



UNIVERSIDAD DE MURCIA

ESCUELA INTERNACIONAL DE DOCTORADO

*FACULTAD DE VETERINARIA
DEPARTAMENTO DE MEDICINA Y CIRUGÍA ANIMAL*

ADVANCES IN SWINE EMBRYO PRODUCTION AND
TRANSFER

AVANCES EN LA PRODUCCIÓN Y TRANSFERENCIA DE EMBRIONES
PORCINOS

DIRECTORAS:
MARÍA ANTONIA GIL CORBALÁN
CRISTINA CUELLO MEDINA

JOSEP MIQUEL CAMBRA BORT
2021

PHD THESIS BY PUBLICATIONS
TESIS DOCTORAL POR COMPENDIO DE PUBLICACIONES

SECTION I

ARTICLE

1

Martinez, C.A.; Cambra, J.M.; Maside, C.; Cuello, C.; Roca, J.; Martinez, E.A.; Parrilla, I.; Gil, M.A. **High pre-freezing sperm dilution improves monospermy without affecting the penetration rate in porcine IVF.** *Theriogenology* **2019**, *131*, 162–168, doi:10.1016/j.theriogenology.2019.04.001.

ARTICLE

2

Maside, C.; Martinez, C.A.; Cambra, J.M.; Lucas, X.; Martinez, E.A.; Gil, M.A.; Rodriguez-Martinez, H.; Parrilla, I.; Cuello, C. **Supplementation with exogenous coenzyme Q10 to media for *in vitro* maturation and embryo culture fails to promote the developmental competence of porcine embryos.** *Reprod. Domest. Anim.* **2019**, *54 Suppl 4*, 72–77, doi:10.1111/rda.13486.

ARTICLE

3

Cambra, J.M.; Martinez, C.A.; Rodriguez-Martinez, H.; Martinez, E.A.; Cuello, C.; Gil, M.A. **N-(2-mercaptopropionyl)-glycine enhances *in vitro* pig embryo production and reduces oxidative stress.** *Sci. Rep.* **2020**, *10*, 18632, doi:10.1038/s41598-020-75442-6.

ARTICLE

4

Cambra, J.M.; Martinez, C.A.; Maside, C.; Rodriguez-Martinez, H.; Martinez, E.A.; Gil, M.A.; Cuello, C. **The cytokine platelet factor 4 successfully replaces bovine serum albumin for the *in vitro* culture of porcine embryos.** *Theriogenology* **2019**, doi:10.1016/j.theriogenology.2019.11.009.

ARTICLE

5

Cambra JM, Martinez EA, Rodriguez-Martinez H, Gil MA, Cuello C. **Transcriptional Profiling of Porcine blastocysts produced *in vitro* in a chemically defined culture medium.** *Animals.* **2021**; *11*(5):1414. <https://doi.org/10.3390/ani11051414>

SECTION II

ARTICLE

6

Parrilla, I.; Martinez, C.A.; Cambra, J.M.; Lucas, X.; Ferreira-Dias, G.; Rodriguez-Martinez, H.; Cuello, C.; Gil, M.A.; Martinez, E.A. **Blastocyst-Bearing Sows Display a Dominant Anti-Inflammatory Cytokine Profile Compared to Cyclic Sows at Day 6 of the Cycle.** *Anim. an open access J. from MDPI* **2020**, *10*, doi:10.3390/ani10112028.

ARTICLE

7

Cambra, J.M.; Jauregi-Miguel, A.; Alvarez-Rodriguez, M.; Parrilla, I.; Gil, M.A.; Martinez, E.A.; Cuello, C.; Rodriguez-Martinez, H.; Martinez, C.A. **Allogeneic Embryos Disregulate Leukemia Inhibitory Factor (LIF) and Its Receptor in the Porcine Endometrium During Implantation.** *Front. Vet. Sci.* **2020**, *7*, 611598, doi:10.3389/fvets.2020.611598.

ARTICLE

8

Martinez, C.A.; Cambra, J.M.; Parrilla, I.; Roca, J.; Ferreira-Dias, G.; Pallares, F.J.; Lucas, X.; Vazquez, J.M.; Martinez, E.A.; Gil, M.A.; et al. **Seminal Plasma Modifies the Transcriptional Pattern of the Endometrium and Advances Embryo Development in Pigs.** *Front. Vet. Sci.* **2019**, *6*, 465, doi:10.3389/fvets.2019.00465.

ARTICLE

9

Martinez, C.A.; Cambra, J.M.; Gil, M.A.; Parrilla, I.; Alvarez-Rodriguez, M.; Rodriguez-Martinez, H.; Cuello, C.; Martinez, E.A. **Seminal Plasma Induces Overexpression of Genes Associated with Embryo Development and Implantation in Day-6 Porcine Blastocysts.** *Int. J. Mol. Sci.* **2020**, *21*, doi:10.3390/ijms21103662.

CONTENTS

Introduction	1
Objectives	7
Extended summary	9
Materials and Methods	9
Experimental Designs and results	17
General Conclusions	26
Abbreviations	28
Resumen General.....	30
Introducción	30
Objetivos	35
Material y Métodos.....	36
Diseños Experimentales y Resultados	44
Conclusiones Generales.....	53
Abreviaturas	54
References.....	56
ARTICLES.....	61
ARTICLE 1	62
ARTICLE 2	63
ARTICLE 3	64
ARTICLE 4	65
ARTICLE 5	66
ARTICLE 6	67
ARTICLE 7	68
ARTICLE 8	69
ARTICLE 9	70
Appendix.....	72
Graphic Appendix.....	72
Impact factors	79

INTRODUCTION

INTRODUCTION

In vitro embryo production (IVP) and embryo transfer (ET) have become key elements within different reproductive biotechnologies used with different species. Both are basic tools for the application of other biotechnologies, such as cloning and transgenesis, with a multitude of applications in fields of research and livestock production. The combined application of IVP and ET has led to great advances in the productivity of the cattle industry, where these biotechnologies have been extensively used in recent years, accelerating genetic progress and reducing costs. In contrast, particularities of swine, which are detailed below, have limited the application of these tools for commercial use. Therefore, is necessary to improve these biotechnologies in this species to promote their application in the swine industry.

Due to the ideal characteristics of pigs as experimental animals for biomedical research [1], among which the physiological and genetic resemblance to humans stand out [2]; the development of these reproductive biotechnologies has become a priority. Somatic cell nuclear transfer for cloning and the use of more precise techniques for genetic modification and the creation of transgenic animals, such as zinc-finger nucleases, transcription activator-like effector nucleases and, more recently, the clustered regularly interspaced short palindromic repeats /Cas9 [3], require the *in vitro* production of zygotes in sufficient number and quality. In addition, subsequent *in vitro* culture (IVC) and ET, which is the final step in obtaining viable offspring, are also necessary.

A virtually unlimited number of zygotes can be obtained by *in vitro* maturation (IVM) and *in vitro* fertilization (IVF) from immature oocytes collected from ovaries of slaughtered prepubertal gilts. However, the quality of zygotes produced *in vitro* is not comparable to those obtained *in vivo*, due to suboptimal IVM systems and the pressing problem of polyspermy that occurs in this species during IVF. Regarding IVM, a large percentage of oocytes obtained from prepubertal gilts complete nuclear maturation (75-85%) through different production systems [4–8]. Under *in vivo* conditions, nuclear maturation of an oocyte is accompanied by proper cytoplasmic maturation, resulting in high quality oocytes.

In contrast, in IVM systems, the cytoplasmic maturation process is impaired, contributing to low oocyte quality [9,10], which affects embryo production rates. Numerous studies have shown that while nuclear maturation is not affected by improvements to the maturation medium, embryo formation is increased due to an improvement in cytoplasmic maturation [11–14]. This fact suggests that it is still possible to increase the quality of *in vitro* matured oocytes prior to fertilization.

Polyspermy is the other major problem for obtaining high quality zygotes *in vitro*. Under physiological conditions, the incidence of this phenomenon in pigs is less than 5% [15,16]; however, under current IVF conditions, the percentage of monospermic oocytes is only 30-40% (reviewed in [17]). One of the problems arising from this alteration is that polyspermic zygotes are able to develop to the blastocyst stage [18]. Moreover, blastocysts derived from polyspermic zygotes are morphologically indistinguishable from those derived from monospermic zygotes, making them not possible to identify without cytogenetic analysis [19]. This fact, inevitably leads to a proportion of polyspermic embryos with chromosomal abnormalities, which substantially reduce their subsequent developmental

competence [20] and the viability of the offspring after ET [21,22]. For these reasons, many studies on porcine IVF have been aimed at reducing the polyspermic incidence through different methods, including the application of physical barriers that hinder penetration [23–25], as well as the supplementation of the medium with different compounds (reviewed in [26]). Other studies have developed techniques for discriminating polyspermic zygotes [20], which are discarded prior to IVC.

Although obtaining a large number and quality of zygotes is important for many biotechnologies, subsequent embryo culture is indispensable for these embryos to reach the appropriate preimplantation stage under the best conditions for ET. The first studies related to IVP and IVC of porcine embryos date back to the 1980s, when several studies combined *in vitro* techniques with *in vivo* derived oocytes and intraoviductal cultures (reviewed in [26]). However, it took until the 1990s when the blockage of 4-cell embryos was overcome by the development of new culture media [27] and the first litters were obtained after the transfer of *in vitro* cultured IVF morulae and blastocysts [28–30]. From these first historical milestones to the present date, the number of studies in this field has increased and important advances have been made in this technique; however, current porcine IVC systems still present two essential problems.

First, porcine IVC systems are unable to provide an optimal environment for embryonic development, as the percentage of blastocysts obtained rarely exceeds 40% in most laboratories [5,6]. The differences between *in vitro* produced and *in vivo* obtained embryos are also observed in the quality of embryos, reflected in the number of cells, which is much lower in embryos produced *in vitro*, and in changes in both the transcriptome and the epigenome [31]. These alterations are not exclusively found in zygotes produced *in vitro*; they have also been reported for *in vivo* derived zygotes cultured *in vitro*. Indeed, under these conditions, only 70–80% of zygotes reach the blastocyst stage [32–34], and they also show impaired quality in terms of cell number and transcriptomic profile [35]. Regardless of embryonic origin, embryo developmental rates and quality after IVC do not reach levels achieved during physiological development, suggesting that culture conditions are the primary cause of these problems. Numerous researches have focused on solving these problems through different approaches, such as modifying the energy sources in the media, the amino acid balance, the addition of specific growth factors or adjustments of the oxygen concentration during the incubation periods, among others (reviewed in [36]). In relation to the latter, the role that the oxidative environment plays in embryonic development is noteworthy. Many studies have pointed out that different mechanisms contribute to the control of the oxidative status of the embryo during its development in a physiological environment; however, culture conditions exacerbate oxidative stress suffered by embryos, limiting their developmental capacity [37,38]. Therefore, the development of environments that reduce oxidative stress during IVC may be an effective tool that contributes to bringing the status of *in vitro* produced embryos closer to that of those developed *in vivo*.

The other remaining problem regarding current culture systems is the use of undefined culture media. To overcome certain problems associated with culture, traditional media contain undefined substances of animal origin, such as bovine serum albumin (BSA) or fetal calf serum. Although these products have improved embryo production rates and increased embryo quality [39,40], their undefined chemical nature complicates the standardization of culture systems, which ultimately hinders the reproducibility of results

[41]. In addition to this problem, there is also a possible risk of contamination from the use of products of animal origin [42] and the possibility that these compounds interact with new additives [43,44], which limits the potential use of these culture media in the research field. For these reasons, obtaining chemically defined media capable of sustaining embryonic development is a priority task for the improvement of culture conditions.

The ultimate success of all the aforementioned techniques lies in the last step of the whole process, which is ET to recipient females. This technology is not only crucial for obtaining offspring from embryos produced *in vitro* or zygotes obtained *in vivo* and cultured *in vitro* but is also of great practical applicability to the farming industry with the use of fully *in vivo* derived embryos. Among these multiple applications, special mention should be made of the possibility of introducing new genetics into farms with the highest sanitary status, thus avoiding the entry of new animals with the associated sanitarian risk. Other notable advantages would be the reduction of costs for the transport of animals as well as the improvement of animal welfare [45]. Despite these benefits, the use of ET technology in swine is very limited compared to that in cattle, where its commercial use is widespread [46]. There are several reasons for this, among which the particular anatomical characteristics of the reproductive tract of the sow stand out, making both the collection and transfer of embryos by nonsurgical procedures difficult [47]. However, different advances made in the last decade have allowed the establishment of a nonsurgical technique for porcine ET [48] with acceptable fertility rates [49], which allows the use of ET in the swine industry. Another limiting factor that conditions ET success is the high embryonic mortality rate posttransfer (>50% and >70% embryo mortality after surgical and nonsurgical ET, respectively; reviewed in [45]) compared to artificial insemination (AI) or natural mating, where embryo mortality rarely exceeds 30-40% [50]. Considering these findings, it can be assumed that the uterine environment is less favorable for the embryo implantation in ET pregnancies in which transferred embryos contain both paternal and maternal material different from that of the recipient. In this sense, the role played by maternal immunity may be particularly relevant, given the need to generate tolerance to embryonic/fetal antigens that avoids their rejection during pregnancy [51,52]. Several researchers emphasize the involvement of cytokines in the regulation of all these immune-mediated phenomena leading to embryo survival and implantation [53,54]. Therefore, the role of these mediators in the success or failure of pregnancies carried out by ET is an interesting area of research.

On the other hand, an exogenous agent that has been shown to influence the immune response at this level is seminal plasma (SP). This complex mixture of products secreted by the different accessory sex glands includes, among its best-known functions, facilitation of sperm motility and transport, and functioning as a source of nutrients for sperm. In addition, its functions have also been associated with other reproductive processes, such as ovulation [55], progesterone synthesis [56], and the ability to interact with the endometrium and modulate its immune response [57]. In this way, porcine SP is able to induce the production of certain cytokines in uterine cells [58], which are related to the phenomena of immunosuppression and immune tolerance [59]. For these various reasons, SP infusions can be considered as a tool to improve the reproductive performance of recipients and therefore have the potential to improve ET outcomes, as has been reported in humans [60].

This thesis, prepared as a compendium of publications, includes a total of nine scientific articles, all published in journals indexed in *Journal Citation Reports*. These articles are divided into two sections.

SECTION I

This section includes studies for improving the efficiency of *in vitro* embryo production technologies (articles 1 to 5).

Article 1, entitled “*High pre-freezing sperm dilution improves monospermy without affecting the penetration rate in porcine IVF*”, was published in the journal *Theriogenology*. In this study, the possibility of reducing polyspermy during IVF by using sperm that were highly extended prior to cryopreservation was explored. The second article in this section (**Article 2**), entitled “*Supplementation with exogenous coenzyme Q10 to media for in vitro maturation and embryo culture fails to promote the developmental competence of porcine embryos*”, was published in the journal *Reproduction in Domestic Animals*. This article studied the effects of the antioxidant molecule coenzyme Q10 during IVM and IVC on oocyte maturation, fertilization and embryo development parameters. **Article 3**, entitled “*N-(2-mercaptopropionyl)-glycine enhances in vitro pig embryo production and reduces oxidative stress*”, was published in the journal *Scientific Reports*. This study evaluated the effects of IVC medium supplementation with the antioxidant N-(2-mercaptopropionyl)-glycine (NMPG) on subsequent embryonic development.

The possibility of developing a chemically defined culture medium for the development of porcine embryos was reported in **Article 4**, published in the journal *Theriogenology*, and entitled “*The cytokine platelet factor 4 successfully replaces bovine serum albumin for the in vitro culture of porcine embryos*”. In this article, BSA from the culture medium was successfully replaced by the defined chemical compound platelet factor 4 (PF4). In **Article 5**, entitled “*Transcriptional profiling of porcine blastocysts produced in vitro in a chemically defined culture medium*” and published in the journal *Animals*, chemically defined medium containing PF4 was studied in depth to assess its impact on the transcriptome of blastocysts produced *in vitro*. This study also analyzed the differences between *in vitro* and *in vivo* developmental conditions by including *in vivo* derived embryos in the experiment.

SECTION II

This section focuses on the improvement of ET technology with particular emphasis on recipient females (articles 6 to 9).

The first two articles in this section examined the role of the maternal immune system of recipient sows, analyzing several cytokines at the endometrial level. In **Article 6**, entitled “*Blastocyst-bearing sows display a dominant anti-inflammatory cytokine profile compared to cyclic sows at day 6 of the cycle*” and published in the journal *Animals*, the levels of 16 cytokines were measured in the endometria of inseminated sows (containing embryos) and noninseminated sows (recipient candidates) during the preimplantation period (day 6 of the cycle). **Article 7**, entitled “*Allogeneic embryos deregulate leukemia inhibitory factor (LIF) and its receptor in the porcine endometrium during implantation*”, was published in the journal *Frontiers in Veterinary Science*. The article describes the levels of a particular cytokine, leukemia inhibitory factor (LIF) and its

receptor, in the endometrium of AI and ET recipient pregnant sows during the implantation (day 18) and postimplantation (day 24) periods.

Finally, articles 8 and 9 describe the use of SP infusions prior to AI as a possible tool to increase the reproductive performance of recipient sows in ET programs. **Article 8**, entitled “*Seminal plasma modifies the transcriptional pattern of the endometrium and advances embryo development in pigs*” and published in the journal *Frontiers in Veterinary Science*, presents an analysis of the impact of SP on the endometrial transcriptome and embryo quality and development, 6 days after its infusion. Variations in the gene expression profiles of these embryos in response to SP infusions were investigated in **Article 9**, entitled “*Seminal plasma induces overexpression of genes associated with embryo development and implantation in day-6 porcine blastocysts*”, and published in the *International Journal of Molecular Science*.

OBJECTIVES

OBJECTIVES

The main objectives addressed in the present thesis were the improvement of two porcine reproductive biotechnologies, IVP and ET. With this purpose, specific objectives developed for the different articles that comprise this thesis were as follows:

1st OBJECTIVE: To improve *in vitro* zygote production systems, reducing the impact of polyspermic penetration during fertilization by modifying sperm-freezing protocols.

2nd OBJECTIVE: To increase *in vitro* blastocyst production and quality by reducing the impact of oxidative stress through supplementation with the antioxidant coenzyme Q10 or N-(2-mercaptopropionyl)-glycine.

3rd OBJECTIVE: To develop a chemically defined culture medium using cytokine platelet factor 4 as a bovine albumin serum substitute and to assess its impact on the embryonic transcriptome.

4th OBJECTIVE: To investigate the immune status of recipient sows by analyzing cytokine levels at the endometrial level at 6, 18 and 24 days of pregnancy.

5th OBJECTIVE: To assess the impact of seminal plasma infusion before insemination on the endometrium and embryo quality and development.

**EXTENDED
SUMMARY**

EXTENDED SUMMARY

MATERIAL AND METHODS

Those experimental procedures included in the scope of this thesis that involved the use of live animals intended for experimentation were performed in accordance with the Directive 2010/63/EU EEC for animal experiments and were reviewed and approved by the Ethical Committee for Experimentation with Animals (code: 69/2014), the Research Ethics Committee (code: 1086/ 2015) of the University of Murcia, Spain; the Murcia Regional Ministry of Agriculture and Water (code: 273.705), and the Murcia Regional Ministry of Health (code: 061015), Spain.

The techniques and procedures performed in the different experiments included in this compendium of publications are divided into two parts. First, there is a description of the techniques employed to collect the biological samples, and secondly, the analytical techniques used on these biological samples are explained. Each of the protocols is described according to their order of appearance in the articles. Finally, the different statistical analyses used within this thesis are summarized.

Unless otherwise specified, all reagents and chemicals used in this study were purchased from Sigma-Aldrich Co. (Alcobendas, Madrid, Spain).

1.-Techniques and sample collection

1.1.-Sperm cryopreservation

The semen samples necessary to perform the different experiments with cryopreserved semen were provided by a local insemination center, where healthy hybrids boars (Landrace x Large White), previously classified as good freezers were used as donors. This freezing protocol was based in those described by Roca et al. [61]. The sperm-rich fractions were obtained using the gloved hand technique and were extended 1:1 with Beltsville thawing solution (BTS) [62]. Samples that satisfied quality analysis were further extended with BTS to a concentration of 100×10^6 spermatozoa/mL and progressively cooled to 17°C for 24 h. The samples were then centrifuged (2400 x g, 3 min), removed from their supernatant and then, extended to a final concentration of 1500×10^6 spermatozoa/mL in lactose-egg yolk medium. The resulting samples were slowly cooled in a cold chamber to 5°C for 2.5 h, and then, extended again to a concentration of 1000×10^6 spermatozoa/mL with lactose-egg yolk medium supplemented 9% with glycerol and 1.5% Orvus ES Paste (Equex STM; Nova Chemical Sales Inc., Scituate, MA, USA). Finally, they were packed into 0.25 mL straws. For the last cooling step, the straws were exposed to liquid nitrogen vapors reaching a temperature of approximately -100°C (Freezing Unit Ref: 15043/0636. Minitüb). After 20 min of exposure, they were immersed in liquid nitrogen, and stored in tanks until they were used in the different experiments.

1.2.-*In vitro* embryo production

The IVP was performed according to the protocol previously reported by Martinez et al. [5]. Briefly, cumulus oocyte complexes (COCs), from ovaries obtained from a local slaughterhouse, were incubated in maturation medium, consisting of tissue culture medium 199 (Gibco Life Technologies S.A., Barcelona, Spain) supplemented with 0.55 mM glucose, 0.9 mM sodium pyruvate, 75 mg/mL penicillin, 50 mg/mL streptomycin, 1 mg/mL polyvinyl alcohol (PVA), 0.57 mM cysteine and 10 ng/mL epidermal growth factor. During the first 22 h of incubation the maturation medium was supplemented with 10 IU equine chorionic gonadotropin (eCG; Folligon, Intervet International B.V., Boxxmeer, the Netherlands) and 10 IU human chorionic gonadotropin (hCG; VeterinCorion, Divasa Farmavic, S.A., Barcelona, Spain), while the following 22 h COCs were incubated in hormone-free maturation medium. Oocytes were matured in a humidified and controlled atmosphere with 5% CO₂, at 38°C. Once maturation was completed, the COCs were denuded with a hyaluronidase solution, and fertilized in tris buffered medium [63] containing 2 mM caffeine and 0.2 mg/mL BSA. Oocytes were incubated with cryopreserved and thawed spermatozoa (ratio oocyte:spermatozoa of 1:1000 to 1:4000) for 5 hours. After co-culture, the presumed zygotes were washed in the base medium for IVC, consisting of North Carolina State University (NCSU)-23 [27]. A two-step sequential culture model was followed, where in the first two-days period the medium was supplemented with 0.3 mM sodium pyruvate and 4.5 mM lactate, and in a second five-day period it was supplemented with 5.5 mM glucose instead. The culture conditions as well as the composition of the base medium may vary slightly depending on the experiment.

During the IVC process, the stage of the embryos was assessed at different days to evaluate the embryonic development capacity. The embryos were classified into the following stages of development: Cleaved embryos, when two or more blastomeres could be easily distinguished in the embryo; morula, when the number of blastomeres could not be clearly differentiated, and when it was possible to distinguish an inner cell mass and a trophoblast, they were classified as blastocysts and assigned to other categories according to the degree of expansion of the blastocoel and the thickness of the zona pellucida as follows: early blastocysts (small but discernible blastocoel), full blastocysts [increased blastocoel allowing clearly discrimination of the inner cell mass (ICM) and trophectoderm (TE)], expanded blastocysts (full blastocysts with large diameter and thinned zona pellucida), perihatching blastocyst (expanded blastocoel and zona pellucida barely distinguishable) and hatching or hatched blastocyst (blastocysts with ruptured or missing zona pellucida, respectively).

Different rates were calculated to determine the degree of embryonic development during culture. On day two of culture, the number of cleaved embryos was evaluated to calculate the cleavage rate, expressed as the number of embryos classified in the two-to-four cells stage with respect to the total number of presumed zygotes. On days five, six and seven of culture, the number of blastocysts was counted, calculating the blastocyst rate as the number of embryos that reached this stage with respect to the number of embryos classified as cleaved on day two. Finally, on day six or seven, the total efficiency of the process was calculated, and defined as the number of blastocysts on these days with respect to the total number of presumed zygotes cultured. The hatching rate was defined as the number of

hatching and hatched blastocysts at the end of the culture out of the total number of blastocysts obtained on the same day.

1.3.- Collection of in vivo derived embryos

The procedure used for *in vivo* embryo collection are described by Martinez et al. [64]. Donor females were evaluated for signs of estrus on the days following the weaning. Those sows with positive signs, were artificially inseminated with a post-cervical dose of 1.5×10^9 spermatozoa in 40 mL of BTS. The day of surgery (defining day 0 as the day of the beginning of estrus) depended on the embryonic stage required for the experiment, being performed on day 5 to obtain morulae and day 6 to obtain blastocysts. Likewise, depending on the experimental design, a superovulation treatment was performed on the donors, consisting of an administration of eCG (1000 IU, im) 24 h after weaning and hCG (750 IU, im) 72-96 h latter, at the onset of the estrus.

The anesthetic protocol consisted of sedation with a dose of azaperone (2 mg/kg body weight, im), followed by a dose of sodium thiopental (7 mg/kg body weight, iv) for anesthesia induction, and inhalation maintenance with isoflurane (3-5% in air). The surgical approach was performed via mid-ventral laparotomy, exposing the female genital tract. First, the corpora lutea were counted and then, embryos were retrieved by flushing with 30 mL of modified Tyrode's lactate (TL)-HEPES-PVA [64]. For morulae and blastocysts collection, flushings were performed in the portion proximal to the utero-tubarian junction of both uterine horns. The embryos obtained were evaluated, and classified with the aid of a stereomicroscope according to the criteria established by the International Embryo Transfer Society [65].

1.5.-Surgical embryo transfer

The surgical approach and anesthetic protocols used, were the same as those previously described for embryo collection. The ET protocol was based in that described previously by Martinez et al. [66]. Embryos were loaded into a Tomcat catheter in 30 μ L of NCSU-HEPES-BSA, separated by air bubbles from other two 50 μ L drops of medium without embryos. With the aid of an Adson forceps, the uterine wall was punctured next to the utero-tubarian junction. The loaded catheter was introduced through this opening, depositing the contents in the uterine lumen. To evaluate embryonic development during pregnancy, the recipients were sacrificed on different days after transfer, and the fetuses and placental membranes present in the uterus were examined.

1.6.-Endometrial tissue collection

Endometrial tissue samples for different analytical tests were collected for the different experiments. This technique was similar in all experiments. The sows used in each experiment underwent hysterectomy following surgical and anesthetic procedures like those previously described for embryo collection. The uterine wall was sectioned longitudinally at the anti-mesometrial border, and the endometrium was exposed, collecting strips of tissue of different areas and sizes depending on the experiment. The samples were washed 3 times in phosphate buffered saline (PBS) solution and stored in microtubes with 500 μ L of RNA Later in case of transcriptomic tests, with 500 μ L of protease inhibitor solution in case of proteomic tests, and in case of histological tests, fixed in 10% neutral-buffered formalin for

24 h. For the former two, the samples were stored at -80°C until the experiments were resumed, whereas for the latter, they were transferred to a 70% alcohol solution and stored at room temperature. When the samples were used for explant culture, they were simply washed and used directly for the experiments.

1.7.-Culture of endometrial explants

Endometrial tissue samples were cultured in 3 mL of NCSU-23 medium, under constant oscillation (150 rpm) and controlled incubation conditions of 38°C in a humidified atmosphere of 5% CO₂ for one hour. Thereafter the medium was removed, replaced with fresh medium, and cultured for a second 22 h period. At the end of the culture, the explant-conditioned medium was collected and stored at -80°C until quantification of cytokine levels. Explants cell viability was checked at the onset and at the conclusion of the culture periods by measuring lactate dehydrogenase activity.

1.8.-Seminal plasma processing and infusion

For the preparation of SP infusions, semen samples were obtained from different sexually mature boars with proven fertility using the gloved hand technique. The complete ejaculates were obtained, discarding the gel fraction, and mixing all of them, forming heterologous samples, which were transported to the laboratory and centrifuged at 1500 x g at 17°C for 10 min. The resultant pellets were discarded, keeping only the supernatant. This process was repeated twice until it was microscopically verified that the last supernatant was devoid of spermatozoa. After this process, the samples were aliquoted in 40 mL volumes and stored at -20°C until the experiments were performed. Prior to infusion, each SP sample was thawed, warmed to 37°C for 20 min and deposited, using a postcervical catheter, at the uterine body. This procedure was repeated before insemination of each sow.

2.-Analytical procedures

2.1.-Assessment of sperm quality

The motility of the semen samples was objectively analyzed using an Integrated Semen Analysis System (ISAS[®]; Proiser R + D, Paterna, Spain) as previously described by Cremades et al. [67]. Samples were re-extended to a concentration of 15-20 x 10⁶ spermatozoa/mL and equilibrated for 5 min at 38°C. A volume of 5 µL per sample was transferred to a Makler counting chamber (Sefi Medical Instruments, Haifa, Israel) and visualized under a phase contrast microscope. Between six and nine fields per sample with at least 400 spermatozoa and free-artifacts were recorded. The software identified the velocities of each spermatozoa, calculating the motility of each sample as the percentage of motile spermatozoa (velocity ≥20 µm/s) with respect to the total number of spermatozoa counted.

To evaluate the integrity of the plasma and acrosomal sperm membranes, a flow cytometry analysis was performed using the triple staining technique [68]. For staining, the samples were extended to a concentration of 1.5-2.0 x 10⁶ spermatozoa, incubating 100 µL for 10 min at 38°C in the dark with 2 mL Hoechst 33342 (H-42; 0.05 mg/mL), 2 mL propidium iodide (PI, 0.5 mg/mL), and 2 mL fluorescein-conjugated peanut agglutinin (PNA-FITC, 100 mg/mL). After incubation, 400 µL of PBS were added and then, they were

analyzed in a BD FACS Canto II flow cytometer (Becton Dickinson & Company, Franklin Lakes, NJ, USA). The percentage of viable (both membranes intact) and viable-reacted spermatozoa (plasma membrane intact but acrosomal membrane damaged) were calculated as the number of H-42⁺/PI/PNA-FITC and the number of H-42⁺/PI/PNA-FITC⁺ sperm respect to the total number, respectively.

2.2.- Assessment of oocyte maturation and in vitro fertilization

In different experiments, both the maturation capacity of *in vitro* matured oocytes and the fertilization efficiency in the *in vitro* produced zygotes were evaluated. Matured oocytes were fixed with a PBS 0.5% glutaraldehyde or an acetic acid:ethanol (1:3) solution at the end of the maturation period (44 h), staining with H-42 or a 1% lacmoid in 45% (v:v) acetic acid solution for the identification of cytoplasmic and perivitelline structures. Oocytes were considered mature when their chromosomes were condensed, organized in the metaphase plate and the extrusion of the first polar body was visible, defining this stage as metaphase II. Thus, the maturation rate was calculated as the number of oocytes in metaphase II with respect to the total number of oocytes evaluated.

For the evaluation of the IVF parameters, presumed zygotes were fixed 18 hours after fertilization and classified as penetrated when pronuclei were identifiable in their cytoplasm and the two polar bodies were extruded, and additionally as monospermic if there were only two pronuclei). The penetration rate was defined as the number of presumed zygotes penetrated in relation to the total number of inseminated; the monospermic rate was calculated as the total number of monospermic ones in relation to those penetrated; and the fertilization efficiency was the percentage of monospermic presumed zygotes in relation to the total number of oocytes inseminated.

2.3.-Determination of the embryo cell number

For the evaluation of the total cell number (TCN) of the embryos, these were fixed in a PBS solution with 4% paraformaldehyde for 30 min at room temperature. Then, blastocysts were preserved in PBS 0.3 mg/mL BSA at 4°C until processing was resumed. The fixed embryos were mounted in Vectashield (Vector, Burlingame, CA, USA) drops containing 10 mg/mL of H-42 and visualized under a fluorescence microscope with an excitation filter ranging from 330 to 380 nm. Those structures compatible with cell nuclei that emitted blue fluorescence were counted and expressed as the number of cells per embryo.

2.4.-Differential staining of blastocysts

This technique made it possible to evaluate the number of cells belonging to the first two cell lineages in the blastocysts, the TE and the ICM. This protocol is based on the one previously published by Wydooghe et al. [69]. The blastocysts were fixed as described in the previous section, incubated in an overnight permeabilization solution, and subjected to a blastomere denaturation process, by incubating them first in an acidic and then in an alkaline solution. Prior to incubation with the primary antibody, blastocysts were blocked in a PBS solution containing 1 mg/mL BSA, 10% normal donkey serum and 0.05% Tween 20 for 5 h and after this period, incubated with the anti-CDX2 antibody (Biogenex, San Ramon, USA) at a concentration of 1:200 for 1.5 days. Finally, they were incubated with the fluorescent

antibody (anti-mouse IgG-Alexa Fluor 568; 1:1000; Invitrogen, Rockford, USA) for 1 h and were mounted following the same process described for the TCN count. Blastocysts were observed under a fluorescence microscope with the 536 nm and 330-380 nm excitation filters. Both lineages emitted blue fluorescence (from H-42), whereas only the cells labeled with the secondary antibody (CDX2⁺, TE cells) emitted red fluorescence. Thus, when the images were merged, purple nuclei were counted as TE cells, while blue nuclei were counted as ICM cells. The ICM/TE ratio was calculated as the number of cells belonging to the ICM out of the TE cells.

2.5.-Reactive oxygen species and glutathione levels determination

The fluorochromes 2',7'-dichlorodihydrofluorescein diacetate (H2DCFDA; Invitrogen, Thermo Fisher Scientific, Massachusetts, USA) and CellTracker Blue (4-chloromethyl-6.8-difluoro-7-hydroxycoumarin; Invitrogen) were used for the determination of embryo reactive oxygen species (ROS) and glutathione (GSH) levels, respectively, as previously described in Nohalez et al. [70]. Briefly, embryos were incubated in TL-HEPES-PVA supplemented with 10 μ M H2DCFDA and 10 μ M CellTracker Blue at 38°C for 30 min, in the dark. The embryos were then washed, placed in TL-HEPES-PVA droplets and immediately observed under a fluorescence microscope. Images of the embryos exposed to 460 and 370 nm excitation filters for ROS and GSH, respectively, were recorded with a digital camera and analyzed using ImageJ software (Version 1.51 h; National Institutes of Health, Bethesda, MD, USA). Embryo ROS and GSH levels were calculated using the corrected total cell fluorescence method [71].

2.6.-RNA extraction and qPCR assays

RNA extraction was carried out with TRIzol reagent (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) in case of endometrial tissues and with the RNeasy Plus Micro Kit (Qiagen, Hilden, Germany) for the embryo pools, following the manufacturer's instructions in both cases. The quality and quantity of the extractions were analyzed using an Agilent 2100 bioanalyzer (Agilent Technologies, Palo Alto, CA, USA) and a NanoDrop system (Thermo Scientific NanoDrop2000), respectively.

These q-PCR assays were performed both for gene expression analysis and for validation of the results obtained by microarray. The retrotranscription of the RNA samples was performed prior to PCRs with the High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Applied Biosystem, CA, USA) for the endometrial samples and the Maxima H Minus First Strand cDNA Synthesis Kit (Thermo Fisher Scientific Waltham, Massachusetts, USA) in the case of the embryonic RNA, following in both cases the thermocycling protocols indicated by the manufacturer.

The primers for the different genes analyzed during the experiments were designed using the Primer3Plus software [72] and the National Center for Biotechnology Information database [73]. The efficiency of each primer pair was determined prior to gene expression analyses. The PCR reactions used SYBR Green technology, adapting the amounts of cDNA and primers according to the design of the experiment. The thermocycling protocol generally used consisted of an uracil N-glycosylase activation (50°C, 2 min) and an initial denaturation (95°C, 2 min). This was followed by 40 cycles of denaturation (95°C, 5 sec) and a combined annealing and extension phase (60°C, 30 sec), concluding with an analysis of melting

temperatures to validate the specificity of the primers. The $\Delta\Delta C_t$ method with the efficiency correction designed by Pfaffl [74] was used to calculate the gene expression. The genes GAPDH, PPIA and RPL19 were employed throughout the experiments as housekeeper genes to normalize expression values.

2.7.-Microarray analysis

For the processing of RNA samples for microarrays, the GeneChip 3' IVT Pico Reagent and GeneChip IVT Labeling kits (Affymetrix) were used following the manufacturer's instructions, obtaining fragmented and biotin-labeled cDNA as the final product, which was hybridized to the GeneChip Porcine Genome Array from Affymetrix (Santa Clara, CA, USA) with the GeneChip Hybridization, Wash and Stain kit (Affymetrix). Data were obtained after scanning the hybridized array chips with the Affymetrix GeneChip scanner GCS3000 and processed with the Affymetrix Expression Command Console.

The results obtained were analyzed with the Partek Genomics Suite & Partek Pathways software (Partek Incorporated, St. Louis, MO, USA). First, the data were normalized with the robust multichip average method [75] and then, the lists of differentially expressed genes (DEG) between experimental groups were obtained by one-way ANOVA tests, classified as upregulated or downregulated according to the positive or negative value of the fold change (FC). These lists were subjected to further analysis to obtain the gene ontology (GO) terms as well as the enriched pathways based on the Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes database (KEGG) [76].

2.8.-Protein extraction and Western Blotting

The procedures described in this section are based on the report published by Alvarez-Rodriguez et al. [77]. For total protein isolation, a process of chemical lysis with a commercial buffer (RIPA; ThermoFisher, Rockford, IL, USA) and mechanical lysis by sonication of the samples followed by constant rotation at 4°C for 1 h was used. Supernatants were collected and quantified after centrifugation.

A total of 25 μg of protein per sample were loaded into commercial gels (4–20% SDS-PAGE Mini-PROTEAN TGX Precast Protein Gels; BioRad, Richmond, CA, USA) for electrophoresis. Once finished, the proteins were transferred from the gels to a polyvinylidene difluoride membrane (BioRad) and incubated for 1 h in a commercial blocking solution (Odyssey; LI-COR Biosciences, Lincoln, NE, USA). The primary antibodies used in the experiment were incubated overnight with the membranes and then, incubated for 1 h with the anti- β -actin antibody which was used as endogenous control. The specificity of the different antibodies was verified with the use of blocking peptides. Finally, the membranes were incubated with the secondary antibodies (goat anti-mouse IRDye 800 CW; 925-32210; LI-COR Biosciences) for 1 h and then scanned with the Odyssey CLx (LI-COR Biosciences). Data obtained were analyzed using the image studio 4.0 software (LI-COR Biosciences) for protein quantification.

2.9.-Cytokine Analysis

The MILLIPLEX MAP Porcine Cytokine and Chemokine Magnetic Bead Panel-Immunology Multiplex Assay (PCYTMG-23K-13PX; Merck Millipore, Burlington, MA, USA) and the MILLIPLEX MAP TGF β Magnetic Bead 3 Plex Kit-Immunology Multiplex

Assay (TGFBMAG-64K-03; Merck Millipore, Burlington, MA, USA), both based on Luminex® xMAP® technology, were used to detect the levels of a total of 16 cytokines; with the former kit being able to detect a total of 13 and the latter, the three transforming growth factor (TGF)- β variants.

The process started with a previous sonication of the explant-conditioned media, followed by incubating them with the bead solution in the dark at 4°C for 18 h under constant shaking. Once washed, they were incubated with the specific antibodies for the time indicated by the kit, and finally streptavidin-phycoerythrin was added for a new 30min incubation. Fluorescence was measured on a MAGPIX R (Luminexcorp, Austin, TX, USA), acquiring the data with the xPONENT software version 4.2 (Luminexcorp, Austin, TX, USA). The final cytokine concentration (pg/mL) was calculated based on the fluorescence emitted by a standard curve.

2.10.-Histological evaluation of the endometrium

Endometrial tissue samples preserved in 70% alcohol were embedded in paraffin and sliced into 4 μ m sections. These sections were placed on coverslips, deparaffinized and rehydrated, and finally stained with the routine hematoxylin-eosin procedure [78]. Using a light microscope (x400), different parameter such as levels of congestion, edema, hemorrhage, or immune cell infiltrates were evaluated in the different layers and structures at the endometrial level.

3.-Statistical analysis

In the different experiments, the residuals of the data were obtained and subjected to normality tests. The Kolmogorov-Smirnov test was used with data sets greater than 50, while for smaller data sets the Shapiro-Wilk test was the chosen. When these tests determined a parametric distribution of the samples, comparisons were performed with a mixed-model ANOVA with the Bonferroni post-hoc test in the case of comparisons of more than two groups, while Student's t test with Levene's correction was used for comparisons between two groups. Results were expressed as mean \pm standard error of the mean or \pm standard deviation. On the other hand, in the case of nonparametric distributions, the tests chosen were the Kruskal-Wallis for three or more groups comparisons, and the Mann-Whitney test for pairwise comparisons. Non-parametric variables were expressed as median and interquartile ranges, representing them with boxplot-type graphs. When correlations were analyzed, Pearson's test was chosen for variables with parametric distribution, while for nonparametric variables, Spearman's test was used. Percentage data were compared using Fisher's exact test. All statistical analyses were performed using the IBM SPSS 24.0 Statistics package software (SPSS, Chicago, IL, USA). The significance threshold value was set at 0.05, considering significant differences when the p-value was lower.

EXPERIMENTAL DESIGNS AND RESULTS

This part describes the experimental designs and results of the articles included in this thesis and is organized according to the following sections:

SECTION I

1st Objective: *To improve in vitro zygote production systems, reducing the impact of polyspermic penetration during fertilization by modifying sperm-freezing protocols* (Article 1).

This experiment was designed to evaluate the effect of high sperm dilution before freezing on porcine IVF and IVC parameters. For this purpose, spermatozoa from four different boars were cryopreserved at two different concentrations: 1000×10^6 sperm/mL (the standard concentration used in our laboratory; control group) and 20×10^6 sperm/mL (high sperm dilution; F20 group). In each of the three replicates of this experiment, a total of four and two straws from the F20 and control groups, respectively, were thawed, and their contents were pooled, with a portion of the pooled sample used for the assessment of sperm quality parameters and the remainder, diluted in IVF medium and used to fertilize a total of 2,949 oocytes. Once inseminated, 1,141 presumptive zygotes were fixed and stained 18 h after fertilization to assess the IVF parameters, while the remaining zygotes (N=1,808) were cultured for 7 days to evaluate embryonic development parameters.

The sperm quality parameters evaluated were not affected by the boar; similarly, the percentage of motile spermatozoa remained unaltered by sperm dilution. However, a higher ($p < 0.05$) viability and a reduced ($p < 0.01$) percentage of reacted spermatozoa were obtained in the F20 group compared to the control group. In relation to IVF and IVC parameters, the interaction between the boar and the dilution factor was not significant; therefore, independent analyses were performed. The IVF parameters were significantly affected by the boar, clearly observing that boars A and B had higher penetration rates ($p < 0.004$) than boars C or D. The boars with lower penetration rates showed increased monospermy ($p < 0.001$) and IVF efficiency ($p < 0.05$). Despite these results, the embryo production parameters did not differ by boar, with IVP efficiency ranging between 29.1% and 34.8%. The effect of sperm dilution did not alter the penetration results (which was 82.7% for the highly diluted group and 87.1% for the control group); however, both monospermic rates and IVF efficiency were significantly increased ($p < 0.001$) in the highly diluted group (65.8% and 52.3%, respectively) compared to the control group (16.6% and 13.6%, respectively). These results were reflected in the embryo production parameters, in which both cleavage rate and total IVP efficiency were higher ($p < 0.05$) in the F20 group than in the control group (51.6% vs. 43.2% and 34.8% vs. 27.5%, respectively). However, the blastocyst formation rate and the total number of cells were similar between groups (36.8 ± 1.1 cells for the F20 embryos and 38.1 ± 1.8 cells for the control).

In conclusion, high sperm dilution before freezing increases monospermic rates without affecting penetration rates, increasing IVP efficiency.

2nd Objective: *To increase in vitro blastocyst production and quality by reducing the impact of oxidative stress through supplementation with the antioxidant coenzyme Q10 or N-(2-mercaptopropionyl)-glycine (Articles 2 and 3).*

The effects of coenzyme Q10 on porcine IVP were tested in **Article 2** by supplementing IVM (Experiment 1) or IVC medium (Experiment 2) with this potent antioxidant. Prior to both experiments, the effects of the vehicle used as the diluent for coenzyme Q10 were tested by adding 0.002% chloroform to the IVM and IVC media. Maturation, fertilization, and embryo development rates obtained with the medium containing chloroform were compared to those obtained with medium without chloroform (N=1287 oocytes; four replicates). Neither oocyte maturation capacity nor zygote development parameters were affected by the addition of the vehicle to the maturation or culture medium. In Experiment 1, a total of four concentrations of coenzyme Q10 (10, 25, 50 and 100 μ M) were used to supplement the IVM medium using unsupplemented medium as a control (four replicates). The maturation rate was assessed for a total of 573 oocytes, while the remaining oocytes were inseminated. Of the inseminated oocytes, 475 oocytes were fixed to calculate fertilization parameters, and 825 oocytes were cultured to evaluate embryo development. In Experiment 2, the same concentrations of coenzyme Q10 were added to the IVC medium. A total of 1,284 inseminated oocytes were used in 4 replicates to evaluate embryonic development.

The results of Experiment 1 indicated that coenzyme Q10 supplementation of the IVM medium did not affect the percentages of mature oocytes (range: $66.0 \pm 10.6\%$ to $76.4 \pm 12.2\%$). The supplementation concentrations did not affect the fertilization parameters, with an overall IVF efficiency ranging from $24.5 \pm 7.8\%$ to $32.2 \pm 7.9\%$. Coenzyme Q10 supplementation during maturation was also ineffective in improving the embryo culture parameters, with the 100 μ M concentration showing a detrimental effect on blastocyst production ($p < 0.05$) compared to the other groups. Regarding Experiment 2, supplementation with coenzyme Q10 during IVC did not increase any of the embryo production parameters evaluated; however, the toxic effect described for maturation at 100 μ M was not found.

From the results of this study, we can conclude that supplementation of IVM or IVC medium with the tested concentrations of coenzyme Q10 failed to improve the *in vitro* production of porcine embryos.

The 2nd objective was also addressed in **Article 3**, where the effects of NMPPG on IVC parameters were tested using the defined culture medium developed in Articles 4 and 5 (NCSU-23 with 0.3 mg/mL PVA and 100 ng/mL PF4). In Experiment 1, the aim was to determine the optimal concentration of NMPPG. Thus, different concentrations [0 (control), 1, 10, 25, 50, and 100 μ M] of NMPPG added to the IVC medium were evaluated using a total of 1,998 *in vitro* fertilized oocytes in three replicates. Once the appropriate concentration was chosen, in Experiment 2, the TCN, ICM/TE ratio, levels of ROS and GSH and expression levels of genes related to oxidative stress and apoptosis were analyzed. A total of 4,310 fertilized oocytes in nine replicates were used.

The results of Experiment 1 revealed that the concentrations of 50 μ M and 100 μ M drastically decreased ($p < 0.05$) the embryo cleavage rates with respect to the control, being unable to sustain blastocyst production. The group treated with a NMPPG concentration of 25 μ M showed a similar cleavage rate as the control, but the number of blastocysts was

reduced ($p < 0.01$) compared to that of the control. The lowest concentration of NMPG (1 μM) showed no improvement in any of the parameters assessed compared to the control. However, when the concentration of NMPG was increased to 10 μM , a beneficial effect on embryo production was observed in comparison with the control group; this concentration led to significantly increased blastocyst formation rates and overall IVP efficiency ($p < 0.05$) without affecting the cleavage or hatching rates. Based on these results, a 10 μM concentration was chosen to continue the embryo quality analysis in Experiment 2. In this experiment, among the parameters analyzed, the number of cells were not affected by the addition of 10 μM NMPG, with a similar TCN (46.6 ± 19.2 and 46.6 ± 20.6 , respectively) and ICM/TE ratio (0.17 ± 0.05 and 0.18 ± 0.07 , respectively) compared to the control. In contrast, significant differences were found in ROS contents, which were lower ($p < 0.05$) in the embryos cultured in medium supplemented with NMPG compared to the control (0.89 ± 0.19 and 0.98 ± 0.15 relative fluorescence, respectively), with a similar trend ($p = 0.07$) for GSH levels (0.86 ± 0.26 and 0.96 ± 0.23 relative fluorescence, respectively). Among the genes related to oxidative stress, GPX1 was the only gene with reduced expression in the NMPG group ($p < 0.01$). GPX4 showed a similar expression pattern, with a downward trend for this group ($p = 0.09$). No apoptosis-related genes were significantly differentially expressed, and only BAX tended to be expressed at lower levels ($p = 0.06$) in the embryos cultured in medium supplemented with NMPG.

In conclusion, these results supported the presumption that supplementation of the embryo culture medium with 10 μM NMPG can increase blastocyst production due to an attenuation of oxidative stress, as reflected by reduced ROS levels and lower GPX1 gene expression.

3rd Objective: *To develop a chemically defined culture medium using cytokine platelet factor 4 as a bovine albumin serum substitute and to assess its impact on the embryonic transcriptome.* (Articles 4 and 5)

In **Article 4** the effect of PF4 as a supplement to porcine IVC medium was evaluated. The possibility of using this supplement as a replacement for BSA in the development of a chemically defined culture medium was also considered. In Experiment 1, the effects of this cytokine were investigated in conventional culture medium consisting of NCSU-23 supplemented with 0.4 mg/mL BSA (NCSU-BSA). For this purpose, *in vitro* produced zygotes were cultured in NCSU-BSA with increasing concentrations of PF4 (100, 200, 500 and 1000 ng/mL). *In vitro* produced zygotes cultured in unsupplemented medium constituted the control group. A total of 3,054 presumptive zygotes were cultured for 7 days in four replicates. The embryonic development parameters and TCN (N=1,015 blastocysts) were assessed. In Experiment 2, embryo development was analyzed in the chemically defined medium produced by removing BSA from the culture medium and replacing it with 0.3 mg/mL PVA and supplemented with the same concentrations of PF4 used in Experiment 1. In addition to a control group of embryos cultured in undefined medium (Control-BSA), a second control was added based on the chemically defined medium in the absence of PF4 (Control-PVA). This experiment was repeated six times with a total of 3,329 presumptive zygotes cultured *in vitro*.

The results of Experiment 1 showed that none of the PF4 concentrations tested had a significant impact on either the embryo production parameters evaluated or the TCN. In

Experiment 2, no differences were observed in the rate of cleavage among groups; however, blastocyst production decreased dramatically ($p < 0.01$) in the Control-PVA group compared to that in the other groups. In the chemically defined groups supplemented with 100, 200 or 500 ng/mL PF4, the blastocyst rates on day 5 (range: 29.9 ± 7.8 to 31.8 ± 5.5) were increased ($p < 0.05$) with respect to the Control-BSA group ($17.2 \pm 8.2\%$), whereas on day 7, blastocyst formation rates and total efficiencies were similar for all these groups (ranging from $42.0 \pm 11.5\%$ to $49.3 \pm 10.0\%$ and from $28.0 \pm 8.2\%$ to $32.3 \pm 7.1\%$, respectively). The medium with 1000 ng/mL PF4 exhibited a reduction ($p < 0.05$) in blastocyst production on day 7 compared to the other PF4 groups and the Control-BSA group. The hatching rate was similar among all groups, except for the Control-PVA group, in which none of the blastocysts hatched. The TCN was similar between blastocysts produced in the defined medium with concentrations of 100, 200 and 500 ng/mL PF4 and those produced in the Control-BSA medium (range: 42.6 ± 19.3 to 45.7 ± 23.9). The group supplemented with 1000 ng/mL PF4 showed a reduced ($p < 0.05$) number of cells (30.7 ± 17.8) compared to the other groups. There were not significant differences in the number of TE and ICM cells among the analyzed groups.

These results showed that the supplementation of BSA in the embryo culture medium containing PF4 did not improve the production of porcine embryos. However, when BSA was removed from the medium, supplementation with 100, 200 or 500 ng/mL PF4 was able to sustain blastocyst production, thus providing an efficient chemically defined medium for porcine embryo culture.

Article 5 analyzed the impact of the defined medium NCSU23 with PF4 on the blastocyst transcriptome. For this experiment, 907 oocytes were matured and fertilized *in vitro* (three replicates) and assigned to two IVC systems: NCSU23 PVA-100 ng/mL PF4 (PF4 group; N= 406 oocytes) and NCSU23 0.03 mg/mL BSA (BSA group; N=438 oocytes). Blastocysts classified as expanded were selected on day 6 of culture for the microarray experiment (50 per group). *In vivo* derived blastocysts (IVV group; N=70) at the same stage of development were also included in the study as embryos of highest quality. IVV blastocysts were surgically collected from ten donor sows. The blastocysts were grouped into pools of ten embryos, performing one array for each pool.

The principal component analysis showed that the samples were distributed into two well-differentiated populations according to their *in vivo* or *in vitro* origin. This distribution was confirmed by hierarchical clustering, clearly grouping the PF4 and BSA groups. DEGs were identified by cross-analysis of the three experimental groups. The comparison of the PF4 group versus BSA group did not identify any DEG among the 24,123 transcripts analyzed under the established criteria ($|FC| > 1.5$ and adjusted p value < 0.05). In contrast, many DEGs were found when the *in vitro* produced and *in vivo* derived embryos were compared. The comparisons of the PF4 and IVV groups and BSA and IVV detected 2,780 DEGs (1219 downregulated genes and 1561 upregulated genes) and 2,577 DEGs (1,108 downregulated genes and 1,469 upregulated genes), respectively. From each set of DEGs, two lists were created and compared, and the results showed that 2,132 DEGs appeared in both lists, suggesting that most of the altered transcripts were common to blastocysts cultured in both types of IVC media. The GO terms obtained with both DEGs lists were classified into the main categories of biological processes, molecular functions and cellular components. In the biological processes category, the most affected functions were

reproduction, detoxification, growth, and cell killing. In the molecular functions category, the most affected terms were antioxidant and cargo adaptor activity, while in the cellular component category, the most altered GO term was intracellular. The PF4 and BSA DEGs lists were split according to upregulated and downregulated transcripts to perform a pathway enrichment analysis (considering only those with a p value < 0.05 as significantly altered). There were 13 and 15 upregulated KEGG pathways on the PF4 and BSA lists, respectively. Of these pathways, 10 were common to both lists. Regarding the downregulated KEGG pathways, 14 pathways were identified in the PF4 list and 13 pathways in the BSA list, 10 of which were common to both lists. The pathways with the highest enrichment values common to both lists were the lysosome pathway for the upregulated DEGs and the cell cycle pathway for the downregulated DEGs. In addition, some altered pathways showed higher enrichment scores and percentages of DEGs in the BSA list than in the PF4 list, such as the protein export and steroid biosynthesis pathways. In contrast, inositol phosphate metabolism was more affected in the PF4 group than in the BSA group. The results of the q-PCR analysis confirmed the validity of the results obtained by microarray.

In conclusion, the results of this experiment showed that there were not differences in the transcriptome between *in vitro* produced blastocysts in PF4-supplemented and BSA-supplemented media, which indicates that the traditional undefined culture medium with BSA can be replaced by the defined medium NCSU23-PVA-PF4.

SECTION II

4th Objective: *To investigate the immune status of recipient sows by analyzing cytokine levels at the endometrial level at 6, 18 and 24 days of pregnancy.* (Articles 6 and 7)

In the study described in **Article 6**, the aim was to compare the endometrial production of 16 cytokines between embryo-bearing sows (inseminated) and candidate recipient sows (not inseminated) on day 6 of the cycle. The cytokines analyzed were classified as anti-inflammatory (IL-1ra, IL-4, IL-6, IL-10, TGF β 1, TGF β 2 and TGF β 3) or proinflammatory (IL-1 α , IL-1 β , IL-2, IL-8, IL-12, IL-18, GM-CSF, IFN- γ and TNF α). For this purpose, a total of eight multiparous sows were divided into two experimental groups. The first group consisted of four inseminated weaned sows, whose presence of embryos on day 6 (day 0 = onset of estrus) was verified by surgical collection (group BB). The second group consisted of four sows that were not inseminated during estrus (U-IC group). All sows underwent hysterectomy on day 6, collecting endometrial tissue from three different regions (proximal, middle, distal) of each uterine horn. The tissues were cultured *in vitro* for 22 h, and cytokine analysis of the explant culture medium was performed.

Since no significant differences in cytokine levels were observed between the different uterine regions within each experimental group, the samples were analyzed together. When anti-inflammatory cytokine levels were compared between the two groups, IL-4 and TGF β 3 cytokines were found to be below detection limits in the U-IC group. All other anti-inflammatory cytokines were detectable in both groups, with significantly lower (p < 0.001) levels in the U-IC group than in the BB group. The proinflammatory cytokines IL-12 and TNF α were undetectable in the U-IC group. As in the case of anti-inflammatory cytokines, the other proinflammatory cytokines were expressed at higher levels (p < 0.05) in the BB group, except for GM-CSF, for which no significant difference was found. Once the

levels of all cytokines were quantified and compared, the ratio of anti-inflammatory to proinflammatory cytokines was calculated to determine whether the immune response shifts towards an anti- or proinflammatory profile. Of the total number of ratios analyzed, 25 showed significant differences, with 15 of them shifting towards an anti-inflammatory profile in the case of the BB group (60%), compared to 12 shifting towards an anti-inflammatory profile in the U-IC group (48%). Of the 12 ratios that indicated a bias towards an anti-inflammatory profile in both groups, 10 ratios were higher in the BB group than in the U-IC group.

The results obtained indicated that on day 6 of the cycle, explants from BB sows produced a higher amount of cytokines than those from U-IC sows. In addition, the balance towards an anti-inflammatory response was greater in the former, suggesting that the presence of embryos and/or AI components was able to influence the uterine immune status and lead it towards an anti-inflammatory profile shift that favors maternal immune tolerance on day 6. These results also demonstrated that the environment in U-IC sows (the recipients in ET programs) is not the most suitable for embryo development. Thus, this study suggests ways to investigate whether the components of the semen/seminal plasma or certain active compounds secreted by the embryo can modify the uterine environment, promoting implantation in recipient sows and thus improve the outcomes of ET programs.

Article 7 presents a study on a particular cytokine, LIF, which plays a key role in reproductive processes. The experiment focused on the time of embryo implantation (day 18 and day 24 of pregnancy, day 0 = onset of estrus). The endometrial gene and protein expression of LIF and its receptor (LIF-R) in sows subjected to postcervical insemination (containing embryos with maternal genetic material; Hemi-AL group; N=8) and sows subjected to ET (containing embryos from parents genetically different from the recipient sows; AL group; N=8) were analyzed. Q-PCR and Western Blotting were performed to determine gene and protein expression, respectively. Three different portions of endometrial tissue (surface and glands) were collected and pooled from random areas of the uterine tract on day 18 and from implantation areas and between implantation areas on day 24.

LIF gene expression in the implantation areas was not significantly different between the two groups on day 18; however, on day 24, LIF gene and protein expression were higher ($p < 0.05$) in the Hemi-AL group. The LIF-R gene and protein expression were similar between both experimental groups regardless on the pregnancy day. A similar pattern was observed for the non-implantation sites, with downregulation of both LIF gene and protein expression in the AL group compared to the expression in the Hemi-AL group; however, LIF-R expression remained similar. When LIF expression was compared between day 18 and 24, the protein levels increased ($p < 0.05$) on day 24 with respect to day 18 in both groups, and the gene expression level increased only in the Hemi-AL group ($p < 0.05$). In contrast, LIF-R mRNA expression was lower ($p < 0.001$) on day 24 in both groups, although this was not reflected in the protein expression. When implantation and non-implantation areas were compared, significant differences were observed only in LIF-R gene expression, which was higher in the AL group ($p < 0.05$) in non-implantation areas. Regarding correlation analysis, a significant inverse correlation was observed between LIF and LIF-R mRNA expression in the Hemi-AL group ($r = -0.791$; $p < 0.01$), but the difference was not significant in the AL group ($r = -0.535$; $p = 0.073$). In addition, no correlation was found between the number of fetuses per sow and LIF or LIF-R gene expression levels, which

indicates that the differences reported in this study are not influenced by the number of fetuses per sow but rather the allogeneic character of the embryos.

In conclusion, the low levels of LIF observed in the allogeneic pregnancies may lead to an unfavorable immune environment for implantation, which may contribute to the high peri-implantation mortality rates described in this type of pregnancies.

5th Objective: *To assess the impact of seminal plasma infusion before insemination on the endometrium and embryo quality and development.* (Articles 8 and 9)

The effects of SP infusions during estrus on the endometrium were analyzed in **Article 8**. In addition, their impact on the number and stage of embryos collected on day 6 after the onset of estrus was also evaluated. A total of 34 weaned superovulated sows were used for the experiment. First, 16 sows received an infusion of 40 mL of SP 30 min before each insemination (SP group). The remaining 18 sows, comprising the control group, received an infusion with BTS instead of SP. Embryos were surgically collected 6 days after the onset of estrus, and endometrial tissue samples were obtained from three embryo-bearing sows from each experimental group. These samples were obtained from the proximal and distal regions of the uterine horns and properly processed for histological (Four slides per region and sow) and transcriptome analysis (One array per region per sow).

Histological evaluation of the samples revealed a variety of inflammatory changes at the endometrial level that were more accentuated in the SP group, including congestion, leukocyte margination, edema, hemorrhages and infiltration of immune cells in the mucosal connective tissue and uterine glands. The transcriptome analysis showed a total of 1,052 DEGs ($|FC| > 1$ and p value < 0.05) in the distal uterine horn region (514 upregulated genes and 537 downregulated genes) between both experimental groups. In the proximal region, the number of DEGs was reduced to 552 (245 upregulated genes and 307 downregulated genes). An analysis of the GO terms revealed a predominant alteration in the biological process category, highlighting the subcategories of biological regulation, cellular processes, and immune system-related genes. Regarding the pathway enrichment analysis, the most significant included cytokine-cytokine receptor interaction, MAPK-ERK signaling, TGF-beta signaling, focal adhesion, cell cycle, and cell adhesion molecules. Several of the genes included in the different GO terms and pathways altered play different roles related to embryonic development, implantation or gestational progress (84 DEGs in the proximal region and 42 DEGs in the distal region). These genes were involved in functions related to embryonic skeletal system development, reproductive system development, interleukin-2 production, regulation of T cell activation, and steroid metabolic processes. The microarray results were validated by q-PCR, which was used to analyze the expression of 15 DEGs. The FCs obtained showed a strong correlation with those obtained by microarray ($R = 0.77$; $P < 0.001$), thus confirming the validity of the results obtained. With respect to the embryos collected from each experimental group, no significant differences were found in terms of quantity; however, SP infusions advanced embryonic development, with a lower ($p < 0.05$) percentage of morulae with respect to the control, while the percentage of full and perihatched blastocysts was increased ($p < 0.05$). There were no differences in the TCN per embryo within each embryonic stage between the experimental groups.

Considering these findings, we can conclude that the SP infusions were able to modify the endometrial transcriptome during the first days of pregnancy. The alteration of

genes related to embryonic development and maternal immunity, as well as the advanced embryonic development observed, confirmed a positive impact of this type of infusion, although further research is needed to evaluate the potential for using this technique in both AI and ET procedures.

The effects of SP infusions were further investigated in **Article 9**, which presented an analysis of the transcriptome of preimplantation embryos following SP infusions during estrus. A total of 12 sows were infused with SP (N=6; SP group) or BTS (N=6; control group), prior to insemination. Laparotomies were performed on day 6 after the onset of estrus to obtain the embryos. They were classified according to their developmental stage, and 30 embryos classified as expanded blastocysts were selected per group. The embryos were grouped in pools of 10, with one array performed with each pool (Three for the SP group and three for the control group).

Statistical analyses revealed a total of 210 DEGs ($|FC| > 2$ and p value < 0.05), of which 93 genes were upregulated and 117 genes were downregulated in the SP group with respect to the control. A principal component analysis separated the samples according to the experimental group to which they belonged, a pattern that was confirmed in the hierarchical cluster analysis, clearly differentiating the SP and control samples. After GO term analysis, it was found that many of the DEGs were associated with different biological, cellular, metabolic and developmental processes within the main biological processes category. In the cellular component category, most of the altered transcripts were classified in cell anatomical entity and cell protein-containing complex functions, while in the molecular function category, binding, catalytic activity and molecular function regulator were the functions enriched with the highest number of DEGs. In the pathway enrichment analysis, 15 pathways significantly altered by SP infusion were identified. The altered pathways that included upregulated DEGs were mostly involved in signal transduction and cellular and endocrine processes, including numerous genes with important functions in reproductive events, such as ApoA-I, CDK1, MAPK1, SMAD2, PRKAA1 and RICTOR. In contrast, the pathways enriched with downregulated DEGs were mineral absorption and p53 signaling pathways, with genes such as MT-2B, CDK2 and SERPINE1, with no apparent role in reproductive functions. Through q-PCR, the expression of five DEGs was verified, showing FC patterns similar to those obtained by microarray, thus validating the results obtained.

In conclusion, these results demonstrated that SP infusions during estrus influenced the transcriptional profile of porcine blastocysts on day 6. These modifications included pathways and genes associated with different key reproductive processes, such as embryonic development, implantation, and immune phenomena, suggesting improved embryo quality. For all these reasons, the use of SP in the swine industry appears to be a promising tool with potential applications for both AI and ET.

GENERAL CONCLUSIONS

GENERAL CONCLUSIONS

1.- High sperm dilution before freezing increases monospermy without affecting penetration rates, thereby increasing porcine IVP efficiency.

2.- Exogenous supplementation of Coenzyme Q10 of IVM or IVC media did not improve *in vitro* embryo production outcomes; consequently, its use as an exogenous antioxidant should not be encouraged.

3.- Supplementation of the embryo culture medium with the antioxidant N-(2-mercaptopropionyl)-glycine can mitigate the oxidative stress suffered by the embryos, increasing blastocyst production.

4.- The chemically defined medium NCSU23-PVA-PF4 can effectively replace traditional undefined culture medium supplemented with BSA with similar blastocyst production and blastocysts transcriptome profile.

5.- Cytokine levels expressed in the endometrium of embryo-bearing sows show a uterine immune environment biased towards an anti-inflammatory profile compared to recipient sows 6 days after the onset of estrus. This opens the door to treatments that can promote the acquisition of this profile in recipient sows, thus improving ET outcomes.

6.- Low endometrial levels of LIF and dysregulation with its receptor during the implantation period in allogeneic pregnancies can lead to an unfavorable environment for embryo survival, which could be partly responsible for the high embryo mortality associated with these procedures.

7.- SP infusions modify the transcriptome at the endometrial and embryonic levels and promote the development and quality of the latter by expressing genes related to embryonic development, implantation, and/or maternal immunity, among others; making SP infusions a promising tool for use in the swine industry in both AI and ET programs.

ABBREVIATIONS

ABBREVIATIONS

AI: Artificial insemination
BSA: Bovine serum albumin
BTS: Beltsville thawing solution
COC: Cumulus oocyte complex
DEG: Differentially expressed gene
eCG: Equine chorionic gonadotropin
ET: Embryo transfer
FC: Fold change
GO: Gene ontology
GSH: Glutathione
H2DCFDA: 2',7'-dichlorodihydrofluorescein diacetate
H-42: Hoechst 33342
hCG: Human chorionic gonadotropin
ICM: Inner cell mass
ISAS: Integrated Semen Analysis System
IVC: *In vitro* culture
IVF: *In vitro* fertilization
IVM: *In vitro* maturation
IVP: *In vitro* embryo production
KEGG: Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes
LIF: Leukemia inhibitory factor
LIF-R: Leukemia inhibitory factor receptor
NCSU: North Carolina State University
NMPG: N-(2-mercaptopropionyl)-glycine
PBS: Phosphate buffered solution
PF4: Platelet factor 4
PI: Propidium iodide
PNA-FITC: Fluorescein-conjugated peanut agglutinin
PVA: Polyvinyl alcohol
ROS: Reactive oxygen species
SP: Seminal plasma
TCN: Total cell number
TE: Trophectoderm
TGF: Transforming growth factor
TL: Tyrode's lactate

**RESUMEN
GENERAL**

RESUMEN GENERAL

INTRODUCCIÓN

La producción *in vitro* de embriones (PIV) y la transferencia embrionaria (TE) se han convertido en elementos clave dentro de las biotecnologías reproductivas utilizadas con distintas especies. Ambas son herramientas básicas para la aplicación de otras biotecnologías, como la clonación y la transgénesis, con multitud de aplicaciones en campos de investigación y producción ganadera. La aplicación combinada de la PIV y la TE ha permitido grandes avances en la productividad de la industria ganadera bovina, donde se han utilizado ampliamente en los últimos años, acelerando el progreso genético y reduciendo los costes. En cambio, las particularidades del ganado porcino, que se detallan más adelante, han limitado la aplicación de estas herramientas para su uso comercial. Por lo tanto, es necesario mejorar estas biotecnologías en esta especie para promover su aplicación en la industria porcina.

Debido a las características idóneas de los cerdos como animales de experimentación para la investigación biomédica [1], entre las que destacan el parecido fisiológico y genético con los humanos [2]; el desarrollo de estas biotecnologías reproductivas se ha convertido en una prioridad. La transferencia nuclear de células somáticas para la clonación y el uso de técnicas más precisas para la modificación genética y la creación de animales transgénicos, como las nucleasas de dedos de zinc, las nucleasas efectoras de tipo activador de la transcripción y, más recientemente, las repeticiones palindrómicas cortas agrupadas y regularmente interespaciadas /Cas9 [3], requieren la producción *in vitro* de cigotos en número y calidad suficientes. Además, también son necesarios el posterior cultivo *in vitro* (CIV) y la TE, que es el último paso para obtener descendencia viable.

Se puede obtener un número prácticamente ilimitado de cigotos mediante la maduración *in vitro* (MIV) y la fecundación *in vitro* (FIV) a partir de ovocitos inmaduros recogidos de ovarios de cerdas jóvenes prepúberes sacrificadas. Sin embargo, la calidad de los cigotos producidos *in vitro* no es comparable a la de los obtenidos *in vivo*, debido a los sistemas de MIV subóptimos y al acuciante problema de la polispermia que se produce en esta especie durante la FIV. En cuanto a la MIV, un gran porcentaje de ovocitos obtenidos de cerdas jóvenes prepúberes completan la maduración nuclear (75-85%) mediante diferentes sistemas de producción [4–8]. En condiciones *in vivo*, la maduración nuclear de un ovocito va acompañada de una correcta maduración citoplasmática, dando lugar a ovocitos de alta calidad. Por el contrario, en los sistemas de MIV, el proceso de maduración citoplasmática se ve afectado, contribuyendo a la baja calidad de los ovocitos [9,10], lo que afecta a las tasas de producción de embriones. Numerosos estudios han demostrado que mientras que la maduración nuclear no se ve afectada por las mejoras en el medio de maduración, la formación de embriones aumenta debido a la mejora de la maduración citoplasmática [11–14]. Este hecho sugiere que todavía es posible aumentar la calidad de los ovocitos madurados *in vitro* antes de la fecundación.

La polispermia es el otro gran problema para la obtención de cigotos *in vitro* de alta calidad. En condiciones fisiológicas, la incidencia de este fenómeno en el cerdo es inferior al 5% [15,16]; sin embargo, en las condiciones actuales de FIV, el porcentaje de ovocitos

monospermicos es sólo del 30-40% (revisado en [17]). Uno de los problemas derivados de esta alteración es que los cigotos polispermicos son capaces de desarrollarse hasta el estadio de blastocisto [18]. Además, los blastocistos derivados de cigotos polispermicos son morfológicamente indistinguibles de los derivados de cigotos monospermicos, por lo que no es posible identificarlos sin un análisis citogenético [19]. Este hecho, conduce inevitablemente a una proporción de embriones polispermicos con anomalías cromosómicas, que reducen sustancialmente su posterior competencia de desarrollo [20] y la viabilidad de la descendencia tras la TE [21,22]. Por estas razones, muchos estudios sobre la FIV porcina se han orientado a reducir la incidencia de polispermia a través de diferentes métodos, incluyendo la aplicación de barreras físicas que dificultan la penetración [23–25], así como la suplementación del medio con diferentes compuestos (revisado en [26]). Otros estudios han desarrollado técnicas para discriminar los cigotos polispermicos [20], que permiten descartarlos antes del CIV.

Aunque la obtención de un gran número cigotos y de calidad es importante para muchas biotecnologías, el posterior CIV de embriones es indispensable para que éstos alcancen el estadio preimplantacional adecuado en las mejores condiciones para la TE. Los primeros estudios relacionados con la PIV y el CIV de embriones porcinos se remontan a los años 80, cuando varios estudios combinaron técnicas *in vitro* con ovocitos derivados *in vivo* y cultivos intraoviductales (revisado en [26]). Sin embargo, hubo que esperar hasta los años 90 para que se superara el bloqueo de los embriones de 4 células mediante el desarrollo de nuevos medios de cultivo [27] y a que obtuvieran las primeras camadas tras la transferencia de mórulas y blastocistos cultivados *in vitro* [28–30]. Desde estos primeros hitos históricos hasta la fecha, el número de estudios en este campo ha aumentado y se han producido importantes avances en esta técnica; sin embargo, los sistemas actuales de CIV porcina siguen presentando dos problemas esenciales.

En primer lugar, los sistemas de CIV porcina son incapaces de proporcionar un entorno óptimo para el desarrollo embrionario, ya que el porcentaje de blastocistos obtenidos rara vez supera el 40% en la mayoría de los laboratorios [5,6]. Las diferencias entre los embriones producidos *in vitro* y los obtenidos *in vivo* se observan también en la calidad de los mismos, reflejada en el número de células, que es mucho menor en los embriones producidos *in vitro*, y en cambios tanto en el transcriptoma como en el epigenoma [31]. Estas alteraciones no se encuentran exclusivamente en los cigotos producidos *in vitro*, sino que también se han reportado en cigotos derivados *in vivo* cultivados *in vitro*. De hecho, en estas condiciones, sólo el 70-80% de los cigotos alcanzan el estadio de blastocisto [32–34], y también muestran una calidad deteriorada en términos de número de células y perfil transcriptómico [35]. Independientemente del origen embrionario, las tasas de desarrollo y la calidad de los embriones después del CIV no alcanzan los niveles logrados durante el desarrollo fisiológico, lo que sugiere que las condiciones de cultivo son la causa principal de estos problemas. Numerosas investigaciones se han centrado en la solución de estos problemas a través de diferentes enfoques, como la modificación de las fuentes de energía en los medios, el equilibrio de aminoácidos, la adición de factores de crecimiento específicos o los ajustes de la concentración de oxígeno durante los períodos de incubación, entre otros (revisado en [36]). En relación con esto último, cabe destacar el papel que juega el ambiente oxidativo en el desarrollo embrionario. Muchos estudios han señalado que diferentes mecanismos contribuyen al control del estado oxidativo del embrión durante su desarrollo en un ambiente

fisiológico; sin embargo, las condiciones de cultivo exacerbaban el estrés oxidativo que sufren los embriones, limitando su capacidad de desarrollo [37,38]. Por tanto, el desarrollo de entornos que reduzcan el estrés oxidativo durante el CIV puede ser una herramienta eficaz que contribuya a acercar el estado de los embriones producidos *in vitro* al de los desarrollados *in vivo*.

El otro problema que persiste en los sistemas de cultivo actuales es el uso de medios de cultivo indefinidos. Para superar ciertos problemas asociados al cultivo, los medios tradicionales contienen sustancias indefinidas de origen animal, como la albúmina sérica bovina (BSA) o el suero fetal de ternero. Aunque estos productos han mejorado las tasas de producción de embriones y han aumentado su calidad [39,40], su naturaleza química indefinida complica la estandarización de los sistemas de cultivo, lo que en última instancia dificulta la reproducibilidad de los resultados [41]. A este problema se suma el posible riesgo de contaminación por el uso de productos de origen animal [42] y la posibilidad de que estos compuestos interactúen con nuevos aditivos [43,44], lo que limita el uso potencial de estos medios de cultivo en el campo de la investigación. Por estas razones, la obtención de medios químicamente definidos capaces de mantener el desarrollo embrionario es una tarea prioritaria para la mejora de las condiciones de cultivo.

El éxito final de todas las técnicas mencionadas reside en el último paso de todo el proceso, que es la TE a las hembras receptoras. Esta tecnología no sólo es crucial para la obtención de crías a partir de embriones producidos *in vitro* o de cigotos obtenidos *in vivo* y cultivados *in vitro*, sino que también tiene una gran aplicabilidad práctica en la industria ganadera con el uso de embriones derivados totalmente *in vivo*. Entre estas múltiples aplicaciones, cabe destacar la posibilidad de introducir nueva genética en explotaciones con el máximo estatus sanitario, evitando así la entrada de nuevos animales con el riesgo sanitario asociado que ello implica. Otras ventajas destacables serían la reducción de costes en el transporte de los animales, así como la mejora del bienestar animal [45]. A pesar de estos beneficios, el uso de la tecnología de TE en el ganado porcino es muy limitado en comparación con el del ganado vacuno, donde su uso comercial está muy extendido [46]. Esto se debe a varias razones, entre las que destacan las particulares características anatómicas del tracto reproductivo de la cerda, que dificultan tanto la recogida como la transferencia de embriones por procedimientos no quirúrgicos [47]. Sin embargo, diferentes avances realizados en la última década han permitido establecer una técnica no quirúrgica para la TE porcina [48] con tasas de fertilidad aceptables [49], lo que permite el uso de la TE en la industria porcina. Otro factor limitante que condiciona el éxito de la TE es la elevada tasa de mortalidad embrionaria tras la transferencia (>50% y >70% de mortalidad embrionaria tras la TE quirúrgica y no quirúrgica, respectivamente; revisado en [45]) en comparación con la inseminación artificial (IA) o la monta natural, donde la mortalidad embrionaria raramente supera el 30-40% [50]. Teniendo en cuenta estos resultados, se puede suponer que el entorno uterino es menos favorable para la implantación del embrión en las gestaciones por TE en los que los embriones transferidos contienen material paterno y materno diferente al de la receptora. En este sentido, el papel que juega la inmunidad materna puede ser especialmente relevante, dada la necesidad de generar tolerancia a los antígenos embrionarios/fetales que evite su rechazo durante el embarazo [51,52]. Varios investigadores destacan la implicación de las citoquinas en la regulación de todos estos fenómenos inmunomediados que conducen a la supervivencia e implantación del embrión [53,54]. Por lo tanto, el papel de estos

mediadores en el éxito o el fracaso de las gestaciones llevadas a cabo por TE es un área de investigación interesante.

Por otro lado, un agente exógeno que ha demostrado capacidad para influir en la respuesta inmunitaria a este nivel es el plasma seminal (SP). Esta compleja mezcla de productos secretados por las diferentes glándulas sexuales accesorias incluye, entre sus funciones más conocidas, la facilitación de la motilidad y el transporte de los espermatozoides, así como servir de fuente de nutrientes para los mismos. Además, sus funciones también se han asociado a otros procesos reproductivos, como la ovulación [55], la síntesis de progesterona [56] y la capacidad de interactuar con el endometrio y modular su respuesta inmunitaria [57]. En este sentido, el SP porcino es capaz de inducir la producción de ciertas citoquinas en las células uterinas [58], que están relacionadas con los fenómenos de inmunosupresión y tolerancia inmunológica [59]. Por estas diversas razones, las infusiones de SP pueden considerarse una herramienta para mejorar el rendimiento reproductivo de las receptoras y, por tanto, tienen el potencial de mejorar los resultados de la TE, como se ha demostrado en humanos [60].

Esta tesis, elaborada como compendio de publicaciones, incluye un total de nueve artículos científicos, todos ellos publicados en revistas indexadas en el *Journal Citation Reports*. Estos artículos se dividen en dos secciones.

SECCIÓN I

Esta sección incluye estudios para mejorar la eficacia de las tecnologías de producción de embriones *in vitro* (artículos 1 a 5).

El **Artículo 1**, titulado "*High pre-freezing sperm dilution improves monospermy without affecting the penetration rate in porcine IVF*", se publicó en la revista *Theriogenology*. En este estudio se exploró la posibilidad de reducir la polispermia durante la FIV utilizando espermatozoides altamente diluidos antes de su criopreservación. El segundo artículo de esta sección (**Artículo 2**), titulado "*Supplementation with exogenous coenzyme Q10 to media for in vitro maturation and embryo culture fails to promote the developmental competence of porcine embryos*", se publicó en la revista *Reproduction in Domestic Animals*. Este artículo estudió los efectos de la molécula antioxidante coenzima Q10 durante la MIV y el CIV sobre los parámetros de maduración de los ovocitos, la fecundación y el desarrollo de los embriones. El **Artículo 3**, titulado "*N-(2-mercaptopropionyl)-glycine enhances in vitro pig embryo production and reduces oxidative stress*", se publicó en la revista *Scientific Reports*. Este estudio evaluó los efectos de la suplementación del medio *in vitro* con el antioxidante N-(2-mercaptopropionil)-glicina (NMPG) en el posterior desarrollo embrionario.

La posibilidad de desarrollar un medio de cultivo químicamente definido para el desarrollo de embriones porcinos se recogió en el **Artículo 4**, publicado en la revista *Theriogenology*, y titulado "*The cytokine platelet factor 4 successfully replaces bovine serum albumin for the in vitro culture of porcine embryos*". En este artículo, la BSA del medio de cultivo fue sustituida con éxito por el compuesto químico definido factor plaquetario 4 (PF4). En el **Artículo 5**, titulado "*Transcriptional profiling of porcine blastocysts produced in vitro in a chemically defined culture medium*" y publicado en la revista *Animals*, se estudió en profundidad el medio químicamente definido que contiene PF4 para evaluar su impacto en el transcriptoma de los blastocistos producidos *in vitro*. Este estudio también analizó las diferencias entre las condiciones de desarrollo *in vitro* e *in vivo* al incluir en el experimento embriones derivados *in vivo*.

SECCIÓN II

Esta sección se centra en la mejora de la tecnología de la TE, haciendo especial hincapié en las hembras receptoras (artículos 6 a 9).

Los dos primeros artículos de esta sección examinan el papel del sistema inmunitario materno de las cerdas receptoras, analizando varias citoquinas a nivel endometrial. En el **Artículo 6**, titulado "*Blastocyst-bearing sows display a dominant anti-inflammatory cytokine profile compared to cyclic sows at day 6 of the cycle*" y publicado en la revista *Animals*, se midieron los niveles de 16 citoquinas en el endometrio de cerdas inseminadas (que contienen embriones) y de cerdas no inseminadas (candidatas a receptoras) durante el periodo preimplantacional (día 6 del ciclo). El **Artículo 7**, titulado "*Allogeneic embryos disregulate leukemia inhibitory factor (LIF) and its receptor in the porcine endometrium during implantation*", se publicó en la revista *Frontiers in Veterinary Science*. El artículo describe los niveles de una citoquina concreta, el factor inhibidor de la leucemia (LIF) y su receptor, en el endometrio de cerdas gestantes por IA y de receptoras por TE durante los periodos de implantación (día 18) y postimplantación (día 24).

Por último, los artículos 8 y 9 describen el uso de infusiones de SP antes de la IA como posible herramienta para aumentar el rendimiento reproductivo de las cerdas receptoras en los programas de TE. El **Artículo 8**, titulado "*Seminal plasma modifies the transcriptional pattern of the endometrium and advances embryo development in pigs*" y publicado en la revista *Frontiers in Veterinary Science*, presenta un análisis del impacto del SP en el transcriptoma endometrial y en la calidad y desarrollo del embrión, 6 días después de su infusión. Las variaciones en los perfiles de expresión génica de estos embriones en respuesta a las infusiones de SP se investigaron en el **Artículo 9**, titulado "*Seminal plasma induces overexpression of genes associated with embryo development and implantation in day-6 porcine blastocysts*", y publicado en la revista *International Journal of Molecular Science*.

OBJETIVOS

Los principales objetivos abordados en la presente tesis fueron la mejora de dos biotecnologías reproductivas porcinas, la PIV y la TE. Con esta finalidad, los objetivos específicos desarrollados para los diferentes artículos que componen esta tesis fueron los siguientes:

OBJETIVO 1º: Mejorar los sistemas de producción de cigotos *in vitro*, reduciendo el impacto de la penetración polispermica durante la fecundación mediante la modificación de los protocolos de congelación de esperma.

OBJETIVO 2º: Incrementar la producción de blastocitos *in vitro* y su calidad reduciendo el impacto del estrés oxidativo mediante la suplementación con el antioxidante coenzima Q10 o el N-(2-mercaptopropionil)-glicina.

OBJETIVO 3º: Desarrollar un medio de cultivo químicamente definido utilizando el factor plaquetario 4 como sustituto de la albúmina sérica bovina y evaluar su impacto en el transcriptoma embrionario.

OBJETIVO 4º: Investigar el estado inmunitario de las cerdas receptoras mediante el análisis de los niveles de citoquinas a nivel endometrial a los 6, 18 y 24 días de gestación.

OBJETIVO 5º: Evaluar el impacto de la infusión de plasma seminal antes de la inseminación en el endometrio y en la calidad y desarrollo del embrión.

MATERIAL Y MÉTODOS

Aquellos procedimientos experimentales incluidos en el ámbito de esta tesis que implicaron el uso de animales vivos destinados a la experimentación se realizaron de acuerdo con la Directiva 2010/63/UE CEE para la experimentación con animales y fueron revisados y aprobados por el Comité Ético de Experimentación con Animales (código: 69/2014), el Comité de Ética de la Investigación (código: 1086/ 2015) de la Universidad de Murcia, España; la Consejería de Agricultura y Agua de Murcia (código: 273.705), y la Consejería de Sanidad de Murcia (código: 061015), España.

Las técnicas y procedimientos realizados en los diferentes experimentos incluidos en este compendio de publicaciones se dividen en dos partes. En primer lugar, se describen las técnicas empleadas para la recogida de las muestras biológicas y, en segundo lugar, se explican las técnicas analíticas utilizadas en dichas muestras biológicas. Cada uno de los protocolos se describe según su orden de aparición en los artículos. Por último, se resumen los diferentes análisis estadísticos utilizados en esta tesis.

Salvo que se especifique lo contrario, todos los reactivos y productos químicos utilizados en este estudio se adquirieron en Sigma-Aldrich Co. (Alcobendas, Madrid, España).

1.-Técnicas y recogida de muestras

1.1-Criopreservación espermática

Las muestras de semen necesarias para la realización de los diferentes experimentos con semen criopreservado fueron proporcionadas por un centro de inseminación local, donde se utilizaron verracos híbridos sanos como donantes (Landrace x Large White), que fueron previamente clasificados como buenos congeladores. Este protocolo de congelación se basó en el descrito por Roca et al. [62]. Las fracciones ricas en espermatozoides se obtuvieron mediante la técnica de la mano enguantada y se diluyeron 1:1 con la solución de descongelación de Beltsville (BTS) [62]. Las muestras que satisfacían los análisis de calidad se diluyeron aún más con BTS hasta una concentración de 100×10^6 espermatozoides/mL y se enfriaron progresivamente a 17°C durante 24 h. A continuación, las muestras se centrifugaron ($2400 \times g$, 3 min), se eliminó su sobrenadante y a continuación, se diluyeron hasta una concentración final de 1500×10^6 espermatozoides/mL en medio de lactosa y yema de huevo. Las muestras resultantes se enfriaron lentamente en una cámara frigorífica a 5°C durante 2,5 h y a continuación, fueron nuevamente diluidas hasta una concentración de 1000×10^6 espermatozoides/mL con medio de lactosa y yema de huevo suplementado al 9% con glicerol y al 1,5% con Orvus ES Paste (Equex STM; Nova Chemical Sales Inc., Scituate, MA, EE.UU.). Finalmente, se envasaron en pajuelas de 0,25 mL. Para el último paso de enfriamiento, las pajuelas se expusieron a vapores de nitrógeno líquido alcanzando una temperatura de aproximadamente -100°C (Unidad de Congelación Ref: 15043/0636. Minitüb). Después de 20 minutos de exposición, se sumergieron en nitrógeno líquido y se almacenaron en tanques hasta su utilización en los diferentes experimentos.

1.2.-Producción in vitro de embriones

La PIV se llevó a cabo de acuerdo con el protocolo previamente descrito en Martínez et al. [5]. Los complejos de cumulus-ovocito (CCOs), procedentes de ovarios obtenidos en un matadero local, se incubaron en medio de maduración, consistente en medio de cultivo tisular 199 (Gibco Life Technologies S.A., Barcelona, España) suplementado con 0,55 mM

de glucosa, 0,9 mM de piruvato sódico, 75 mg/mL de penicilina, 50 mg/mL de estreptomina, 1 mg/mL de alcohol polivinílico (PVA), 0,57 mM de cisteína y 10 ng/mL de factor de crecimiento epidérmico. Durante las primeras 22 h de incubación, el medio de maduración se suplementó con 10 UI de gonadotropina coriónica equina (eCG; Folligon, Intervet International B.V., Boxxmeer, Países Bajos) y 10 UI de gonadotropina coriónica humana (hCG; VeterinCorion, Divasa Farmavic, S.A., Barcelona, España), mientras que las siguientes 22 h los CCO se incubaron en un medio de maduración sin hormonas. Los ovocitos se maduraron en una atmósfera humidificada y controlada con un 5% de CO₂, a 38°C. Una vez completada la maduración, los CCOs se desnudaron con una solución de hialuronidasa y se fecundaron en medio tris tamponado [63] que contenía 2 mM de cafeína y 0,2 mg/mL de BSA. Los ovocitos se incubaron con espermatozoides criopreservados y descongelados (proporción ovocito:espermatozoide de 1:1000 a 1:4000) durante 5 horas. Tras el cocultivo, los presuntos cigotos se lavaron en el medio base para el CIV, consistente en North Carolina State University (NCSU)-23 [27]. Se siguió un modelo de cultivo secuencial en dos pasos, donde durante el primer periodo de dos días el medio se suplementó con 0,3 mM de piruvato sódico y 4,5 mM de lactato, y en el segundo periodo de cinco días, se suplementó con 5,5 mM de glucosa en su lugar. Las condiciones de cultivo, así como la composición del medio base, pueden variar ligeramente en función del experimento.

Durante el proceso de CIV, se evaluó el estado de los embriones en diferentes días para valorar la capacidad de desarrollo embrionario. Los embriones se clasificaron en los siguientes estadios de desarrollo: Embriones divididos, cuando se podían distinguir fácilmente dos o más blastómeros en el embrión; mórula, cuando no se podía diferenciar claramente el número de blastómeros y finalmente, cuando era posible distinguir una masa celular interna y un trofoblasto, se clasificaron como blastocistos y se asignaron a otras categorías según el grado de expansión del blastocele y el grosor de la zona pelúcida. Estos fueron: blastocistos tempranos (blastocele pequeño pero perceptible), blastocistos [blastocele aumentado que permite discriminar claramente la masa celular interna (ICM) y el trofotodermo (TEC)], blastocistos expandidos (blastocistos completos con un gran diámetro y zona pelúcida adelgazada), blastocistos perieclucionados (blastocele expandido y zona pelúcida apenas distinguible) y blastocistos eclucionando o eclucionados (blastocistos con zona pelúcida rota o ausente, respectivamente).

Se calcularon diferentes índices para determinar el grado de desarrollo embrionario durante el cultivo. En el segundo día de cultivo, se evaluó el número de embriones divididos para calcular la tasa de división, expresada como el número de embriones con dos o cuatro células con respecto al número total de presuntos cigotos. En los días cinco, seis y siete de cultivo, se contó el número de blastocistos, calculando la tasa de blastocistos como el número de embriones que alcanzaron este estadio con respecto al número de embriones clasificados como divididos en el día dos. Por último, en el día seis o siete, se calculó la eficacia total del proceso, la cual se definió como el número de blastocistos en esos días con respecto al número total de presuntos cigotos cultivados. La tasa de eclusión se definió como el número de blastocistos eclucionados al final del cultivo respecto al número total de blastocistos obtenidos ese mismo día.

1.3.-Recogida de embriones obtenidos in vivo

El procedimiento utilizado para la recogida de embriones *in vivo* se describe en Martínez et al. [64]. Las hembras donantes fueron evaluadas en busca de signos de celo en los días siguientes al destete. Aquellas cerdas con signos positivos fueron inseminadas artificialmente con una dosis post-cervical de $1,5 \times 10^9$ espermatozoides en 40 mL de BTS.

El día de la cirugía (definiendo el día 0 como el día de inicio del celo) dependió del estado embrionario requerido para el experimento, realizándose el día 5 para obtener mórulas y el día 6 para obtener blastocistos. Asimismo, dependiendo del diseño experimental, se realizó un tratamiento de superovulación en las donantes, consistente en una administración de eCG (1000 UI, im) 24 h después del destete y de hCG (750 UI, im) 72-96 h después, al inicio del celo.

El protocolo anestésico comenzó con una sedación con una dosis de azaperona (2 mg/kg de peso corporal, im), seguida de una dosis de tiopental sódico (7 mg/kg de peso corporal, iv) para la inducción de la anestesia, y el isofluorano inhalatorio (3-5% en aire) para el mantenimiento. El abordaje quirúrgico se realizó mediante una laparotomía media-ventral, exponiendo el tracto genital de la hembra. En primer lugar, se contaron los cuerpos lúteos y a continuación, se recuperaron los embriones lavando con 30 mL de lactato de Tyrode (TL)-HEPES-PVA modificado [64]. Para la recogida de las mórulas y los blastocistos, los lavados se realizaron en la porción proximal a la unión útero-tubárica de ambos cuernos uterinos. Los embriones obtenidos fueron evaluados y clasificados con la ayuda de un estereomicroscopio según los criterios establecidos por la International Embryo Transfer Society [65].

1.5.-Transferencia quirúrgica de embriones

Las técnicas quirúrgicas y los protocolos anestésicos utilizados fueron los mismos que los descritos anteriormente para la recogida de embriones. El protocolo de TE se basó en el descrito previamente en Martínez et al. [66]. Los embriones se cargaron en un catéter Tomcat en 30 μ L de NCSU-HEPES-BSA, separados por burbujas de aire de otras dos gotas de 50 μ L de medio sin embriones. Con la ayuda de una pinza Adson, se perforó la pared uterina cerca de la unión útero-tubárica. El catéter cargado se introdujo a través de esta abertura, depositando el contenido en el lumen uterino. Para evaluar el desarrollo embrionario durante la gestación, las receptoras fueron sacrificadas en diferentes días después de la transferencia y se examinaron los fetos y las membranas placentarias presentes en el útero.

1.6.-Recogida de tejido endometrial

Para los diferentes experimentos se recogieron muestras de tejido endometrial para diferentes pruebas analíticas. Esta técnica fue similar en todos los experimentos. Las cerdas utilizadas en cada experimento se sometieron a una histerectomía tras procedimientos quirúrgicos y anestésicos similares a los descritos anteriormente para la recogida de embriones. Se seccionó la pared uterina longitudinalmente en el borde antimesometrial y se expuso el endometrio, recogiendo tiras de tejido de diferentes áreas y tamaños según el experimento. Las muestras se lavaron 3 veces en tampón fosfato salino (PBS) y se almacenaron en microtubos con 500 μ L de RNA later en el caso de los ensayos transcriptómicos, con 500 μ L de solución inhibidora de proteasas en el caso de los ensayos proteómicos y, en el caso de los ensayos histológicos, se fijaron en formol neutro tamponado al 10% durante 24 h. En el caso de los dos primeros, las muestras se almacenaron a -80°C hasta que se reanudaron los experimentos, mientras que, en el caso de los últimos, se transfirieron a una solución de alcohol al 70% y se almacenaron a temperatura ambiente. Cuando las muestras se utilizaron para el cultivo de explantes, simplemente se lavaron y se utilizaron directamente para los experimentos.

1.7.-Cultivo de los explantes endometriales

Las muestras de tejido endometrial se cultivaron en 3 mL de medio NCSU-23, bajo una oscilación constante (150 rpm) y condiciones de incubación controladas de 38°C en una atmósfera humidificada de 5% de CO₂ durante una hora. A continuación, se retiró el medio y se sustituyó por medio fresco, cultivándose durante un segundo período de 22 horas. Al final del cultivo, se recogió el medio condicionado por el explante y se almacenó a -80°C hasta la cuantificación de los niveles de citoquinas. La viabilidad de las células de los explantes se comprobó al inicio y al final de los periodos de cultivo midiendo la actividad de la lactato deshidrogenasa.

1.8.-Procesamientos e infusión del plasma seminal

Para la preparación de las infusiones de SP, se obtuvieron muestras de semen de diferentes verracos sexualmente maduros y con fertilidad comprobada mediante la técnica de la mano enguantada. Se obtuvieron los eyaculados completos, descartando la fracción de gel y mezclándose todos ellos, formando muestras heterólogas, que fueron transportadas al laboratorio y centrifugadas a 1500 x g a 17°C durante 10 min. Los pellets resultantes se desecharon, conservando únicamente el sobrenadante. Este proceso se repitió dos veces hasta que se verificó microscópicamente que el último sobrenadante carecía de espermatozoides. Tras este proceso, las muestras se alicuotaron en volúmenes de 40 mL y se almacenaron a -20°C hasta la realización de los experimentos. Antes de la infusión, cada muestra de SP fue descongelada, calentada a 37°C durante 20 minutos y depositada, mediante un catéter postcervical, en el cuerpo uterino. Este procedimiento se repitió antes de la inseminación de cada cerda.

2.-Técnicas analíticas

2.1.-Evaluación de la calidad espermática

La motilidad de las muestras de semen se analizó de forma objetiva utilizando un Sistema Integrado de Análisis de Semen (ISAS[®]; Proiser R + D, Paterna, España), tal y como habían descrito previamente Cremades et al. [67]. Las muestras se rediluyeron hasta una concentración de 15-20 x 10⁶ espermatozoides/mL y se equilibraron durante 5 minutos a 38°C. Se transfirió un volumen de 5 µL por muestra a una cámara de recuento Makler (Sefi Medical Instruments, Haifa, Israel) y se visualizó bajo un microscopio de contraste de fases. Se registraron entre seis y nueve campos por muestra con al menos 400 espermatozoides y libres de artefactos. El software identificó las velocidades de cada espermatozoide, calculando la motilidad de cada muestra como el porcentaje de espermatozoides móviles (velocidad ≥20 µm/s) con respecto al número total de espermatozoides contados.

Para evaluar la integridad de las membranas plasmáticas y acrosómicas de los espermatozoides, se realizó un análisis de citometría de flujo mediante la técnica de triple tinción [68]. Para la tinción, las muestras se diluyeron a una concentración de 1.5-2.0 x 10⁶ espermatozoides, incubando 100 µL durante 10 min a 38°C en la oscuridad con 2 mL de Hoechst 33342 (H-42; 0,05 mg/mL), 2 mL de yoduro de propidio (PI, 0,5 mg/mL), y 2 mL de aglutinina de cacahuete conjugada con fluoresceína (PNA-FITC, 100 mg/mL). Tras la incubación, se añadieron 400 µL de PBS y, a continuación, se analizaron en un citómetro de flujo BD FACS Canto II (Becton Dickinson & Company, Franklin Lakes, NJ, EE.UU.). El porcentaje de espermatozoides viables (ambas membranas intactas) y viables-reaccionados (membrana plasmática intacta, pero membrana acrosómica dañada) se calculó como el

número de espermatozoides H-42+/PI-/PNA-FITC- y el número de espermatozoides H-42+/PI-/PNA-FITC+ respecto al número total, respectivamente.

2.2.-Evaluación de la maduración y de la fecundación in vitro de los ovocitos

En diferentes experimentos se evaluó tanto la capacidad de maduración de los ovocitos madurados *in vitro* como la eficacia de la fecundación en los cigotos producidos *in vitro*. Los ovocitos madurados se fijaron con una solución de glutaraldehído al 0,5% en PBS o con una solución de ácido acético:etanol (1:3) al final del periodo de maduración (44 h), tiñéndose con H-42 o con una solución de lacmoid 1% en ácido acético al 45% (v:v) para identificar las estructuras citoplasmáticas y perivitelinas. Los ovocitos se consideraron maduros cuando sus cromosomas estaban condensados, organizados en la placa de metafase y la extrusión del primer cuerpo polar era visible, definiendo este estadio como metafase II. Así, la tasa de maduración se calculó como el número de ovocitos en metafase II con respecto al número total de ovocitos evaluados.

Para la evaluación de los parámetros de la FIV, los presuntos cigotos se fijaron 18 horas después de la fecundación y se clasificaron como penetrados cuando los pronúcleos eran identificables en su citoplasma y los dos cuerpos polares estaban extruidos, y adicionalmente como monospérmicos si solo había dos pronúcleos. La tasa de penetración se definió como el número de presuntos cigotos penetrados en relación con el número total de inseminados; la tasa de monospérmicos se calculó como el número total de monospérmicos en relación con los penetrados; y la eficacia de la fecundación fue el porcentaje de presuntos cigotos monospérmicos en relación con el número total de ovocitos inseminados.

2.3.-Determinación del número de células del embrión

Para la evaluación del número total de células (TCN) de los embriones, éstos se fijaron en una solución de PBS con paraformaldehído al 4% durante 30 minutos a temperatura ambiente. A continuación, los blastocistos se conservaron en PBS 0,3 mg/mL de BSA a 4°C hasta que se reanudó el procesado de las muestras. Los embriones fijados se montaron en gotas de Vectashield (Vector, Burlingame, CA, EE.UU.) que contenían 10 mg/mL de H-42 y se visualizaron en un microscopio de fluorescencia con un filtro de excitación que iba de 330 a 380 nm. Se contaron las estructuras compatibles con núcleos celulares que emitían fluorescencia azul y se expresaron como el número de células por embrión.

2.4.-Tinción diferencial de los blastocistos

Esta técnica permitió evaluar el número de células pertenecientes a los dos primeros linajes celulares de los blastocistos, el TEC y el ICM. Este protocolo se basa en el publicado anteriormente por Wydooghe et al. [69]. Los blastocistos se fijaron como se describe en la sección anterior, se incubaron en una solución de permeabilización durante toda la noche y se sometieron a un proceso de desnaturalización de los blastómeros, incubándolos primero en una solución ácida y luego en una alcalina. Antes de la incubación con el anticuerpo primario, los blastocistos se bloquearon en una solución de PBS que contenía 1 mg/mL de BSA, 10% de suero de burro y 0,05% de Tween 20 durante 5 h y, tras este periodo, se incubaron con el anticuerpo anti-CDX2 (Biogenex, San Ramon, EE.UU.) a una concentración de 1:200 durante 1,5 días. Por último, se incubaron con el anticuerpo fluorescente (anti-mouse IgG-Alexa Fluor 568; 1:1000; Invitrogen, Rockford, EE.UU.) durante 1 h y se montaron siguiendo el mismo proceso descrito para el recuento de TCN.

Los blastocitos se observaron en un microscopio de fluorescencia con los filtros de excitación de 536 nm y 330-380 nm. Ambos linajes emitieron fluorescencia azul (del H-42), mientras que sólo las células marcadas con el anticuerpo secundario (CDX2⁺, células del TEC) emitieron fluorescencia roja. Así, cuando se fusionaron las imágenes, los núcleos morados se contaron como células del TEC, mientras que los azules se contaron como células de la ICM. La proporción ICM/TEC se calculó como el número de células pertenecientes a la ICM entre las células del TEC.

2.5.-Determinación de los niveles de las especies reactivas de oxígeno y glutatión

Los fluorocromos diacetato de 2',7'-diclorodifluoresceína (H2DCFDA; Invitrogen, Thermo Fisher Scientific, Massachusetts, EE.UU.) y CellTracker Blue (4-clorometil-6.8-difluoro-7-hidroxycumarina; Invitrogen) se utilizaron para la determinación de las especies reactivas de oxígeno (ROS) y los niveles de glutatión (GSH) del embrión, respectivamente, como se describió previamente en Nohalez et al. [70]. Los embriones se incubaron en TL-HEPES-PVA suplementado con 10 µM de H2DCFDA y 10 µM de CellTracker Blue a 38°C durante 30 min, en la oscuridad. A continuación, se lavaron los embriones, se colocaron en gotas de TL-HEPES-PVA y se observaron inmediatamente en un microscopio de fluorescencia. Las imágenes de los embriones expuestos a los filtros de excitación de 460 y 370 nm para ROS y GSH, respectivamente, se tomaron con una cámara digital y se analizaron utilizando el software ImageJ (Versión 1.51 h; National Institutes of Health, Bethesda, MD, EE.UU.). Los niveles de ROS y GSH en el embrión se calcularon mediante el método de fluorescencia celular total corregida [71].

2.6.-Extracción de ARN y ensayos mediante q-PCR

La extracción de ARN se realizó con el reactivo TRIzol (Invitrogen, Carlsbad, CA, EE.UU.) en el caso de los tejidos endometriales y con el kit RNeasy Plus Micro (Qiagen, Hilden, Alemania) para los grupos de embriones, siguiendo las instrucciones del fabricante en ambos casos. La calidad y la cantidad de las extracciones se analizaron utilizando un bioanalizador Agilent 2100 (Agilent Technologies, Palo Alto, CA, EE.UU.) y un sistema NanoDrop (Thermo Scientific NanoDrop2000), respectivamente.

Estos ensayos de q-PCR se realizaron tanto para el análisis de la expresión génica como para la validación de los resultados obtenidos por *microarray*. La retrotranscripción de las muestras de ARN se realizó previamente a la PCR con el High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Applied Biosystem, CA, EE.UU.) para las muestras de endometrio y el Maxima H Minus First Strand cDNA Synthesis Kit (Thermo Fisher Scientific Waltham, Massachusetts, EE.UU.) en el caso del ARN embrionario, siguiendo en ambos casos los protocolos de termociclado indicados por el fabricante.

Los cebadores para los diferentes genes analizados durante los experimentos se diseñaron utilizando el software Primer3Plus [72] y la base de datos del National Center for Biotechnology Information [73]. La eficacia de cada par de cebadores se determinó antes de los análisis de expresión génica. En las reacciones de PCR se utilizó la tecnología SYBR Green, adaptando las cantidades de ADNc y cebadores según el diseño del experimento. El protocolo de termociclado generalmente utilizados consistieron en una activación de la uracil N-glicosilasa (50°C, 2 min) y una desnaturalización inicial (95°C, 2 min). A esto le seguían 40 ciclos de desnaturalización (95°C, 5 seg) y una fase combinada de alineamiento y extensión (60°C, 30 seg), concluyendo con un análisis de las temperaturas de fusión para validar la especificidad de los cebadores. Para calcular la expresión génica se utilizó el método $\Delta\Delta C_t$ con la corrección de eficiencia diseñada por Pfaffl [74]. Los genes GAPDH, PPIA y RPL19

se emplearon a lo largo de los experimentos como genes endógenos para normalizar los valores de expresión.

2.7.-Análisis de microarrays

Para el procesamiento de las muestras de ARN para los *microarrays*, se utilizaron los kits GeneChip 3' IVT Pico Reagent y GeneChip IVT Labeling (Affymetrix) siguiendo las instrucciones del fabricante, obteniendo como producto final ADNc fragmentado y marcado con biotina, que se hibridó en el GeneChip Porcine Genome Array de Affymetrix (Santa Clara, CA, EE.UU.) con el kit GeneChip Hybridization, Wash and Stain (Affymetrix). Los datos se obtuvieron después de escanear los arrays hibridados, mediante el escáner GeneChip GCS3000 de Affymetrix, procesándose con la consola de comandos de expresión de Affymetrix.

Los resultados obtenidos se analizaron con el software Partek Genomics Suite & Partek Pathways (Partek Incorporated, St. Louis, MO, EE.UU.). En primer lugar, los datos se normalizaron con el método robust multichip average [75] y, a continuación, se obtuvieron las listas de genes diferencialmente expresados (DEG) entre los grupos experimentales mediante pruebas ANOVA de una vía, clasificándolos de acuerdo con el valor positivo o negativo de su *fold change* (FC). Estas listas se sometieron a un análisis posterior para obtener los términos de la ontología génica (GO), así como las rutas enriquecidas basadas en la base de datos de la Enciclopedia de Genes y Genomas de Kioto (KEGG) [76].

2.8.-Extracción de proteínas y Western Blotting

Los procedimientos descritos en esta sección se basan en el artículo publicado por Álvarez-Rodríguez et al. [77]. Para el aislamiento de las proteínas totales, se utilizó un proceso de lisis química con un tampón comercial (RIPA; ThermoFisher, Rockford, IL, EE.UU.) y de lisis mecánica por sonicación de las muestras seguida de rotación constante a 4°C durante 1 h. Se recogieron los sobrenadantes y se cuantificaron tras la centrifugación.

Se cargaron un total de 25 µg de proteína por muestra en geles comerciales (4-20% SDS-PAGE Mini-PROTEAN TGX Precast Protein Gels; BioRad, Richmond, CA, EE.UU.) para la electroforesis. Una vez terminada, las proteínas se transfirieron de los geles a una membrana de polivinildifluoruro (BioRad) y se incubaron durante 1 h en una solución comercial de bloqueo (Odyssey; LI-COR Biosciences, Lincoln, NE, EE.UU.). Los anticuerpos primarios utilizados en el experimento se incubaron durante toda la noche con las membranas y, a continuación, se incubaron durante 1 h con el anticuerpo anti-β-actina que se utilizó como control endógeno. La especificidad de los diferentes anticuerpos se verificó con el uso de péptidos bloqueantes. Finalmente, las membranas se incubaron con los anticuerpos secundarios (cabra anti-ratón IRDye 800 CW; 925-32210; LI-COR Biosciences) durante 1 h y luego se escanearon con el Odyssey CLx (LI-COR Biosciences). Los datos obtenidos se analizaron con el software image studio 4.0 (LI-COR Biosciences) para la cuantificación de proteínas.

2.9.-Análisis de citoquinas

Los ensayos MILLIPLEX MAP Porcine Cytokine and Chemokine Magnetic Bead Panel-Immunology Multiplex (PCYTMG-23K-13PX; Merck Millipore, Burlington, MA, EE.UU.) y MILLIPLEX MAP TGFβ Magnetic Bead 3 Plex Kit-Immunology Multiplex (TGFBMAG-64K-03; Merck Millipore, Burlington, MA, EE.UU.), ambos basados en la tecnología Luminex® xMAP®, se utilizaron para detectar los niveles de un total de 16

citoquinas; siendo el primer kit capaz de detectar un total de 13 y el segundo, las tres variantes del factor de crecimiento transformante (TGF)- β .

El proceso comenzó con una sonicación previa de los medios condicionados por los explantes, seguido de la incubación de estos con la solución de microesferas en la oscuridad a 4°C, durante 18 h, bajo agitación constante. Una vez lavados, se incubaron con los anticuerpos específicos durante el tiempo indicado por el kit, y finalmente se añadió estreptavidina-ficoeritrina para una nueva incubación de 30 minutos. La fluorescencia se midió en un MAGPIX R (Luminexcorp, Austin, TX, EE.UU.), adquiriendo los datos con el software xPONENT versión 4.2 (Luminexcorp, Austin, TX, EE.UU.). La concentración final de citoquinas (pg/mL) se calculó a partir de la fluorescencia emitida por una curva estándar.

2.10.-Evaluación histológica del endometrio

Las muestras de tejido endometrial conservadas en alcohol al 70% se embebieron en parafina y se cortaron en secciones de 4 μ m. Estas secciones se colocaron en cubreobjetos, se desparafinaron y rehidrataron, y finalmente se tiñeron con el procedimiento rutinario de hematoxilina-eosina [78]. Utilizando un microscopio óptico (x400) se evaluaron diferentes parámetros como los niveles de congestión, edema, hemorragia o infiltrados de células inmunes en las diferentes capas y estructuras a nivel endometrial.

3.-Análisis estadísticos

En los distintos experimentos se obtuvieron los residuos de los datos y se sometieron a pruebas de normalidad. La prueba de Kolmogorov-Smirnov se utilizó con conjuntos de datos superiores a 50, mientras que para conjuntos de datos menores se eligió la prueba de Shapiro-Wilk. Cuando estas pruebas determinaron una distribución paramétrica de las muestras, las comparaciones se realizaron con un ANOVA de modelo mixto con la prueba post-hoc de Bonferroni en el caso de comparaciones de más de dos grupos, mientras que la prueba t de Student con la corrección de Levene se utilizó para las comparaciones entre dos grupos. Los resultados se expresaron como media \pm error estándar de la media o media \pm desviación estándar. Por otra parte, en el caso de las distribuciones no paramétricas, las pruebas elegidas fueron la de Kruskal-Wallis para las comparaciones de tres o más grupos, y la de Mann-Whitney para las comparaciones por parejas. Las variables no paramétricas se expresaron como mediana y rangos intercuartílicos, representándolos con gráficos tipo boxplot. Cuando se analizaron las correlaciones, se eligió la prueba de Pearson para las variables con distribución paramétrica, mientras que para las no paramétricas se utilizó la prueba de Spearman. Los datos porcentuales se compararon mediante la prueba exacta de Fisher. Todos los análisis estadísticos se realizaron con el paquete estadístico IBM SPSS 24.0 (SPSS, Chicago, IL, EE.UU.). El valor umbral de significación se fijó en 0,05, considerándose diferencias significativas cuando el valor p fuese inferior.

DISEÑOS EXPERIMENTALES Y RESULTADOS

Esta parte describe los diseños experimentales y los resultados de los artículos incluidos en esta tesis.

SECCIÓN I

Objetivo 1°: *Mejorar los sistemas de producción de cigotos in vitro, reduciendo el impacto de la penetración polispérmica durante la fecundación mediante la modificación de los protocolos de congelación de esperma* (Artículo 1).

Este experimento se diseñó para evaluar el efecto de una alta dilución de los espermatozoides antes de la congelación sobre los parámetros de la FIV y el CIV porcinos. Para ello, se criopreservaron espermatozoides de cuatro verracos diferentes a dos concentraciones distintas: 1000×10^6 espermatozoides/mL (la concentración estándar utilizada en nuestro laboratorio; grupo de control) y 20×10^6 espermatozoides/mL (alta dilución espermática; grupo F20). En cada una de los tres replicados de este experimento, se descongelaron un total de cuatro y dos pajuelas de los grupos F20 y control, respectivamente, y se mezcló su contenido, utilizándose una parte de la muestra para la evaluación de los parámetros de calidad del esperma y el resto, diluido en medio de FIV, se utilizó para fecundar un total de 2.949 ovocitos. Una vez inseminados, 1.141 presuntos cigotos se fijaron y tiñeron 18 h después de la fecundación para evaluar los parámetros de FIV, mientras que los cigotos restantes (N=1.808) se cultivaron durante 7 días para evaluar los parámetros de desarrollo embrionario.

Los parámetros de calidad espermática evaluados no se vieron afectados por el verraco; asimismo, el porcentaje de espermatozoides móviles permaneció inalterado por la dilución del esperma. Sin embargo, se obtuvo una mayor ($p < 0,05$) viabilidad y un menor ($p < 0,01$) porcentaje de espermatozoides reaccionados en el grupo F20 en comparación con el grupo control. En relación con los parámetros de FIV y CIV, la interacción entre el verraco y el factor de dilución no fue significativa, por lo que se realizaron análisis independientes. Los parámetros de FIV se vieron significativamente afectados por el verraco, observándose claramente que los verracos A y B tenían mayores tasas de penetración ($p < 0,004$) que los verracos C o D. Los verracos con menores tasas de penetración mostraron una mayor monospermia ($p < 0,001$) y eficiencia de FIV ($p < 0,05$). A pesar de estos resultados, los parámetros de producción de embriones no difirieron por verraco, con una eficiencia de FIV que osciló entre el 29,1% y el 34,8%. El efecto de la dilución espermática no alteró los resultados de penetración (que fue del 82,7% para el grupo altamente diluido y del 87,1% para el grupo control); sin embargo, tanto las tasas de monospermia como la eficiencia de la FIV aumentaron significativamente ($p < 0,001$) en el grupo altamente diluido (65,8% y 52,3%, respectivamente) en comparación con el grupo control (16,6% y 13,6%, respectivamente). Estos resultados se reflejaron en los parámetros de producción de embriones, en los que tanto la tasa de división como la eficiencia total de la PIV fueron mayores ($p < 0,05$) en el grupo F20 respecto al grupo control (51,6% frente a 43,2% y 34,8% frente a 27,5%, respectivamente). Sin embargo, la tasa de formación de blastocistos y el

número total de células fueron similares entre los grupos ($36,8 \pm 1,1$ células para los embriones F20 y $38,1 \pm 1,8$ células para el control).

En conclusión, una alta dilución de los espermatozoides antes de la congelación aumenta la tasa de monospermia sin afectar a la tasa de penetración, aumentando la eficacia de la PIV.

Objetivo 2º: *Incrementar la producción de blastocitos in vitro y su calidad reduciendo el impacto del estrés oxidativo mediante la suplementación con el antioxidante coenzima Q10 o el N-(2-mercaptopropionil)-glicina* (Artículos 2 y 3).

Los efectos de la coenzima Q10 en la PIV porcina se evaluaron en el **Artículo 2**, suplementando el medio MIV (experimento 1) o el medio CIV (experimento 2) con este potente antioxidante. Antes de ambos experimentos, se probaron los efectos del vehículo utilizado como diluyente de la coenzima Q10, añadiendo 0,002% de cloroformo a los medios IVM e IVC. Las tasas de maduración, fecundación y desarrollo embrionario obtenidas con el medio que contenía cloroformo se compararon con las obtenidas con el medio sin cloroformo (N=1287 ovocitos; cuatro replicados). Ni la capacidad de maduración de los ovocitos ni los parámetros de desarrollo del cigoto se vieron afectados por la adición del vehículo al medio de maduración o de cultivo. En el Experimento 1, se utilizaron un total de cuatro concentraciones de coenzima Q10 (10, 25, 50 y 100 μM) para suplementar el medio de MIV, utilizando como control un medio no suplementado (cuatro replicados). Se evaluó la tasa de maduración de un total de 573 ovocitos, mientras que los ovocitos restantes fueron inseminados. De los ovocitos inseminados, se fijaron 475 ovocitos para calcular los parámetros de fecundación y se cultivaron 825 ovocitos para evaluar el desarrollo embrionario. En el Experimento 2, se añadieron las mismas concentraciones de coenzima Q10 al medio de CIV. Se utilizó un total de 1.284 ovocitos inseminados en 4 replicados para evaluar el desarrollo embrionario.

Los resultados del Experimento 1 indicaron que la suplementación con coenzima Q10 del medio MIV no afectó a los porcentajes de ovocitos maduros (rango: $66,0 \pm 10,6\%$ a $76,4 \pm 12,2\%$). Las diferentes concentraciones tampoco afectaron a los parámetros de fecundación, con una eficiencia global de la FIV que osciló entre el $24,5 \pm 7,8\%$ y el $32,2 \pm 7,9\%$. La suplementación con coenzima Q10 durante la maduración tampoco fue eficaz para mejorar los parámetros de cultivo de embriones, y la concentración de 100 μM mostró un efecto perjudicial en la producción de blastocistos ($p < 0,05$) en comparación con los otros grupos. En cuanto al Experimento 2, la suplementación con coenzima Q10 durante la CIV no aumentó ninguno de los parámetros de producción embrionaria evaluados; sin embargo, no se encontró el efecto tóxico descrito para la maduración a 100 μM .

A partir de los resultados de este estudio, podemos concluir que la suplementación del medio IVM o IVC con las concentraciones probadas de coenzima Q10 no mejoró la producción *in vitro* de embriones porcinos.

El segundo objetivo también se abordó en el **Artículo 3**, en el que se probaron los efectos del NMPG en los parámetros de la CIV utilizando el medio de cultivo definido desarrollado en los artículos 4 y 5 (NCSU-23 con 0,3 mg/mL de PVA y 100 ng/mL de PF4). En el experimento 1, el objetivo era determinar la concentración óptima de NMPG. Así, se evaluaron diferentes concentraciones [0 (control), 1, 10, 25, 50 y 100 μM] de NMPG añadidas al medio de CIV utilizando un total de 1.998 ovocitos fecundados *in vitro* en tres replicados.

Una vez elegida la concentración adecuada, en el Experimento 2 se analizaron el TCN, la relación ICM/TEC, los niveles de ROS y GSH y los niveles de expresión de genes relacionados con el estrés oxidativo y la apoptosis. Se utilizó un total de 4.310 ovocitos fecundados en nueve replicados.

Los resultados del Experimento 1 revelaron que las concentraciones de 50 μM y 100 μM disminuyeron drásticamente ($p < 0,05$) las tasas de división de los embriones respecto al control, siendo incapaces de mantener la producción de blastocistos. El grupo tratado con una concentración de NMPG de 25 μM mostró una tasa de división similar a la del control, pero el número de blastocistos se redujo ($p < 0,01$) en comparación con dicho grupo. La concentración más baja de NMPG (1 μM) no mostró ninguna mejora en ninguno de los parámetros evaluados en comparación con el control. Sin embargo, cuando la concentración de NMPG se aumentó a 10 μM , se observó un efecto beneficioso en la producción de embriones en comparación con el grupo de control; esta concentración condujo a un aumento significativo de las tasas de formación de blastocistos y de la eficiencia global de la PIV ($p < 0,05$) sin afectar a las tasas de división o eclosión. Basándose en estos resultados, se eligió una concentración de 10 μM para continuar con el análisis de la calidad embrionaria en el Experimento 2. En este experimento, entre los parámetros analizados, el número de células no se vio afectado por la adición de 10 μM de NMPG, con un TCN similar ($46,6 \pm 19,2$ y $46,6 \pm 20,6$, respectivamente) y una relación ICM/TEC ($0,17 \pm 0,05$ y $0,18 \pm 0,07$, respectivamente) comparado con el control. Por el contrario, se encontraron diferencias significativas en los contenidos de ROS, que fueron menores ($p < 0,05$) en los embriones cultivados en medio suplementado con NMPG en comparación con el control ($0,89 \pm 0,19$ y $0,98 \pm 0,15$ de fluorescencia relativa, respectivamente), con una tendencia similar ($p = 0,07$) para los niveles de GSH ($0,86 \pm 0,26$ y $0,96 \pm 0,23$ de fluorescencia relativa, respectivamente). Entre los genes relacionados con el estrés oxidativo, GPX1 fue el único gen con expresión reducida en el grupo NMPG ($p < 0,01$). El GPX4 mostró un patrón de expresión similar, con una tendencia a la baja para este grupo ($p = 0,09$). Ningún gen relacionado con la apoptosis se expresó de forma significativamente diferente, y sólo BAX tendió a expresarse a niveles más bajos ($p = 0,06$) en los embriones cultivados en medio suplementado con NMPG.

En conclusión, estos resultados apoyan la hipótesis de que la suplementación del medio de cultivo de embriones con 10 μM de NMPG puede aumentar la producción de blastocistos debido a la atenuación del estrés oxidativo, como se refleja en la reducción de los niveles de ROS y la menor expresión del gen GPX1.

Objetivo 3°: *Desarrollar un medio de cultivo químicamente definido utilizando el factor plaquetario 4 como sustituto de la albúmina sérica bovina y evaluar su impacto en el transcriptoma embrionario* (Artículos 4 y 5).

En el **Artículo 4** se evaluó el efecto del PF4 como suplemento del medio CIV porcino. También se consideró la posibilidad de utilizar este suplemento como sustituto de la BSA para el desarrollo de un medio de cultivo químicamente definido. En el Experimento 1, se investigaron los efectos de esta citoquina en un medio de cultivo convencional consistente en NCSU-23 suplementado con 0,4 mg/mL de BSA (NCSU-BSA). Para ello, los cigotos producidos *in vitro* se cultivaron en NCSU-BSA con concentraciones crecientes de PF4 (100, 200, 500 y 1000 ng/mL). Los cigotos producidos *in vitro* cultivados en medio no

suplementado constituyeron el grupo control. Se cultivaron 3.054 presuntos cigotos durante 7 días en cuatro replicados. Se evaluaron los parámetros de desarrollo embrionario y el TCN (N=1.015 blastocistos). En el Experimento 2, se analizó el desarrollo embrionario en el medio químicamente definido tras eliminar la BSA del medio de cultivo y sustituirla por 0,3 mg/mL de PVA y suplementado con las mismas concentraciones de PF4 utilizadas en el Experimento 1. Además de un grupo de control de embriones cultivados en medio no definido (Control-BSA), se añadió un segundo control basado en el medio químicamente definido en ausencia de PF4 (Control-PVA). Este experimento se repitió seis veces con un total de 3.329 presuntos cigotos cultivados *in vitro*.

Los resultados del Experimento 1 mostraron que ninguna de las concentraciones de PF4 probadas tuvo un impacto significativo ni en los parámetros de producción de embriones evaluados ni en el TCN. En el Experimento 2, no se observaron diferencias en la tasa de división entre los grupos; sin embargo, la producción de blastocitos disminuyó drásticamente ($p < 0,01$) en el grupo Control-PVA en comparación con la de los otros grupos. En los grupos químicamente definidos y suplementados con 100, 200 o 500 ng/mL de PF4, las tasas de blastocistos en el día 5 (rango: $29,9 \pm 7,8$ a $31,8 \pm 5,5$) se incrementaron ($p < 0,05$) con respecto al grupo Control-BSA ($17,2 \pm 8,2\%$), mientras que en el día 7, las tasas de formación de blastocistos y las eficiencias totales fueron similares para todos estos grupos (con un rango de $42,0 \pm 11,5\%$ a $49,3 \pm 10,0\%$ y de $28,0 \pm 8,2\%$ a $32,3 \pm 7,1\%$, respectivamente). El medio con 1000 ng/mL de PF4 mostró una reducción ($p < 0,05$) en la producción de blastocitos en el día 7 en comparación con los otros grupos de PF4 y el grupo Control-BSA. La tasa de eclosión fue similar en todos los grupos, excepto en el grupo Control-PVA, en el que no eclosionó ningún blastocisto. El TCN fue similar entre los blastocistos producidos en el medio definido con concentraciones de 100, 200 y 500 ng/mL de PF4 y los producidos en el medio Control-BSA (rango: $42,6 \pm 19,3$ a $45,7 \pm 23,9$). El grupo suplementado con 1000 ng/mL de PF4 mostró un número reducido ($p < 0,05$) de células ($30,7 \pm 17,8$) en comparación con los otros grupos. No hubo diferencias significativas en el número de células del TEC y de la ICM entre los grupos analizados.

Estos resultados mostraron que la suplementación de BSA en el medio de cultivo de embriones que contiene PF4 no mejora la producción de embriones porcinos. Sin embargo, cuando se elimina la BSA del medio, la suplementación con 100, 200 o 500 ng/mL de PF4 fue capaz de mantener la producción de blastocistos, proporcionando así un medio químicamente definido para el cultivo de embriones porcinos.

El **Artículo 5** analizó el impacto del medio definido NCSU23 con PF4 en el transcriptoma de los blastocistos. Para este experimento, 907 ovocitos fueron madurados y fecundados *in vitro* (tres replicados) y asignados a dos sistemas de CIV: NCSU23 PVA-100 ng/mL PF4 (grupo PF4; N=406 ovocitos) y NCSU23 0,03 mg/mL BSA (grupo BSA; N=438 ovocitos). Los blastocistos clasificados como expandidos se seleccionaron en el día 6 de cultivo para el experimento de *microarrays* (50 por grupo). También se incluyeron en el estudio blastocistos derivados *in vivo* (grupo IVV; N=70) en la misma fase de desarrollo como embriones de la más alta calidad. Los blastocistos IVV se recogieron quirúrgicamente de diez cerdas donantes. Los blastocistos se agruparon en pools de diez embriones, realizando un array por cada pool.

El análisis de componentes principales mostró que las muestras se distribuían en dos poblaciones bien diferenciadas según su origen *in vivo* o *in vitro*. Esta distribución fue

confirmada por el agrupamiento jerárquico, juntando claramente los grupos PF4 y BSA. Los DEGs fueron identificados mediante el análisis cruzado de los tres grupos experimentales. La comparación del grupo PF4 frente al grupo BSA no identificó ningún DEG entre los 24.123 transcritos analizados bajo los criterios establecidos ($|FC| > 1,5$ y valor p ajustado $< 0,05$). En cambio, se encontraron muchos DEG cuando se compararon los embriones producidos *in vitro* y los derivados *in vivo*. Las comparaciones de los grupos PF4 e IVV y BSA e IVV detectaron 2.780 DEGs (1219 genes infraexpresados y 1561 genes sobreexpresados) y 2.577 DEGs (1.108 genes infraexpresados y 1.469 genes sobreexpresados), respectivamente. A partir de cada conjunto de DEGs, se crearon dos listas y se compararon, y los resultados mostraron que 2.132 DEGs aparecían en ambas listas, lo que sugiere que la mayoría de los transcritos alterados eran comunes a los blastocistos cultivados en ambos tipos de medios CIV. Los términos GO obtenidos con ambas listas de DEGs se clasificaron en las categorías principales de procesos biológicos, funciones moleculares y componentes celulares. En la categoría de procesos biológicos, las funciones más afectadas fueron reproducción, detoxificación, crecimiento y muerte celular. En la categoría de funciones moleculares, los términos más afectados fueron antioxidante y la actividad del adaptador de carga, mientras que, en la categoría de componentes celulares, el término GO más alterado fue intracelular. Las listas de DEGs de PF4 y BSA se dividieron de acuerdo con los transcritos sobreexpresados e infraexpresados para realizar un análisis de enriquecimiento de rutas (considerando sólo aquellas con un valor $p < 0,05$ como significativamente alteradas). Había 13 y 15 KEGG rutas con genes sobreexpresados en las listas de PF4 y BSA, respectivamente. De estas rutas, 10 eran comunes a ambas listas. En cuanto a las rutas KEGG con genes infraexpresados, se identificaron 14 rutas en la lista PF4 y 13 en la lista BSA, 10 de las cuales eran comunes a ambas listas. Las rutas con los mayores valores de enriquecimiento comunes a ambas listas fueron la ruta de los lisosomas para los DEGs sobreexpresados y la del ciclo celular para los DEGs infraexpresados. Además, algunas rutas alteradas mostraron mayores valores de enriquecimiento y porcentajes de DEGs en la lista BSA que en la lista PF4, como las rutas de exportación de proteínas y biosíntesis de esteroides. Por el contrario, la ruta del metabolismo del inositol se vio más afectada en el grupo PF4 que en el grupo BSA. Los resultados de los análisis por q-PCR confirmaron la validez de los resultados obtenidos por *microarray*.

En conclusión, los resultados de este experimento mostraron que no había diferencias en el transcriptoma entre los blastocistos producidos *in vitro* en medios suplementados con PF4 y con BSA, lo que indica que el medio de cultivo tradicional indefinido con BSA puede ser sustituido por el medio definido NCSU23-PVA-PF4.

SECCIÓN II

4º Objetivo: *Investigar el estado inmunitario de las cerdas receptoras mediante el análisis de los niveles de citoquinas a nivel endometrial a los 6, 18 y 24 días de gestación (Artículos 6 y 7).*

En el estudio descrito en el **Artículo 6**, el objetivo era comparar la producción endometrial de 16 citoquinas entre cerdas portadoras de embriones (inseminadas) y cerdas candidatas a receptoras (no inseminadas) en el día 6 del ciclo. Las citoquinas analizadas se clasificaron como antiinflamatorias (IL-1ra, IL-4, IL-6, IL-10, TGF β 1, TGF β 2 y TGF β 3) o proinflamatorias (IL-1 α , IL-1 β , IL-2, IL-8, IL-12, IL-18, GM-CSF, IFN- γ y TNF α). Para ello,

un total de ocho cerdas multíparas se dividieron en dos grupos experimentales. El primer grupo estaba formado por cuatro cerdas destetadas inseminadas, cuya presencia de embriones en el día 6 (día 0 = inicio del celo) se verificó mediante recogida quirúrgica (grupo BB). El segundo grupo consistió en cuatro cerdas que no fueron inseminadas durante el celo (grupo U-IC). Todas las cerdas fueron sometidas a una histerectomía el día 6, recogiendo tejido endometrial de tres regiones diferentes (proximal, media y distal) de cada cuerno uterino. Los tejidos se cultivaron *in vitro* durante 22 h, y se realizó un análisis de citoquinas del medio de cultivo de los explantes.

Dado que no se observaron diferencias significativas en los niveles de citoquinas entre las distintas regiones uterinas dentro de cada grupo experimental, las muestras se analizaron conjuntamente. Cuando se compararon los niveles de citoquinas antiinflamatorias entre los dos grupos, se encontró que las citoquinas IL-4 y TGF β 3 estaban por debajo de los límites de detección en el grupo U-IC. Todas las demás citoquinas antiinflamatorias eran detectables en ambos grupos, con niveles significativamente más bajos ($p < 0,001$) en el grupo U-IC comparados con el grupo BB. Las citoquinas proinflamatorias IL-12 y TNF α fueron indetectables en el grupo U-IC. Al igual que en el caso de las citoquinas antiinflamatorias, las proinflamatorias se expresaron a niveles más altos ($p < 0,05$) en el grupo BB, excepto el GM-CSF, para el que no se encontraron diferencias significativas. Una vez cuantificados y comparados los niveles de todas las citoquinas, se calculó la relación entre las citoquinas antiinflamatorias y las proinflamatorias para determinar si la respuesta inmunitaria se desplaza hacia un perfil anti o proinflamatorio. Del total de ratios analizados, 25 mostraron diferencias significativas, y 15 de ellas se desplazaron hacia un perfil antiinflamatorio en el caso del grupo BB (60%), frente a 12 que se desplazaron hacia un perfil antiinflamatorio en el grupo U-IC (48%). De las 12 ratios que indicaban una desviación hacia un perfil antiinflamatorio en ambos grupos, 10 ratios eran mayores en el grupo BB comparadas con el grupo U-IC.

Los resultados obtenidos indicaron que en el día 6 del ciclo, los explantes de las cerdas BB produjeron una mayor cantidad de citoquinas que los de las cerdas U-IC. Además, el balance hacia una respuesta antiinflamatoria fue mayor en las primeras, lo que sugiere que la presencia de embriones y/o componentes de la IA fue capaz de influir en el estado inmunitario uterino y conducirlo hacia un cambio de perfil antiinflamatorio que favorece la tolerancia inmunitaria materna en el día 6. Estos resultados también demostraron que el entorno uterino de las cerdas U-IC (las receptoras en los programas de TE) no es el más adecuado para el desarrollo del embrión. Por lo tanto, este estudio sugiere seguir investigando si los componentes del semen/plasma seminal o ciertos compuestos activos secretados por el embrión pueden modificar el ambiente uterino, promoviendo la implantación en las cerdas receptoras y así mejorar los resultados de los programas de TE.

El **Artículo 7** presenta un estudio sobre una citoquina concreta, el LIF, que desempeña un papel clave en los procesos reproductivos. El experimento se centró en el momento de la implantación del embrión (días 18 y 24 de gestación, día 0 = inicio del celo). Se analizó la expresión génica y proteica endometrial de LIF y su receptor (LIF-R) en cerdas sometidas a inseminación postcervical (que contenían embriones con material genético materno; grupo Hemi-AL; N=8) y cerdas sometidas a TE (que contenían embriones de padres genéticamente diferentes a las cerdas receptoras; grupo AL; N=8). Se realizaron Q-PCR y *Western Blotting* para determinar la expresión génica y proteica, respectivamente. Se

recogieron y agruparon tres porciones diferentes de tejido endometrial (superficie y glándulas) de zonas aleatorias del tracto uterino el día 18 y de zonas de implantación y entre zonas de implantación el día 24.

La expresión génica de LIF en las zonas de implantación no fue significativamente diferente entre los dos grupos el día 18; sin embargo, el día 24, la expresión génica y proteica de LIF fue mayor ($p < 0,05$) en el grupo Hemi-AL. La expresión génica y proteica de LIF-R fue similar entre ambos grupos experimentales, independientemente del día de gestación. Se observó un patrón similar para los lugares de no implantación, con una regulación a la baja de la expresión del gen y la proteína LIF en el grupo AL en comparación con la expresión en el grupo Hemi-AL; sin embargo, la expresión de LIF-R se mantuvo similar. Cuando se comparó la expresión de LIF entre el día 18 y el 24, los niveles de proteína aumentaron ($p < 0,05$) el día 24 con respecto al día 18 en ambos grupos, y el nivel de expresión génica sólo aumentó en el grupo Hemi-AL ($p < 0,05$). Por el contrario, la expresión del ARNm de LIF-R fue menor ($p < 0,001$) el día 24 en ambos grupos, aunque esto no se reflejó en la expresión proteica. Cuando se compararon las zonas de implantación y las de no implantación, sólo se observaron diferencias significativas en la expresión génica de LIF-R, que fue mayor en el grupo AL ($p < 0,05$) en las zonas de no implantación. En cuanto al análisis de correlación, se observó una correlación inversa significativa entre la expresión de ARNm de LIF y LIF-R en el grupo Hemi-AL ($r = -0,791$; $p < 0,01$), pero la diferencia no fue significativa en el grupo AL ($r = -0,535$; $p = 0,073$). Además, no se encontró ninguna correlación entre el número de fetos por cerda y los niveles de expresión génica de LIF o LIF-R, lo que indica que las diferencias señaladas en este estudio no están influidas por el número de fetos por cerda, sino por el carácter alogénico de los embriones.

En conclusión, los bajos niveles de LIF observados en las gestaciones alogénicas pueden dar lugar a un entorno inmunitario desfavorable para la implantación, lo que puede contribuir a las elevadas tasas de mortalidad periimplantacional descritas en este tipo de gestaciones.

5° Objetivo: *Evaluar el impacto de la infusión de plasma seminal antes de la inseminación en el endometrio y en la calidad y desarrollo del embrión* (Artículos 8 y 9).

En el **Artículo 8** se analizaron los efectos de las infusiones de SP durante el celo en el endometrio. Además, se evaluó su impacto sobre el número y el estadio de los embriones recogidos el día 6 después del inicio del celo. Para el experimento se utilizaron un total de 34 cerdas destetadas y superovuladas. En primer lugar, 16 cerdas recibieron una infusión de 40 mL de SP 30 min antes de cada inseminación (grupo SP). Las 18 cerdas restantes, que constituían el grupo de control, recibieron una infusión con BTS en lugar de SP. Los embriones se recogieron quirúrgicamente 6 días después del inicio del celo, y se obtuvieron muestras de tejido endometrial de tres cerdas portadoras de embriones de cada grupo experimental. Estas muestras se obtuvieron de las regiones proximal y distal de los cuernos uterinos y se procesaron adecuadamente para el análisis histológico (cuatro cortes por región y cerda) y del transcriptoma (un array por región y por cerda).

La evaluación histológica de las muestras reveló una variedad de cambios inflamatorios a nivel endometrial que fueron más acentuados en el grupo SP, incluyendo congestión, marginación de leucocitos, edema, hemorragias e infiltración de células inmunes en el tejido conectivo de la mucosa y las glándulas uterinas. El análisis del transcriptoma

mostró un total de 1.052 DEG ($|FC| > 1$ y valor $p < 0,05$) en la región distal del cuerno uterino (514 genes sobreexpresados y 537 genes infraexpresados) entre ambos grupos experimentales. En la región proximal, el número de DEGs se redujo a 552 (245 genes sobreexpresados y 307 infraexpresados). El análisis de los términos GO reveló una alteración predominante en la categoría de procesos biológicos, destacando las subcategorías de regulación biológica, procesos celulares y genes relacionados con el sistema inmunitario. En cuanto al análisis de enriquecimiento de rutas, las más significativas incluyeron la interacción citoquina-receptor de citoquinas, la señalización MAPK-ERK, la señalización TGF-beta, la adhesión focal, el ciclo celular y las moléculas de adhesión celular. Varios de los genes incluidos en los diferentes términos GO y rutas alteradas desempeñan diferentes funciones relacionadas con el desarrollo embrionario, la implantación o el progreso gestacional (84 DEGs en la región proximal y 42 DEGs en la región distal). Estos genes estaban implicados en funciones relacionadas con el desarrollo del sistema esquelético embrionario, el desarrollo del sistema reproductivo, la producción de IL-2, la regulación de la activación de las células T y los procesos metabólicos de los esteroides. Los resultados de los *microarray* se validaron mediante q-PCR, que se utilizó para analizar la expresión de 15 DEGs. Los FCs obtenidos mostraron una fuerte correlación con los obtenidos por *microarray* ($Rh0 = 0,77$; $P < 0,001$), confirmando así la validez de los resultados obtenidos. Con respecto a los embriones recogidos de cada grupo experimental, no se encontraron diferencias significativas en cuanto a la cantidad; sin embargo, las infusiones de SP adelantaron el desarrollo embrionario, con un menor ($p < 0,05$) porcentaje de mórulas con respecto al control, mientras que el porcentaje de blastocistos y blastocistos periclosionados se incrementó ($p < 0,05$). No hubo diferencias en el TCN por embrión dentro de cada estadio embrionaria entre los grupos experimentales.

Teniendo en cuenta estos resultados, podemos concluir que las infusiones de SP fueron capaces de modificar el transcriptoma endometrial durante los primeros días de gestación. La alteración de los genes relacionados con el desarrollo embrionario y la inmunidad materna, así como el avanzado desarrollo embrionario observado, confirmaron un impacto positivo de este tipo de infusiones, aunque se necesitan más investigaciones para evaluar el potencial de uso de esta técnica tanto en procedimientos de IA como de TE.

Los efectos de las infusiones de SP se investigaron más a fondo en el **Artículo 9**, que presentó un análisis del transcriptoma de los embriones preimplantacionales tras las infusiones de SP durante el celo. Un total de 12 cerdas fueron infundidas con SP (N=6; grupo SP) o BTS (N=6; grupo control), antes de la inseminación. Se realizaron laparotomías el día 6 después del inicio del celo para obtener los embriones. Se clasificaron según su estado de desarrollo y se seleccionaron 30 embriones clasificados como blastocistos expandidos por grupo. Los embriones se juntaron en grupos de 10, realizándose un array con cada grupo (tres para el grupo SP y tres para el grupo control).

Los análisis estadísticos revelaron un total de 210 DEGs ($|FC| > 2$ y valor $p < 0,05$), de los cuales 93 genes estaban sobreexpresados y 117 genes estaban infraexpresados en el grupo SP con respecto al control. Un análisis de componentes principales separó las muestras según el grupo experimental al que pertenecían, patrón que se confirmó en el análisis de agrupamiento jerárquico, diferenciando claramente las muestras SP y las del control. Tras el análisis de términos GO, se encontró que muchos de los DEGs estaban asociados a diferentes procesos biológicos, celulares, metabólicos y de desarrollo dentro de

la categoría principal de procesos biológicos. En la categoría de componentes celulares, la mayoría de los transcritos alterados se clasificaron en funciones de entidades anatómicas celulares y complejos que contienen proteínas celulares, mientras que, en la categoría de funciones moleculares, la unión, la actividad catalítica y el regulador de funciones moleculares fueron las funciones enriquecidas con el mayor número de DEGs. En el análisis de enriquecimiento de rutas, se identificaron 15 rutas significativamente alteradas por la infusión de SP. Las rutas alteradas que incluían DEGs sobreexpresados estaban principalmente implicadas en la transducción de señales y en procesos celulares y endocrinos, incluyendo numerosos genes con funciones importantes en eventos reproductivos, como ApoA-I, CDK1, MAPK1, SMAD2, PRKAA1 y RICTOR. Por el contrario, las rutas enriquecidas con DEGs infraexpresados fueron las rutas de absorción de minerales y de señalización de p53, con genes como MT-2B, CDK2 y SERPINE1, sin papel aparente en las funciones reproductivas. Mediante q-PCR, se verificó la expresión de cinco DEGs, mostrando patrones de FC similares a los obtenidos por *microarray*, validando así los resultados obtenidos.

En conclusión, estos resultados demostraron que las infusiones de SP durante el celo influyeron en el perfil transcripcional de los blastocitos porcinos en el día 6. Estas modificaciones incluyeron rutas y genes asociados a diferentes procesos reproductivos clave, como el desarrollo embrionario, la implantación y los fenómenos inmunológicos, lo que sugiere una mejora de la calidad embrionaria. Por todas estas razones, el uso de SP en la industria porcina parece ser una herramienta prometedora con aplicaciones potenciales tanto para la IA como para la TE.

CONCLUSIONES GENERALES

1.- Una alta dilución de los espermatozoides antes de la congelación aumenta la monospermia sin afectar a las tasas de penetración, aumentando así la eficiencia de la PIV porcina.

2.- La suplementación exógena de la Coenzima Q10 en los medios de MIV o CIV no mejoró los resultados de la producción de embriones *in vitro*, por lo que no se debe fomentar su uso como antioxidante exógeno.

3.- La suplementación del medio de cultivo embrionario con el antioxidante N-(2-mercaptopropionil)-glicina puede mitigar el estrés oxidativo que sufren los embriones, aumentando la producción de blastocistos.

4.- El medio químicamente definido NCSU23-PVA-PF4 puede sustituir eficazmente al tradicional medio de cultivo indefinido suplementado con BSA con una producción de blastocistos y un perfil transcriptómico similar entre ambos.

5.- Los niveles de citoquinas expresados en el endometrio de las cerdas portadoras de embriones muestran un entorno inmune uterino desviado hacia un perfil antiinflamatorio en comparación con las cerdas receptoras 6 días después del inicio del celo. Esto abre la puerta a tratamientos que puedan promover la adquisición de este perfil en las cerdas receptoras, mejorando así los resultados de la TE.

6.- Los bajos niveles endometriales de LIF y la desregulación con su receptor durante el periodo de implantación en las gestaciones alogénicas pueden conducir a un entorno desfavorable para la supervivencia del embrión, lo que podría ser en parte responsable de la alta mortalidad embrionaria asociada a estos procedimientos.

7.- Las infusiones de SP modifican el transcriptoma a nivel endometrial y embrionario y promueven el desarrollo y la calidad de estos últimos mediante la expresión de genes relacionados con el desarrollo embrionario, la implantación y/o la inmunidad materna, entre otros; lo que hace de las infusiones de SP una herramienta prometedora para su uso en la industria porcina tanto en programas de IA como de TE.

ABREVIATURAS

BSA: Albúmina sérica bovina

BTS: Solución de descongelación de Beltsville

CCO: Complejos cúmulus-ovocito

CIV: Cultivo *in vitro*

DEG: Genes diferencialmente expresados

eCG: Gonadotropina coriónica equina

FC: *Fold change*

FIV: Fecundación *in vitro*

GO: Ontología génica

GSH: Glutación

H2DCFDA: diacetato de 2',7'-diclorodifluoresceína

H-42: Hoechst 33342

hCG: Gonadotropina coriónica humana

IA: Inseminación artificial

ICM: Masa celular interna

ISAS: Sistema Integrado de Análisis de Semen

KEGG: Enciclopedia de Genes y Genomas de Kioto

LIF: Factor inhibidor de la leucemia

LIF-R: Receptor del factor inhibidor de la leucemia

MIV: Maduración *in vitro*

NCSU: North Carolina State University

NMPG: N-(2-mercaptopropionil)-glicina

PBS: Tampón fosfato salino

PF4: Factor plaquetario 4

PI: Yoduro de propidio

PIV: Producción *in vitro* de embriones

PNA-FITC: Aglutinina de cacahuete conjugada con fluoresceína

PVA: Alcohol polivinílico

ROS: Especies reactivas de oxígeno

SP: Plasma seminal

TCN: Número total de células

TE: Transferencia embrionaria

TEC: Trofoectodermo

TGF: Factor de crecimiento transformante

TL: Lactato de Tyrode

REFERENCES

REFERENCES

1. Gutierrez, K.; Dicks, N.; Glanzner, W.G.; Agellon, L.B.; Bordignon, V. Efficacy of the porcine species in biomedical research. *Front. Genet.* **2015**, *6*, 293, doi:10.3389/fgene.2015.00293.
2. Perleberg, C.; Kind, A.; Schnieke, A. Genetically engineered pigs as models for human disease. *Dis. Model. Mech.* **2018**, *11*, doi:10.1242/dmm.030783.
3. Gaj, T.; Gersbach, C.A.; Barbas, C.F. 3rd ZFN, TALEN, and CRISPR/Cas-based methods for genome engineering. *Trends Biotechnol.* **2013**, *31*, 397–405, doi:10.1016/j.tibtech.2013.04.004.
4. Yoshioka, K.; Suzuki, C.; Onishi, A. Defined system for in vitro production of porcine embryos using a single basic medium. *J. Reprod. Dev.* **2008**, *54*, 208–213.
5. Martinez, C.A.; Nohalez, A.; Ceron, J.J.; Rubio, C.P.; Roca, J.; Cuello, C.; Rodriguez-Martinez, H.; Martinez, E.A.; Gil, M.A. Peroxidized mineral oil increases the oxidant status of culture media and inhibits in vitro porcine embryo development. *Theriogenology* **2017**, *103*, 17–23, doi:10.1016/j.theriogenology.2017.07.028.
6. Yuan, Y.; Spate, L.D.; Redel, B.K.; Tian, Y.; Zhou, J.; Prather, R.S.; Roberts, R.M. Quadrupling efficiency in production of genetically modified pigs through improved oocyte maturation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2017**, *114*, E5796–E5804, doi:10.1073/pnas.1703998114.
7. Nie, J.; Yan, K.; Sui, L.; Zhang, H.; Zhang, H.; Yang, X.; Lu, S.; Lu, K.; Liang, X. Mogroside V improves porcine oocyte in vitro maturation and subsequent embryonic development. *Theriogenology* **2019**, *141*, 35–40, doi:10.1016/j.theriogenology.2019.09.010.
8. Yang, L.; Wang, Q.; Cui, M.; Li, Q.; Mu, S.; Zhao, Z. Effect of melatonin on the in vitro maturation of porcine oocytes, development of parthenogenetically activated embryos, and expression of genes related to the oocyte developmental capability. *Animals* **2020**, *10*, doi:10.3390/ani10020209.
9. Hunter, M.G. Oocyte maturation and ovum quality in pigs. *Rev. Reprod.* **2000**, *5*, 122–130, doi:10.1530/ror.0.0050122.
10. Appeltant, R.; Somfai, T.; Maes, D.; VAN Soom, A.; Kikuchi, K. Porcine oocyte maturation in vitro: role of cAMP and oocyte-secreted factors - A practical approach. *J. Reprod. Dev.* **2016**, *62*, 439–449, doi:10.1262/jrd.2016-016.
11. Lee, Y.; Shim, J.; Ko, N.; Kim, H.-J.; Park, J.-K.; Kwak, K.; Kim, H.; Choi, K. Effect of alanine supplementation during in vitro maturation on oocyte maturation and embryonic development after parthenogenesis and somatic cell nuclear transfer in pigs. *Theriogenology* **2019**, *127*, 80–87, doi:10.1016/j.theriogenology.2019.01.001.
12. You, J.; Kim, J.; Lee, H.; Hyun, S.-H.; Hansen, P.J.; Lee, E. MG132 treatment during oocyte maturation improves embryonic development after somatic cell nuclear transfer and alters oocyte and embryo transcript abundance in pigs. *Mol. Reprod. Dev.* **2012**, *79*, 41–50, doi:10.1002/mrd.21402.
13. Kwak, S.-S.; Cheong, S.-A.; Jeon, Y.; Lee, E.; Choi, K.-C.; Jeung, E.-B.; Hyun, S.-H. The effects of resveratrol on porcine oocyte in vitro maturation and subsequent embryonic development after parthenogenetic activation and in vitro fertilization. *Theriogenology* **2012**, *78*, 86–101, doi:10.1016/j.theriogenology.2012.01.024.
14. You, J.; Lee, J.; Hyun, S.-H.; Lee, E. L-carnitine treatment during oocyte maturation improves in vitro development of cloned pig embryos by influencing intracellular glutathione synthesis and embryonic gene expression. *Theriogenology* **2012**, *78*, 235–243, doi:10.1016/j.theriogenology.2012.02.027.
15. Hunter, R.H.; Léglise, P.C. Polyspermic fertilization following tubal surgery in pigs, with particular reference to the rôle of the isthmus. *J. Reprod. Fertil.* **1971**, *24*, 233–246, doi:10.1530/jrf.0.0240233.

16. Hunter, R.H. Polyspermic fertilization in pigs after tubal deposition of excessive numbers of spermatozoa. *J. Exp. Zool.* **1973**, *183*, 57–63, doi:10.1002/jez.1401830107.
17. Funahashi, H. Polyspermic penetration in porcine IVM - IVF systems. *Reprod. Fertil. Dev.* **2003**, *15*, 167, doi:10.1071/RD02076.
18. Somfai, T.; Ozawa, M.; Noguchi, J.; Kaneko, H.; Karja, N.W.K.; Fahrudin, M.; Nakai, M.; Maedomari, N.; Dinnyés, A.; Nagai, T.; et al. In vitro development of polyspermic porcine oocytes: Relationship between early fragmentation and excessive number of penetrating spermatozoa. *Anim. Reprod. Sci.* **2008**, *107*, 131–147, doi:10.1016/j.anireprosci.2007.06.025.
19. McCauley, T.C.; Mazza, M.R.; Didion, B.A.; Mao, J.; Wu, G.; Coppola, G.; Coppola, G.F.; Di Bernardino, D.; Day, B.N. Chromosomal abnormalities in Day-6, in vitro-produced pig embryos. *Theriogenology* **2003**, *60*, 1569–1580, doi:10.1016/s0093-691x(03)00172-9.
20. Gil, M.A.; Gomis, J.; Angel, M.A.; Sanchez-Osorio, J.; Maside, C.; Cuello, C.; Parrilla, I.; Roca, J.; Vazquez, J.M.; Martinez, E.A. The in vitro and in vivo developmental capacity of selected porcine monospermic zygotes. *Theriogenology* **2013**, *79*, 392–398, doi:10.1016/j.theriogenology.2012.10.012.
21. Han, Y.M.; Wang, W.H.; Abeydeera, L.R.; Petersen, A.L.; Kim, J.H.; Murphy, C.; Day, B.N.; Prather, R.S. Pronuclear location before the first cell division determines ploidy of polyspermic pig embryos. *Biol. Reprod.* **1999**, *v. 61*.
22. Han, Y.M.; Abeydeera, L.R.; Kim, J.H.; Moon, H.B.; Cabot, R.A.; Day, B.N.; Prather, R.S. Growth retardation of inner cell mass cells in polyspermic porcine embryos produced in vitro. *Biol. Reprod.* **1999**, *60*, 1110–1113, doi:10.1095/biolreprod60.5.1110.
23. Funahashi, H.; Nagai, T. Sperm Selection by a Climbing-over-a-Wall IVF Method Reduces the Incidence of Polyspermic Penetration of Porcine Oocytes. *J. Reprod. Dev.* **2000**, *46*, 319–324, doi:10.1262/jrd.46.319.
24. Li, Y.-H.; Ma, W.; Li, M.; Hou, Y.; Jiao, L.-H.; Wang, W.-H. Reduced polyspermic penetration in porcine oocytes inseminated in a new in vitro fertilization (IVF) system: straw IVF. *Biol. Reprod.* **2003**, *69*, 1580–1585, doi:10.1095/biolreprod.103.018937.
25. Park, C.H.; Lee, S.G.; Choi, D.H.; Lee, C.K. A modified swim-up method reduces polyspermy during in vitro fertilization of porcine oocytes. *Anim. Reprod. Sci.* **2009**, *115*, 169–181, doi:10.1016/j.anireprosci.2008.12.004.
26. Grupen, C. The evolution of porcine embryo invitro production. *Theriogenology* **2014**, *81*, 24–37, doi:10.1016/j.theriogenology.2013.09.022.
27. Petters, R.M.; Wells, K.D. Culture of pig embryos. *J. Reprod. Fertil. Suppl.* **1993**, *48*, 61–73.
28. Abeydeera, L.R.; Wang, W.H.; Cantley, T.C.; Rieke, A.; Prather, R.S.; Day, B.N. Presence of epidermal growth factor during in vitro maturation of pig oocytes and embryo culture can modulate blastocyst development after in vitro fertilization. *Mol. Reprod. Dev.* **1998**, *51*, 395–401, doi:10.1002/(SICI)1098-2795(199812)51:4<395::AID-MRD6>3.0.CO;2-Y.
29. Marchal, R.; Feugang, J.M.; Perreau, C.; Venturi, E.; Terqui, M.; Mermillod, P. Meiotic and developmental competence of prepubertal and adult swine oocytes. *Theriogenology* **2001**, *56*, 17–29, doi:10.1016/s0093-691x(01)00539-8.
30. Kikuchi, K.; Onishi, A.; Kashiwazaki, N.; Iwamoto, M.; Noguchi, J.; Kaneko, H.; Akita, T.; Nagai, T. Successful piglet production after transfer of blastocysts produced by a modified in vitro system. *Biol. Reprod.* **2002**, *66*, 1033–1041.
31. Canovas, S.; Ivanova, E.; Romar, R.; García-Martínez, S.; Soriano-Úbeda, C.; García-Vázquez, F.A.; Saadeh, H.; Andrews, S.; Kelsey, G.; Coy, P. DNA methylation and gene expression changes derived from assisted reproductive technologies can be decreased by reproductive fluids. *Elife* **2017**, *6*, doi:10.7554/eLife.23670.

32. Koo, D.B.; Kim, N.H.; Lim, J.G.; Lee, S.M.; Lee, H.T.; Chung, K.S. Comparison of in vitro development and gene expression of in vivo- and IVM/IVF-derived porcine embryos after microinjection of foreign DNA. *Theriogenology* **1997**, *48*, 329–340, doi:10.1016/s0093-691x(97)84079-4.
33. Yoshioka, K.; Suzuki, C.; Tanaka, A.; Anas, I.M.-K.; Iwamura, S. Birth of piglets derived from porcine zygotes cultured in a chemically defined medium. *Biol. Reprod.* **2002**, *66*, 112–119, doi:10.1095/biolreprod66.1.112.
34. Alminana, C.; Gil, M.A.; Cuello, C.; Parrilla, I.; Caballero, I.; Sanchez-Osorio, J.; Vazquez, J.M.; Roca, J.; Martinez, E.A. Capability of frozen-thawed boar spermatozoa to sustain pre-implantational embryo development. *Anim. Reprod. Sci.* **2010**, *121*, 145–151, doi:10.1016/j.anireprosci.2010.05.004.
35. Bauer, B.K.; Isom, S.C.; Spate, L.D.; Whitworth, K.M.; Spollen, W.G.; Blake, S.M.; Springer, G.K.; Murphy, C.N.; Prather, R.S. Transcriptional profiling by deep sequencing identifies differences in mRNA transcript abundance in in vivo-derived versus in vitro-cultured porcine blastocyst stage embryos. *Biol. Reprod.* **2010**, *83*, 791–798, doi:10.1095/biolreprod.110.085936.
36. Gil, M.A.; Cuello, C.; Parrilla, I.; Vazquez, J.M.; Roca, J.; Martinez, E.A. Advances in Swine In vitro Embryo Production Technologies. *Reprod. Domest. Anim.* **2010**, *45*, 40–48, doi:10.1111/j.1439-0531.2010.01623.x.
37. Guerin, P.; El Mouatassim, S.; Menezo, Y. Oxidative stress and protection against reactive oxygen species in the pre-implantation embryo and its surroundings. *Hum. Reprod. Update* **2001**, *7*, 175–189, doi:10.1093/humupd/7.2.175.
38. Takahashi, M. Oxidative stress and redox regulation on in vitro development of mammalian embryos. *J. Reprod. Dev.* **2012**, *58*, 1–9, doi:10.1262/jrd.11-138n.
39. Koo, D.B.; Kim, N.H.; Lee, H.T.; Chung, K.S. Effects of fetal calf serum, amino acids, vitamins and insulin on blastocoel formation and hatching of in vivo and IVM/IVF-derived porcine embryos developing in vitro. *Theriogenology* **1997**, *48*, 791–802, doi:10.1016/s0093-691x(97)00302-6.
40. Ott, M.; Schernthaner, W.; Sinowatz, F.; Wolf, E. Effects of bovine serum albumin and estrous cow serum on development and ultrastructure of in vitro-produced porcine embryos. *Anat. Histol. Embryol.* **2002**, *31*, 151–157, doi:10.1046/j.1439-0264.2002.00384.x.
41. Van der Valk, J.; Brunner, D.; De Smet, K.; Fex Svenningsen, A.; Honegger, P.; Knudsen, L.E.; Lindl, T.; Noraberg, J.; Price, A.; Scarino, M.L.; et al. Optimization of chemically defined cell culture media--replacing fetal bovine serum in mammalian in vitro methods. *Toxicol. In vitro* **2010**, *24*, 1053–1063, doi:10.1016/j.tiv.2010.03.016.
42. Vanroose, G.; Van Soom, A.; de Kruif, A. From co-culture to defined medium: state of the art and practical considerations. *Reprod. Domest. Anim.* **2001**, *36*, 25–28, doi:10.1046/j.1439-0531.2001.00264.x.
43. Lim, K.T.; Jang, G.; Ko, K.H.; Lee, W.W.; Park, H.J.; Kim, J.J.; Lee, S.H.; Hwang, W.S.; Lee, B.C.; Kang, S.K. Improved in vitro bovine embryo development and increased efficiency in producing viable calves using defined media. *Theriogenology* **2007**, *67*, 293–302, doi:https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2006.07.011.
44. Gómez, E.; Carrocera, S.; Martin, D.; Sánchez-Calabuig, M.J.; Gutiérrez-Adán, A.; Murillo, A.; Muñoz, M. Hepatoma-derived growth factor: Protein quantification in uterine fluid, gene expression in endometrial-cell culture and effects on in vitro embryo development, pregnancy and birth. *Theriogenology* **2017**, *96*, 118–125, doi:10.1016/j.theriogenology.2017.04.008.
45. Martinez, E.A.; Cuello, C.; Parrilla, I.; Martinez, C.A.; Nohalez, A.; Vazquez, J.L.; Vazquez, J.M.; Roca, J.; Gil, M.A. Recent advances toward the practical application of embryo transfer in pigs. *Theriogenology* **2016**, *85*, 152–161, doi:10.1016/j.theriogenology.2015.06.002.
46. Rodriguez-Martinez, H. Assisted reproductive techniques for cattle breeding in developing countries: a critical appraisal of their value and limitations. *Reprod. Domest. Anim.* **2012**, *47 Suppl 1*, 21–26, doi:10.1111/j.1439-0531.2011.01961.x.

47. Hazeleger, W.; Kemp, B. Recent developments in pig embryo transfer. *Theriogenology* **2001**, *56*, 1321–1331, doi:10.1016/s0093-691x(01)00633-1.
48. Martinez, E.A.; Caamaño, J.N.; Gil, M.A.; Rieke, A.; McCauley, T.C.; Cantley, T.C.; Vazquez, J.M.; Roca, J.; Vazquez, J.L.; Didion, B.A.; et al. Successful nonsurgical deep uterine embryo transfer in pigs. *Theriogenology* **2004**, *61*, 137–146, doi:10.1016/S0093-691X(03)00190-0.
49. Martinez, E.A.; Martinez, C.A.; Cambra, J.M.; Maside, C.; Lucas, X.; Vazquez, J.L.; Vazquez, J.M.; Roca, J.; Rodriguez-Martinez, H.; Gil, M.A.; et al. Achievements and future perspectives of embryo transfer technology in pigs. *Reprod. Domest. Anim.* **2019**, *54 Suppl 4*, 4–13, doi:10.1111/rda.13465.
50. Geisert, R.D.; Schmitt, R.A.M. Early embryonic survival in the pig: Can it be improved? *J. Anim. Sci.* **2002**, *80*, E54–E65, doi:10.2527/animalsci2002.0021881200800ES10009x.
51. Veenstra van Nieuwenhoven, A.L.; Heineman, M.J.; Faas, M.M. The immunology of successful pregnancy. *Hum. Reprod. Update* **2003**, *9*, 347–357, doi:10.1093/humupd/dmg026.
52. Tilburgs, T.; Roelen, D.L.; van der Mast, B.J.; de Groot-Swings, G.M.; Kleijburg, C.; Scherjon, S.A.; Claas, F.H. Evidence for a selective migration of fetus-specific CD4+CD25bright regulatory T cells from the peripheral blood to the decidua in human pregnancy. *J. Immunol.* **2008**, *180*, 5737–5745, doi:10.4049/jimmunol.180.8.5737.
53. Dimitriadis, E.; White, C.A.; Jones, R.L.; Salamonsen, L.A. Cytokines, chemokines and growth factors in endometrium related to implantation. *Hum. Reprod. Update* **2005**, *11*, 613–630, doi:10.1093/humupd/dmi023.
54. Waclawik, A.; Kaczmarek, M.M.; Blitek, A.; Kaczynski, P.; Ziecik, A.J. Embryo-maternal dialogue during pregnancy establishment and implantation in the pig. *Mol. Reprod. Dev.* **2017**, *84*, 842–855, doi:10.1002/mrd.22835.
55. Weitze, K.; Rath, D.; Willmen, T.; Waberski, D.; Lotz, J. Advancement of Ovulation in the Sow Related to Seminal Plasma Application before Insemination. *Reprod. Domest. Anim.* **1990**, *25*, 61–67, doi:https://doi.org/10.1111/j.1439-0531.1990.tb00682.x.
56. O’Leary, S.; Jasper, M.J.; Robertson, S.A.; Armstrong, D.T. Seminal plasma regulates ovarian progesterone production, leukocyte recruitment and follicular cell responses in the pig. *Reproduction* **2006**, *132*, 147–158, doi:10.1530/rep.1.01119.
57. Rodríguez-Martínez, H.; Kvist, U.; Saravia, F.; Wallgren, M.; Johannisson, A.; Sanz, L.; Peña, F.J.; Martínez, E.A.; Roca, J.; Vázquez, J.M.; et al. The physiological roles of the boar ejaculate. *Soc. Reprod. Fertil. Suppl.* **2009**, *66*, 1–21.
58. O’Leary, S.; Jasper, M.J.; Warnes, G.M.; Armstrong, D.T.; Robertson, S.A. Seminal plasma regulates endometrial cytokine expression, leukocyte recruitment and embryo development in the pig. *Reproduction* **2004**, *128*, 237–247, doi:10.1530/rep.1.00160.
59. Schjenken, J.E.; Robertson, S.A. The Female Response to Seminal Fluid. *Physiol. Rev.* **2020**, *100*, 1077–1117, doi:10.1152/physrev.00013.2018.
60. Crawford, G.; Ray, A.; Gudi, A.; Shah, A.; Homburg, R. The role of seminal plasma for improved outcomes during in vitro fertilization treatment: review of the literature and meta-analysis. *Hum. Reprod. Update* **2015**, *21*, 275–284, doi:10.1093/humupd/dmu052.
61. Roca, J.; Gil, M.A.; Hernandez, M.; Parrilla, I.; Vazquez, J.M.; Martinez, E.A. Survival and fertility of boar spermatozoa after freeze-thawing in extender supplemented with butylated hydroxytoluene. *J. Androl.* **2004**, *25*, 397–405.
62. Pursel, V.G.; Johnson, L.A. Freezing of boar spermatozoa: fertilizing capacity with concentrated semen and a new thawing procedure. *J. Anim. Sci.* **1975**, *40*, 99–102, doi:10.2527/jas1975.40199x.

63. Abeydeera, L.R.; Day, B.N. In vitro penetration of pig oocytes in a modified Tris-buffered medium: effect of BSA, caffeine and calcium. *Theriogenology* **1997**, *48*, 537–544.
64. Martinez, E.A.; Angel, M.A.; Cuello, C.; Sanchez-Osorio, J.; Gomis, J.; Parrilla, I.; Vila, J.; Colina, I.; Diaz, M.; Reixach, J.; et al. Successful non-surgical deep uterine transfer of porcine morulae after 24 hour culture in a chemically defined medium. *PLoS One* **2014**, *9*, e104696, doi:10.1371/journal.pone.0104696.
65. Wright, J. Photographic illustrations of embryo developmental stage and quality codes. In *Man. Int. Embryo Transf. Soc. IETS, Savoy, Illinois, USA*; 1998; pp. 167–170.
66. Martinez, E.A.; Martinez, C.A.; Nohalez, A.; Sanchez-Osorio, J.; Vazquez, J.M.; Roca, J.; Parrilla, I.; Gil, M.A.; Cuello, C. Nonsurgical deep uterine transfer of vitrified, in vivo-derived, porcine embryos is as effective as the default surgical approach. *Sci. Rep.* **2015**, *5*, 10587, doi:10.1038/srep10587.
67. Cremades, T.; Roca, J.; Rodriguez-Martinez, H.; Abaigar, T.; Vazquez, J.M.; Martinez, E.A. Kinematic changes during the cryopreservation of boar spermatozoa. *J. Androl.* **2005**, *26*, 610–618, doi:10.2164/jandrol.05028.
68. Martinez-Alborcia, M.J.; Valverde, A.; Parrilla, I.; Vazquez, J.M.; Martinez, E.A.; Roca, J. Detrimental effects of non-functional spermatozoa on the freezability of functional spermatozoa from boar ejaculate. *PLoS One* **2012**, *7*, e36550, doi:10.1371/journal.pone.0036550.
69. Wydooghe, E.; Vandaele, L.; Beek, J.; Favoreel, H.; Heindryckx, B.; De Sutter, P.; Van Soom, A. Differential apoptotic staining of mammalian blastocysts based on double immunofluorescent CDX2 and active caspase-3 staining. *Anal. Biochem.* **2011**, *416*, 228–230, doi:10.1016/j.ab.2011.05.033.
70. Nohalez, A.; Martinez, C.A.; Parrilla, I.; Roca, J.; Gil, M.A.; Rodriguez-Martinez, H.; Martinez, E.A.; Cuello, C. Exogenous ascorbic acid enhances vitrification survival of porcine in vitro-developed blastocysts but fails to improve the in vitro embryo production outcomes. *Theriogenology* **2018**, *113*, 113–119, doi:10.1016/j.theriogenology.2018.02.014.
71. McCloy, R.A.; Rogers, S.; Caldon, C.E.; Lorca, T.; Castro, A.; Burgess, A. Partial inhibition of Cdk1 in G 2 phase overrides the SAC and decouples mitotic events. *Cell Cycle* **2014**, *13*, 1400–1412, doi:10.4161/cc.28401.
72. Untergasser, A.; Nijveen, H.; Rao, X.; Bisseling, T.; Geurts, R.; Leunissen, J.A.M. Primer3Plus, an enhanced web interface to Primer3. *Nucleic Acids Res.* **2007**, *35*, W71–W74, doi:10.1093/nar/gkm306.
73. NCBI resource coordinators Database resources of the National Center for Biotechnology Information. *Nucleic Acids Res.* **2016**, *44*, D7-19, doi:10.1093/nar/gkv1290.
74. Pfaffl, M.W. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Res.* **2001**, *29*, e45, doi:10.1093/nar/29.9.e45.
75. Bolstad, B.M.; Irizarry, R.A.; Astrand, M.; Speed, T.P. A comparison of normalization methods for high density oligonucleotide array data based on variance and bias. *Bioinformatics* **2003**, *19*, 185–193, doi:10.1093/bioinformatics/19.2.185.
76. Kanehisa, M. The KEGG database. *Novartis Found. Symp.* **2002**, *247*, 91-93,119-128,244-252.
77. Alvarez-Rodriguez, M.; López-Bejar, M.; Rodriguez-Martinez, H. The risk of using monoclonal or polyclonal commercial antibodies: controversial results on porcine sperm CD44 receptor identification. *Reprod. Domest. Anim.* **2019**, *54*, 733–737, doi:10.1111/rda.13415.
78. Feldman, A.T.; Wolfe, D. Tissue processing and hematoxylin and eosin staining. *Methods Mol. Biol.* **2014**, *1180*, 31–43, doi:10.1007/978-1-4939-1050-2_3.

ARTICLES

Section I

1

High pre-freezing sperm dilution improves monospermy without affecting the penetration rate in porcine IVF.

2

Supplementation with exogenous coenzyme Q10 to media for in vitro maturation and embryo culture fails to promote the developmental competence of porcine embryos.

3

N-(2-mercaptopropionyl)-glycine enhances in vitro pig embryo production and reduces oxidative stress.

4

The cytokine platelet factor 4 successfully replaces bovine serum albumin for the in vitro culture of porcine embryos.

5

Transcriptional profiling of porcine blastocysts produced in vitro in a chemically defined culture medium

Section II

6

Blastocyst-Bearing Sows Display a Dominant Anti-Inflammatory Cytokine Profile Compared to Cyclic Sows at Day 6 of the Cycle

7

Allogeneic Embryos Disregulate Leukemia Inhibitory Factor (LIF) and Its Receptor in the Porcine Endometrium During Implantation.

8

Seminal Plasma Modifies the Transcriptional Pattern of the Endometrium and Advances Embryo Development in Pigs.

9

Seminal Plasma Induces Overexpression of Genes Associated with Embryo Development and Implantation in Day-6 Porcine Blastocysts.

ARTICLE 1

High pre-freezing sperm dilution improves monospermy without affecting the penetration rate in porcine IVF.

Martinez, C.A.; Cambra, J.M.; Maside, C.; Cuello, C.; Roca, J.; Martinez, E.A.; Parrilla, I.; Gil, M.A.



DOI: 10.1016/j.theriogenology.2019.04.001
<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30974393/>

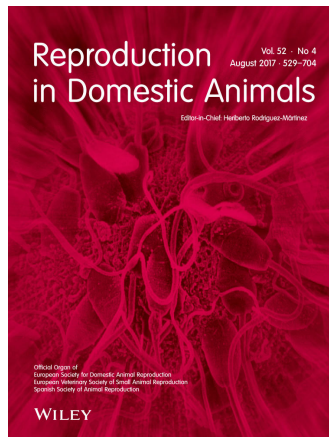
ABSTRACT

The high incidence of polyspermy is still an unresolved problem for the production of in vitro-produced porcine embryos. In this work, we modified the usual sperm processing sequence for in vitro fertilization (IVF), and the spermatozoa from four boars were frozen directly at a low sperm concentration of 20×10^6 sperm/mL (high pre-freezing sperm dilution group; F20), thawed and processed for IVF in three replicates. Spermatozoa from the same boars frozen at a conventional concentration (1000×10^6 sperm/mL) were used as the control group. The post-thaw sperm quality evaluation demonstrated that despite there being no differences in the percentage of motile spermatozoa between groups, the proportion of live spermatozoa with intact acrosomes was significantly higher in the F20 group than in the control. The in vitro penetration rate was also similar between groups; however, the co-incubation of oocytes with F20 sperm increased monospermy, IVF efficiency, cleavage rate and the efficiency of blastocyst formation compared with the results for oocytes co-incubated with control spermatozoa. These results indicate, for the first time, that a high pre-freezing sperm dilution increases monospermy without affecting penetration rates, thereby increasing blastocyst formation.

ARTICLE 2

Supplementation with exogenous coenzyme Q10 to media for in vitro maturation and embryo culture fails to promote the developmental competence of porcine embryos.

Maside, C.; Martinez, C.A.; Cambra, J.M.; Lucas, X.; Martinez, E.A.; Gil, M.A.; Rodriguez-Martinez, H.; Parrilla, I.; Cuello, C.



DOI: 10.1111/rda.13486

<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31625244/>

ABSTRACT

The coenzyme Q10 (CoQ10) is a potent antioxidant with critical protection role against cell oxidative stress, caused by the mitochondrial dysfunction. This study evaluated the effects of CoQ10 supplementation to in vitro maturation (IVM) or embryo culture media on the maturation, fertilization and subsequent embryonic development of pig oocytes and embryos. Maturation (Experiment 1) or embryo culture (Experiment 2) media were supplemented with 0 (control), 10, 25, 50 and 100 μM CoQ10. The addition of 10–50 μM CoQ10 to the IVM medium did not affect the percentage of MII oocytes nor the fertilization or the parameters of subsequent embryonic development. Exogenous CoQ10 in the culture medium neither did affect the development to the 2–4-cell stage nor rates of blastocyst formation. Moreover, the highest concentration of CoQ10 (100 μM) in the maturation medium negatively affected blastocyst rates. In conclusion, exogenous CoQ10 supplementation of maturation or embryo culture media failed to improve the outcomes of our in vitro embryo production system and its use as an exogenous antioxidant should not be encouraged.

ARTICLE 3

N-(2-mercaptopropionyl)-glycine enhances in vitro pig embryo production and reduces oxidative stress.

Cambra, J.M.; Martinez, C.A.; Rodriguez-Martinez, H.; Martinez, E.A.; Cuello, C.;
Gil, M.A



DOI: 10.1038/s41598-020-75442-6
<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33122658/>

ABSTRACT

This study evaluated the effects of different concentrations (1, 10, 25, 50, and 100 μM) of the antioxidant N-(2-mercaptopropionyl)-glycine (NMPG), during the culture of in vitro-fertilized porcine oocytes. While the highest concentrations of NMPG (50 and 100 μM) were toxic to the developing embryos during the first two days of culture, 25 μM NMPG achieved cleavage rates that were similar to those achieved by the control but did not sustain blastocyst production by Day 7 of culture. Compared to the control culture medium, the culture medium supplemented with 10 μM NMPG increased ($P < 0.05$) the rates of blastocyst formation, decreased ($P < 0.05$) the intracellular levels of reactive oxygen substances, and downregulated ($P < 0.05$) the expression of the oxidative stress related gene GPX1. In conclusion, these results demonstrated that supplementation of porcine embryo culture medium with 10 μM NMPG can attenuate oxidative stress and increase the yield of in vitro production of blastocysts.

ARTICLE 4

The cytokine platelet factor 4 successfully replaces bovine serum albumin for the in vitro culture of porcine embryos.

Cambra, J.M.; Martinez, C.A.; Maside, C.; Rodriguez-Martinez, H.; Martinez, E.A.;
Gil, M.A.; Cuello, C.



DOI: 10.1016/j.theriogenology.2019.11.009
<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31748174/>

ABSTRACT

The cytokine platelet factor 4 (PF4) enhances differentiation and cell viability of different stem cells lines in vitro. This study investigated whether PF4 addition to customary pig embryo semi-defined culture media can improve their developmental outcome (Experiment 1) and ultimately replace the need for bovine serum albumin (BSA, Experiment 2). Experiment 1 added PF4 (100-1000 ng/mL, 0 = control) to NCSU-23 with 0.4 mg/mL BSA culturing 3430 presumptive zygotes. Experiment 2 added PF4 (100 e1000 ng/mL, 0 = Control-PVA) to a BSA-free medium (NCSU-23 with 0.3 mg/mL PVA) culturing 3820 presumptive zygotes. Zygote culture in NCSU-23 with 0.4 mg/mL BSA was used as overall control. All groups of Experiment 1 displayed similar rates of day 2-cleavage (range: 65.0 ± 10.9 to $70.0 \pm 5.8\%$); of day 7-blastocyst rates (range: 46.6 ± 10.0 to $56.4 \pm 8.2\%$) and of total day 7-blastocyst efficiency (range: 32.3 ± 8.3 to $37.2 \pm 7.3\%$). Addition of PF4 did not affect total cell numbers of day 7 blastocysts (range: 44.1 ± 23.2 to 50.5 ± 26.4). In Experiment 2, PF4 accelerated embryo development, increasing ($P < 0.01$) blastocyst yield compared to 0-PF4, and blastocyst formation by day 5 adding PF4 100e500 ng/mL (range: 29.9 ± 7.8 to $31.8 \pm 5.5\%$; $P < 0.05$) compared with BSA-control ($17.2 \pm 8.2\%$) and PF4 1000 ng/mL ($15.5 \pm 7.9\%$); showing similar blastocyst rates (range: 42.0 ± 11.5 to $49.3 \pm 10.0\%$), total efficiency (28.0 ± 8.2 to $32.3 \pm 7.1\%$) total cell numbers (range: 42.6 ± 19.3 to 45.7 ± 23.9) as BSA-controls. In conclusion, although PF4 did not show additive improvement under usual semi-defined, BSA-supplemented embryo media, it successfully replaced BSA sustaining porcine blastocyst production in chemically defined conditions.

ARTICLE 5

Transcriptional profiling of porcine blastocysts produced in vitro in a chemically defined culture medium

Cambra, J.M.; Martinez, E.A.; Rodriguez-Martinez, H.; Gil, M.A.; Cuello, C.

animals



DOI: 10.3390/ani11051414

<https://www.mdpi.com/2076-2615/11/5/1414/html>

ABSTRACT

The development of chemically defined media is a growing trend in in vitro embryo production (IVP). Recently, traditional undefined culture medium with bovine serum albumin (BSA) has been successfully replaced by a chemically defined medium using substances with embryotrophic properties such as platelet factor 4 (PF4). Although the use of this medium sustains IVP, the impact of defined media on the embryonic transcriptome has not been fully elucidated. This study analyzed the transcriptome of porcine IVP blastocysts, cultured in defined (PF4 group) and undefined media (BSA group) by microarrays. In vivo-derived blastocysts (IVV group) were used as a standard of maximum embryo quality. The results showed no differentially expressed genes (DEG) between the PF4 and BSA groups. However, a total of 2780 and 2577 DEGs were detected when comparing the PF4 or the BSA group with the IVV group, respectively. Most of these genes were common in both in vitro groups (2132) and present in some enriched pathways, such as cell cycle, lysosome and/or metabolic pathways. These results show that IVP conditions strongly affect embryo transcriptome and that the defined culture medium with PF4 is a guaranteed replacement for traditional culture with BSA.

ARTICLE 6

Blastocyst-Bearing Sows Display a Dominant Anti-Inflammatory Cytokine Profile Compared to Cyclic Sows at Day 6 of the Cycle.

Parrilla, I.; Martinez, C.A.; Cambra, J.M.; Lucas, X.; Ferreira-Dias, G.; Rodriguez-Martinez, H.; Cuello, C.; Gil, M.A.; Martinez, E.A.

animals



DOI: 10.3390/ani10112028

<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33158034/>

ABSTRACT

In the context of porcine embryo transfer (ET) technology, understanding the tightly regulated local uterine immune environment is crucial to achieve an adequate interaction between the transferred embryos and the receiving endometrium. However, information is limited on the uterine immune status of cyclic-recipient sows when receiving embryos during ET. The present study postulated that the anti- and proinflammatory cytokine profile 6 days after the onset of estrus differs between endometria from uninseminated cyclic sows and blastocyst-bearing sows. On Day 6 of the cycle, endometrial explants were collected from sows inseminated or not inseminated during the postweaning estrus and cultured for 22 h. The culture medium was then analyzed for the contents of a total of 16 cytokines using Luminex MAP[®] technology. The results showed important differences in the endometrial production of most cytokines between the sow categories, with a predominant anti-inflammatory environment displayed by the blastocyst-bearing endometria. These findings suggest that sperm, seminal plasma (SP) and/or early embryos modify the uterine environment by inducing an immune-tolerant cytokine profile already visible at Day 6. Whether the SP or some of its active components may help to develop strategies to maximize the reproductive performance of recipients after ET needs further investigation.

ARTICLE 7

Allogeneic Embryos Disregulate Leukemia Inhibitory Factor (LIF) and Its Receptor in the Porcine Endometrium During Implantation.

Cambra, J.M.; Jauregi-Miguel, A.; Alvarez-Rodriguez, M.; Parrilla, I.; Gil, M.A.;
Martinez, E.A.; Cuello, C.; Rodriguez-Martinez, H.; Martinez, C.A.



DOI: 10.3389/fvets.2020.611598

<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33330727/>

ABSTRACT

Despite its advantages for pig breeding, embryo transfer (ET) has a major handicap: high embryo mortality during the pre- and implantation period, probably caused by divergent phenomena of tolerance between the immunologically unrelated (i.e., allogeneic) embryos and the recipient sow. Thus, to reach a similar maternal tolerance as in conventional breeding by artificial insemination (AI) would be the key to ET-success. For this reason, we studied the expression of the leukemia inhibitory factor (LIF) cytokine and its receptor in the pig endometrium during the implantation period (days 18 and 24) in sows subjected to ET (AL group) vs. post-cervical-AI controls (Hemi-AL group). Quantification of expression was performed at both mRNA (rt-qPCR) and protein (WB) levels. The expression of endometrial LIF on day 24 was considerably lower in ET than in AI pregnancies. Correlations between endometrial mRNA levels of LIF and LIF-R showed that, contrary to early AI-pregnancies, ET-pregnancies lack an inverse relation between cytokine and receptor levels. In conclusion, ET-pregnancies lack sufficient endometrial levels of LIF to develop adequate immunotolerance mechanisms to prevent the rejection of allogeneic ET-embryos.

ARTICLE 8

Seminal Plasma Modifies the Transcriptional Pattern of the Endometrium and Advances Embryo Development in Pigs.

Martinez, C.A.; Cambra, J.M.; Parrilla, I.; Roca, J.; Ferreira-Dias, G.; Pallares, F.J.; Lucas, X.; Vazquez, J.M.; Martinez, E.A.; Gil, M.A.; Rodriguez-Martinez, H.; Cuello, C.; Alvarez-Rodriguez, M.



DOI: 10.3389/fvets.2019.00465
<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31921921/>

ABSTRACT

Background: Seminal plasma (SP) promotes sperm survival and fertilizing capacity, and potentially affects embryo development, presumably via specific signaling pathways to the internal female genital tract. Objectives: This study evaluated how heterologous SP, infused immediately before postcervical artificial insemination (AI) affected embryo development and the transcriptional pattern of the pig endometria containing embryos.

Materials and Methods: Postweaning estrus sows ($n = 34$) received 40-mL intrauterine infusions of either heterologous pooled SP or Beltsville Thawing Solution (BTS; control) 30min before AI of semen extended to 10% of homologous SP. Embryos (all sows) and endometrium samples (3 sows/group) were removed during laparotomy 6 days after the infusion of SP or BTS to morphologically evaluate the embryos to determine their developmental stage and to analyze the endometrial transcriptome using microarrays (PORGENE 1.0 ST GeneChip array, Affymetrix) followed by qPCR for further validation.

Results: Embryo viability was equal between the groups ($\sim 93\%$), but embryo development was significantly ($P < 0.05$) more advanced in the SP-treated group compared to control. A total of 1,604 endometrium transcripts were differentially expressed in the SP group compared to the control group. An enrichment analysis showed an overrepresentation of genes and pathways associated with the immune response, cytokine signaling, cell cycle, cell adhesion, and hormone response, among others.

Conclusions: SP infusions prior to AI positively impacted the preimplantation embryo development and altered the expression of the endometrial genes and pathways potentially involved in embryo development.

ARTICLE 9

Seminal Plasma Induces Overexpression of Genes Associated with Embryo Development and Implantation in Day-6 Porcine Blastocysts.

Martinez, C.A.; Cambra, J.M.; Gil, M.A.; Parrilla, I.; Alvarez-Rodriguez, M.; Rodriguez-Martinez, H.; Cuello, C.; Martinez, E.A.

International Journal of
Molecular Sciences



DOI: 10.3390/ijms21103662

<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32455957/>

ABSTRACT

The infusion of boar seminal plasma (SP) before artificial insemination (AI) positively alters the expression of endometrial genes and pathways involved in embryo development. This study aimed to determine which transcriptome changes occur in preimplantation embryos in response to SP infusions during estrus. Postweaning estrus sows received 40-mL intrauterine infusions of either SP (N = 6) or BTS extender (control group; N = 6) 30 min before each of two post-cervical AIs. On Day 6, embryos were surgically collected and analyzed for differential gene expression. Microarray analysis of embryos revealed 210 annotated genes, differentially expressed (p -value < 0.05 and fold change ≥ 2) in SP-blastocysts, compared to controls. Most of these genes were associated with biological, cellular, metabolic and developmental processes. The pathways enriched among the upregulated genes related to signal transduction, cellular processes and the endocrine system. Among altered genes involved in these pathways, the SP-group showed a conspicuous overexpression of ApoA-I, CDK1, MAPK1, SMAD2, PRKAA1 and RICTOR, with reported key roles in embryo development, implantation, or progression of pregnancy. In conclusion, the results demonstrate that SP infusions prior to AI upregulates the expression of embryo development related genes in Day 6 pig embryos.

APPENDIX

APPENDIX

GRAPHIC APPENDIX

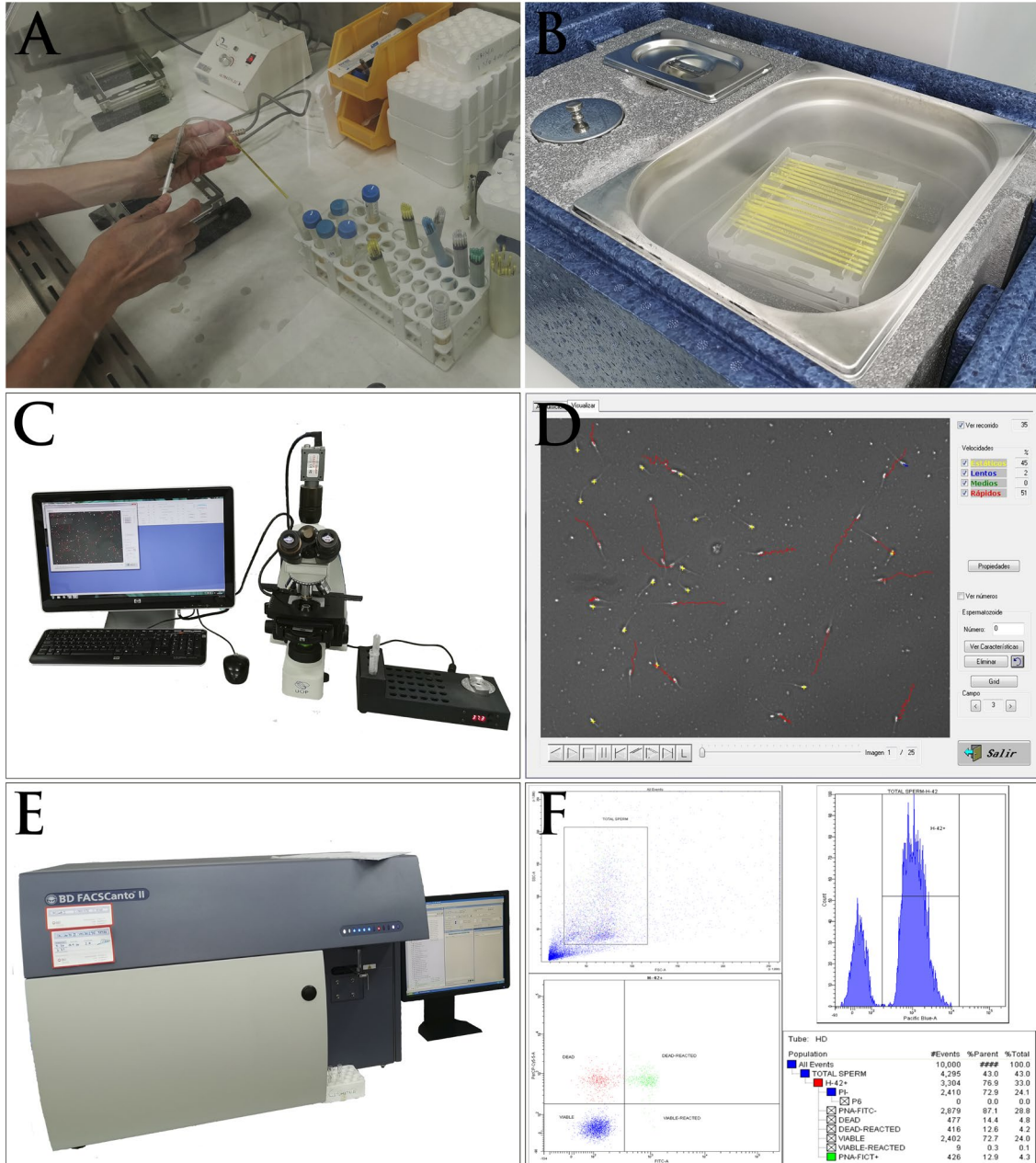


Figure 1. Porcine semen cryopreservation process and quality assessment. Packaging of the straws with the semen samples extended in media supplemented with cryoprotectants (**A**). Cooling of straws over liquid nitrogen vapors (**B**). Integrated Semen Analysis System (ISAS[®]; Proiser R + D, Paterna, Spain) for sperm motility assessment (**C**). Capture of the semen sample for motility assessment (**D**). BD FACS Canto II flow cytometer (Becton Dickinson & Company, Franklin Lakes, NJ, USA) (**E**). Dot plots and histograms for the assessment of sperm viability and acrosomal integrity by triple staining. (**F**).

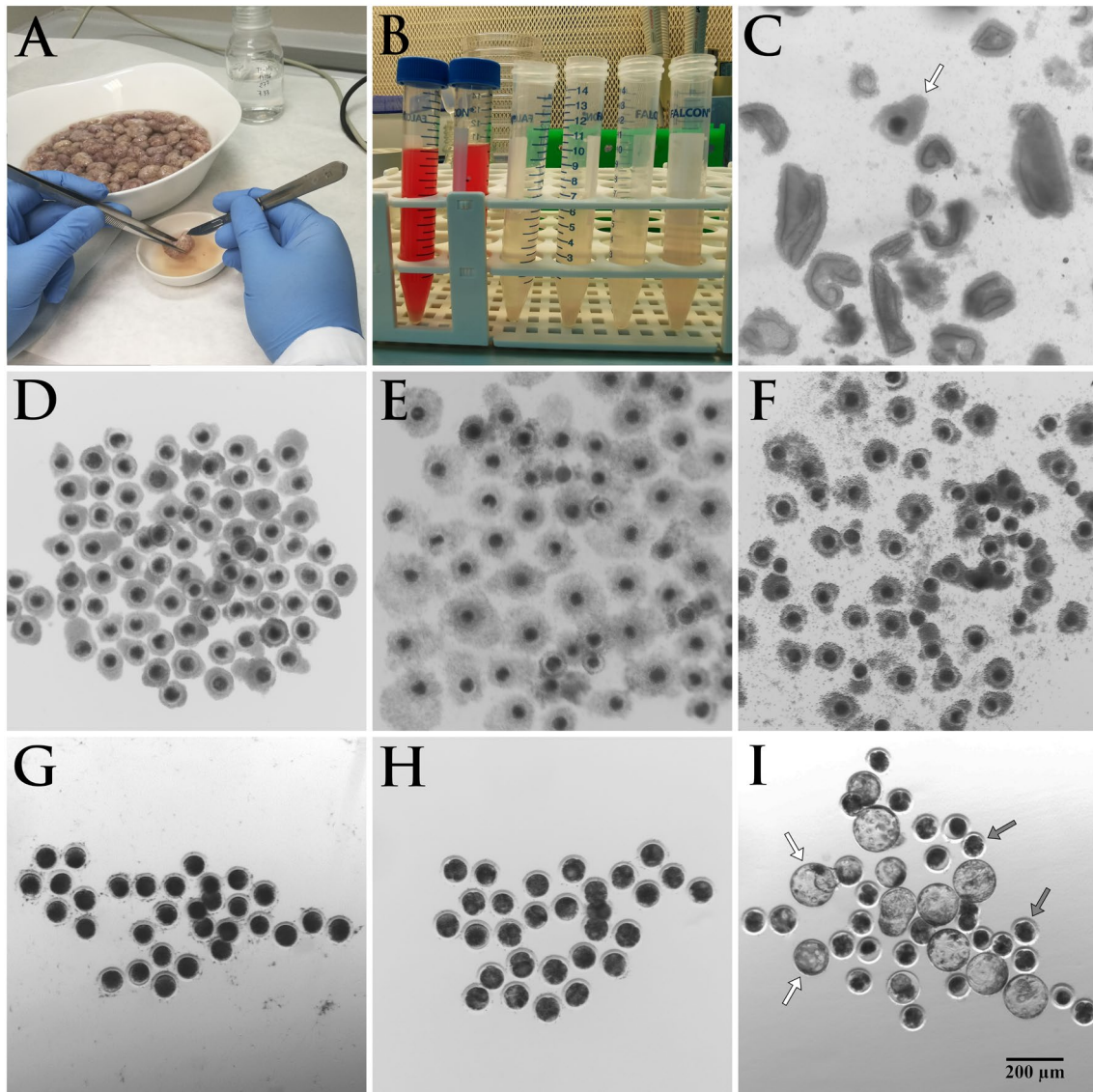


Figure 2. Different stages of the process for the *in vitro* production of porcine embryos. Sectioning of ovarian follicles for cumulus-oocyte complexes (COCs) collection (**A**). Sedimentation and washing of the collection tubes (**B**). Stereomicroscope image of the sediment obtained (**C**), with a COC meeting the selection criteria: dense, granular ooplasm, surrounded by at least two layers of cumulus cells (white arrow). COCs selected to initiate the *in vitro* maturation (IVM) stage (**D**). COCs after 22 h of IVM (**E**). COCs after 44 h of IVM (**F**). Oocytes after 5 h of co-culture with spermatozoa. Note the sperm attached to the zona pellucida (**G**). Embryos after 2 days of *in vitro* culture, in the middle of the cleavage process (**H**). Embryos after 7 days of *in vitro* culture (**I**); note the blastocysts at different stages of development (white arrows) and the arrested embryos (grey arrows).

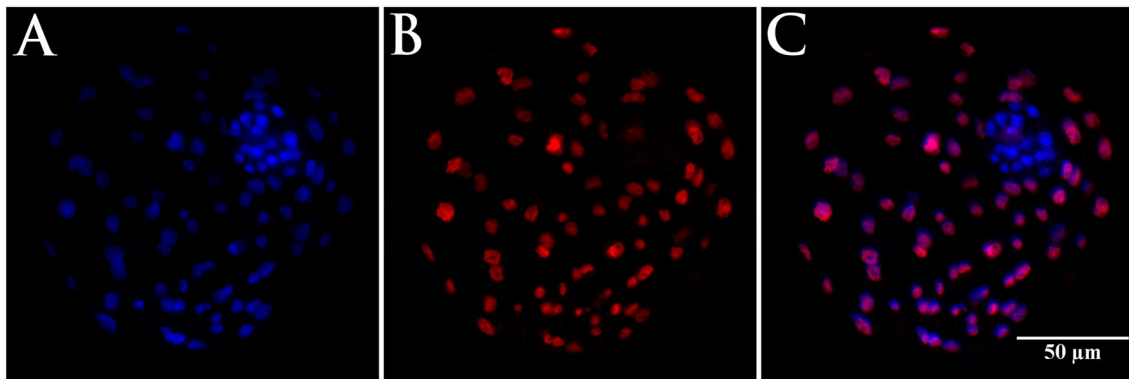


Figure 3. Differential staining performed on *in vitro* produced day 7 blastocysts. Total cells stained with Hoechst-33342, with nuclei displaying blue fluorescence (**A**). Trophoblast cells labeled with anti-CDX2, with nuclei displaying red fluorescence (**B**). Merging of images, A and B, with the nuclei of the trophoblast cells displaying in purple and those of the inner cell mass cells displaying in blue (**C**).

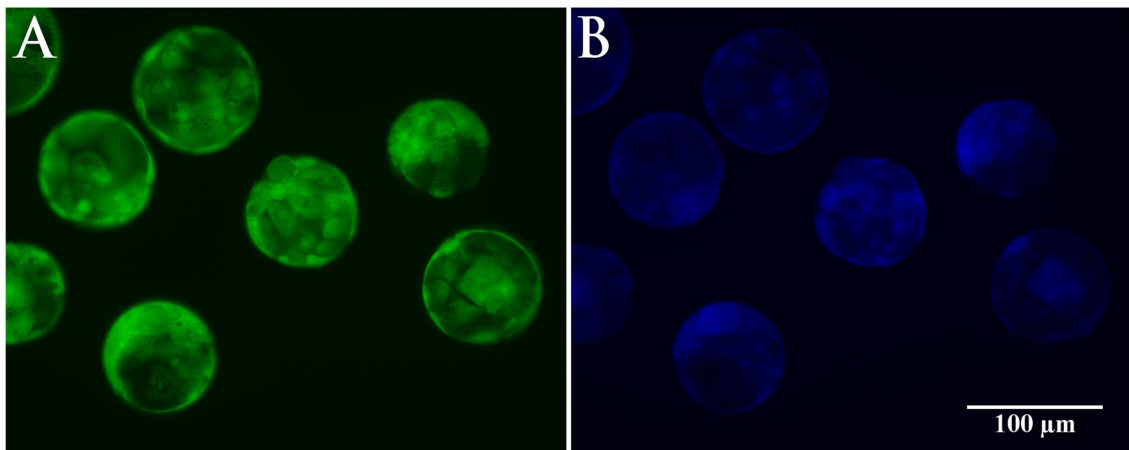


Figure 4. Determination of reactive oxygen species (ROS) and glutathione (GSH) levels. Blastocysts stained with 2',7'-dichlorodihydrofluorescein diacetate, displaying green fluorescence proportional to the intracellular ROS content (**A**). Blastocysts stained with CellTracker Blue, displaying blue fluorescence proportional to the intracellular GSH content (**B**).



Figure 5. Stages for the process of surgical embryo collection in swine. Donor sows housed in their crates after insemination (**A**). Induction of anaesthetic with sodium thiopental (**B**). Laparotomy procedure with midline incision (**C**). Exposure of the genital tract and corpora lutea count (**D**). Perforation of the uterine wall with Adson forceps for catheter insertion (**E**). Insertion of a blunt needle connected to the syringe with the medium, next to the uterotubal junction (**F**). Flushing of the proximal portion of the uterine horn and collection of the medium with the embryos in the collection tube (**G**). Washing of the collection tube (**H**) and visualization of the embryos using a stereomicroscope (**F**); detail of *in vivo* derived blastocysts after collection.

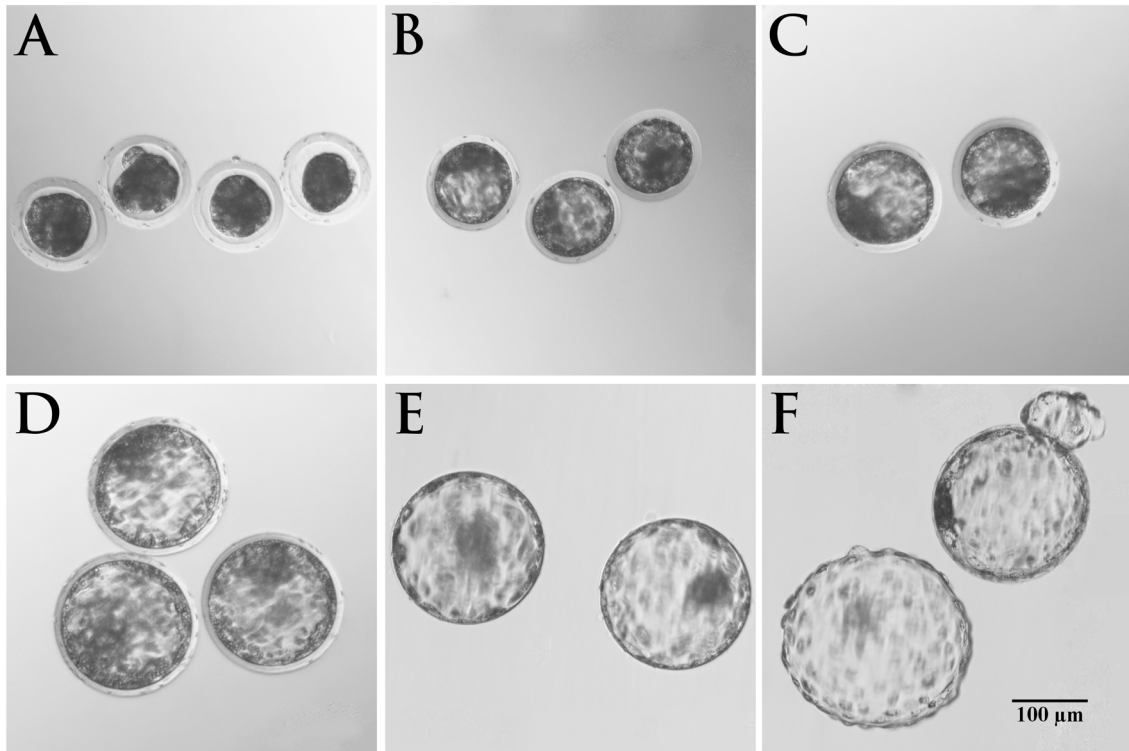


Figure 6. Different developmental stages of *in vivo* derived embryos. Compact morulae (A). Early blastocysts (B). Full blastocysts (C). Expanded blastocysts (D). Perihatching blastocysts (E). Hatching (upper right) and hatched (lower left) blastocysts (F).

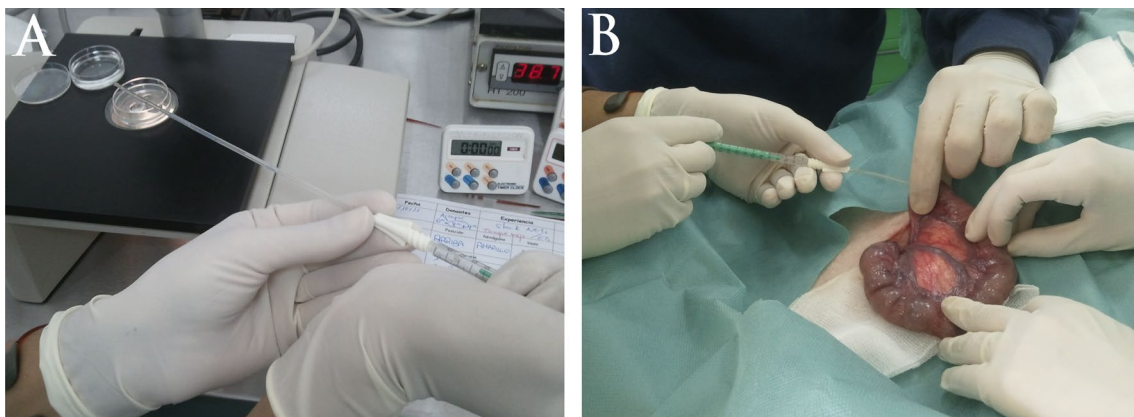


Figure 7. Process for the surgical transfer of porcine embryos. Loading of embryos into the transfer catheter (A). Insertion of the catheter through the uterine wall in the proximal portion of the horn, in the direction of the utero-tubal junction (B).

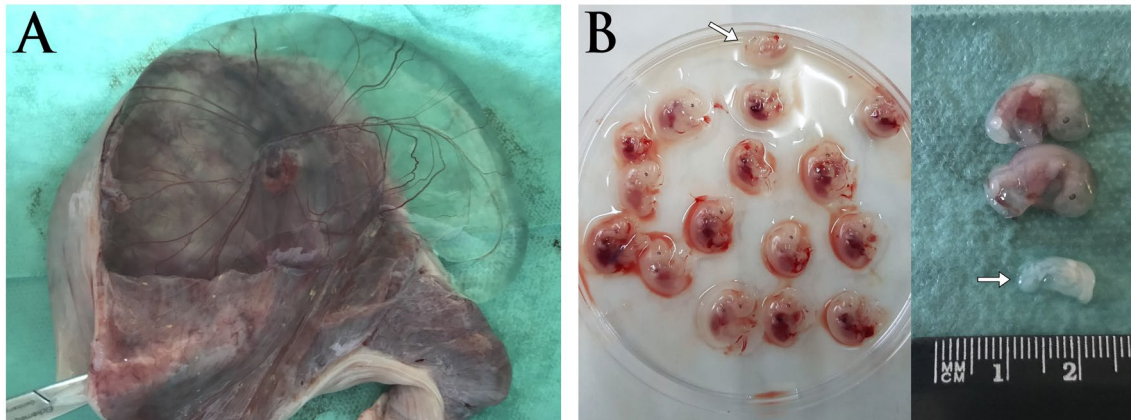


Figure 8. Endometrial sampling and evaluation of fetal development. Uterine horn opened longitudinally to visualize the amniotic sacs and endometrial areas of implantation for sampling (A). Fetuses obtained to confirm pregnancy status (B). Fetuses obtained from one recipient sow (left) and detail of fetuses with different development (right). White arrows indicate unviable fetuses, with delayed development and little or absent vascularization.

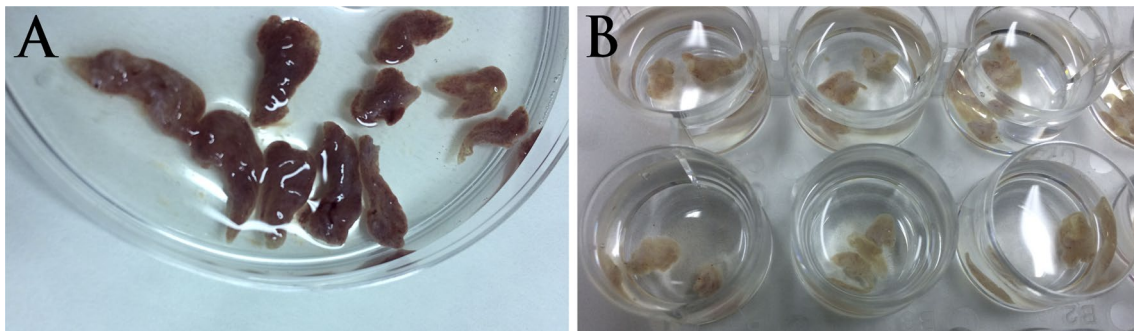


Figure 9. Endometrial explants. Endometrial tissue strips being washed (A). Explant culture (B).

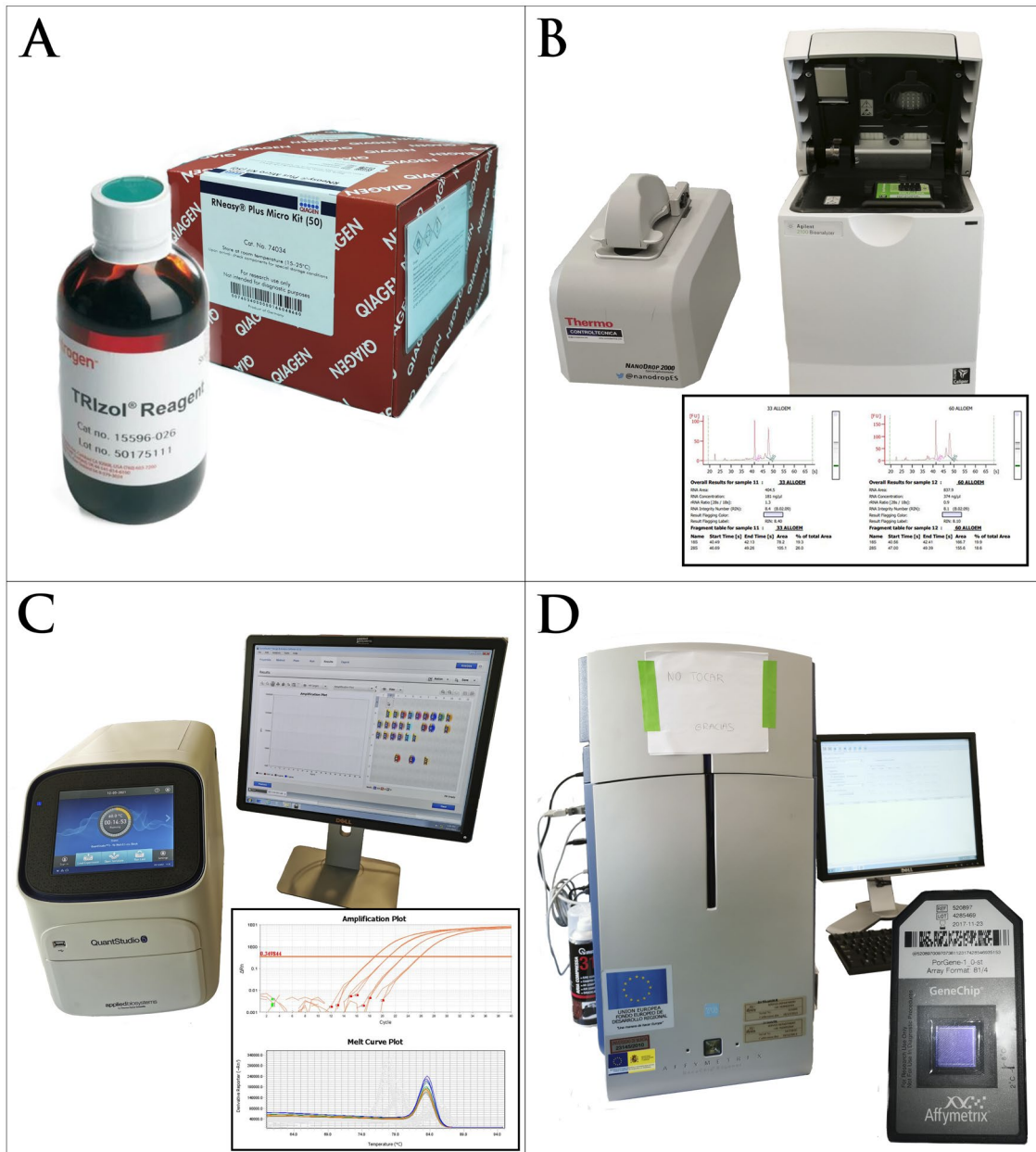


Figure 10. Reagents and equipment used for q-PCR and microarray assays. Kits used for RNA extraction. TRIzol (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) reagent for endometrial tissue RNA isolation and RNeasy Plus Micro Kit (Qiagen, Hilden, Germany) for embryonic RNA isolation (**A**). Equipment to determine the quantity and quality of extracted RNA. NanoDrop 2000/2000c Spectrophotometer (Thermo Scientific NanoDrop2000) and Agilent 2100 bioanalyzer (Agilent Technologies, Palo Alto, CA, USA) (**B**). QuantStudio™ 5 Flex (Applied Biosystems, Foster City, California, USA) thermal cycler for performing q-PCRs (**C**). Affymetrix GeneChip scanner GCS3000 for array reading and GeneChip Porcine Genome Array from Affymetrix (**D**).

IMPACT FACTORS

THERIOGENOLOGY

Journal information

ISSN: 0093-619X

eISSN: 1879-3231

ELSEVIER SCIENCE INC

STE 800, 230 PARK AVE, NEW YORK, N7 1069. USA



Titles

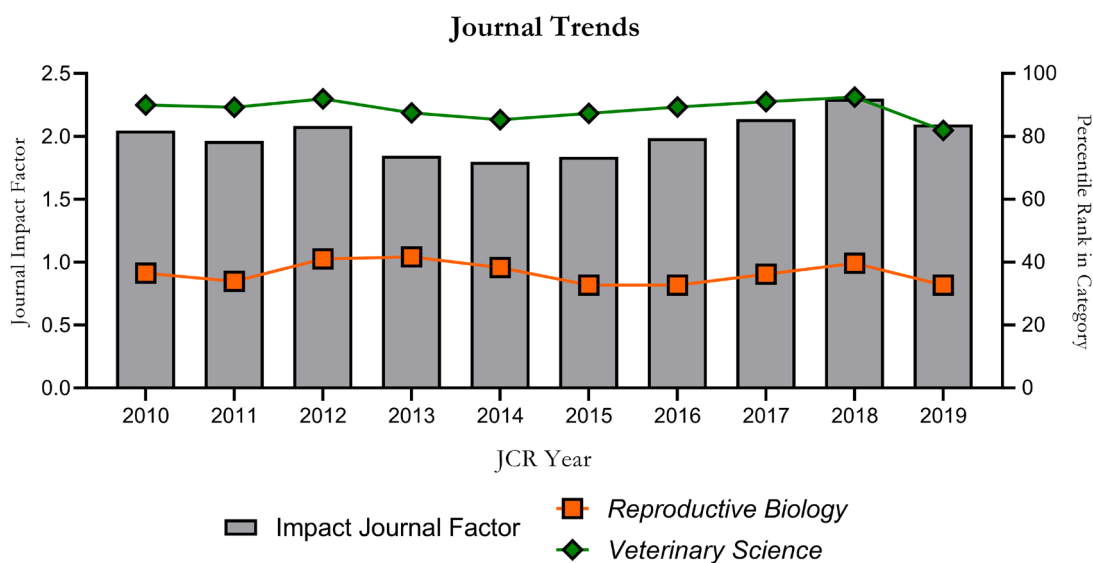
ISO: Theriogenology

JCR Abbrev: THERIOGENOLOGY

Categories

Veterinary Science

Reproductive Biology



YEAR	KEY INDICATORS			CATEGORIES					
	Journal Impact Factor	Total Cites	Article Influence Score	REPRODUCTIVE BIOLOGY			VETERINARY SCIENCE		
				Rank	Quartile	JIF Percentile	Rank	Quartile	JIF Percentile
2019	2.094	16,857	0.477	20/29	Q3	32.759	26/141	Q1	81.915
2018	2.299	16,695	0.495	18/29	Q3	39.655	11/141	Q1	92.553
2017	2.136	15,663	0.485	19/29	Q3	36.207	13/140	Q1	91.071
2016	1.986	14,271	0.502	20/29	Q3	32.759	15/136	Q1	89.338
2015	1.838	13,110	0.503	20/29	Q3	32.759	18/138	Q1	87.319
2014	1.798	13,332	0.519	19/30	Q3	38.333	20/133	Q1	85.338
2013	1.845	12,505	0.534	18/30	Q3	41.667	17/132	Q1	87.5
2012	2.082	13,198	0.525	17/28	Q3	41.071	12/143	Q1	91.958
2011	1.963	11,511	0.504	19/28	Q3	33.929	16/145	Q1	89.31
2010	2.045	11,630	0.500	17/26	Q3	36.538	15/145	Q1	90

REPRODUCTION IN DOMESTIC ANIMALS

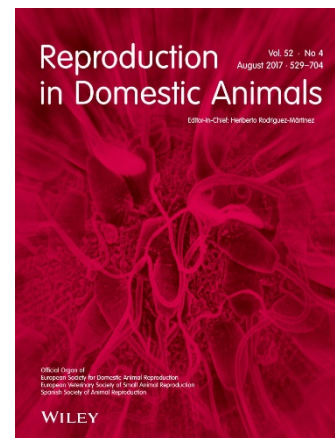
Journal information

ISSN: 0936-6768

eISSN: 1439-0531

WILEY

111 RIVER ST, HOBOKEN 07030-5774, NJ. GERMANY



Titles

ISO: Reprod. Domest. Anim.

JCR Abbrev: REPROD DOMEST ANIM

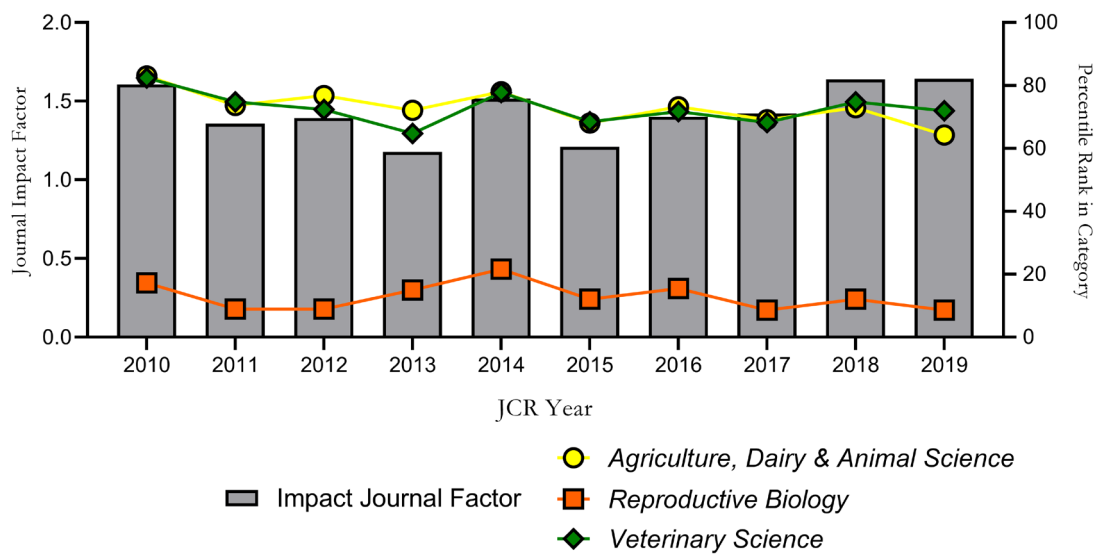
Categories

Agricultural, Dairy & Animal Science

Veterinary Science

Reproductive Biology

Journal Trends



YEAR	KEY INDICATORS			CATEGORIES								
	Journal Impact Factor	Total Cites	Article Influence Score	AGRICULTURE, DAIRY & ANIMAL SCIENCE			REPRODUCTIVE BIOLOGY			VETERINARY SCIENCE		
				Rank	Quartile	JIF Percentile	Rank	Quartile	JIF Percentile	Rank	Quartile	JIF Percentile
2019	1.641	4,841	0.392	23/63	Q2	64.286	27/29	Q4	8.621	40/141	Q2	71.986
2018	1.638	4,552	0.395	17/61	Q2	72.951	26/29	Q4	12.069	36/141	Q2	74.823
2017	1.422	4,106	0.375	19/60	Q2	69.167	27/29	Q4	8.621	45/140	Q2	68.214
2016	1.400	3,623	0.381	16/58	Q2	73.276	25/29	Q4	15.517	39/136	Q2	71.691
2015	1.210	3,508	0.393	19/58	Q2	68.103	26/29	Q4	12.069	44/138	Q2	68.478
2014	1.515	3,303	0.382	13/57	Q1	78.07	24/30	Q4	21.667	30/133	Q1	77.82
2013	1.177	2,828	0.394	15/52	Q2	72.115	26/30	Q4	15	47/132	Q2	64.773
2012	1.392	2,880	0.400	13/54	Q1	76.852	26/28	Q4	8.929	40/143	Q2	72.378
2011	1.356	2,288	0.406	15/55	Q2	73.636	26/28	Q4	8.929	37/145	Q2	74.828
2010	1.606	1,947	0.404	10/56	Q1	83.036	22/26	Q4	17.308	26/145	Q1	82.414

SCIENTIFIC REPORTS

Journal information

ISSN: 2045-2322

eISSN: 2045-2322

NATURE PUBLISHING GROUP

MACMILLAN BUILDING, 4 CRINAN ST, LONDON N1

9XW. ENGLAND



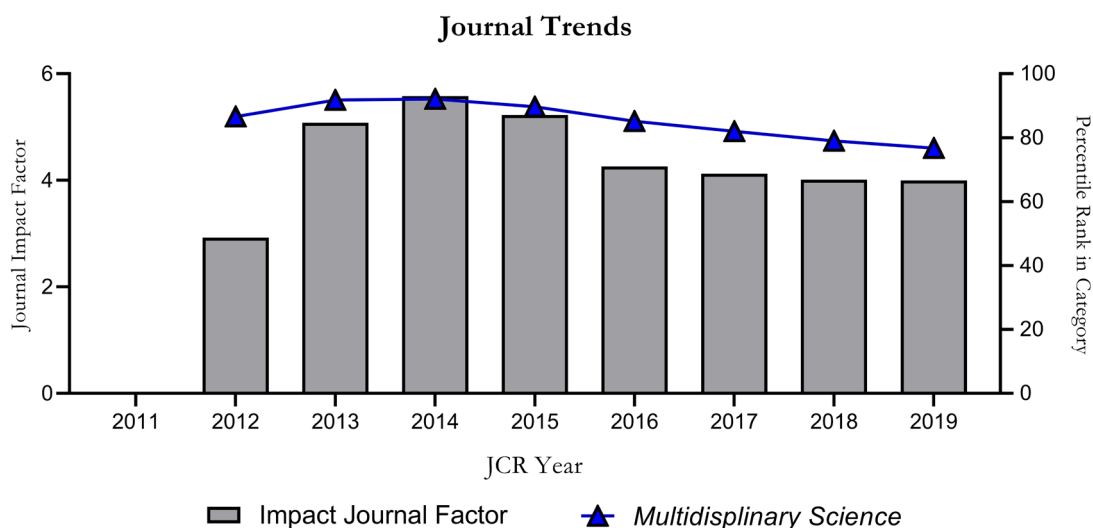
Titles

ISO: Sci Rep

JCR Abbrev: SCI REP-UK

Categories

Multidisciplinary Sciences



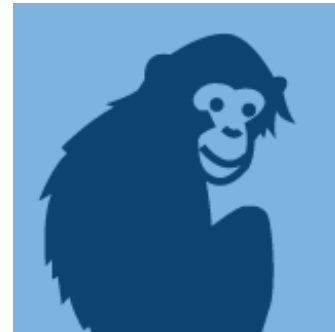
YEAR	KEY INDICATORS			CATEGORIES		
	Journal Impact Factor	Total Cites	Article Influence Score	Rank	Quartile	JIF Percentile
2019	3.998	386,857	1.261	17/71	Q1	76.761
2018	4.011	302,086	1.286	15/69	Q1	78.986
2017	4.122	192,841	1.356	12/64	Q1	82.031
2016	4.259	101,255	1.484	10/64	Q1	85.156
2015	5.228	46,918	1.863	7/63	Q1	89.683
2014	5.578	22,336	2.075	5/57	Q1	92.105
2013	5.078	7,118	2.174	5/55	Q1	91.818
2012	2.927	1,158	1.576	8/56	Q1	86.607
2011	n/a	23	n/a	56/56	Q4	n/a

ANIMALS

Journal information

ISSN: 2076-2615
 eISSN: 2076-2615
 MDPI
 ST ALBAN-ANLAGE 66, CH-4052 BASEL.
 SWITZERLAND

animals

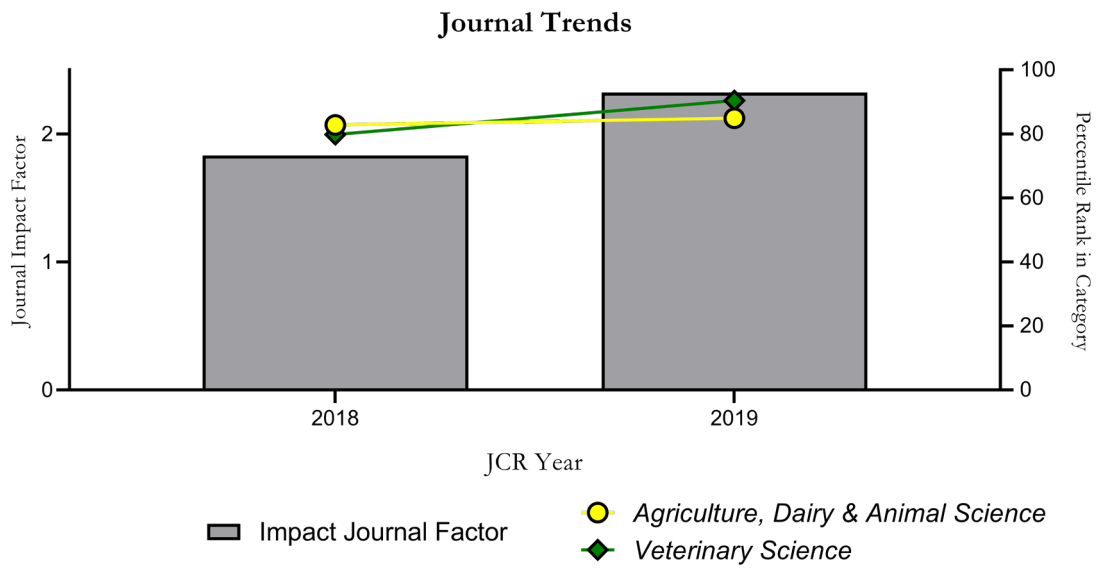


Titles

ISO: Animals
 JCR Abbrev: ANIMALS-BASEL

Categories

Agricultural, Dairy & Animal Science
 Veterinary Science



YEAR	KEY INDICATORS			CATEGORIES					
	Journal Impact Factor	Total Cites	Article Influence Score	AGRICULTURE, DAIRY & ANIMAL SCIENCE			VETERINARY SCIENCE		
				Rank	Quartile	JIF Percentile	Rank	Quartile	JIF Percentile
2019	2.323	2,181	n/a	10/63	Q1	84.921	14/141	Q1	90.426
2018	1.832	1,036	n/a	11/61	Q1	82.787	29/141	Q1	79.787

FRONTIERS IN VETERINARY SCIENCE

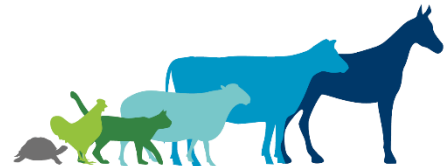
Journal information

ISSN: ****_****

eISSN: 2297-1769

FRONTIERS MEDIA SA

AVENUE DU TRIBUNAL FEDERAL, 34,
LAUSANNE CH-1015. SWITZERLAND



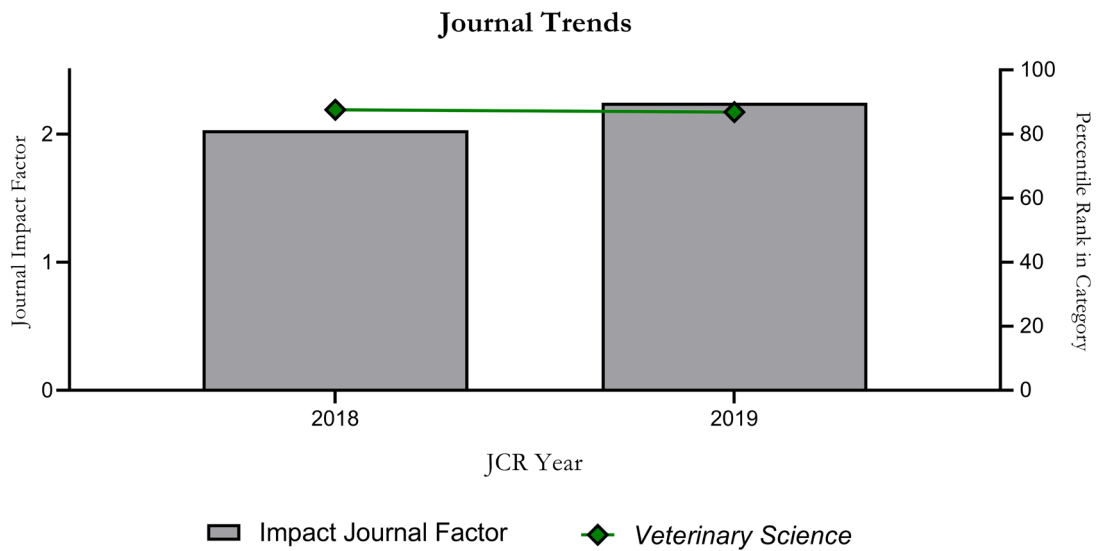
Titles

ISO: Front. Vet. Sci.

JCR Abbrev: FRONT VET SCI

Categories

Veterinary Science



YEAR	KEY INDICATORS			CATEGORIES		
	Journal Impact Factor	Total Cites	Article Influence Score	VETERINARY SCIENCE		
				Rank	Quartile	JIF Percentile
2019	2.245	2,076	n/a	19/141	Q1	86.879
2018	2.029	1,036	n/a	18/141	Q1	87.589

Journal information

ISSN: ****_****

eISSN: 1422-0067

MDPI

ST ALBAN-ANLAGE 66, CH-4052 BASEL
SWITZERLANDInternational Journal of
Molecular Sciences**Titles**

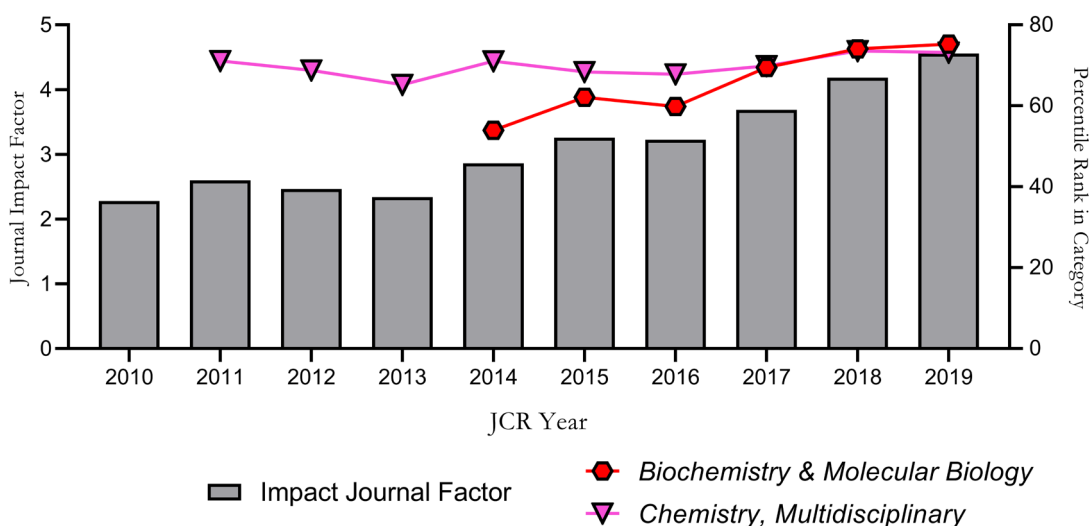
ISO: Int. J. Mol. Sci.

JCR Abbrev: INT J MOL SCI

Categories

Biochemistry & Molecular Biology

Chemistry, Multidisciplinary

Journal Trends

■ Impact Journal Factor

● Biochemistry & Molecular Biology

▼ Chemistry, Multidisciplinary

YEAR	KEY INDICATORS			CATEGORIES					
	Journal Impact Factor	Total Cites	Article Influence Score	BIOCHEMISTRY & MOLECULAR BIOLOGY			CHEMISTRY, MULTIDISCIPLINARY		
				Rank	Quartile	JIF Percentile	Rank	Quartile	JIF Percentile
2019	4.556	77,288	0.943	74/297	Q1	75.253	48/177	Q2	73.164
2018	4.183	53,148	0.932	78/299	Q2	74.08	46/172	Q2	73.547
2017	3.687	37,071	0.876	90/293	Q2	69.454	52/171	Q2	69.883
2016	3.226	25,928	0.806	117/290	Q2	59.828	54/166	Q2	67.771
2015	3.257	18,190	0.764	110/289	Q2	62.111	52/163	Q2	68.405
2014	2.862	12,460	0.713	134/290	Q2	53.966	46/157	Q2	71.019
2013	2.339	7,898	0.640	n/a	n/a	n/a	52/148	Q2	65.203
2012	2.464	4,706	0.665	n/a	n/a	n/a	48/152	Q2	68.75
2011	2.598	2,744	0.637	n/a	n/a	n/a	45/154	Q2	71.104
2010	2.279	1,652	0.537	n/a	n/a	n/a	41/147	Q2	72.449