarce number of studies performed limit comparison of these studies with contemporary application of newer methods, such as NsDU-ET. Consequently, further research is needed to evaluate the effect of recipient–donor estrous cycle synchrony on recipient reproductive performance after NsDU-ET.

From a commercial standpoint, the embryos must be transported from the donor to the recipient farms, which implies the need for their national or international transport, requiring a storage period. Vitrification is the only suitable method for the long-term storage of porcine embryos. With current methods, high percentages of morulae and blastocysts survive the vitrification and warming procedures, and high farrowing rates (75%) and litter sizes (10 piglets born) have been obtained with these embryos after surgical transfer to recipients. Unfortunately, when embryo vitrification and NsDU-ET are combined, a severe decrease in the reproductive performance of the recipients has been noted (reviewed in Martinez et al. 2013a). Although several research programs are in progress to improve these results, an alternative method to maintain the developmental capacity of the embryos from collection until transfer is *in vitro* culture, which can be used as a method for medium-term (3–4 days) or short-term (24 h) embryo storage. Because transportation is restricted to embryos with

an intact zona pellucida (ZP) for hygienic reasons, the most appropriate stages for commercial ET are the morula and unhatched blastocyst. For medium-term storage, the embryos must be collected at a very early developmental stage, which prevents development beyond the unhatched blastocyst stage at the end of the culture. Although high blastocyst formation rates from one-, two- and four-cell embryos cultured *in vitro* for 3-4 days has been reported (Cuello et al. 2007, Almiñana et al. 2010), these blastocysts had a lower total cell number (Almiñana et al. 2010, Macháty et al. 1998) and *in vivo* developmental potential (Blum-Reckow & Holtz 1991) compared with their *in vivo* counterparts. The harmful effects of the culture conditions on embryo development might be minimized by using a shorter period of culture, such as 24 h. This period will allow for the short- and medium-distance transportation of the embryos from the donor to the recipient farm. In this case, the embryos should be collected at the morula or early blastocyst stages, which should not develop beyond the unhatched blastocyst stage during the 24 h of culture. Despite its importance, research on short-term porcine embryo culture has been very limited. Nonetheless, some promising findings have been reported, including the acceptable farrowing rates (50%) and litter sizes (6 piglets born) obtained after surgical transfers of embryos cultured in serum-containing medium for 30 h at 36.5 °C (Niemann et al. 1989), which indicates that short-term cultured embryos are able to develop to term. In addition, several types of serum-containing or bovine serum albumin (BSA)-containing media and several temperatures have been shown to be effective for short-term embryo culture (Rubio Pomar et al. 2004), although the *in vivo* developmental capacity after the transfer of the cultured embryos was not evaluated in that study. Unfortunately, to the best of our knowledge, there are no reports in the literature that address an important aspect for the practical use of short-term embryo culture: the potential use of chemically defined culture media to allow safe embryo transportation and transfer. Generally, the media intended for embryo culture are supplemented with either serum or serum components, which carries a risk of disease transmission (Wrathal. 1995, Martinez et al. 2001), and this is an important limitation for embryo movement. Similarly, there has been no research on the use of short-term cultured embryos in combination with NsDU-ETs, which is fundamental for practical ET.

OBJECTIVES

OBJECTIVES

This work was designed to develop an efficient and practical procedure for NsDU-ET with fresh embryos that allow the commercial use of ET technology by the pig industry, which will benefit from the numerous applications of this technology. Particularly from the exchange of relevant genetic material with minimal risk of disease transmission, reduced transportation costs and no effect on animal welfare during transport. With this propose, the specific objectives contained in this thesis were:

1. To determine the effect of two doses of eCG to induce superovulation in donor sows on the number and quality of 5- to 6-day-old embryos and to evaluate the reproductive performance of recipients after NsDU transfer of embryos collected from superovulated and non-superovulated donors. (Article 1).
2. To evaluate the effect of several specific degrees of recipient-donor asynchrony on the reproductive performance of recipients following NsDU-ETs of morulae or blastocysts (Article 2).
3. To evaluate the potential application of NsDU-ET with in vivo-derived morulae cultured for 24 h in liquid stage in a chemically defined medium (Article 3).

EXTENDED SUMMARY

EXTENDED SUMMARY

MATERIALS AND METHODS

Biomedical ethics

All experimental procedures used in the present study were performed in accordance with the 2010/63/EU EEC Directive for animal experiments and were reviewed and approved by the Ethical Committee for Experimentation with Animals of the University of Murcia, Spain.

Chemicals

All chemicals used in this study were purchased from Sigma-Aldrich Quimica SA (Madrid, Spain) unless otherwise indicated.

Embryo collection

Embryo donors

Weaned purebred Duroc sows from a pig genetics company (Selección Batallé SA, Girona, Spain) were used as donors. Sows were randomly selected on the day of weaning and individually held in crates in a mechanically ventilated confinement facility under commercial production conditions. They were fed a commercial ration twice per day, and water was provided as libitum.

Estrous synchronization and superovulation of donors

Weaning was used to synchronize estrus between donors and recipients. To standardize the ET schedule, only sows with a weaning-to-estrus interval of 3–4 days were selected. According to the experimental design, the superovulation of the donors was induced by an intramuscular administration of different doses of eCG (Folligon, Intervet International B.V., Boxmeer, The Netherlands) 24 h after weaning. Beginning at 2 days after the administration of eCG, estrous detection was performed by experienced personnel twice a day (7 am and 5 pm) by exposing sows to a mature boar (nose-to-nose contact) and applying manual back pressure. Sows exhibiting a standing heat reflex in the presence of the boar were considered to be in estrus. The first day of onset of estrus was designated as day 0. Only sows with clear signs of estrus at 48–72 h post-eCG administration were treated with 750 IU, im, of human chorionic gonadotrophin (hCG; Veterin Corion, Divasa, Farmavic S.A., Barcelona, Spain) at the onset of estrus.

Insemination of donors

Donors were inseminated using semen from healthy mature Duroc boars of proven fertility and undergoing regular semen collection for commercial artificial insemination (AI). Post-cervical inseminations were performed at 0, 24 and 36 h after the onset of estrus with doses of 1.5×10^9 spermatozoa in 45 mL. The seminal doses were prepared from semen diluted in Beltsville thawing solution (BTS) extender (Pursel and Johnson, 1975) and stored for a maximum of 72 h at 18 °C.

Embryo recovery by laparotomy

Embryo collection was performed in a surgical room located on the farm. The donors were subjected to a midventral laparotomy on Days 5 and 6 of the estrous cycle (Day 0: onset of estrus) to obtain morulae and unhatched blastocysts, respectively. Donors were sedated with administration of azaperone (2 mg/kg of body weight, im). General anesthesia was induced with sodium thiopental (7 mg/kg of body weight, iv) and maintained with isoflurane (3.5%–5%). After exposure of the genital tract, the corpora lutea were counted on the ovaries to evaluate the ovulatory response. Embryos were collected by

flushing the tip of each uterine horn with 30 mL of a chemically defined medium consisting of Tyrode's lactate (TL)-HEPES-polyvinyl alcohol (PVA) (TL-HEPES-PVA; Funahashi et al. 2000) with some modifications. This medium (TL-PVA) was composed of 124.3 mM NaCl, 3.2 mM KCl, 2 mM NaHCO₃, 0.34 mM KH₂PO₄, 10 mM Na-lactate, 0.5 mM MgCl₂·6H₂O, 2 mM CaCl₂·2H₂O, 10 mM HEPES, 0.2 mM Na-pyruvate, 12 mM sorbitol, 0.1% (w/v) PVA, 75 µg/ml potassium penicillin G and 50 µg/mL streptomycin sulfate.

Morphological embryo assessment

Recovered embryos were evaluated under a stereomicroscope at a magnification of X 60 to grade their developmental stage and quality. One-cell eggs and poorly developed embryos were classified as unfertilized oocytes and degenerate embryos, respectively. The remaining embryos that exhibited appropriate morphology according to the criteria determined by the International Embryo Transfer Society (Wright et al. 1998) were considered viable. Only compacted morulae and/or unhatched blastocysts graded as excellent or good for morphological appearance were classified as transferable.

Assessment of the ovulatory response and effectiveness of the superovulation treatment

The ovulatory response of the donors was determined by counting the number of corpora lutea in both ovaries. To evaluate the effectiveness of the superovulation treatment, the number of viable and transferable embryos and the number of oocytes and/or degenerated embryos were counted in each donor. The recovery rate was defined as the ratio of the number of embryos and oocytes and/or degenerated embryos recovered to the number of corpora lutea present. The fertilization rate was defined as the ratio of the number of viable embryos to the total number of embryos and oocytes and/or degenerated embryos collected.

Non-surgical deep uterine embryo transfer

Embryo Recipients

Recipients were non-hormonally treated weaned purebred Duroc sows. Females were allocated individually to crates in a small room (12 crates) exclusively used for NsDU-ET on a commercial pig-breeding farm (Selección Batallé SA, Girona, Spain). Sows were fed a commercial ration twice a day. Water was provided ad libitum.

NsDU-ET procedure

The NsDU-ETs were conducted in these sows on Days 3-7 of the estrous cycle according to the experimental design. Sows were housed in gestation crates and were not sedated. The transfer procedure was performed as described by Martinez et al. (2004). Six hours prior to transfer, each recipient received a single intramuscular injection of a long-acting amoxicillin suspension (Clamoxyl LA®; Pfizer, Madrid, Spain) at a dosage of 15 mg/kg. The perineal area of the recipients was thoroughly cleaned with soap and water using a different sponge for each sow. The tail of each recipient was covered with a latex glove to protect the vulva from possible contamination. The vulva was then washed and decontaminated (inside and outside) using sterile gauze soaked with chlorhexidine. Non-surgical ET catheters (Deep Blue® ET catheter, Minitüb, Tiefenbach, Germany) were used for the transfers. The ET catheter is composed of an artificial insemination spirette containing a flexible catheter (FC; 1.8 m length) inside and a protective sanitary sheath outside. Before insertion, the inner tubing of the flexible catheter was rinsed with 0.3 mL of TL-HEPES-PVA medium at 39 °C and the protective sheath was lubricated with silicone (Rüsch silkospray®, Willy Rüsch GMBH, Kernen-Rommelshausen, Germany). Then, the spirette was inserted through the vulva into the first 20-25 cm of the vagina. In this region, the spirette tip was pushed through the sheath and inserted into the cervix. The FC was then moved through the cervical canal and propelled forward along one uterine horn until the length of the FC outside of the recipient was approximately 30-40 cm. The FC was flushed with 0.3 mL of medium at 39 °C using a 1 mL disposable syringe when the tip of the FC reached the uterine body. When the FC was completely inserted into one

uterine horn, a 1 mL syringe containing 30 embryos in 0.1 mL TL-HEPES-PVA medium was connected to the FC, and the contents were introduced into the FC. Finally, an additional volume of 0.3 mL TL-HEPES-PVA medium was used to force the embryos out of the FC into the uterus. Correct positioning of the FC was assumed if no bends or kinks in the catheter were present after its removal.

Starting 12 days after NsDU ET, the recipients were checked daily for signs of estrus. Pregnancy was diagnosed using ultrasonography on Day-20 posttransfer. All pregnant sows were allowed to carry litters to term, and farrowing rates, and litter sizes were recorded. Embryo survival rate or the piglet production efficiency was calculated as the ratio of the number of piglets born alive to the number of embryos transferred to all recipients.

EXPERIMENTAL DESIGN, STATISTICAL ANALYSIS AND RESULTS

Objective 1: To determine the effect of two doses of eCG to induce superovulation in donor sows on the number and quality of 5- to 6-day-old embryos and to evaluate the reproductive performance of recipients after NsDU transfer of embryos collected from superovulated and non-superovulated donors. (Article 1).

Experimental design

The experiment was conducted in a total of 10 trials. Each trial was conducted in separate sessions over a 1 year period and consisted of 8-12 donors and 4-6 embryo transfers. A total of 90 donor sows of proven fertility and satisfactory reproductive characteristics were superovulated with 1000 IU and 1500 IU eCG. Non-hormonally treated sows were used as a control. The reproductive history of donors in each group was similar [fertility (range: 95.3 ± 1.6 - $97.2 \pm 1.8\%$, litter size (range: 11.0 ± 0.2 - 11.2 ± 0.2 piglets), parity number (range: 4.4 ± 0.4 - 5.0 ± 0.4) and lactation length (range: 21.3 ± 0.2 - 21.7 ± 0.2 days)]. Donors from the three treatment groups were inseminated with sperm doses from the same boar and included in each trial. The ovulatory response,

number of viable and transferable embryos and the incidence of ovarian cysts in donor sows at day 5 and 6 after insemination were studied.

Transferable embryos (compacted morulae and unhatched blastocysts) from each group were non-surgically transferred (30 embryos per transfer) to a total of 46 recipient sows. Recipients were selected based on their reproductive history and body condition. There were no differences in the reproductive history of recipients assigned to each group [fertility (range: $95.1 \pm 2.6 - 99.9 \pm 2.5\%$, litter size (range: $9.3 \pm 0.5 - 10.5 \pm 0.5$ piglets), parity number (range: $2.3 \pm 0.4 - 2.9 \pm 0.4$) and lactation length (range: $21.9 \pm 0.6 - 22.3 \pm 0.6$ days)]. All NsDU-ETs were performed 4-6 h after embryo recovery by the same operator. Recipients with transferred embryos collected from the three groups were included in each trial.

Statistical analysis

The data were analyzed using the IBM SPSS 19 Statistics package (SPSS, Chicago, IL, USA). Percentage data were compared using Fisher's exact test. The continuous variables were evaluated using the Kolmogorov–Smirnov test to check the assumption of normality and compared among groups with ANOVA. Post hoc analysis was performed with Bonferroni's test. Within each treatment, correlations between donor parity and CLs, viable embryos, transferable embryos, and oocytes and/or degenerated embryos, and between CLs and oocyte or degenerated embryos were analyzed with the nonparametric Spearman rank-order coefficient (r_s). Pearson's correlation coefficient (r) was used to evaluate the associations between the number of corpora lutea and the other continuous variables (viable embryos, transferable embryos). The coefficient of variation ($CV = \text{standard deviation}/\text{mean}$) was used as a measure of variability of the ovulatory response and was calculated within each group. Differences were considered significant at $P < 0.05$. Differences among values with $0.05 < P < 0.10$ were accepted as representing tendencies toward differences. The results are expressed as percentages and means \pm S.E.M..

Results

The potential pregnancy rate (percentage of sows with more than four viable embryos) tended ($P = 0.07$) to be lower in sows superovulated with the highest dosage of eCG (88.9%) compared to the controls (100%). This result was due to the presence of polycystic ovaries in three sows (11.1%). None of these sows had corpora lutea on their ovaries, and the size of the majority of cysts was greater than 3 cm. In the control and 1000 IU eCG groups, there was no incidence of polycystic ovaries. A high proportion of donors (range: 33.3 - 44.4%) had cysts in the ovaries, with a mean number of cysts ranging between 2.4 ± 0.4 and 3.6 ± 1.0 per sow, with no differences among groups. There were no differences in the recovery rates (range: 89.8 - 94.6%) or fertilization rates (range: 91.5 - 94.3%) among groups. A higher variability among donors in the ovulatory response to gonadotrophins (range: 11-36 and 17-51 corpora lutea, CV=21.4% and 26.5%, for the 1000 and 1500 IU eCG groups, respectively) compared to the controls (15-28 corpora lutea, CV=15.9%) was observed. The mean number of corpora lutea and viable embryos was higher ($P < 0.05$) in the superovulated groups compared to the controls and increased ($P < 0.05$) with increasing doses of eCG (31.0 ± 1.7 and 26.8 ± 1.6 , 24.5 ± 1.0 and 21.3 ± 1.0 and 19.7 ± 0.5 and 16.5 ± 0.6 for the 1500 IU eCG, 1000 IU eCG and Control groups, respectively). There were no differences among groups in the mean number of oocytes/degenerated embryos, which ranged between 1.1 ± 0.3 and 2.4 ± 0.8 . The mean number of transferable embryos obtained in pregnant sows was higher ($P < 0.05$) in the superovulated groups (25.2 ± 1.9 and 20.6 ± 1.0 for the 1500 IU eCG and 1000 IU eCG groups, respectively) than in the control group (14.8 ± 1.1) and tended ($P = 0.07$) to be greater in the 1500 IU eCG group than in the 1000 IU eCG group. However, this tendency disappeared when the total number of sows superovulated (pregnant and non-pregnant) was considered (20.6 ± 1.0 and 22.4 ± 2.1 transferable embryos for the 1000 IU and 1500 IU eCG groups, respectively). In general, the proportion of transferable embryos in relation to the number of viable embryos was high in all three groups, although it was higher ($P < 0.03$) in the superovulated groups (94.1% and 96.8% for the 1000 and 1500 IU eCG groups, respectively) compared with the control group (89.7%). At day 5 of pregnancy, the percentages of non-transferable viable embryos were different ($P < 0.01$) among groups (3.5%, 0.0%, and 23.1% for the

1000 IU eCG, 1500 IU eCG, and control groups, respectively) due exclusively to the presence of uncompact morulae. At day 6 of pregnancy, a higher ($P < 0.02$) percentage of non-transferable viable embryos (8.1%) was recorded in the 1500 IU eCG group compared to the control (2.4%) and 1000 IU eCG (2.9%) groups as a result of the presence of hatched blastocysts. In all groups, there was a significant linear correlation between the number of corpora lutea and the total number of viable embryos and transferable embryos, but the number of corpora lutea and the number of oocytes and/or degenerated embryos were not correlated. The donor parity was not correlated in any group with the number of corpora lutea, viable embryos, transferable embryos or oocytes/degenerated embryos.

The total number of transferable embryos collected from the donors inseminated in the 1000 IU eCG ($n = 27$), 1500 IU eCG ($n = 27$), and the control ($n = 36$) groups was 556, 604, and 533, respectively, resulting in a donor:recipient ratio of 1.4:1, 1.3:1, and 2:1, respectively. Five out of 46 ETs (10.9%) were eliminated from the study due to incorrect insertions of the NsDU ET catheter. The transfers were mainly performed in each group with embryos at the morula/early blastocyst (range: 60.0-63.3%) and full blastocyst stages (range: 27.7-36.4%) on recipients during day 5 of the cycle (>80% of the transfers). The number of transferred embryos per recipient was 29.5 ± 0.3 , 29.9 ± 0.1 , and 29.9 ± 0.1 (range: 27-30) for the 1000 IU eCG, 1500 IU eCG, and control groups, respectively, with no differences among groups. In total, pregnancy and farrowing rates were 75.1 and 73.2%, respectively, and the litter size was 9.4 ± 0.6 piglets born, of which 8.8 ± 0.5 were born alive, with an average weight of 1.5 ± 0.6 kg. The percentage of female offspring was 51.4. There were no differences for any of the reproductive parameters evaluated among groups. Additionally, there were no differences among groups in embryo survival rates (range: 20.9%-22.4%).

Objective 2: To evaluate the effect of several specific degrees of recipient-donor asynchrony on the reproductive performance of recipients following NsDU-ETs of morulae or blastocysts (Article 2).

Experimental design

A total of 193 donors were selected based on their reproductive history (fertility, $96.1 \pm 0.9\%$; litter size, 11.0 ± 0.1 ; parity number, 4.9 ± 0.1 ; and lactation length, 21.3 ± 0.1 days). Donors were superovulated as mentioned above but with a dosage of 1000 IU eCG. Transfers were conducted in recipients that started estrus 24 h before (-24 h; $n = 9$) or 0 (synchronous; $n = 31$), 24 ($+24$ h; $n = 74$) or 48 ($+48$ h; $n = 18$) h after the donors. The recipients ($n = 132$) were selected based on their reproductive history and body condition. There were no differences in reproductive history of the recipients assigned to each group (fertility range, $93.7 \pm 3.3\%$ to $95.1 \pm 4.1\%$; litter size range, 9.9 ± 0.2 to 10.9 ± 0.4 ; parity number range, 2.4 ± 0.1 to 2.7 ± 0.2 ; lactation length range, 21.6 ± 0.4 to 22.2 ± 0.4 days). Thirty transferable embryos (morulae and unhatched blastocysts) were nonsurgically transferred into one uterine horn of each recipient. Each trial was conducted in separate sessions over a 2-year period and included 18 to 20 donors and 11 to 13 NsDU-ETs.

Statistical analysis

The data were analyzed using IBM SPSS Statistics for Windows, Version 19.0 (IBM, Armonk, NY, USA). The percentage data were compared using the Fisher's exact test. Continuous variables were evaluated using the Kolmogorov–Smirnov test to assess the assumption of normality, and groups were compared with analysis of variance or the Student's t-test. Post hoc analysis was performed using Bonferroni's test. The coefficient of variation (CV, standard deviation/mean) was used as a measure of variability of the ovulatory response. Differences were considered significant when $P < 0.05$. Differences among values with $0.05 < P < 0.10$ were accepted as representing tendencies toward differences. The results are expressed as percentages and means \pm S.E.M.

Results

Of 193 donors, 184 (95.3%) had embryos on days 5 to 6 post AI, 6 (3.1%) had only oocytes after flushing and 3 (1.5%) had polycystic ovaries with no corpora lutea in their ovaries. The proportion of donors with ovarian cysts was 39.1%, and sows with cysts had 2.4 ± 0.2 cysts. The mean ovulation rate was 24.9 ± 0.4 corpora lutea (range 11 to 51 corpora lutea, CV = 25.4%). The recovery and fertilization rates were 94.8% and 92.8%, respectively, and the mean number of viable embryos and oocytes and/or degenerate embryos obtained in the pregnant sows was 21.9 ± 0.4 and 1.7 ± 0.4 , respectively. The proportion of transferable embryos in relation to the number of viable embryos was 95.0%. The total number of transferable embryos collected from the inseminated donors ($n = 193$) was 3,828, resulting in a donor to recipient ratio of 1.5:1.

Ten out of 132 ETs (7.6%) were removed from the study due to incorrect insertion of the NsDU-ET catheter. The highest pregnancy and farrowing rates were achieved when estrus in recipients was 24 h later than in the donors (85.1% and 81.1%, respectively), regardless of the embryonic stage (day 5 morulae or day 6 blastocysts) used for the transfers. The pregnancy and farrowing rates decreased ($P < 0.05$) when recipients were synchronous (61.3% and 61.3%, respectively) or -24 h (11.1% and 0%, respectively) or +48 h (50% and 50%, respectively) asynchronous relative to the donors. Although no differences in litter sizes, piglet birth weights and sex ratio at birth were observed among the groups, the piglet production efficiency was higher ($P < 0.001$) for the synchronous and +24 h groups (20.6% and 24%, respectively) compared with -24h and +48h groups (0% and 14.3%, respectively).

The reproductive parameters of the recipients in estrus 0 h and 24 h later than the donors after NsDU transfers of day 5 morulae and day 6 blastocysts were analyzed and no differences were observed between the groups for any of the parameters evaluated with the exception of the piglet production efficiency, which was higher ($P < 0.02$) for blastocysts than morula embryonic stage in the +24 h group (25.6% and 21.3%, respectively). The results obtained when the recipients were in estrus 48 h later than the donors indicate that such asynchrony was adequate for transfers performed with blastocysts but not for those with morulae. The farrowing rate (87.5%; $P < 0.05$) and piglet production

efficiency (27.9%; $P < 0.001$) were higher in the blastocyst group compared with the morula group (30.0% and 7.0%, respectively). There were no differences between both groups in the other parameters evaluated, although the litter size and number of piglets born alive tended ($P = 0.09$) to be higher when the transfers were performed with blastocysts (10.4 ± 0.7 and 9.6 ± 0.7 , respectively) compared to those done with morulae (7.3 ± 2.3 and 7.0 ± 2.0 , respectively).

Objective 3: To evaluate the potential application of NsDU-ET with in vivo-derived morulae cultured for 24 h in liquid stage in a chemically defined medium (Article 3).

Experimental design

Experiment 3.1: Influence of culture temperature and medium on the in vitro viability and development of morulae cultured for 24 h

A 2x2 factorial design experiment in two replicates was conducted to evaluate the influence of culture temperature and medium on in vitro development of morulae cultured for 24 h. A total of 12 donors were selected based on their reproductive history (farrowing rate: 90.0%, litter size: 10.3 ± 0.4 piglets, parity number: 3.0 ± 0.2 , and lactation length: 22.8 ± 0.5 days). Superovulation of donors was induced by the intramuscular administration of 1000 IU of eCG 24 h after weaning. Embryo collection was performed on day 5 of the cycle to collect morulae. Immediately after collection, groups of 7–10 morulae were cultured for 24 h at 25 °C or 37 °C in Eppendorf tubes containing 1.5 mL of chemically defined TL-PVA medium or NCSU-23 medium (Petters et al, 1993) supplemented with 10 mM HEPES and 0.4% BSA (semi-defined medium; NCSU-BSA). Morulae cultured (7–10 per well) in a 4-well multi-dish plate containing 500 μ L of NCSU-23 medium supplemented with 0.4% BSA and 10% fetal calf serum at 38.5°C in humidified air with 5% CO₂ were used as controls. Embryos from each donor were equally and randomly allocated to each of the groups. The embryos were photographed at 0 h and 24 h of culture and retrospectively analyzed to determine their stage of development and quality (Macháty et al. 1998). The outer diameter (including the ZP) and the thickness of the embryo ZP were measured using the open-source software ImageJ

(National Institutes of Health; <http://rsbweb.nih.gov/ij/>). For evaluation of total cell number, embryos were fixed in 4% paraformaldehyde in phosphate-buffered saline (PBS) for 30 min at room temperature (22–24°C), washed twice with PBS containing 3 mg/mL BSA, mounted on a slide in 4 µL of Vectashield (Vector, Burlingame, CA, USA) containing 10 µg/mL Hoechst 33342 and covered with a coverslip. Fixed embryos were examined with fluorescence microscopy using an excitation filter of 330–380 nm. The total number of nuclei that displayed blue fluorescence was counted.

Morulae that progressed during culture to the blastocyst stage were considered viable. The *in vitro* survival rate was defined as the ratio of viable embryos divided by the total number of cultured embryos. The hatching rate was defined as the ratio of the number of hatching or hatched embryos to the total number of cultured embryos.

Experiment 3.2: Reproductive performance of recipients after NsDU transfer of embryos cultured at 37 °C in a chemically defined medium.

This experiment was performed to evaluate the *in vivo* development of blastocysts derived from cultured morulae. The experiment comprised a total of 5 trials. Each trial was conducted in separate sessions over a 1-year period and consisted of 14–16 donors and 9–11 transfers. Within each trial, the donors were inseminated with sperm doses from the same boar, and a similar number of recipients with transferred embryos from the two groups (cultured and uncultured blastocysts) were included. A total of 77 donors were selected based on their reproductive history (farrowing rate: 91.0%, litter size: 11.5 ± 0.2 piglets, parity number: 4.9 ± 0.2 , and lactation length: 23.2 ± 0.2 days). Donors were subjected to laparotomy on Days 5 and 6 of the cycle to collect morulae and blastocysts, respectively. Embryos at the morulae stage were cultured in TL-PVA medium at 37 °C for 24 h. At the end of the culture, the embryos were morphologically evaluated, and those progressing to the blastocyst stage were transferred to the recipients. A control group was established in which uncultured embryos collected at the blastocyst stage were directly transferred to the recipients within 3 h of collection.

All transfers to recipients were conducted on Day 5 of the estrous cycle. The recipients (n = 49) were selected based on their reproductive history and body condition. There were no differences in the reproductive history of the recipients assigned to each of the two groups (farrowing rates: 85.7% and 92.3%; litter sizes: 11.4 ± 0.3 and 11.6 ± 0.3 piglets; parity number: 5.2 ± 0.2 and 5.3 ± 0.2 ; lactation length: 25.2 ± 0.4 and 25.7 ± 0.5 days). Thirty transferable un-hatched blastocysts were non-surgically transferred to the depth of a uterine horn of each recipient. The same operator performed all transfers.

Statistical analysis

The data were analyzed using the IBM SPSS 19 Statistics package (SPSS, Chicago, IL, USA). The percentage data were compared using Fisher's exact test. The development stage scores were analyzed using Kruskal–Wallis' test. As this test revealed significant differences, two-by-two comparisons were made using a Mann–Whitney U-test for two independent samples. Continuous variables were evaluated using the Kolmogorov–Smirnov test to assess the assumption of normality, and groups were compared by mixed-model ANOVA (Experiment 3.1) or Student's t-test (Experiment 3.2). The ANOVA model included the fixed effects of the temperature, the medium and their interaction, and the random effect of the replicate. When the ANOVA revealed a significant effect, values were compared using Bonferroni's test. The coefficient of variation (CV, standard deviation/mean) was used as a measure of variability of the ovulatory response. Differences were considered significant when $p < 0.05$. The results are expressed as percentages and means \pm S.E.M.

Results

Experiment 3.1.

Of 12 donors, 8 (66.7%) and 2 (16.7%) sows had embryos at the morula and blastocyst stage, respectively, whereas the remaining two donors had oocytes after flushing. The mean ovulation rate in pregnant sows was 25.2 ± 1.5 corpora lutea (range 19 to 31 corpora lutea, CV = 17.3%). The recovery and

fertilization rates were 96.5% and 95.5%, respectively, and the mean number of viable embryos and oocytes and/or degenerate embryos obtained in the pregnant sows was 23.2 ± 1.6 and 1.1 ± 0.2 , respectively. Only embryos at the morula stage (n=212) were used in this experiment.

While the control embryos had a 100% survival rate after 24 h of culture, a decrease ($P < 0.05$) in viability was observed for embryos cultured at 25 °C (45.8% and 82.6 for the TL-PVA and NCSU-BSA groups, respectively). Embryos cultured at 37 °C in TL-PVA or NCSU-BSA media exhibited survival rates above 95%, with no differences compared with the control group. Embryo development in all experimental groups was delayed at 24 h of culture compared with that of the control group ($p < 0.001$). This delay was more profound ($p < 0.001$) when the embryos were incubated at 25°C, regardless of the medium selected. At the end of the culture, 80.0% of the embryos cultured at 25 °C achieved the early blastocyst stage, whereas 82.0% of the embryos cultured at 37 °C achieved the full or expanded blastocyst stages. Unlike the controls, none of the embryos cultured in the experimental groups hatched at the end of the culture period. At 24 h of culture and corresponding with these data, the outer diameter and the number of cells of the embryos in the experimental groups increased ($P < 0.002$) and the ZP thickness decreased ($P < 0.02$) with increasing culture temperature, regardless of the medium. There was no temperature x medium interaction. The control embryos had a larger ($P < 0.001$) diameter, more cells, and a smaller ($P < 0.001$) ZP thickness than those observed in the experimental groups. There were differences ($P < 0.001$) in the diameter, ZP thickness and number of cells between 0 h and 24 h of culture for the 37 °C and control groups but not for embryos cultured at 25 °C. When embryos at the early blastocyst or full blastocyst stages with similar outer diameters and ZP thicknesses were selected, differences ($P < 0.004$) in the total cell number between the embryos cultured at 25 °C and 37 °C were also evident.

Experiment 3.2.

Of 77 donors, 74 (96.1%) had morulae and blastocysts on Days 5–6 of the cycle, and 3 (3.9%) had only oocytes. The mean ovulation rate was 23.9 ± 0.5

corpora lutea (range 16 to 40 corpora lutea, CV = 17.7%). The recovery and fertilization rates were 95.4% and 94.3%, respectively, and the mean number of viable embryos and oocytes and/or degenerate embryos per pregnant sows was 21.5 ± 0.5 and 1.3 ± 0.3 , respectively. The total number of embryos collected was 785, of which 737 morulae (93.9%) were viable at 24 h of culture, achieving the early (23.9%), full (67.1%) or expanded (9.0%) blastocyst stages. Blastocysts derived from culture (n = 720) and uncultured embryos collected at the blastocyst stage (n = 750) were transferred to a total of 24 and 25 recipients, respectively. No differences in farrowing rates (91.7% and 92.0%) or litter sizes (9.0 ± 0.6 and 9.4 ± 0.8) were observed between the groups (cultured and uncultured, respectively). Additionally, there were no differences between groups with respect to piglet birth weight (1.6 ± 0.1 and 1.5 ± 0.1 kg), embryo survival rates (27.5% and 28.8%) or sex ratio at birth (male/female: 55.6/44.4 and 53.1/46.9).

C CONCLUSIONS

CONCLUSIONS

1. The results of this study demonstrate that the ovulatory response and the number of viable and transferable embryos increased in superovulated sows and that superovulation treatments did not affect the number of oocytes and/or degenerated embryos. Transferable embryos from nonsuperovulated and superovulated sows had a similar ability to develop to term after NsDU-ET to the recipients.
2. The number of donors needed to nonsurgically transfer 30 embryos per recipient can be decreased from 2.0 to 1.3 to 1.4 through superovulation treatments and that a dosage of 1000 IU eCG is enough to obtain an acceptable number of transferable embryos and a satisfactory reproductive performance of the recipients.
3. Porcine embryos tolerate better a less advanced uterine environment if they are nonsurgically transferred deep into a uterine horn. Using NsDU-transfers of day 5 morulae and day 6 blastocysts, the ideal recipient should start estrus 24 h after the donors. This asynchrony can be increased to +48 h for transfers performed with day 6 blastocysts. In contrast, the use of synchronous recipients or recipients with heat ahead (-24 h) of the donors does not result in adequate pregnancy and farrowing rates.
4. The TL-PVA medium provided a chemically defined medium capable of maintaining a high in vitro viability of porcine morula cultured at 37°C for 24 h. More than 95% of the embryos cultured under these conditions progressed to the unhatched blastocyst stage during culture, which is the most appropriate stage for NsDU-ET. Although culture caused certain

embryo developmental delays, the resulting blastocysts retained their potential to develop to term in the same way as uncultured blastocysts.

5. The excellent reproductive performance of the recipients following NsDU-ETs reported in these three studies represents an important advance for the widespread commercial use of ET by the pig industry.

RESUMEN GENERAL

RESUMEN GENERAL

INTRODUCCIÓN

La transferencia de embriones (TE) debería jugar un crítico papel en los sistemas actuales de producción porcina ya que posibilita el movimiento nacional e internacional de material genético y su introducción en las explotaciones de destino con un riesgo mínimo de transmisión de enfermedades. Además supone una considerable reducción de los costes de transporte y no conlleva problemas asociados con el bienestar animal durante el mismo. Aunque los primeros resultados de TE en la especie porcina fueron obtenidos hace más de 60 años, la utilización comercial de esta técnica, a diferencia de otras especies, ha sido prácticamente inexistente debido a la necesidad de emplear métodos quirúrgicos tanto para la obtención como para la transferencia de los embriones. La complejidad anatómica del conducto cervical y la longitud y sinuosidad de los cuernos uterinos de la cerda fueron los principales obstáculos para el desarrollo de procedimientos no quirúrgicos. Sin embargo, en la última década se ha desarrollado un nuevo y efectivo procedimiento para transferir embriones porcinos en la profundidad de un cuerno uterino por vía no quirúrgica (revisado por Martínez y cols. 2004, 2013a,b). Se trata de un procedimiento simple, seguro y bien tolerado por la cerda receptora. En los primeros ensayos utilizando esta tecnología con embriones frescos se logró un rendimiento reproductivo aceptable (71'4% tasa de parto y 6.9 lechones nacidos por cerda) (Martínez y cols. 2004). Sin embargo, como ocurre durante el desarrollo de cualquier nueva tecnología, es necesario reevaluar determinados factores (tales como los tratamientos de superovulación de las donantes, el grado de sincronización entre el estadio de desarrollo embrionario y la receptora, y el efecto del cultivo de embriones (24 h) previo a la transferencia no quirúrgica de embriones) que puedan afectar la eficiencia de la TE ya que dichos factores fueron evaluados inicialmente utilizando la TE quirúrgica o la TE no quirúrgica en el interior del cuerpo del útero.

En la actualidad, para obtener óptimos resultados de fertilidad y prolificidad, es necesario transferir un elevado número de embriones frescos de buena calidad. Aunque no hay estudios que comparen los procedimientos de transferencia de embriones por vía quirúrgica y no quirúrgica, parece ser que el número de embriones necesarios para obtener buenos resultados reproductivos mediante el empleo de la transferencia quirúrgica se sitúa entre 15 y 23 (Polge. 1982, Cameron y cols. 1989, Martinat Botté y cols. 1993) y entre 24 y 30 en el caso de utilizar la transferencia no quirúrgica en la profundidad de un cuerno uterino (Martinez y cols. 2004). Aunque las tasas de ovulación en la especie porcina difieren notablemente entre razas y entre animales de diferentes edades (núlparas y múltiparas) dentro de una misma raza (Dyck. 1971, Cárdenas y Pope. 2002), un número promedio de 15-20 ovocitos podría ser considerado como típico en esta especie. Estos datos indican que los embriones obtenidos de una cerda donante podrían ser suficientes para realizar una transferencia, resultando en un ratio donante: receptora muy próximo al 1:1. Sin embargo, en la práctica la situación es muy diferente debido a varios factores, entre los que destacan la tasa de gestación (no todas las cerdas quedan gestantes después de la inseminación), la tasa de fecundación (no todos los ovocitos son fecundados), el estadio de desarrollo embrionario (los embriones no siempre se encuentran en el estadio de desarrollo adecuado en el momento de su obtención), la calidad embrionaria (no todos los embriones obtenidos son transferibles) y la tasa de obtención de embriones (se pierden algunos embriones durante el lavado uterino). Todos estos factores hacen que dicho ratio aumente aproximadamente hasta 2:1, lo cual supone un incremento del coste por transferencia. Para reducir el ratio donante:receptora se podría reducir el número de embriones por transferencia, pero esta posibilidad no ha sido evaluada hasta el momento. Otra posibilidad radica en el empleo de tratamientos de superovulación con gonadotropina coriónica equina (eCG). Sin embargo, se han asociado varios problemas a esos tratamientos al menos en cerdas prepuberales, incluyendo variabilidad en la respuesta superovulatoria, elevados porcentajes de ovocitos no fecundados, embriones de pobre calidad (Holtz y Schlieper. 1991) y elevada mortalidad embrionaria (Guthrie y cols. 1974). Por estas razones, el uso de cerdas prepuberales como donantes de embriones debe ser

cuidadosamente considerado. Las cerdas nulíparas y multíparas también pueden estimularse para incrementar su tasa de ovulación utilizando gonadotropinas al finalizar un tratamiento de sincronización o después del destete (revisado por Brüssow. 2009). En estos casos, la administración de eCG además de provocar una gran variabilidad en la respuesta superovulatoria y un aumento en la tasa de ovulación, también provoca un aumento de la mortalidad embrionaria en cerdas nulíparas (Guthrie y cols. 1974, Martinat-Botté y cols. 2010) y multíparas (Longenecker y cols. 1968) entre los días 24 y 40 días de gestación. Son escasos los estudios que han evaluado la calidad de los embriones obtenidos en día 5 y 6 a partir de cerdas nulíparas (Rátky y cols. 2001) y multíparas (Hazeleger y cols. 2000a) superovuladas, así como la fertilidad y prolificidad de las cerdas receptoras transferidas con este tipo de embriones. Debido a que estos estudios y otros que utilizaron donantes superovuladas no incluyeron en el diseño experimental un grupo control (cerdas no superovuladas) (Cameron y cols. 1989, Rátky y cols. 2001, Hazeleger y cols. 2000a, Misumi y cols. 2003, Cuello y cols. 2004, Cameron y cols. 2004, Beebe y cols. 2005, Berthelot y cols. 2007, Beebe y cols. 2011, Matsunari y cols. 2012, Ducro-Steeverink y cols. 2004), la eficacia de los tratamientos de superovulación no ha sido todavía claramente establecida.

Por otro lado, el éxito de algunos programas de transferencia de embriones depende de la calidad de los embriones, de las cerdas receptoras y/o de la interacción de ambos factores (Spell y cols. 2001). Por lo tanto, el grado de sincronía entre el ciclo estral de la donante y de la receptora es determinante. Pese a ello, estudios previos han aportado resultados muy variables, incluyendo variaciones entre diferentes especies. En varios estudios de TE por vía quirúrgica, las tasas de gestación fueron más altas cuando las transferencias se realizaron en cerdas receptoras que comenzaron el estro 24 h o 48 h después de las donantes, en comparación con aquellas que se hicieron sobre receptoras que comenzaron el estro antes que las donantes (Polge. 1982, Wilde y cols. 1988, Blum-Reckow & Holtz. 1991). Por el contrario, cuando se utiliza la transferencia no quirúrgica de embriones en el interior del cuerpo del útero en receptoras que ovulan entre 18 h y 36 h después que las donantes, las tasas de gestación son inferiores en comparación con aquellas realizadas en receptoras que ovulan entre 24 h antes y 12 h después que las

donantes (Hazeleger y cols. 2000b). Las diferencias existentes entre el procedimiento de TE (quirúrgica y no quirúrgica), el bajo número de animales utilizados y el escaso número de estudios realizados al respecto, hacen que no se puedan comparar estos estudios entre si y mucho menos que sus resultados sirvan como base de aplicación para los nuevos métodos de TE, como es la transferencia no quirúrgica de embriones en la profundidad de un cuerno uterino. Por ello, es necesario seguir investigando en este sentido para evaluar el efecto de la sincronía entre el ciclo estral de la donante y de la receptora sobre el rendimiento reproductivo de las cerdas receptoras después de la transferencia no quirúrgica de embriones en la profundidad de un cuerno uterino.

Desde un punto de vista comercial, los embriones se tienen que transportar desde la granja donante hasta la receptora, lo cual implica su transporte nacional o internacional y la necesidad de conservarlos viables hasta el momento de la TE. La vitrificación es el único método disponible para conservar embriones porcinos durante periodos indefinidos de tiempo. Con los procedimientos actuales, un elevado número de mórulas y blastocistos sobreviven al proceso de vitrificación y calentamiento. Además se han obtenido aceptables tasas de gestación (75%) y elevada prolificidad (10 lechones nacidos) tras su transferencia quirúrgica a las receptoras. Desafortunadamente, cuando se combina la vitrificación y la transferencia de embriones no quirúrgica, se produce un descenso en la eficiencia reproductiva de las receptoras (revisado por Martínez y cols. 2013a). Aunque hay varios estudios en marcha para mejorar esos resultados, un método alternativo para mantener viables a los embriones desde que se obtienen hasta que se transfieren es el cultivo *in vitro*, el cual puede utilizarse para la conservación embrionaria a medio plazo (3-4 días) o a corto plazo (24 h). Debido a que el transporte solo está permitido por razones higiénicas para aquellos embriones que presenten la zona pelúcida intacta, los estadios más apropiados para la TE son el de mórula y blastocisto no eclosionado. Para la conservación a medio plazo, los embriones deberían ser obtenidos en un estadio temprano de desarrollo, que permita tener embriones en estadio de blastocisto no eclosionado al final del cultivo. A pesar de que se han obtenido elevadas tasas de formación de blastocistos después de 3-4 días de cultivo *in*

vitro de embriones en estadio de una, dos y cuatro células (Cuello y cols. 2007, Almiñana y cols. 2010), estos blastocistos tuvieron un número total de células más bajo (Almiñana y cols. 2010, Macháty y cols. 1998) y un menor potencial de desarrollo *in vivo* (Blum-Reckow & Holtz 1991) en comparación con aquellos embriones no cultivados. El efecto negativo del cultivo en el desarrollo embrionario puede ser minimizado mediante el uso de periodos más cortos (24 h) de cultivo. Este periodo podría permitir el transporte de embriones a corta-media distancia desde la granja donante hasta la receptora. En este caso, los embriones deberían ser obtenidos en estadio de mórula o blastocisto temprano, los cuales no deberían desarrollarse más allá de blastocisto expandido durante las 24 h de cultivo. A pesar de la importancia que puede suponer este cultivo a corto plazo, la información existente en la literatura es muy limitada. No obstante, se han publicado unos resultados muy prometedores, (tasa de partos: 50%; tamaño de camada: 6 lechones nacidos) después de transferir por vía quirúrgica embriones cultivados en un medio químicamente indefinido durante 30 h a 36'5 °C (Niemann y cols. 1989), lo que indica que los embriones cultivados durante un corto plazo de tiempo son capaces de desarrollarse a termino. Además se ha demostrado que se pueden utilizar de forma efectiva varias temperaturas y varios tipos de medio para el cultivo de embriones a corto plazo (Rubio Pomar y cols. 2004), aunque la capacidad de desarrollo *in vivo* de los embriones resultantes no fue evaluada en ese estudio. Desafortunadamente, no hay estudios en la literatura que aborden un aspecto importante del cultivo de embriones a corto plazo: el uso de medios de cultivo químicamente definidos que permitan realizar un transporte y una transferencia de embriones de forma segura desde un punto de vista sanitario. Generalmente, los medios utilizados para el cultivo de embriones están suplementados con sueros o componentes de suero, lo cual supone un riesgo de transmisión de enfermedades (Wrathal. 1995, Martínez y cols. 2001) y una importante limitación para el movimiento de embriones. Del mismo modo, tampoco hay estudios sobre el uso de transferencia de embriones no quirúrgica con embriones cultivados durante 24 h, lo cual es fundamental para los programas comerciales de TE.

OBJETIVOS

Este trabajo fue diseñado para desarrollar un procedimiento práctico y efectivo de transferencia intrauterina profunda de embriones frescos por vía no quirúrgica para posibilitar el uso comercial de esta tecnología en la industria porcina, la cual se podría beneficiar de las numerosas aplicaciones de esta tecnología; particularmente del intercambio de material genético de gran valor con un mínimo riesgo de transmisión de enfermedades, con unos costes de transporte muy reducidos y sin afectar al bienestar animal. Con este propósito, los objetivos específicos que contiene esta tesis fueron:

1. Determinar el efecto de dos dosis de eCG para inducir una respuesta superovulatoria en cerdas donantes sobre el número y calidad de los embriones de día 5-6, y evaluar el rendimiento reproductivo de las receptoras después de la transferencia intrauterina profunda no quirúrgica de embriones obtenidos de cerdas donantes superovuladas y no superovuladas (Artículo 1).
2. Evaluar el efecto de varios grados de asincronía entre las cerdas donantes y receptoras sobre los resultados reproductivos de las cerdas receptoras después de la transferencia intrauterina profunda no quirúrgica de morulas y blastocistos (Artículo 2).
3. Evaluar la utilización potencial de la transferencia intrauterina profunda no quirúrgica con mórulas cultivadas in vitro durante 24 h en un medio químicamente definido (Artículo 3).

MATERIAL Y MÉTODOS

Ética Biomédica

Todos los procedimientos experimentales que se utilizaron en este estudio fueron realizados de acuerdo con la Directiva 2010/63/EU EEC para la experimentación animal, y fueron previamente evaluados y aprobados por el Comité Bioético de la Universidad de Murcia, España.

Reactivos químicos

Todos los reactivos químicos empleados en este trabajo fueron suministrados por Sigma-Aldrich S.A. Química (Madrid, España), a menos que se indique lo contrario.

Obtención de embriones

Donantes de embriones

Se emplearon como donantes cerdas de pura raza Duroc procedentes del destete, pertenecientes a una empresa de genética porcina (Selección Batallé SA, Girona, España). Las cerdas fueron seleccionadas al azar el día del destete y se alojaron individualmente en jaulas situadas en una nave con ventilación mecánica bajo condiciones de producción comercial. La alimentación consistió en una ración comercial dos veces al día y agua *ad libitum*.

Sincronización del estro y tratamiento de superovulación de las donantes

Se utilizó el destete como método de sincronización del estro de las cerdas. Para estandarizar el protocolo de transferencia embrionaria, solo fueron seleccionadas aquellas cerdas que presentaron un intervalo destete-celo de 3-4 días. De acuerdo con el diseño experimental, las cerdas donantes fueron superovuladas mediante la administración de diferentes dosis de eCG por vía intramuscular 24 h después del destete. Empezando 2 días después de la administración de eCG, se realizó la detección del estro dos veces al día

(7:00–17:00 h) por parte de un operario con amplia experiencia, mediante la exposición de las cerdas a un verraco adulto y la aplicación manual de presión en la zona lumbar de la cerda. Las cerdas que mostraron el reflejo de inmovilidad en presencia del macho, se consideraron en estro. El primer día del estro fue considerado como día 0. Solo las cerdas que mostraron evidentes síntomas de celo a las 48-72 h después de la administración de eCG se intramuscularmente trataron con 750 UI de gonadotropina coriónica humana al inicio del estro.

Inseminación de las donantes

Las cerdas donantes fueron inseminadas con semen procedente de verracos de raza Duroc de fertilidad probada sometidos a condiciones usuales de recolección de semen para inseminación artificial. Las cerdas donantes fueron inseminadas post-cervicalmente a las 0, 24 y 36 h del inicio del estro con dosis de 1.5×10^9 espermatozoides en 45 mL. Las dosis seminales se prepararon diluyendo el semen con BTS (Bestville Thawing Solution; Pursel y Johnson, 1975) y posteriormente se conservaron un máximo de 72 h a 18 °C.

Obtención de embriones

La recolección de embriones se realizó en un quirófano localizado en la propia granja. Las donantes fueron sometidas a una laparotomía ventromedial en día 5 y 6 del ciclo estral (día 0: inicio del estro) para obtener mórulas y blastocistos no eclosionados, respectivamente. Para ello las donantes se sedaron mediante azaperona (2 mg/kg de peso vivo, i.m). A continuación, se indujo la anestesia general mediante la inyección intravenosa de tiopental sódico (7 mg/kg de peso vivo) y finalmente se mantuvo con isoflurano (3.5-5%). Una vez exteriorizado el tracto genital, se procedió al recuento del número de cuerpos lúteos presentes en cada ovario para evaluar la respuesta ovulatoria. Seguidamente, se obtuvieron los embriones mediante el lavado de la primera porción de los cuernos uterinos utilizando 30 mL de un medio químicamente definido, el TL-HEPES-PVA (Funahasi y cols. 2000) con algunas modificaciones. Este medio (TL-PVA) estuvo constituido por 124.3 mM NaCl, 3.2 mM KCl, 2 mM NaHCO₃, 0.34 mM KH₂PO₄, 10 mM Na-lactato, 0.5 mM MgCl₂·6H₂O, 2 mM CaCl₂·2H₂O, 10 mM HEPES, 0.2 mM Na-piruvato, 12 mM

sorbitol, 0'1% (w/v) PVA, 75 µg/ml penicilina G potasio and 50 µg/mL sulfato de estreptomicina.

Evaluación morfológica embrionaria

Los embriones recolectados fueron visualizados bajo un estereomicroscopio a 60X para evaluar el estadio de desarrollo y la calidad embrionaria. Las estructuras con una célula o aquellas con desarrollo embrionario retrasado se clasificaron como ovocitos no fecundados y embriones degenerados, respectivamente. El resto de embriones que mostraron una morfología apropiada según los criterios de la Sociedad Internacional de Tránsito de Embriones (Wright et al. 1998) fueron considerados viables. Solamente aquellos embriones en estadio de mórula compacta y/o blastocistos no eclosionados clasificados morfológicamente como buenos o excelentes se consideraron como transferibles.

Evaluación de la respuesta ovulatoria y de la efectividad del tratamiento de superovulación

La respuesta ovulatoria de las cerdas donantes se determinó mediante el número de cuerpos lúteos presentes en cada ovario. La efectividad del tratamiento de superovulación fue evaluada en cada hembra donante contando el número de embriones viables y transferibles y el número de ovocitos y embriones degenerados. La tasa de recolección de embriones se estableció como el ratio entre el número de embriones, ovocitos y embriones degenerados recogidos con respecto al número de cuerpos lúteos presentes en cada cerda. La tasa de fecundación se definió como el ratio entre el número de embriones viables con respecto al número total de estructuras obtenidas (embriones, ovocitos y embriones degenerados).

Transferencia no quirúrgica de embriones en la profundidad del cuerno uterino

Receptoras de embriones

Las receptoras de embriones fueron cerdas de pura raza Duroc procedentes del destete y que no fueron hormonalmente tratadas. Las cerdas se alojaron

en jaulas individuales en una nave pequeña (12 jaulas) usada exclusivamente para la transferencia no quirúrgica de embriones y situada en una granja comercial de genética porcina (Selección Batallé SA, Girona, España). La alimentación consistió en una ración comercial proporcionada en dos tomas diarias. El agua se administró *ad libitum*.

Transferencia intrauterina profunda de embriones vía no quirúrgica

Las transferencias fueron llevadas a cabo en cerdas que estaban en día 3-7 del ciclo, dependiendo del diseño experimental. Las receptoras se alojaron en jaulas de gestación, sin ningún condicionamiento especial. Las transferencias se realizaron siguiendo el método descrito por Martínez y cols, (2004). Seis horas antes de realizar las transferencias, a cada receptora se le administró una inyección de amoxicilina (Clamoxyl® LA, Pfizer, España) de larga actividad a una dosis de 15 mg/kg. Posteriormente, se limpió la zona perineal de cada cerda con agua jabonosa, utilizando una esponja para cada receptora. Se cubrió el rabo de cada cerda con un guante de látex para evitar contaminaciones en la vulva. Finalmente, se desinfectó la vulva con gasas estériles empapadas en clorhexidina. Para las transferencias se utilizaron catéteres comerciales diseñados específicamente para esa finalidad (Deep Blue® ET catheter, Minitüb, Tiefenbach, Alemania). Este catéter de transferencia de embriones se compone de un catéter de inseminación artificial que contenía a su vez un catéter flexible en su interior (FC; 1'8 m longitud) y una cubierta sanitaria protectora por fuera. Antes de proceder a la inserción de catéter de transferencia, el tubo interno de dicho catéter se lavó con 0.3 ml de TL-HEPES-PVA a 39 °C y la cubierta protectora se lubricó con silicona (Rüsch silkospray®, Willy Rüsch GMBH, Kernen-Rommelshausen, Alemania). A continuación, el catéter se insertó a través de la vulva hasta los primeros 20-25 cm de la vagina. En esta zona, se eliminó la funda protectora y se insertó el catéter en el cérvix. El FC fue dirigido delicadamente a través del canal cervical hasta conseguir atravesar todos los pliegues del cérvix y alcanzar la profundidad de uno de los cuernos uterinos. Una vez que el FC alcanzó el cuerpo de útero se procedió a un lavado del tubo interno con 0'3 ml de TL-HEPES-PVA a 39 °C. Con la ayuda de una jeringa de 1 mL se transfirieron 30 embriones en un volumen de 0'3 mL de TL-HEPES-PVA. Finalmente, el tubo

interno del FC se lavó con un volumen adicional de 300 μ L del mismo medio para asegurar la salida de todos los embriones hacia el lumen uterino. Se asumió que la transferencia fue correcta cuando una vez retirado el FC no se observaron marcas o bucles sobre su superficie.

A partir del día 12 post-transferencia se observaron diariamente las cerdas receptoras para detectar cualquier posible síntoma de celo. El diagnóstico de gestación se realizó mediante ecografía transabdominal 20 días después de la transferencia. Las cerdas gestantes se mantuvieron hasta el parto con el fin de evaluar la fertilidad y la prolificidad. La tasa de supervivencia embrionaria o la eficiencia en la producción de lechones se calculó como el ratio entre el número de lechones nacidos vivos con respecto al número de embriones que se transfirieron a todas las receptoras.

DISEÑO EXPERIMENTAL ANÁLISIS ESTADÍSTICO Y RESULTADOS

Objetivo 1: Determinar el efecto de dos dosis de eCG para inducir una respuesta superovulatoria en cerdas donantes sobre el número y calidad de los embriones de día 5-6, y evaluar el rendimiento reproductivo de las receptoras después de la transferencia intrauterina profunda no quirúrgica de embriones obtenidos de cerdas donantes superovuladas y no superovuladas (Artículo 1).

Diseño experimental

El experimento se llevó a cabo en un total de 10 replicados. Cada replicado se realizó por separado en diferentes momentos a lo largo de un año e incluyó 8-12 donantes y 4-6 transferencias de embriones. Se utilizaron 90 cerdas donantes de fertilidad probada, las cuales fueron superovuladas con 1000 UI y 1500 UI de eCG. Como control se utilizaron cerdas sin tratamiento hormonal. El historial reproductivo de las donantes incluidas en cada grupo experimental fue similar. Un número determinado de donantes pertenecientes a cada uno

de los tres grupos fueron inseminadas con dosis seminales del mismo verraco e incluidas en cada replicado. En este estudio se evaluó la respuesta ovulatoria, el número de embriones viables y transferibles, y la incidencia de quistes ováricos en cerdas donantes en día 5 y 6 después de la inseminación.

Los embriones transferibles (mórulas compactas y blastocistos no eclosionados) obtenidos en cada grupo se transfirieron (30 embriones por transferencia) por vía no quirúrgica a un total de 46 cerdas receptoras. Las cerdas receptoras fueron seleccionadas en base a su historial reproductivo y su condición corporal. No se observaron diferencias entre los grupos en el historial reproductivo previo de las receptoras. Todas las transferencias de embriones fueron realizadas por el mismo técnico entre 4 y 6 horas después de la obtención de embriones. En cada replicado se incluyeron transferencias con embriones procedentes de los 3 grupos experimentales.

Análisis estadístico

Los datos se analizaron mediante el paquete estadístico IBM SPSS 19 (SPSS Chicago, IL, USA). Los datos en porcentaje se compararon con el test exacto de Fisher. Las variables continuas se evaluaron utilizando el test de Kolmogorov-Smirnov para comprobar la normalidad de las mismas. Las comparaciones entre grupos de dichas variables fueron realizadas con ANOVA. El análisis Post hoc se realizó con el test de Bonferroni. Dentro de cada tratamiento, se utilizó el coeficiente de Spearman (r_s) para analizar las correlaciones entre el número de partos de las donantes y el número de cuerpos lúteos, embriones viables, embriones transferibles, y ovocitos y/o embriones degenerados, y entre el número de cuerpos lúteos y ovocitos o embriones degenerados. El coeficiente de correlación de Pearson se utilizó para evaluar la asociación entre el número de cuerpos lúteos y otras variables continuas (número de embriones viables, embriones transferibles). El coeficiente de variación ($CV = \text{desviación estándar}/\text{media}$) se utilizó para determinar la variabilidad de la respuesta ovulatoria y fue calculado para cada grupo. Se consideraron diferencias significativas para $P < 0.05$. Las diferencias entre valores de $0.05 < P < 0.10$ se consideraron como tendencia. Los resultados se expresaron como porcentajes y medias \pm S.E.M.

Resultados

La tasa de gestación (porcentaje de cerdas con más de 4 embriones viables) tendió ($P = 0'07$) a ser más baja en el grupo de cerdas superovuladas con la dosis más alta de eCG (88'9%) comparado con las cerdas control (100%). Esto fue debido a la presencia de ovarios poliquísticos en 3 de las cerdas (11'1%). Ninguna de estas 3 cerdas presentó cuerpos lúteos en los ovarios, y el tamaño de la mayoría de los quistes fue mayor de 3 cm. En el grupo control y en el grupo de 1000 UI de eCG, no hubo ningún caso de ovarios poliquísticos. Una elevada proporción de cerdas donantes (rango: 33'3-44'4%) tuvieron quistes en los ovarios, con un número medio de quistes entre $2'4 \pm 0'4$ y $3'6 \pm 1'0$ por cerda, pero no hubo diferencias entre grupos. Tampoco existieron diferencias entre grupos en las tasas de recuperación embrionaria (rango: 89'8-94'6%) ni en las tasas de fecundidad (rango: 91'5-94'3%). Se observó una elevada variabilidad entre grupos en cuanto a la respuesta ovulatoria a las gonadotropinas (rango: 11-36 y 17-51 cuerpos lúteos, CV = 21'4% y 26'5%, para los grupos de 1000 y 1500 UI de eCG, respectivamente) en comparación con el grupo control (15-28 cuerpos lúteos, CV = 15'9%). El número medio de cuerpos lúteos y embriones viables fue mayor ($P < 0'05$) en los grupos superovulados comparado con el control, incrementándose ($P < 0'05$) a medida que aumentó la dosis de eCG ($31'0 \pm 1'7$ y $26'8 \pm 1'6$, $24'5 \pm 1'0$ y $21'3 \pm 1'0$ y $19'7 \pm 0'5$ y $16'5 \pm 0'6$ para los grupos de 1500 UI de eCG, 1000 UI de eCG y control, respectivamente). No hubo diferencias entre grupos en el número medio de ovocitos/embriones degenerados (rango: entre $1'1 \pm 0'3$ y $2'4 \pm 0'8$). El número medio de embriones transferibles obtenidos en cerdas gestantes fue mayor ($P < 0'05$) en los grupos superovulados ($25'2 \pm 1'9$ y $20'6 \pm 1'0$ para los grupos de 1500 UI y 1000 UI de eCG, respectivamente) que en el grupo control ($14'8 \pm 1'1$) y tendió ($P = 0'07$) a ser mayor en el grupo de 1500 UI de eCG que en el de 1000 UI de eCG. Sin embargo, esta tendencia desapareció ($20'6 \pm 1'0$ y $22'4 \pm 2'1$ embriones transferibles para los grupos de 1000 UI y 1500 UI de eCG, respectivamente) cuando se tuvieron en cuenta todas las cerdas superovuladas (preñadas y no preñadas). En general, la proporción de embriones trasferibles en relación al número de embriones viables fue alta en los tres grupos, aunque fue más alta ($P < 0'03$) en los grupos superovulados (94'1% y 96'8% para los grupos de 1000 and 1500 UI de eCG, respectivamente)

comparado con el grupo control (89'7%). En día 5 de gestación, los porcentajes de embriones viables no transferibles fueron diferentes ($P < 0'01$) entre grupos (3'5%, 0'0%, y 23'1% para los grupos de 1000 UI de eCG, 1500 UI de eCG, y el control, respectivamente) debido exclusivamente a la presencia de mórulas no compactas. En cambio, en el día 6 de gestación, se registró un mayor ($P < 0'02$) número de embriones viables no transferibles (8'1%) en el grupo de 1500 UI de eCG comparado con el control (2'4%) y el de 1000 UI de eCG (2'9%) debido a la presencia de blastocistos eclosionados. En todos los grupos, hubo una correlación lineal significativa entre el número de cuerpos lúteos y el número total de embriones viables y de embriones transferibles. Sin embargo, no existieron correlaciones entre el número de cuerpos lúteos y el número de ovocitos y/o embriones degenerados. El número de partos de las cerdas donantes no se correlacionó, en ninguno de los tres grupos, con el número de cuerpos lúteos, el número de embriones viables, el número de embriones transferibles ni con el número de ovocitos/embriones degenerados.

El número de embriones transferibles obtenido de las donantes inseminadas en los grupos de 1000 UI de eCG ($n = 27$), 1500 UI de eCG ($n = 27$), y control ($n = 36$) fue de 556, 604 y 533, respectivamente, lo cual resultó en un ratio donante:receptora de 1.4:1, 1.3:1 y 2:1, respectivamente. De las 46 transferencias de embriones que se realizaron, 5 de ellas (10'9%) fueron eliminadas del estudio debido a una inserción incorrecta del catéter de transferencia. Las transferencias se llevaron a cabo en cada grupo experimental con embriones en estadio de mórula/blastocisto temprano (rango: 60'0-63'3%) y en estadio de blastocisto (rango: 27'7-36'4%), utilizando receptoras mayoritariamente en día 5 del ciclo ($> 80\%$ de las transferencias). El número de embriones transferidos por receptora fue de $29'5 \pm 0'3$, $29'9 \pm 0'1$, y $29'9 \pm 0'1$ (rango: 27-30) para los grupos de 1000 UI eCG, 1500 UI de eCG y el control, respectivamente, no existiendo diferencias entre grupos. En total, las tasas de gestación y parto fueron de 75'1 y 73'2%, respectivamente, y el tamaño de camada fue de $9'4 \pm 0'6$ lechones nacidos, de los cuales $8'8 \pm 0'5$ fueron nacidos vivos, con un peso medio al nacimiento de $1'5 \pm 0'6$ kg. El porcentaje de hembras nacidas fue de 51'4%. No hubo diferencias entre grupos en ninguno de los parámetros evaluados. Tampoco existieron

diferencias entre grupos en las tasas de supervivencia embrionaria (rango: 20'9%-22'4%).

Objetivo 2: Evaluar el efecto de varios grados de asincronía entre las cerdas donantes y receptoras sobre los resultados reproductivos de las cerdas receptoras después de la transferencia intrauterina profunda no quirúrgica de morulas y blastocistos (Artículo 2).

Diseño experimental

En base al historial reproductivo se seleccionaron 193 cerdas donantes. Las donantes se superovularon como se ha indicado anteriormente, pero con una dosis de 1000 UI de eCG. Las transferencias se efectuaron en receptoras que salieron en celo 24 h antes (-24 h; n = 9), ó 0 h (sincrónicas; n = 31), 24 h (+24 h; n = 74) o 48 h (+48 h; n = 18) después que las donantes. Las receptoras (n = 132) se seleccionaron en base a su historial reproductivo y su condición corporal. No hubo diferencias entre los historiales reproductivos de las cerdas receptoras asignadas a cada grupo. Se transfirieron a cada cerda por vía no quirúrgica en la profundidad de un cuerno uterino 30 embriones clasificados como transferibles (mórulas y blastocistos no eclosionados). Cada replicado se llevó a cabo en sesiones separadas durante un periodo de 2 años e incluyó 18-20 cerdas donantes y entre 11 y 13 transferencias.

Análisis estadístico

Los datos se analizaron mediante la versión 19.0 del programa IBM SPSS Statistics para Windows (IBM, Armonk, NY, USA). Los datos en porcentajes se compararon con el test exacto de Fisher. Las variables continuas se evaluaron con el test de Kolmogorov-Smirnov para comprobar la normalidad, y los grupos se compararon con análisis de varianzas o el test de Student. El análisis Post hoc se realizó con el test de Bonferroni. El coeficiente de variación (CV = desviación estándar/media) se utilizó como una medida de la variabilidad de la respuesta ovulatoria. Se consideraron diferencias significativas para $P < 0'05$.

Las diferencias entre valores de $0.05 < P < 0.10$ se consideraron como tendencia. Los resultados se expresaron como porcentajes y medias \pm S.E.M.

Resultados

De las 193 donantes, 184 (95.3%) tuvieron embriones en día 5 y 6 después de la inseminación artificial, 6 (3.1%) tuvieron solo ovocitos después del lavado uterino y 3 (1.5%) presentaron ovarios poliquísticos. La proporción de donantes con quistes ováricos fue de 39.1% y cada cerda con quistes ováricos tuvo una media de 2.4 ± 0.2 quistes. El promedio de ovulaciones por cerda fue de 24.9 ± 0.4 cuerpos lúteos (rango entre 11 y 51 cuerpos lúteos, CV = 25.4%). Las tasas de recuperación embrionaria y de fecundidad fueron 94.8% y 92.8%, respectivamente, y el número medio de embriones viables y ovocitos/embriones degenerados obtenidos en cerdas gestantes fue de 21.9 ± 0.4 y 1.7 ± 0.4 , respectivamente. La proporción de embriones transferibles en relación al número de embriones viables fue del 95.0%. El número total de embriones transferibles obtenidos de las cerdas donantes inseminadas ($n = 193$) fue de 3828, lo cual resultó en un ratio donante:receptora de 1.5:1.

De las 132 transferencias de embriones realizadas, 10 (7.6%) de ellas fueron eliminadas del estudio, debido a la incorrecta inserción del catéter de transferencia no quirúrgica. Las tasas de gestación y parto más altas se lograron cuando las receptoras salieron en celo 24 h más tarde que las donantes (85.1% y 81.1%, respectivamente), independientemente del estadio embrionario utilizado para las transferencias (día 5, mórula o día 6, blastocisto). Las tasas de gestación y parto disminuyeron ($P < 0.05$) cuando las receptoras fueron sincrónicas con las donantes (61.3% y 61.3%, respectivamente) o cuando la asincronía fue de -24 h (11.1% y 0%, respectivamente) o + 48 h (50% y 50%, respectivamente). Aunque no se observaron diferencias en el tamaño de camada, el peso y el ratio del sexo de los lechones al nacimiento entre los grupos experimentales, la eficiencia en la producción de lechones fue mayor ($P < 0.001$) para los grupos de asincronía de 0 h y + 24 h (20.6% y 24%, respectivamente) que para los grupos de - 24 h y + 48 h (0% y 14.3%, respectivamente).

Después de analizar los parámetros reproductivos de las cerdas receptoras transferidas con mórulas de día 5 o blastocistos de día 6, que salieron en celo a las 0 h y 24 h después de las donantes, no se encontraron diferencias entre los grupos en ninguno de los parámetros evaluados a excepción de la eficiencia de producción de lechones, la cual fue más alta ($P < 0'02$) para los blastocistos que para las mórulas en el grupo de + 24 h (25'6% y 21'3%, respectivamente). Los resultados obtenidos de las cerdas que salieron en celo 48 h después de las donantes demostraron que esta asincronía era más adecuada para las transferencias realizadas con blastocistos que para aquellas en las que se utilizaron mórulas. La tasa de partos (87'5%; $P < 0'05$) y la eficiencia en la producción de lechones (27'9%; $P < 0'001$) aumentaron en el grupo de los blastocistos comparado con el grupo de las mórulas (30'0% y 7'0%, respectivamente). No se encontraron diferencias entre grupos en los demás parámetros evaluados, aunque el tamaño de camada y el número de lechones nacidos vivos tendió ($P = 0'09$) a ser más elevado cuando se utilizaron blastocistos ($10'4 \pm 0'7$ y $9'6 \pm 0'7$, respectivamente) que cuando se emplearon mórulas ($7'3 \pm 2'3$ y $7'0 \pm 2'0$, respectivamente).

Objetivo 3: Evaluar la utilización potencial de la transferencia intrauterina profunda no quirúrgica con mórulas cultivadas in vitro durante 24 h en un medio químicamente definido (Artículo 3).

Diseño experimental

Experimento 3.1: Influencia de la temperatura y el medio de cultivo sobre la viabilidad y desarrollo de mórulas cultivadas durante 24 h.

Para la realización de este experimento se diseñó un experimento factorial 2x2 en un total de dos replicados. Se seleccionaron 12 cerdas donantes en base a su historial reproductivo. Estas donantes fueron sometidas a un tratamiento de superovulación mediante la administración de 1000 UI de eCG 24 h después del destete. La obtención de embriones se realizó en el día 5 del ciclo para obtener embriones en estadio de mórula. Inmediatamente después de su

obtención, las mórulas se cultivaron en grupos de 7-10 durante 24 h a 25 °C ó 37 °C en tubos eppendorf que contenían 1'5 mL de un medio químicamente definido (TL-PVA) o de NCSU-23 (Petters y cols. 1993) suplementado con 10 mM HEPES y 0'4% BSA medio semi-definido; NCSU-BSA). Además se cultivó un grupo de mórulas como grupo control (7-10 por pocillo) en una placa de 4 pocillos, los cuales contenían 500 µL de NCSU-23 suplementados con 0'4% de BSA y un 10% de suero fetal bovino a 38'5 °C, bajo condiciones de humedad y con un 5% de CO₂. Los embriones de cada donante se repartieron de forma equitativa en cada uno de los grupos. Los embriones se fotografiaron a las 0 h y a las 24 h de cultivo y se analizaron retrospectivamente para determinar su estadio de desarrollo y la calidad embrionaria (Macháty y cols.. 1998). El diámetro exterior (incluyendo la zona pelúcida) y el grosor de la zona pelúcida se midieron con la ayuda del software ImageJ (National Institutes of Health; <http://rsbweb.nih.gov/ij/>). Para la evaluación del número total de células, los embriones se fijaron en paraformaldehído al 4% en solución salina fosfatada (PBS) durante 30 min a temperatura ambiente, se lavaron 2 veces con PBS-BSA, se depositaron en microgotas de 4 µL de Vectashield (Vector, Burlingame, USA) suplementado con 10 µg/mL de Hoechst 33342 y se cubrieron con un cubreobjetos. La evaluación de los embriones fijados se realizó con un microscopio de fluorescencia, usando un filtro de excitación de 330-380 nm. El número total de células se determinó mediante contaje de los núcleos que se identificaron por emitir fluorescencia azul.

Las mórulas que progresaron durante el cultivo hasta blastocisto se consideraron como viables. La tasa de supervivencia *in vitro* se definió como el número de embriones viables con respecto al número total de embriones cultivados. La tasa de eclosión se estableció como la proporción entre el número de embriones eclosionando o eclosionados en relación al número total de embriones cultivados.

Experimento 3.2: Rendimiento reproductivo de las cerdas receptoras después de la transferencia no quirúrgica intrauterina profunda de embriones cultivados a 37 °C en un medio químicamente definido.

Este experimento se realizó para evaluar el desarrollo *in vivo* de los blastocistos procedentes de las mórulas cultivadas. El experimento se desarrolló en un total de 5 replicados. Cada uno de ellos fue llevado a cabo en sesiones independientes a lo largo de 1 año y comprendió 14-16 donantes y 9-11 transferencias. Dentro de cada replicado, las donantes se inseminaron con dosis espermáticas del mismo verraco, y se transfirieron un número similar de receptoras en cada uno de los dos grupos de estudio (blastocistos cultivados y no cultivados). En total se seleccionaron 77 donantes de embriones, basándonos en su historial reproductivo. Estas donantes se sometieron a una laparotomía en día 5 y 6 del ciclo para la obtención de mórulas y blastocistos, respectivamente. Los embriones en estadio de mórula se cultivaron en TL-PVA a 37 °C durante 24 h. Al final del cultivo, se efectuó una valoración morfológica de los embriones y aquellos que progresaron hasta el estadio de blastocisto se transfirieron a las receptoras. El grupo control fue establecido con aquellos embriones obtenidos en estadio de blastocisto y transferidos directamente a la receptora sin cultivo previo.

Todas las transferencias se realizaron en día 5 del ciclo estral. Las receptoras (N = 49) fueron seleccionadas en base a su historial reproductivo y su condición corporal. No hubo diferencias entre los dos grupos con respecto al historial reproductivo de las cerdas receptoras. Se transfirieron 30 blastocistos en la profundidad de un cuerno uterino en cada receptora. La misma persona llevó a cabo todas las transferencias.

Análisis estadístico

Los datos se analizaron mediante el paquete estadístico IBM SPSS 19 (SPSS, Chicago, IL, USA). Los datos en porcentaje se compararon con el test de Fisher. Los estadios de desarrollo se analizaron con el test de Kruskal-Wallis. Como este test reveló diferencias significativas, las comparaciones se realizaron dos a dos

mediante el test de Mann-Whitney para dos muestras independientes. Las variables continuas se evaluaron con el test de Kolmogorov-Smirnov para comprobar la normalidad, y los grupos se compararon con un modelo mixto ANOVA (Experimento 3.1) o el test de Student (Experimento 3.2). El modelo ANOVA incluyó los efectos fijos de la temperatura, el medio y su interacción, y el efecto aleatorio del replicado. Cuando el ANOVA reveló un efecto significativo, se utilizó el test de Bonferroni para comparar los datos. El coeficiente de variación ($CV = \text{desviación estándar}/\text{media}$) se usó como una medida de la variabilidad de la respuesta ovulatoria. Se consideraron diferencias significativas cuando $P < 0.05$. Los resultados se expresaron como porcentajes y medias \pm S.E.M.

Resultados

Experimento 3.1.

De las 12 donantes, 8 (66.7%) tuvieron mórulas, 2 (16.7%) blastocistos y las dos restantes ovocitos después de los lavados uterinos. La tasa de ovulación en las cerdas gestantes fue 25.2 ± 1.5 cuerpos lúteos (rango: 19 a 31 cuerpos lúteos, $CV = 17.3\%$). Las tasas de recuperación embrionaria y de fecundidad fueron 96.5% y 95.5%, respectivamente, y el número medio de embriones viables y ovocitos/embriones degenerados en cerdas gestantes fue de 23.2 ± 1.6 y 1.1 ± 0.2 , respectivamente. En este experimento, sólo se utilizaron los embriones que se encontraban en estadio de mórula ($n = 212$) en el momento de la obtención.

La tasa de supervivencia de los embriones control después de 24 h de cultivo fue del 100%. En el grupo de embriones cultivados a 25 °C se observó una disminución ($P < 0.05$) de la viabilidad embrionaria (45.8% y 82.6 para los grupos de TL-PVA y NCSU-BSA, respectivamente). El grupo de embriones cultivados a 37 °C en TL-PVA o NCSU-BSA tuvo una tasa de supervivencia en torno al 95%, no habiendo diferencias con los del grupo control. A las 24 h de cultivo, se observó un retraso del desarrollo embrionario en todos los grupos experimentales, en comparación con el grupo control ($P < 0.001$). Este retraso fue más marcado ($P < 0.001$) cuando los embriones fueron cultivados a 25 °C,

independientemente del medio de cultivo. Tras el cultivo, el 80'0% de los embriones incubados a 25 °C alcanzaron en estadio de blastocisto temprano, mientras el 82'2% de los embriones cultivados a 37 °C se encontraron en los estadios de blastocisto o blastocisto expandido. A diferencia del grupo control, ninguno de los embriones cultivados en los grupos experimentales llegó a eclosionar al final del periodo de cultivo. A las 24 h del cultivo, el diámetro exterior del embrión y el número de células totales en los grupos experimentales aumentó ($P < 0'002$) y el grosor de la zona pelúcida disminuyó ($P < 0'02$) a medida que se incrementó la temperatura, independientemente del medio de cultivo. No hubo interacción temperatura x medio. Los embriones del grupo control presentaron un diámetro mayor ($P < 0'001$), más células totales y un grosor de la zona pelúcida menor ($P < 0'001$) que los embriones de los grupos experimentales. Hubo diferencias ($P < 0'001$) en el diámetro, el grosor de la zona pelúcida y el número de células entre las 0 h y 24 h de cultivo en los embriones pertenecientes al grupo de 37 °C y al control. En contraste, dichas diferencias no fueron observadas en los embriones cultivados a 25 °C.

Cuando se seleccionaron embriones en estadio de blastocistos temprano o blastocisto con diámetros externos y grosor de la zona pelúcida similares, las diferencias ($P < 0'004$) en el número total de células entre embriones cultivados a 25 °C y 37 °C fueron también evidentes.

Experimento 3.2.

De las 77 donantes utilizadas, 74 (96'1%) tuvieron mórulas y blastocistos en día 5-6 del ciclo, y 3 (3'9%) tuvieron sólo ovocitos. La tasa de ovulación fue de $23'9 \pm 0'5$ cuerpos lúteos (rango 16 a 40 cuerpos lúteos, CV = 17'7%). La tasa recuperación embrionaria y de fecundidad fueron 95'4% y 94'3%, respectivamente, y el número medio de embriones viables y ovocitos/embriones degenerados por cerda gestante fue de $21'5 \pm 0'5$ y $1'3 \pm 0'3$, respectivamente. Un total de 737 mórulas de 785 (93'9%) fueron viables a las 24 h de cultivo, presentando diferentes estadios de desarrollo (blastocito temprano: 23'9%, blastocisto: 67'16%, o blastocisto expandido: 9'0%). Un total de 720 blastocistos procedentes del cultivo y 750 blastocistos no cultivados (control) fueron transferidos a un total de 24 y 25 receptoras, respectivamente.

No hubo diferencias en las tasas de parto (91'7% y 92'0%), ni en el tamaño de camada ($9'0 \pm 0'6$ y $9'4 \pm 0'8$) entre los grupos (cultivados y no cultivados, respectivamente). Además tampoco hubo diferencias entre grupos con respecto al peso de los lechones al nacimiento ($1'6 \pm 0'1$ y $1'5 \pm 0'1$ kg), la tasa de supervivencia embrionaria (27'5% y 28'8%) o el ratio del sexo de los lechones (macho/hembra: 55'6/44'4 y 53'1/46'9).

CONCLUSIONES

1. Los resultados de este estudio demuestran que la respuesta ovulatoria y el número de embriones viables y transferibles aumentan con los tratamientos de superovulación y que dichos tratamientos no afectan al número de ovocitos y/o embriones degenerados. Además, los embriones transferibles obtenidos a partir de cerdas superovuladas como no superovuladas tienen una capacidad similar para desarrollarse a término después de ser transferidos por vía no quirúrgica en la profundidad de un cuerno uterino de las receptoras.
2. El número de donantes necesarias para transferir 30 embriones por receptora por vía no quirúrgica se puede reducir de 2'0 a 1.3 ó 1'4, mediante los tratamientos de superovulación. Concretamente, una dosis de 1000 UI de eCG es suficiente para obtener un número aceptable de embriones transferibles por donante y unos resultados reproductivos satisfactorios en las receptoras.
3. Los embriones porcinos toleran mejor un ambiente uterino más temprano del que les corresponde cuando son transferidos por vía no quirúrgica en la profundidad de un cuerno uterino. Cuando se utilizan mórulas de día 5 y blastocistos de día 6 para la transferencia no quirúrgica en la profundidad de un cuerno uterino, lo más adecuado es emplear receptoras que comiencen el estro 24 h después de las donantes. Esta asincronía se puede ampliar hasta + 48 h en el caso de transferir blastocistos de día 6. Por el contrario, la utilización de

receptoras sincrónicas o con celos anteriores al de las donantes (- 24 h), no mostró unos resultados adecuados de gestación y parto.

4. El medio TL-PVA es un medio químicamente definido capaz de mantener una elevada viabilidad in vitro de mórulas porcinas cultivadas a 37 °C durante 24 h. Más del 95% de los embriones que se cultivaron bajo estas condiciones se desarrollaron hasta blastocisto no eclosionado, que es el estadio más adecuado para la transferencia de embriones no quirúrgica en la profundidad de un cuerno uterino. Aunque el cultivo causó un cierto retraso en el desarrollo, los blastocistos resultantes mantuvieron su potencial de desarrollo a término, tras la transferencia no quirúrgica en la profundidad de un cuerno uterino, de forma similar a los blastocistos no cultivados.

5. El excelente rendimiento reproductivo de las cerdas receptoras tras la transferencia no quirúrgica en la profundidad de un cuerno uterino reportados en estos tres estudios representa un avance muy importante para la difusión y comercialización de esta tecnología por la industria porcina.

ABBREVIATIONS

ABBREVIATIONS

AI: Artificial insemination

BSA: Bovine serum albumin

BTS: Beltsville thawing solution

eCG: Equine chorionic gonadotrophin

ET: Embryo transfer

FC: Flexible catheter

hCG: Human chorionic gonadotrophin

NCSU-23: BSA-free North Carolina state university

NsDU: Non-surgical deep uterine

PBS: Phosphate-buffered saline

PVA: Polyvinyl alcohol

TL: Tyroide's lactate

ZP: Zona pellucida

REFERENCES

REFERENCES

- Almiñana C, Gil MA, Cuello C, Parrilla I, Caballero I, Sanchez–Osorio J, Vazquez JM, Roca J, Martinez EA. Capability of frozen–thawed boar spermatozoa to sustain pre–implantational embryo development. *Anim Reprod Sci* 2010; 121:145–151.
- Beebe LFS, Cameron RDA, Blackshaw AW, Keates HL. Changes to porcine blastocyst vitrification methods and improved litter size after transfer. *Theriogenology* 2005; 64: 879–890.
- Beebe LFS, Bouwman EG, McIlpatrick SM, Nottle MB. Piglets produced from *in vivo* blastocysts vitrified using the cryologic vitrification method (solid surface vitrification) and a sealed storage container. *Theriogenology* 2011; 75: 1453–1458.
- Berthelot F, Venturi E, Cogné J, Furstoss V, Martinat-Botte F. Development of OPS vitrified pig blastocysts: effects of size of the collected blastocysts, cryoprotectant concentration used for vitrification and number of blastocysts transferred. *Theriogenology* 2007; 68: 178–185.
- Blum–Reckow B, Holtz W. Transfer of porcine embryos after 3 days of *in vitro* culture. *J Anim Sci* 1991; 69: 3335–3342.
- Brüssow KP, Schneider F, Kanitz W, Rátky J, Kauffold J, Wähner M. Studies on fixed-time ovulation induction in the pig. *Soc Reprod Fertil Suppl* 2009; 66: 187–195.
- Cameron RDA, Durack M, Fogarty R, Putra DKH, McVeigh J. Practical experience with commercial embryo transfer in pigs. *Aust Vet J* 1989; 66: 314–318. Cameron RD, Beebe LF, Blackshaw AW, Keates HL. Farrowing rates and litter size following transfer of vitrified porcine embryos into a commercial swine herd. *Theriogenology* 2004; 61: 1533–1543.
- Cárdenas H, Pope WF. Control of ovulation rate in swine. *J Anim Sci* 2002; 80: 36–46.
- Cuello C, Gil MA, Almiñana C, Sanchez-Osorio J, Parrilla I, Caballero I, Vazquez JM, Roca J, Rodriguez-Martínez H, Martínez EA.. Vitrification of *in vitro*

cultured porcine two-to-four cell embryos. *Theriogenology* 2007; 68: 258–264.

Cuello C, Berthelot F, Martinat-Botté F, Guillouet P, Furstoss V, Boisseau C, Manceau P, Locatelli A, Martínez EA. Transfer of vitrified blastocysts from one or two superovulated Large White Hyperprolific donors to Meish recipients: reproductive parameters at Day 30 of pregnancy. *Theriogenology* 2004; 61: 843–850.

Dyck GW. Puberty, postweaning estrus and estrous cycle length in Yorkshire and Lacombe swine. *Can J Anim Sci* 1971; 51: 135–140.

Ducro-Steverink DWB, Peters CGW, Maters CC, Hazeleger W, Merks JWM. Reproduction results and offspring performance after non-surgical embryo transfer in pigs. *Theriogenology* 2004; 62: 522–531.

Funahashi H, Ekwall H, Rodriguez-Martinez H. Zona reaction in porcine oocytes fertilized *in vivo* and *in vitro* as seen with scanning electron microscopy. *Biol Reprod* 2000; 63: 1437–1442.

Guerin B, Nibart M, Marquant-Le Guienne B, Humblot P. Sanitary risks related to embryo transfer in domestic species. *Theriogenology* 1997; 47(1): 33–42.

Guthrie HD, Henricks DM, Handlin DL. Plasma hormone levels and fertility in pigs induced to superovulate with PMSG. *J Reprod Fertil* 1974; 41: 361–370.

Hazeleger W, Bouwman EG, Noordhuizen JPTM, Kemp B. Effect of superovulation induction on embryonic development on day 5 and subsequent development and survival after nonsurgical embryo transfer in pigs. *Theriogenology* 2000a; 53: 1063–1070.

Hazeleger W, Noordhuizen JPTM, Kemp B. Effect of asynchronous non-surgical transfer of porcine embryos on pregnancy rate and embryonic survival. *Livest Prod Sci* 2000b; 64: 281–284.

Holtz W, Schlieper B. Unsatisfactory results with the transfer of embryos from gilts superovulated with PMSG and hCG. *Theriogenology* 1991; 35: 1237–1249.

Longenecker DE, Day BN. Fertility level of sows superovulated at post-weaning estrus. *J Anim Sci* 1968; 27: 709–711. Macháty Z, Day BN, Prather RS. Development of early porcine embryos *in vitro* and *in vivo*. *Biol Reprod* 1998; 59: 451–455

- Martinat Botté F, Procureur R, Plat M, Forgerit Y, Bussiere J, Bariteau F, Despres P, Locatelli A, Terqui M. Embryo transfer in the pig: effects of the number of embryos transferred and genotype. In: 9thm AETE meeting proceedings, Lyon, 1993, p. 236.
- Martinat-Botté F, Venturi E, Guillouet P, Driancourt MA, Terqui M. Induction and synchronization of ovulations of nulliparous and multiparous sows with an injection of gonadotropin-releasing hormone agonist (receptal). *Theriogenology* 2010; 73: 332–3342.
- Martinez EA, Caamaño JN, Gil MA, Rieke A, Mccauley TC, Cantley TC, Vazquez JM, Roca J, Vazquez JL, Didion BA, Murphy CN, Prather RS, Day BN. Successful nonsurgical deep uterine embryo transfer in pigs. *Theriogenology* 2004; 61: 137–146. Martinez EA, Gil MA, Cuello C, Sanchez-Osorio J, Gomis J, Parrilla I, Angel MA, Rodriguez-Martinez H, Lucas X, Vazquez JL, Vazquez JM, Roca J. Current progress in non-surgical embryo transfer with fresh and vitrified/warmed pig embryos. In: Rodriguez-Martinez H, Soede NM, Flowers WL, editors. Control of pig reproduction IX. Leicestershire, UK: Context Products Ltd; 2013a. p. 101–12.
- Martinez EA, Cuello C, Parrilla I, Rodriguez-Martinez H, Roca J, Vazquez JL, Vazquez JM, Gil MA. Design, development, and application of a nonsurgical deep uterine embryo transfer technique in pigs. *Anim Front* 2013b; 3: 40–47.
- Matsunari H, Maehara M, Nakano K, Ikezawa Y, Hagiwara Y, Sasayama N, Shirasu A, Ohta H, Takahashi M, Nagashima H. Hollow fiber vitrification: a novel method for vitrifying multiple embryos in a single device. *J Reprod Dev* 2012; 58: 599–608.
- Misumi K, Suzuki M, Sato S, Saito N. Successful production of piglets derived from vitrified morulae and early blastocysts using a microdroplet method. *Theriogenology* 2003; 60: 253–260.
- Niemann H, Wüst A, Gardon JC. Successful intercontinental transport of porcine embryos from Europe to South America. *Theriogenology* 1989; 31: 525–530.

- Polge C. Embryo transplantation and preservation. In: Cole DJA, Foxcroft GR, editors. Control of pig reproduction. London: Butterworth; 1982. pp. 277–291.
- Pursel VG, Johnson LA. Freezing of boar spermatozoa: fertilizing capacity with concentrated semen and a new thawing procedure. *J Anim Sci* 1975; 40: 99–102.
- Rátky J, Brüssow KP, Solti L, Torner H, Sarlós P. Ovarian response, embryo recovery and results of embryo transfer in a Hungarian native pig breed. *Theriogenology* 2001; 56: 969–978.
- Rubio Pomar FJ, Ducro-Steeverink DWB, Hazeleger W, Teerds KJ, Colenbrander B, Bevers MM. (2004) Development, DNA fragmentation and cell death in porcine embryos after 24 h storage under different conditions. *Theriogenology* 61: 147–158.
- Spell AR, Beal WE, Corah LR, Lamb GC. Evaluating recipient and embryo factors that affect pregnancy rates of embryo transfer in beef cattle. *Theriogenology* 2001; 56: 287–297.
- Wilde MH, Xie S, Day ML, Pope WF. Survival of small and large littermate blastocysts in swine after synchronous and asynchronous transfer procedures. *Theriogenology* 1988; 30: 1069–1074.
- Wrathall AE. Embryo transfer and disease transmission in livestock: a review of recent research. *Theriogenology* 1995; 43: 81–88.
- Wright JM. Photographic illustrations of embryo developmental stage and quality codes. In: Stringfellow DA, Siedel SM (eds.), *Manual of the International Embryo Transfer Society*. Savoy: IETS; 1998: 167–170.

ARTICLES

Article 1

The effects of superovulation of donor sows on ovarian response and embryo development after nonsurgical deep-uterine embryo transfer

Revista:

Theriogenology

Resumen:

This study aimed to evaluate the effectiveness of superovulation protocols in improving the efficiency of embryo donors for porcine nonsurgical deep-uterine (NsDU) embryo transfer (ET) programs. After weaning (24 hours), purebred Duroc sows (2–6 parity) were treated with 1000 IU (n ¼ 27) or 1500 IU (n ¼ 27) of eCG. Only sows with clear signs of estrus 4 to 72 hours after eCG administration were treated with 750 IU hCG at the onset of estrus. Nonhormonally treated postweaning estrus sows (n ¼ 36) were used as a control. Sows were inseminated and subjected to laparotomy on Days 5 to 6 (Day 0 ¼ onset of estrus). Three sows (11.1%) treated with the highest dosage of eCG presented with polycystic ovaries without signs of ovulation. The remaining sows from nonsuperovulated and superovulated groups were all pregnant, with no differences in fertilization rates among groups. The number of CLs and viable embryos was higher ($P < 0.05$) in the superovulated groups compared with the controls and increased ($P < 0.05$) with increasing doses of eCG. There were no differences among groups in the number of oocytes and/or degenerated embryos. The number of transferable embryos (morulae and unhatched blastocysts) obtained in pregnant sows was higher ($P < 0.05$) in the superovulated groups than in the control group. In all groups, there was a significant correlation between the number of CLs and the number of viable and transferable embryos, but the number of CLs and the number of oocytes and/or degenerated embryos were not correlated. A total of 46 NsDU ETs were performed in nonhormonally treated recipient sows, with embryos (30 embryos per transfer) recovered from the 1000-IU eCG, 1500-IU eCG, and control groups. In total, pregnancy and farrowing rates were 75.1% and 73.2%, respectively,

with a litter size of 9.4 ± 0.6 piglets born, of which 8.8 ± 0.5 were born alive. There were no differences for any of the reproductive parameters evaluated among groups. In conclusion, our results demonstrated the efficiency of eCG superovulation treatments in decreasing the donor-to-recipient ratio. Compared with nonsuperovulated sows, the number of transferable embryos was increased in super-ovulated sows without affecting their quality and in vivo capacity to develop to term after transfer. The results from this study also demonstrate the effectiveness of the NsDU ET procedure used, making possible the commercial use of ET technology by the pig industry.

Dirección url:

<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0093691X13005335>

Article 2

An Earlier Uterine Environment Favors the In Vivo Development of Fresh Pig Morulae and Blastocysts Transferred by a Nonsurgical Deep-uterine Method.

Revista:

Journal of Reproduction and Development

Resumen:

This study aimed to evaluate the effect of recipient-donor estrous cycle synchrony on recipient reproductive performance after nonsurgical deep-uterine (NsDU) embryo transfer (ET). The transfers (N=132) were conducted in recipients sows that started estrus 24 h before (-24 h; N=9) or 0 h (synchronous; N=31), 24 h (+24 h; N=74) or 48 h (+48 h; N=18) after the donors. A total of 30 day 5 morulae or day 6 blastocysts (day 0=onset of estrus) were transferred per recipient. The highest farrowing rates (FRs) were achieved when estrus appeared in recipients 24 h later than that in the donors (81.1%), regardless of the embryonic stage used for the transfers. The FR notably decreased ($P<0.05$) when recipients were -24 h asynchronous (0%), synchronous (61.3%) or +48 h asynchronous (50%) relative to the donors. No differences in litter size (LS) and piglet birth weights were observed among the synchronous and +24 h or +48 h asynchronous groups. While a +24 h asynchronous recipient was suitable for transfers performed with either morulae (FR, 74.3%; LS, 9.2 ± 0.6 piglets) or blastocysts (FR, 84.6%; LS, 9.8 ± 0.6 piglets), a +48 h asynchronous recipient was adequate for blastocysts (FR, 87.5%; LS, 10.4 ± 0.7 piglets) but not for morulae (FR, 30.0%; LS, 7.3 ± 2.3 piglets). In conclusion, this study confirms the effectiveness of the NsDU-ET technology and shows that porcine embryos tolerate better a less advanced uterine environment if they are nonsurgically transferred deep into the uterine horn.

Dirección url:

https://www.jstage.jst.go.jp/article/jrd/advpub/0/advpub_2014-022/_article

Article 3

Successful Non-Surgical Deep Uterine Transfer of Porcine Morulae after 24 Hour Culture in a Chemically Defined Medium

Revista:

Plos One

Resumen:

Excellent fertility and prolificacy have been reported after non-surgical deep uterine transfers of fresh in vivo-derived porcine embryos. Unfortunately, when this technology is used with vitrified embryos, the reproductive performance of recipients is low. For this reason and because the embryos must be stored until they are transferred to the recipient farms, we evaluated the potential application of non-surgical deep uterine transfers with in vivo-derived morulae cultured for 24 h in liquid stage. In Experiment 1, two temperatures (25 °C and 37 °C) and two media (one fully defined and one semi-defined) were assessed. Morulae cultured in culture medium supplemented with bovine serum albumin and fetal calf serum at 38.5 °C in 5% CO₂ in air were used as controls. Irrespective of medium, the embryo viability after 24 h of culture was negatively affected ($P < 0.05$) at 25 °C but not at 37 °C compared with the controls. Embryo development was delayed in all experimental groups compared with the control group ($P < 0.001$). Most of the embryos (95.7%) cultured at 37 °C achieved the full or expanded blastocyst stage, and unlike the controls, none of them hatched at the end of culture. In Experiment 2 785 morulae were cultured in the defined medium at 37 °C for 24 h, and the resulting blastocysts were transferred to the recipients ($n = 24$). Uncultured embryos collected at the blastocyst stage ($n = 750$) were directly transferred to the recipients and used as controls ($n = 25$). No differences in farrowing rates (91.7% and 92.0%) or litter sizes (9.0 ± 0.6 and 9.4 ± 0.8) were observed between the groups. This study demonstrated, for the first time, that high reproductive performance can be achieved after non-surgical deep uterine transfers with short-term cultured

morulae in a defined medium, which opens new possibilities for the sanitary, safe national and international trade of porcine embryos and the commercial use of embryo transfer in pigs.

Dirección url:

<http://www.plosone.org/article/info%3Adoi%2F10.1371%2Fjournal.pone.0104696>

