



**UNIVERSIDAD DE MURCIA**  
**ESCUELA INTERNACIONAL DE DOCTORADO**  
**TESIS DOCTORAL**

Reproductive and molecular responses to a short-term treatment for estrus synchronization combined with conventional superovulation in weaned sows

Impacto reproductivo y molecular de un tratamiento combinado de sincronización del estro y superovulación en cerdas multíparas

**D<sup>a</sup>. HENAR GONZÁLEZ RAMIRO**  
**2024**





**UNIVERSIDAD DE MURCIA**  
**ESCUELA INTERNACIONAL DE DOCTORADO**  
**TESIS DOCTORAL**

Reproductive and molecular responses to a short-term  
treatment for estrus synchronization combined with  
conventional superovulation in weaned sows

Impacto reproductivo y molecular de un tratamiento  
combinado de sincronización del estro y superovulación en  
cerdas multíparas

Autor: D<sup>a</sup>. HENAR GONZÁLEZ RAMIRO

Director/es: D<sup>a</sup>. Inmaculada Parrilla Riera, D<sup>a</sup>. Cristina Alicia Martínez  
Serrano y D. Alejandro Lucas Sánchez





**DECLARACIÓN DE AUTORÍA Y ORIGINALIDAD  
DE LA TESIS PRESENTADA EN MODALIDAD DE COMPENDIO O ARTÍCULOS PARA  
OBTENER EL TÍTULO DE DOCTOR**

*Aprobado por la Comisión General de Doctorado el 19-10-2022*

D./Dña. Henar González Ramiro

doctorando del Programa de Doctorado en

Programa de Doctorado en Ciencias Veterinarias

de la Escuela Internacional de Doctorado de la Universidad Murcia, como autor/a de la tesis presentada para la obtención del título de Doctor y titulada:

Reproductive and molecular responses to a short-term treatment for estrus synchronization combined with conventional superovulation in weaned sows

Impacto reproductivo y molecular de un tratamiento combinado de sincronización del estro y superovulación en cerdas múltiparas

y dirigida por,

D./Dña. Inmaculada Parrilla Riera

D./Dña. Cristina Alicia Martínez Serrano

D./Dña. Alejandro Lucas Sánchez

**DECLARO QUE:**

La tesis es una obra original que no infringe los derechos de propiedad intelectual ni los derechos de propiedad industrial u otros, de acuerdo con el ordenamiento jurídico vigente, en particular, la Ley de Propiedad Intelectual (R.D. legislativo 1/1996, de 12 de abril, por el que se aprueba el texto refundido de la Ley de Propiedad Intelectual, modificado por la Ley 2/2019, de 1 de marzo, regularizando, aclarando y armonizando las disposiciones legales vigentes sobre la materia), en particular, las disposiciones referidas al derecho de cita, cuando se han utilizado sus resultados o publicaciones.

Además, al haber sido autorizada como compendio de publicaciones o, tal y como prevé el artículo 29.8 del reglamento, cuenta con:

- *La aceptación por escrito de los coautores de las publicaciones de que el doctorando las presente como parte de la tesis.*
- *En su caso, la renuncia por escrito de los coautores no doctores de dichos trabajos a presentarlos como parte de otras tesis doctorales en la Universidad de Murcia o en cualquier otra universidad.*

Del mismo modo, asumo ante la Universidad cualquier responsabilidad que pudiera derivarse de la autoría o falta de originalidad del contenido de la tesis presentada, en caso de plagio, de conformidad con el ordenamiento jurídico vigente.

En Murcia, a 6 de Febrero de 2024

Fdo.:

**GONZALEZ  
RAMIRO  
HENAR -  
23313062D**

Firmado digitalmente por  
GONZALEZ RAMIRO HENAR -  
23313062D  
Nombre de reconocimiento (DN):  
c=ES,  
serialNumber=DCE:23313062D,  
givenName=HENAR,  
sn=GONZALEZ RAMIRO,  
cn=GONZALEZ RAMIRO HENAR -  
23313062D  
Fecha: 2024.02.06 17:58:35 +01'00'



# PhD THESIS BY PUBLICATIONS

---





# PHD THESIS BY PUBLICATIONS

## TESIS DOCTORAL POR COMPENDIO DE PUBLICACIONES

- PAPER  
ARTÍCULO  
1
- A short-term altrenogest treatment post-weaning followed by superovulation reduces pregnancy rates and embryo production efficiency in multiparous sows.** 2021. Henar Gonzalez-Ramiro, Cristina Cuello, Josep M. Cambra, Alejandro Gonzalez-Plaza, Juan M. Vazquez, Jose L. Vazquez, Heriberto Rodriguez-Martinez, Maria A. Gil, Alejandro Lucas-Sanchez, Inmaculada Parrilla, Emilio A. Martinez. *Frontiers in Veterinary Science, Sec. Animal Reproduction–Theriogenology*, 8:771573. <https://doi.org/10.3389/fvets.2021.771573>.
- PAPER  
ARTÍCULO  
2
- Combined synchronization and superovulation treatments negatively impact embryo viability possibly by the downregulation of WNT/ $\beta$ -catenin and Notch signaling genes in the porcine endometrium.** 2022. Henar Gonzalez-Ramiro, Inmaculada Parrilla, Josep Miquel Cambra, Alejandro Gonzalez-Plaza, Maria Antonia Gil, Cristina Cuello, Emilio A. Martinez, Heriberto Rodriguez-Martinez, Cristina A. Martinez. *Journal of Animal Science*, 100: 1–12. <https://doi.org/10.1093/jas/skac315>.
- PAPER  
ARTÍCULO  
3
- The use of a brief synchronization treatment after weaning, combined with superovulation, has moderate effects on the gene expression of surviving pig blastocysts.** 2023. Henar Gonzalez-Ramiro, Maria A. Gil, Cristina Cuello, Josep M. Cambra, Alejandro Gonzalez-Plaza, Juan M. Vazquez, Jose L. Vazquez, Heriberto Rodriguez-Martinez, Alejandro Lucas-Sanchez, Inmaculada Parrilla, Cristina A. Martinez, Emilio A. Martinez. *Animals (Basel)*, 13(9):1568. <https://doi.org/10.3390/ani13091568>.



*Escuela Internacional de Doctorado (EIDUM)*  
*Departamento de Medicina y Cirugía Animal*  
*Campus Regional de Excelencia Internacional "Campus Mare Nostrum"*  
*Universidad de Murcia*



Los estudios realizados en esta Tesis Doctoral han sido financiados por: 1) El Ministerio de Ciencia, Innovación y Universidades-FEDER (Madrid, España; MCIN/AEI/10.13039/501100011033; ERDF (RTI2018-093525-B-I00); 2) La Fundación Séneca de la Región de Murcia (Grupos de excelencia; GERM 04543/07 y 19892/ GERM/15); 3) The Swedish Research Council Formas, Stockholm, Sweden (Project 2019-00288).



**A mis padres**





# AGRADECIMIENTOS

---



## AGRADECIMIENTOS

Este trabajo se ha llevado a cabo gracias a un grupo enorme de personas que lo han enriquecido directa o indirectamente, desde el ámbito académico, profesional y personal. Esta tesis, además de lo que pueda aportar a nivel científico, implica lograr mi mayor objetivo a nivel formativo, ha complementado a la perfección mi carrera profesional y me ha proporcionado muchas satisfacciones a nivel personal. Compaginar esta tesis con mi trabajo en la empresa Agropor ha sido en muchas ocasiones un reto, pero a la vez me ha permitido implicar a gente diferente, lo que sin duda para mí le otorga más valor y es algo que quiero reflejar en estos agradecimientos.

En primer lugar, quiero agradecer a mi Tutor de Tesis, el Dr. Emilio A. Martínez, la confianza depositada en mí, la sabiduría que ha sabido trasmitirme y la capacidad de formar un equipo con el talento que impera en el departamento. Siempre apreciaré su habilidad para poner “negro sobre blanco” y su paciencia en el desarrollo de esta tesis, sin esto estoy segura de que no habría podido concluirla.

A mis directores de Tesis, Inmaculada Parrilla, Cristina A. Martínez y Alejandro Lucas. A Inma agradecerle la cercanía, los conocimientos y la capacidad de escucha, lo que me ha hecho sentir guiada y apoyada en todo momento. A Cristina su trabajo, valentía y generosidad para trasmitirme lo que necesitaba saber y acogerme en Suecia, fue una experiencia realmente enriquecedora. A Alejandro Lucas su apoyo, comprensión y hacerme ver que sí se puede.

Al resto del departamento, los Dres. Cristina Cuello, Miquel Cambra y Maria Antonia Gil, y a Alejandro González, ya que sin su colaboración y su trabajo esta tesis no existiría, espero poder devolverles la ayuda prestada con la misma ilusión que me la regalaron ellos.

Al Dr. Heriberto Rodriguez-Martinez y al Departamento de Medicina Clínica y Experimental de la Universidad de Linköping por su hospitalidad y sus inestimables aportaciones.

A mi empresa Agropor S.L., no solo por proporcionarme las instalaciones y los animales que he requerido para los diversos estudios, sino también por depositar en mí la confianza y permitirme continuar con mi formación a la vez que me he desarrollado profesionalmente. Sin el apoyo de M<sup>a</sup> Belén Muñoz, como representante de la Propiedad, y Juan Alcántara y Jose Antonio López, como representantes de la Gerencia y Recursos Humanos de la empresa, esto tampoco hubiera sido posible. Al equipo humano que conforma Agropor y que siempre está dispuesto a innovar: a todos mis compañeros veterinarios, en especial a Paula y Juan (los primeros que me formaron), Pedro Sánchez, Jose Luis Íñiguez, Jose Manuel Sánchez, Isaac, Khalid y al resto del personal de granja... gracias por vuestra colaboración.

A Álvaro, Esperanza y Ana, que cuando nos juntamos es como si el tiempo no hubiese pasado, gracias por vuestra amistad y por soportar mis ausencias.

A Alex, por formar junto a mí un equipo único y ser mi refugio. Gracias por entenderme y respaldarme en todas las decisiones que tomo, siempre dándome los consejos que necesito. Me siento muy orgullosa de lo que compartimos y la vida que estamos construyendo. A Encarna y Paco por darme lo mejor que tengo.

A mi familia, que me apoya en todo y es lo más importante. En especial a mi madre y mis hermanas, Ana y Laura, por estar siempre ahí y hacerme la persona que soy hoy en día. Por todo lo que me dais, mis logros siempre serán también vuestros. A Rafa y Sofía por traer esa alegría diaria a nuestra casa.

A mi padre, por enseñarme a luchar por lo que quiero y no decir nunca “no puedo”. Sé que siempre estás presente y en estos momentos más que nunca.

La lectura de esta Tesis espero que no sea un final, sino un comienzo de la siguiente etapa que me permita seguir colaborando con el Grupo de Investigación de Reproducción Animal y seguir aprendiendo de los profesionales que lo componen.

**“La vida es un proceso continuo de cambio y evolución”**

*Lynn Margulis, Bióloga estadounidense (1938-2011)*



# CONTENTS

---





## CONTENTS/CONTENIDO

INTRODUCTION .....	1
OBJECTIVES.....	7
EXTENDED SUMMARY .....	11
MATERIAL AND METHODS .....	13
General methodology.....	13
Specific methodology.....	14
EXPERIMENTAL DESIGN AND RESULTS .....	21
Experimental Design.....	21
Results .....	22
Experimental Design.....	23
Results .....	24
Experimental design .....	25
Results .....	26
CONCLUSIONS .....	29
RESUMEN GENERAL .....	33
INTRODUCCIÓN .....	35
OBJETIVOS .....	39
MATERIAL Y MÉTODOS.....	40
Metodología general .....	40
Metodología específica .....	41
DISEÑO EXPERIMENTAL Y RESULTADOS .....	49
Diseño experimental .....	49
Resultados .....	50
Diseño experimental .....	52
Resultados .....	52
Diseño experimental .....	54
Resultados .....	54
CONCLUSIONES .....	57
ABREVIATIONS/ ABREVIATURAS.....	59
REFERENCES/REFERENCIAS.....	63
PUBLICATIONS/ PUBLICACIONES.....	71
GRAPHIC APPENDIX.....	79
APPENDIX .....	87



# INTRODUCTION

---



## INTRODUCTION

The European Union (EU) is the second biggest pig producer in the world and the largest exporter of pig products derived from animals raised on high welfare standards and with the highest genetic value. Spain is the third producer of pigs in the world, only behind China and the United States, and the first in the EU, with 25,4% of the Community production (MAPA, 2022; <https://mapa.gob.es>). Therefore, the Spanish pig industry has a key economic importance. In recent years, the Spanish sector has experienced a highly favorable growth trend, in terms of the census, the number of farms, and production. This growth led to a self-sufficiency rate of 205% in 2022 (MAPA, 2022; <https://mapa.gob.es>). These factors establish Spain as a robust economic player, and a significant producer and exporter of pork, all while upholding animal welfare standards, delivering high-quality products, and continuously enhancing efficiency, health conditions and genetic progress.

In the last decades, improved nutrition and animal management, disease control, genetic selection, and artificial insemination (AI) have been the most important factors for increasing pork production. The adoption of emerging breeding technologies, such as embryo transfer (ET), would bolster the sustainability and competitiveness of the pig industry and would contribute to the implementation of the bio-economy strategies. Commercial ET has unprecedented implications for the pig sector from the productive and economic points of view because it would enable the transfer of valuable genetic (embryos) without risk of disease transmission, with a lower transportation cost and without compromising animal welfare. Despite the importance of implementing this procedure, it was deemed unattainable for many years, even within production and genetic improvement systems. Nevertheless, over the past two decades, there has been a significant shift in this scenario, and currently, this technology is approaching commercial viability as several advances allow non-surgical ET (NET) [1] and the use of embryos preserved for a short (liquid state) and long (vitrified) period [2–6]. Unfortunately, although the development of ET technology allows its commercial use today, there are still some issues about its effectiveness and efficiency that must be solved before the technique can be widely used.

For optimal reproductive outcomes following NET a substantial quantity of fresh embryos (24-30 embryos) [1,6] or vitrified embryos (40 embryos) [2] should be utilized in each transfer. While there is considerable individual variation in ovulation rates [7,8], it can be

generally considered that a range of 15 to 25 oocytes per ovulation is typical for the porcine species. This means that the donor:recipient ratio would range from 1-1.5:1. Nonetheless, in practice, various factors can elevate the ratio of donors required per recipient to a range of 2.5-3.5:1 [9], which leads to a high cost per transferable embryo. Some of these factors are pregnancy and fertilization rates, embryonic development and quality at the moment of collection and the rate of embryo recovery. A potential approach to decrease this ratio is by administering superovulation (SO) treatments to the donor females. Previously, these females should be synchronized to effectively group the animals and to optimize the efficiency of embryo collection. Best synchronization and SO treatments depend on the type of donor to be used. Basically, three types of females, prepubertal gilts, cyclic gilts and weaned sows, can be used in ET programs as embryo donors.

In prepubertal gilts, the SO treatments not only induce the synchronization of estrus and ovulation but also increase ovulation rate and the number of embryos in comparison to those obtained in mature gilts [10]. However, these treatments also produce a high percentage (25-50%) of oocytes and/or degenerated embryos [11,12] depicting extreme individual variability in the superovulatory response [13]. For these reasons, the utilization of such females as embryo donors is controversial.

The search for an effective method to synchronize estrus and ovulation in mature gilts began more than 50 years ago [14]. The most efficient approach for estrus synchronization in gilts involves inhibiting the secretion of pituitary gonadotropins during a period of 14 to 20 days, which allows the regression of the corpora lutea while also preventing the growth of new follicles and ovulation [15]. At the end of the treatment, gonadotropin secretion is resumed synchronously in all treated animals. For this purpose, different progestational treatments were tested, and currently, altrenogest (ALT), marketed as Regumate in Europe and as Matrix in North America, is the only authorized progestational substance for use in pigs in Europe and North America, and is commonly used by the swine industry to synchronize estrus in gilts. ALT at a dose of 15 to 20 mg/day/gilt orally for 14 to 18 days suppresses follicular development, and females normally are in estrus within 5-7 days of ending the treatment [16–18]. When mature gilts are used as embryo donors, a SO treatment should be used once the estrus synchronization treatment has been completed. The administration of equine chorionic gonadotropin (eCG) following synchronization treatment increases the ovulation rate but also

yielding an inconsistent ovulatory response, an increase in embryonic losses between days 24 and 40 of pregnancy [19,20], and does not influence the size of the litter compared with controls (without gonadotropin treatment) [21,22]. Unfortunately, only one study has focused on the quantity and quality of day 5-6 embryos collected from synchronized and superovulated gilts [23], whose results can, however, not be properly considered since they did not include a control group (without SO) in the experimental design. These authors speculated that a percentage of ovulated oocytes after treatments were immature and thus remained unfertilized. Confirming this speculation, in previous own experiments (unpublished data), we obtained 40% of immature oocytes on day 6 of the cycle from gilts that were superovulated with 1000 IU of eCG at the conclusion of the synchronization treatment. Therefore, modifications in the synchronization and/or SO treatments must be evaluated to obtain maximum performance of the gilts used in ET programs.

Most of weaned sows exhibit a fertile estrus within 7 days post-weaning. Consequently, weaning proves to be an exceptionally effective physiological means of synchronizing estrus and ovulation in a group of sows. Superovulation treatment through the administration of eCG and human chorionic gonadotropin (hCG) administered 24 h after weaning and at the beginning of estrus, respectively, has been shown to be effective in increasing the ovulation rate and the quantity of viable and transferable embryos, all while not adversely affecting the percentage of unfertilized oocytes or the quality of the collected embryos [24]. Additionally, this treatment also does not imply any negative effect on fertility or prolificacy after NETs of superovulated and control embryos [24,25]. Therefore, weaned sows represent an interesting source as embryo donors given that weaning offers a straightforward and natural method to synchronize estrus and the superovulation of this type of females reduces the donor-to-recipient ratio, enhancing the efficiency of ET programs. However, ET programs frequently require a considerably greater number of donor sows than can be obtained from a single weaning event, making it essential to combine sows from different weanings.

The post-weaning estrus can be delayed using ALT [26] without negative effects on embryo-fetal development and ovulation [27,28]. The application of ALT for 7 or 14 days is frequently used by producers to delay the start of estrus by one or two weeks. This procedure would make it possible to have an adequate batch of sows for ET, and would also reduce the number of females that cannot be used due to post-weaning estrus outside the appropriate

range, since, for practical reasons, ET programs only use sows with a specific weaning-estrus interval (3-5 days) [6]. Nonetheless, the impact of the brief administration of ALT to weaned sows in combination with a SO treatment on the quantity and quality of the embryos produced is still unknown. Furthermore, the combined use of estrus synchronization and SO treatments initiates molecular alterations whose effects have yet not been revealed. It is established that hormones play a pivotal role in governing reproductive physiology by influencing gene expression. In particular, mRNA encoding hormone receptors are frequently regulated by their corresponding hormones through autoregulatory feedback mechanisms [29,30]. While the use of hormonal treatments to delay the estrus in combination with SO may influence the stability and expression of the mRNAs, the impact of these hormonal treatments on gene expression in the ovaries and endometrium of sows, as well as in the resultant embryos, and the potential consequences on reproductive physiology, are yet to be established.



# OBJECTIVES

---



## OBJECTIVES

The main objective of this thesis was to assess the efficacy of a short-term estrous synchronization treatment combined with a SO treatment in weaned sows utilized as donors in ET programs. With this purpose, the specific objectives contained in this thesis were to investigate the impact of these combined hormonal treatments on:

1. Estrus and ovulation response, ovarian characteristics, reproductive outcomes, and the quality and quantity of pre-implantation embryos at day 6 of the cycle (Article 1).
2. Reproductive parameters and gene expression changes in ovaries and endometrium at day 6 of the cycle (Article 2).
3. Gene expression changes in surviving day 6 blastocysts (Article 3).



# EXTENDED SUMMARY

---



## EXTENDED SUMMARY

### MATERIAL AND METHODS

#### General methodology

##### 1. *Animals*

This field study was carried out in a pig production farm (Agropor SL, Murcia, Spain). Multiparous Landrace x Large-White sows with a lactation period of 21–24 days were randomly selected on the day of weaning. Animals were assigned to individual crates under ambient conditions of controlled humidity and temperature facilitated by a forced ventilation system. Duroc boars (2 to 3 years old) housed in a boar station producing seminal doses for AI (AIM Iberica, Murcia, Spain) were used as semen donors. The animals had ad libitum access to water and were fed according to their nutritional requirements. The experiments were carried out following the Directive 2010/63/EU on animal experimentation. The study was reviewed and approved by the Ethics Committee for experiments with animals of the University of Murcia (Code: 486/2018).

##### 2. *Hormonal treatments, estrus detection and AI*

Sows were synchronized by oral administration of ALT (Regumate<sup>®</sup>, Merck Sharp & Dohme Animal Health, S.L., Salamanca, Spain) at a dose of 20 mg per sow per day. Sows were superovulated with 1,000 IU eCG (Foligon, Intervet, Boxmeer, The Netherlands; i.m). Detection of estrus was performed by trained personnel in the presence of vasectomized boars once daily, starting on the day of the end of synchronization treatment or the day of weaning. At the onset of estrus, the sows were treated with 750 IU hCG (Veterin Corion, Divasa, Farmavic S.A., Barcelona, Spain; i.m.) and inseminated. Standard AIs were carried out 6 h and 24 h after the onset of estrus with fresh or stored for 24 h at 18°C AI doses containing  $3 \times 10^9$  spermatozoa extended in 90 mL of BTS extender (Beltsville thawing solution) [31].

##### 3. *Surgical procedure and embryo recovery*

Surgical and embryo recovery procedures were performed on day 6 (day 0 = onset of estrus) as previously reported [32]. Briefly, sows were sedated and then anesthetized

with azaperone (2 mg/kg body weight; Stresnil<sup>®</sup>, Landegger Strasse, Austria; i.m.) and sodium thiopental (7 mg/kg body weight; B. Braun VetCare SA, Barcelona, Spain; i.v.), respectively. Anesthesia was maintained with isoflurane (3–5%; IsoFlo<sup>®</sup>, Madrid, Spain). After exposure of the reproductive tract, the ovaries were examined to determine their response to the hormone treatments. The ovulatory response of the sows was assessed by counting the corpora lutea in both ovaries. The presence of follicular cysts and polycystic ovaries was recorded in each sow. Embryos were recovered by washing the tip of each uterine horn with modified Tyrode's lactate-HEPES-polyvinyl alcohol (THP) medium [6,33] at 37°C, and the number of unfertilized oocytes and viable and degenerated embryos was recorded for each sow.

### Specific methodology

The specific methodology used in each of the articles of the thesis to achieve the intended objectives was as follow:

#### **ARTICLE 1. A short-term altrenogest treatment post-weaning followed by superovulation reduces pregnancy rates and embryo production efficiency in multiparous sows**

##### *1. Evaluation of oocytes and degenerated embryos*

For nuclear assessment, unfertilized oocytes and degenerated embryos were fixed, stained with lacmoid, and assessed microscopically, as previously reported [34]. Oocytes with chromatin enclosed by a nuclear membrane were considered immature oocytes at the germinal vesicle (GV) stage, and oocytes with chromosomes organized in metaphase and with the presence of an extruded first polar body were considered mature oocytes at the metaphase II stage. Degenerated structures with multiple stained nuclei were considered degenerate embryos.

##### *2. Embryo quality assessment*

Embryo quality evaluation was conducted by studying the morphology, differential staining, specifically the number of inner cell mass (ICM) and trophectoderm (TE) cells, apoptosis and cryotolerance.



### *2.1. Morphology*

The embryos were assessed for their stage of development and quality under a stereomicroscope. Unicellular eggs were considered oocytes. Insufficiently or poorly developed embryos were considered degenerate embryos. Embryos that exhibited an appropriate developmental stage for age (day 6: morulae and blastocysts) and good or excellent morphology following the International Embryo Transfer Society criteria [35] were considered viable.

### *2.2. Cell number in the blastocysts: differential staining*

Total cell number (TCN) and the numbers of ICM and TE cells were counted in the blastocysts following an immunofluorescence procedure [36]. Briefly, viable embryos were fixed in paraformaldehyde, permeabilized with Triton X-100 and Tween 20 and incubated sequentially in HCl and Tris-HCl. Embryos were then washed, placed in blocking solution, and washed again before incubation with a primary antibody (CDX-2) that specifically binds to TE cells. Next, the embryos were washed, incubated with Alexa Fluor R 568- donkey anti-mouse IgG secondary antibody, transferred to microdroplets containing Vectashield-Hoechst 33342 solution, and examined under a fluorescence microscope to count the Hoechst-stained nuclei (TCN; blue fluorescence) and the TE cells (red fluorescence).

### *2.3. Cellular apoptosis*

Apoptosis was determined in morulae using the APO-BrdUTM TUNEL Assay Kit (A23210; Invitrogen, Oregon, USA) as previously reported [37]. Briefly, viable embryos were fixed in paraformaldehyde and permeabilized with Triton X-100 and Tween 20. Positive control embryos were incubated in Dnase I. Then, control and experimental morulae were transferred to PBS (phosphate buffered saline)-BSA (bovine serum albumin) medium containing Tween 20 and incubated in TUNEL reaction medium. Finally, the embryos were washed, placed in microdroplets of Vectashield-Hoechst 33342 solution, and examined by fluorescence microscopy. Cells with green, fluorescent nuclei were classified as TUNEL+. The proportion of TUNEL+ cells to total Hoechst-stained nuclei (blue fluorescence) was the apoptotic index.

#### 2.4. Cryotolerance

Cryotolerance was used as a marker of embryo quality and as a potential predictor of embryo developmental ability. Morula stage embryos from each treatment group were vitrified within 3 h of embryo recovery as previously described [4]. Briefly, embryos were washed in THP medium and incubated in THP containing 7.5% dimethyl sulfoxide (DMSO) and 7.5% ethylene glycol (EG) and then in THP containing 16% DMSO, 16% EG and 0.4 M sucrose. Groups of 5–6 embryos were loaded into super open pulled straws and placed in liquid nitrogen. After storage, the embryos were warmed in THP medium supplemented with 0.13 M sucrose and cultured for 24 h in North Carolina State University (NCSU)-23 medium [38] containing BSA (0.4%) and fetal calf serum (10%) at 38.5°C in 5% CO<sub>2</sub> in air. Morulae that reached the blastocyst stage with excellent or good morphology at the end of culture were considered viable. The survival rate was defined as the proportion of postwarming viable embryos out of the total number of embryos cultured.

### **ARTICLE 2. Combined synchronization and superovulation treatments negatively impact embryo viability possibly by the downregulation of WNT/ $\beta$ -catenin and Notch signaling genes in the porcine endometrium**

#### 1. Tissue collection

Tissue samples were recovered from the mesometrial side of the left uterine horn and the entire left ovary, washed with THP medium, snap-frozen, and stored at -80°C until RNA extraction.

#### 2. Total RNA extraction

Total RNA isolation was performed as previously reported [39]. Briefly, endometrial or ovary samples were disrupted in 1 mL of TRIzol reagent (Thermo Scientific, Waltham, MA, USA) with a TissueLyser II (Qiagen, Hilden, Germany) and centrifuged. The supernatant was incubated with bromochloropropane, centrifuged again, and re-incubated with isopropanol and RNA precipitation solution. The precipitate was mixed with 1 mL of 75% ethanol and centrifuged, and the resulting pellet was air-dried and dissolved in 30  $\mu$ L of

RNase-free water. The RNA quantity and integrity were measured with a Bioanalyzer 2100 (Agilent, Santa Clara, USA). All RNA samples had satisfactory quality, with an RNA integrity number (RIN) >8.

### 3. RNA sequencing (RNA-seq)

RNA-Seq technique was used to identify differentially expressed genes (DEGs) among groups. Libraries were generated as previously reported [39] with the TruSeq Stranded mRNA Library Prep Kit (Illumina, San Diego, CA, USA) according to the manufacturer's protocol. Briefly, total RNA was diluted in nuclease-free water, and after purification and fragmentation, mRNA was converted into a cDNA library through an end repair process, the addition of a single "A" base to the 3' end and the ligation of Illumina adaptors. The products were purified and PCR-enriched to produce the final double-stranded cDNA library. The NextSeq 500/550 High Output kit v2.5 (150 cycles) was used for library sequencing (sequencing setup of 2 × 75 bp paired-end). The raw datasets were deposited in the Sequence Read Archive under accession number PRJNA862977 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/bioproject/862977>).

### 4. Analysis of sequencing data

Clean reads were aligned to the pig genome (SusScrofa 10.2) by using Spliced Transcripts Alignment to a Reference (STAR) method [40]. Normalization of the data was performed by the Robust Multichip Average (RMA) method [41]. Raw intensities were background adjusted, log<sub>2</sub> transformed, and normalized using quantile normalization to assign a single intensity value to each probe. The data analysis was performed with Partek Genomics Suite & Partek Pathways software (Partek Incorporated, St. Louis, USA). A one-way ANOVA was used to detect DEGs among groups with the cutoff P value and fold change (FC) values set to 0.05 and 2, respectively. Gene Ontology (GO) and pathway enrichment analyses of DEGs were performed using DAVID (database for annotation, visualization, and integrated discovery), KEGG (Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes), and DICE (database of Immune Cell Expression) databases. Enrichment analysis was performed using g:Profiler (version e106\_eg53\_p16\_65fcd97) with the g:SCS multiple testing correction method applying significance threshold of 0.05 [42]. Network connections

among genes were performed using STRING software (v11.0), available online at <https://string-db.org/> [43].

### 5. *RNA-seq validation*

RNA-Seq data were validated by real-time quantitative PCR (RT-qPCR) of six selected DEGs. RNA samples used for RT-qPCR assay were the same samples used for RNA-Seq analysis. Primers were commercially synthesized and tested (Bio Rad, Hercules, CA, USA). Total RNA was reverse transcribed into cDNA using the High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Applied Biosystems, Foster City, CA). RT-qPCR was performed in 10- $\mu$ L reactions with 5  $\mu$ L of PowerUp SYBR Green Master Mix (Applied Biosystems, CA, USA), 50 nM for each set of primers, 1  $\mu$ L of cDNA, and water. All reactions were carried out using the Real-Time PCR Detection System (QuantStudio 5, Thermo Fisher, Waltham, MA, USA). Each sample for each gene was run in duplicate. The gene relative expression levels were quantified using the  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  method and two reference genes, glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) and beta-actin (ACTB).

## **ARTICLE 3: The use of a brief synchronization treatment after weaning, combined with superovulation, has moderate effects on the gene expression of surviving pig blastocysts**

### 1. *Total RNA Extraction*

The RNeasy Micro Kit (Qiagen Iberica, Madrid, Spain) was used for the extraction of total RNA from blastocysts following the manufacturer's manual. The concentration and quality of the extracted RNA were determined with the 2100 Bioanalyzer (Agilent, Santa Clara, CA, USA). The RIN of each sample was greater than 8.5.

### 2. *Microarray processing*

Gene expression differences among groups were determined with the GeneChip Porcine Gene 1.1 ST Array Strip (901798, Affymetrix, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA). ss-cDNA was produced from 800 pg of total RNA of each sample using the GeneChip WT Pico Reagent Kit (P/N 902623; Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) following the recommendations of the manufacturer. The amount and quality of cDNA were checked by Nanodrop and Bioanalyzer. ss-cDNA targets were cleaned up and after fragmentation and terminal labeling, and 3.75  $\mu$ g of fragmented and biotinylated ss-cDNA

were included in the hybridization mix, using the GeneAtlas Hybridization, Wash and Stain kit for WT Array Strips (Affymetrix, P/N 901667) according to recommendations of the manufacturer. The resulting preparations were hybridized to the array strip (Porcine Gene 1.1 ST Array Strip) for 20 h at 48 °C. After incubation, arrays were washed, stained, and scanned using GeneAtlas System (Affymetrix, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA). The data were then analyzed using Affymetrix's Expression Command Console, and all samples passed the quality criteria.

### *3. Analysis of the microarray data*

The data underwent normalization using the RMA method [41], with background correction followed by quantile normalization to generate a value for each probeset. Statistical and functional interpretation of data was conducted using the software of the Partek Genomics Suite and Partek Pathways. Principal component analysis (PCA) was utilized as an exploratory tool to examine transcriptome variations among the samples. DEGs between groups were detected using one-way ANOVA with an un-adjusted P value < 0.05 and a FC 1.5. The identification of overrepresented gene sets, GO and pathway categories, in the DEG list was based on the KEGG database [44] using Fisher's exact test.

### *4. Microarray validation*

A total of 7 DEGs, 5 up-regulated (CHSY1, CSGALNACT2, CTPS1, RDH10, SPTLC2) and 2 down-regulated (GSTK1, ATG4C) were examined by RT-qPCR to confirm the microarray results using the same RNA extracted for the analysis of microarrays. cDNA was generated using the Maxima H Minus First Strand cDNA Synthesis Kit (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA). The Primer Express software v3.0.1 (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) was used to design the primers, which were commercially synthesized. The assay of RT-qPCR was carried out with iTaq Universal SYBR Green Supermix (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) in 10 µL (including 2 µL cDNA and 500 nM of each primer). A QuantStudio 5 Real-Time PCR System (Applied Biosystems) was used for the reactions. Each RT-qPCR's specificity was assessed by performing a melt curve analysis, which was incorporated into each PCR reaction. The expression levels of each gene were quantified as previously reported [23] and normalized to the housekeeping reference genes ACTB and MRPL46 (mitochondrial ribosomal protein L46). The RT-qPCR data analysis was carried out

using IBM SPSS Statistics package version 28.0.1.1 (IBM, Chicago, IL, USA), with statistical significance considered at a p-value less than 0.05 and evaluated using Student's t-test.

### 5. *Statistical analysis*

The analysis of RNA-Seq and microarray results has been outlined in their respective sections. Statistical analysis of the remaining data was performed using the statistical packages IBM SPSS 28.0 (IBM, Chicago, IL, USA) and GraphPad PRISM version 8.0 (GraphPad Software, Inc., San Diego, CA). The chi-square test with Yates correction when necessary was used for comparisons of the percentage data. Continuous variables were analyzed using the Shapiro-Wilk test to check the normality assumption and compared with ANOVA. The Bonferroni or Tukey tests were performed when necessary for post hoc analysis. The embryo development stage was scored subjectively on a scale of 1–4 as follows: 1, morula; 2, early blastocyst; 3, blastocyst; and 4, hatching or hatched blastocyst. The end of ALT treatment or weaning to estrus intervals and the embryo development stage were compared with the nonparametric Kruskal-Wallis test, and when necessary, two by-two comparisons were performed with the Mann–Whitney U test. A  $P < 0.05$  was considered significantly different. All data are expressed as the mean  $\pm$  standard deviation (SD) and percentages.

## EXPERIMENTAL DESIGN AND RESULTS

### **ARTICLE 1: A short-term altrenogest treatment post-weaning followed by superovulation reduces pregnancy rates and embryo production efficiency in multiparous sows**

#### Experimental Design

To group the estrus and superovulate sows weaned on different days, we evaluated the effect of a short-term synchronization treatment combined with SO on reproductive parameters and the quality and quantity of the embryos produced. For this, the sows were administered ALT for 14 (SS-14 group; N = 26), 7 (SS-7 group; N = 31) and 4 (SS4 group; N = 32) days, beginning the treatment on the day of weaning. Sows were superovulated with eCG 24 h after the last administration of ALT and given hCG at the onset of estrus. ALT nontreated sows were superovulated with eCG 24 h after weaning and hCG at the beginning of estrus (SC group; N = 37) and sows with post-weaning natural estrus (C group; N = 34) were used as control groups.

The interval between the end of synchronization treatment (SS groups) or weaning (SC and C groups) to estrus was assessed. Sows that showed signs of estrus were inseminated and subjected to laparotomy on day 6 for examination of their ovaries and the collection of embryos.

During laparotomy, the number of corpora lutea and the number and size of ovarian cysts in each ovary were assessed. After collecting the uterine washings, the number of viable embryos, unfertilized oocytes, degenerated embryos, and the stage of embryonic development were also recorded. Finally, the recovery rates and fertilization rates were determined. To determine the quality of the embryos, the TCN, ICM and TE cell ratio, apoptosis index and cryotolerance were assessed. Sows that showed no signs of estrus 10 days after the end of ALT treatment or weaning also underwent laparotomy to evaluate the status of their ovaries. This experiment was repeated six times to evaluate a total of 160 sows (26 to 37 sows per group). The sows from each replicate were all inseminated with seminal doses from the same boar.

## Results

There was a significant effect of treatment on the interval from ALT withdrawal (SS groups) or from weaning (SC and C groups) to estrus and on the potential pregnancy rate relative to sows that showed estrus or relative to all sows in each group. The percentage of sows that showed estrus within 10 days was not statistically affected by the treatment but ranged from 80.8% to 87.5% in the SS groups and from 93.7% to 94.1% in the control groups. The interval from weaning to estrus was shorter ( $P < 0.05$ ) for the control sows (SC and C groups) ( $3.8 \pm 0.7$  and  $4.2 \pm 0.7$  days, respectively) than the interval from ALT withdrawal to estrus ( $5.2 \pm 1.1$ ,  $5.3 \pm 0.6$ , and  $5.1 \pm 0.8$  days, for SS-14, SS-7, and SS-4 groups, respectively). The estimated pregnancy rate in sows that showed estrus was affected by the duration of ALT treatment. Fewer ( $P < 0.01$ ) sows from the SS-14 group were pregnant on day 6 of the cycle (66.7%) compared with the control groups (97.2 and 96.9% for SC and C groups, respectively). Overall, the estimated pregnancy efficiency, i.e., the percentage of pregnant sows relative to the total number of weaned sows in each group, was negatively affected by the ALT treatment. The efficiency was significantly lower for SS sows (range 53.8–73.3%;  $P < 0.05$ ) than for control sows (94.6 and 91.2% for the SC and C groups, respectively).

Synchronization-SO treatment affected the development of polycystic ovaries, which were observed only in sows from the three SS groups. None of these sows had corpora lutea on their ovaries, and most cysts were larger than 2 cm. While all control sows and sows from the SS-4 group that showed no signs of estrus had functional ovaries, with the presence of multiple corpora lutea and no alterations of the oviducts or uterine horns, 60% of the SS-14 and SS-7 sows had reproductive abnormalities in the form of vaginal discharge and/or polycystic ovaries. Synchronization and SO treatment not only increased ( $P < 0.05$ ) the percentage of sows with ovarian cysts (range of 57.7–65.5%) compared with control sows (~30%) but also increased ( $P < 0.05$ ) the number of ovarian cysts per sow ( $3.1 \pm 2.2$  and  $3.4 \pm 1.5$  in SS-14 and SS-7 sows, respectively, and  $1.2 \pm 0.4$  and  $1.4 \pm 0.5$  in SC and C control sows, respectively).

The ovulatory response was similar in the hormonally treated groups (range:  $28.5 \pm 6.5$  to  $34.1 \pm 10.7$  corpora lutea) and higher ( $P < 0.05$ ) than in the nontreated C sows ( $22.2 \pm 4.3$  corpora lutea).



There were no differences in embryo recovery rates between groups (range:  $84.0 \pm 16.4\%$  to  $87.1 \pm 14.5\%$ ). The mean number of recovered viable embryos (compacted morulae and unhatched blastocysts) was higher ( $P < 0.05$ ) in the SC group ( $26.4 \pm 6.1$ ) than in the SS and C groups ( $\sim 19.0$ ). However, the developmental stage of these embryos was similar among the groups. There were differences between groups in the mean number of oocytes and degenerated embryos, which was almost 5-fold higher ( $P < 0.05$ ) in the SS groups (range:  $6.3 \pm 5.6$ – $7.4 \pm 6.4$ ) than in the control groups ( $1.9 \pm 2.3$  and  $1.4 \pm 1.4$  for SC and C groups, respectively). Fertilization rates in pregnant sows were almost 20 percentage points lower ( $P < 0.05$ ) (range:  $72.5 \pm 22.7\%$  to  $74.4 \pm 18.3\%$ ) in sows of the SS groups than in control sows ( $93.5 \pm 7.8\%$  and  $92.4 \pm 7.1\%$  for SC and C groups, respectively). The overall efficiency of embryo production, i.e., the mean number of viable embryos obtained from the total number of sows in each treatment, was similar in the SS groups (range:  $10.0 \pm 11.3$  to  $14.7 \pm 11.0$ ) and the untreated C group ( $16.0 \pm 7.6$ ) but much lower than in the SC sows ( $25.0 \pm 8.4$ ). Regarding the distribution of collected structures classified as oocytes or degenerated embryos, 68.1%, 8.7%, and 23.2% of these structures were immature oocytes at the GV stage, mature oocytes at the metaphase II stage and degenerated embryos, respectively, in sows from the SS groups. These data were very different ( $P < 0.05$ ) in sows from the control groups, where the percentage of immature oocytes was 0.0% and the percentage of degenerated embryos was 85.8%.

The TCN, TE, and ICM, as well as the ICM/TCN ratio were similar in the viable blastocysts, regardless of treatment. Apoptosis rates in morulae of the different experimental groups were also similar. The cryotolerance of vitrified and warmed morulae in terms of postwarming survival and embryonic developmental stage after 24 h of culture were also not affected by the treatments.

**ARTICLE 2: Combined synchronization and superovulation treatments negatively impact embryo viability possibly by the downregulation of WNT/ $\beta$ -catenin and Notch signaling genes in the porcine endometrium**

### Experimental Design

We evaluated the gene expression patterns in endometria and ovaries after short-term ALT treatment postweaning followed by SO compared to the following two control sets: a conventional SO procedure and spontaneous estrus. Sows were treated with ALT for 7 days,

beginning on the day of weaning and superovulated with eCG 24 h after the last ALT administration and hCG at the onset of estrus (synchronization and SO, SS-7 group; n = 6). Superovulated sows treated with eCG 24 h after weaning and hCG at the beginning of estrus (SO control, SC group; n = 6) and sows with postweaning spontaneous estrus (natural control, NC; n = 6) constituted the two control groups.

Sows in estrus were inseminated with sperm doses from the same boar and laparotomized on day 6 for ovary examination and embryo collection and evaluation. Viable embryos, unfertilized oocytes, and degenerated embryos were noted, and the recovery and fertilization rates were also recorded. Samples from the uterine horn and ovary were collected from each sow, directly snap-frozen in liquid nitrogen, and kept at -80 °C until further use for transcriptome analysis. A total of 30 samples were analyzed corresponding to 5 samples from ovaries and 5 samples from endometrial tissue from each of the three groups studied.

## Results

Although the mean number of corpora lutea per ovary was higher in both SS-7 and SC groups than in the NC group ( $39.8 \pm 10.2$ ,  $38.3 \pm 11.1$ , and  $23.2 \pm 3.8$ , respectively;  $P < 0.05$ ), a decrease ( $P < 0.05$ ) in the fertilization rates ( $75.1 \pm 15.2\%$ ,  $93.8 \pm 7.6\%$ , and  $91.8 \pm 6.9\%$ , respectively) and an increase in the numbers of oocytes and degenerated embryos ( $9.2 \pm 4.3$ ,  $2.0 \pm 2.4$ , and  $1.5 \pm 1.4$ , respectively) were observed in the SS-7 group compared with those in both the SC and NC groups. Consequently, more transferable embryos ( $P < 0.02$ ) were collected in the SC group ( $29.0 \pm 1.8$ ) than in the SS7 ( $22.0 \pm 3.9$ ) and control ( $17.5 \pm 4.7$ ) groups.

In the present study, we observed 675 and 1,583 DEGs in the SS-7 group compared to both the SC and NC groups in endometrial and ovarian samples, respectively. From this general set of genes, 530 were downregulated (with 54 having an  $FC < 10$ ), and 145 were upregulated (with 29 having an  $FC > 10$ ) in the endometrium. A total number of 42 downregulated transcripts (9 with an  $FC < 10$ ) and 1,541 upregulated transcripts (124 with an  $FC > 10$ ) were observed in the ovary when comparing the SS-7 group to both SC and NC groups.

All DEGs were classified into the following three main GO categories: biological processes, cellular components, and molecular functions. From the general set of DEGs in SS-7 sows compared to SC and NC sows, a high proportion of genes were enriched in functional groups related to cell proliferation and communication, metabolic process, developmental

process, cell-to-cell signaling, energy production, etc. Specifically, 43 and 31 genes (ovary and endometrium, respectively) were assigned to functional categories associated with oocyte progression and in utero-embryo development based on the information retrieved from KEGG and DAVID databases.

The combination of synchronization and SO treatments induced the activation of several genes with potential roles in ovarian folliculogenesis and oocyte progression (e.g., *Insr*-FC: 3.3;  $P < 0.02$ , *Esr1*-FC: 21.1;  $P < 0.04$ ). In addition, we found a strong enrichment of genes associated with the Wnt/ $\beta$ -catenin and Notch signaling pathways in the endometrium of SS-7 sows compared to SC and NC groups, concomitant with detrimental endometrial responses for embryo development. Among the transcripts involved in Wnt/ $\beta$ -catenin signaling, we found a downregulation of *Cttnb1* (FC: -2.2;  $P < 0.02$ ), *Ccny* (FC: -2.3;  $P < 0.01$ ), *Rbpj* (FC: -3.1;  $P < 0.01$ ); *Mib1* (FC: -2.6;  $P < 0.04$ ), among others.

RNA-Seq transcriptome *results were validated by RT-qPCR using a total of six genes*. These genes presented similar patterns of expression under both methods proving that RNA-Seq results were reliable.

**ARTICLE 3: The use of a brief synchronization treatment after weaning, combined with superovulation, has moderate effects on the gene expression of surviving pig blastocysts**

### Experimental design

Animals were included in one of three groups: SS7 group ( $n = 6$ ): sows administered ALT 7 days from the day of the weaning and superovulated with eCG 24 h after the end of ALT treatment and hCG at the onset of estrus; SO group ( $n = 6$ ), ALT nontreated sows were superovulated with eCG 24 h postweaning and hCG at the onset of estrus; control group ( $n = 6$ ), weaned sows displaying natural estrus. In three replicates, 18 sows (6 sows per group) were inseminated with AI doses from the same boar. At day 6 of the cycle, the sows underwent surgery for embryo collection. Transcriptome analysis was performed on early and full blastocyst-stage embryos with excellent or good morphology. These embryonic stages were equally distributed among the three groups. Five blastocysts from each sow of each group were placed into a tube containing 5  $\mu$ L of PBS, snap-frozen in liquid nitrogen, and stored at  $-80^{\circ}\text{C}$  until further analysis. We conducted 18 microarray analyses (6 for each group), and the

outcomes were authenticated via RT-qPCR, which involved three biological and three technical replicates for each gene.

## Results

Data on embryo recovery, fertilization, and embryo viability in animals from SS7, SO, and control groups were published in article 2 of this thesis. Analysis of the transcriptome showed 172 and 97 transcripts being differentially expressed in embryos from SS7 and SO groups relative to control embryos. Among these, 85 (48 and 37 up- and down-regulated, respectively) and 36 (8 and 28 up- and down-regulated, respectively) transcripts were annotated as known genes in the SS7 embryos and SO embryos, respectively.

PCA over all genes split SS7 and SO from control samples. The first three PCA axes accounted for 51.6% (SS7 vs. control) and 50.1% (SO vs. control) of data variance, with the first axis accounting for 24.3% and 25.3%, respectively. Based on hierarchical clustering, the DEGs between SS7 embryos and control embryos were strikingly segregated into two groups, but this segregation was not evident for the DEGs between SO embryos and control embryos.

According to the KEGG database, the DEGs fit into three main GO categories: biological processes, cellular components, and molecular functions. While the majority of the DEGs in the SS7 embryos were associated with biological processes such as cell growth, detoxification, and proliferation of cell populations, DEGs from SO embryos were related to localization, cellular component organization, and multicellular organismal process. Cell anatomical entity was the most highly represented category within cellular components for both SS7 and SO embryos. Genes involved in molecular functions such as catabolic activity, antioxidant activity, and binding (SS7 embryos) or binding and transporter activity (SO embryos) were the most abundant. Generally, more up-regulated and down-regulated genes were detected in SS7 and SO embryos, respectively, in each biological function.

To identify significant KEGG pathways, dataset lists including all DEGs (ALL), upregulated DEGs (UP), and down-regulated DEGs (DOWN) were considered. In the SS7 treatment, we found six, two, and five pathways enriched in the ALL, UP, and DOWN lists, respectively, resulting in eight pathways that were specifically affected by the treatment. In the SO treatment, only two, one, and three pathways were enriched in the ALL, UP, and DOWN lists, respectively, with a total of four pathways influenced by the treatment.

KEGG pathway analysis in the UP list of SS7 vs. control embryos showed enrichment of pathways associated with glycan biosynthesis (glycosaminoglycan biosynthesis-chondroitin sulfate/dermatan sulfate) and metabolic pathways, and these pathways comprised genes (CHSY1, CSGALNACT2, CTPS1, RDH10, and SPTLC2) that affect main reproductive processes. Six pathways, metabolism of xenobiotics by cytochrome P450, drug metabolism—cytochrome P450, glutathione metabolism, chemical carcinogenesis, lysosome, and terpenoid backbone biosynthesis, were enriched in the DOWN list of SS7 vs. control embryos and contained genes (GSTK1, GSTO1, ASAH1, SUMF1, and FDPS) with key roles in cell functions.

Comparison between SO embryos and control embryos provided only one (natural killer cell-mediated cytotoxicity) and three (collecting duct acid secretion, autophagy, and N-glycan biosynthesis) enriched pathways in the UP and DOWN lists, respectively, and these pathways contained genes (HCST, ATP6V1B1, ATG4C, and MAN1A2) seemingly unrelated to reproduction.

Microarray results were corroborated by RT-qPCR using seven genes. The results supported the reliability of the microarray analysis.



# CONCLUSIONS

---





## CONCLUSIONS

1. The combination of ALT synchronization treatment with SO treatment was effective in delaying post-weaning estrus and in inducing superovulation in weaned multiparous sows.
2. The combination of ALT synchronization treatment with SO treatment negatively affected the interval to the onset of estrus, ovarian status, pregnancy rate, most of the reproductive parameters assessed, and the overall embryo production efficiency.
3. The hormonal treatments (synchronization combined with SO) have the potential to alter ovarian and endometrial gene expression patterns, triggering improper follicle development, and oocyte growth.
4. The hormonal treatments led to the dysregulation in reproductive tissues of genes involved in two critical metabolic pathways for embryo development, the Wnt/ $\beta$ -catenin and Notch signaling pathways.
5. The impact of the synchronization-SO treatments on the number of altered pathways and on the number and FC of DEGs in the surviving day-6 blastocysts was moderate compared to control blastocysts collected from weaned sows with natural estrus.
6. The adverse effects observed in fertilization, embryo production, and the gene expression profiles of the ovaries and uterus resulting from the combined application of synchronization and SO treatments discourage its utilization in ET programs.



# RESUMEN GENERAL

---



## RESUMEN GENERAL

### INTRODUCCIÓN

La Unión Europea (UE) es el segundo productor mundial de porcino y el mayor exportador de productos derivados del cerdo, provenientes de animales criados con altos estándares de bienestar y con el mayor valor genético. España es el tercer productor mundial de porcino, sólo por detrás de China y Estados Unidos, y el primero de la UE, con el 25,4% de la producción comunitaria. (MAPA, 2022; <https://mapa.gob.es>). Por tanto, el sector porcino español tiene una importancia económica clave. En los últimos años, el sector español ha experimentado una tendencia de crecimiento muy favorable, tanto en censo como en número de explotaciones y producción. Este crecimiento ha llevado a una tasa de autoabastecimiento del 205% en 2022 (MAPA, 2022; <https://mapa.gob.es>). Estos factores consolidan a España como un actor económico sólido y un importante productor y exportador de carne de cerdo, todo ello manteniendo los estándares de bienestar animal, ofreciendo productos de alta calidad y mejorando continuamente la eficiencia, las condiciones sanitarias y el progreso genético.

En las últimas décadas, la mejora de la nutrición y el manejo de los animales, el control de enfermedades, la selección genética y la inseminación artificial (AI) han sido los factores más importantes para aumentar la producción porcina. La adopción de tecnologías de reproducción emergentes, como la transferencia de embriones (ET), reforzaría la sostenibilidad y competitividad del sector porcino y contribuiría a la aplicación de las estrategias de bioeconomía. A nivel comercial, la ET ofrece posibilidades extraordinarias para el sector porcino tanto desde un punto de vista productivo como económico, ya que permitiría la difusión de genética de alto valor (embriones) sin riesgo de transmisión de enfermedades, con un menor coste de transporte y sin comprometer el bienestar animal. A pesar de su importancia, la aplicación comercial de la ET se ha considerado durante muchos años como una utopía, incluso dentro de los sistemas de producción y mejora genética. Sin embargo, en las últimas dos décadas, se ha producido un cambio significativo en este escenario y, actualmente, esta tecnología se encuentra disponible para su utilización comercial, ya que varios avances permiten hoy la ET no quirúrgica (NET) [1] y el uso de embriones conservados durante periodos de tiempo cortos (en estado líquido) o largos (vitrificados) [2-6]. Sin

embargo, continúan existiendo algunas cuestiones sobre su eficiencia que deben ser resueltas antes de que esta tecnología pueda utilizarse de forma generalizada.

Para obtener resultados reproductivos óptimos tras la NET es necesario utilizar un número considerable de embriones frescos (24-30 embriones) [1,6] o vitrificados (40 embriones) [2] en cada transferencia. Aunque existe una variabilidad individual considerable en la tasa de ovulación [7,8], en general se suele considerar que un rango entre 15 y 25 ovocitos por ovulación es típico para la especie porcina. Esto significa que la proporción donante:receptora oscilaría entre 1-1,5:1. Sin embargo, en la práctica, diversos factores suelen aumentar dicha proporción hasta 2,5-3,5:1 [9], lo que conlleva un elevado coste por embrión transferible. Algunos de estos factores implican bajas tasas de gestación y fecundación, pobre desarrollo y calidad de los embriones en el momento de la recogida y reducidas tasas de recuperación embrionaria. Una posibilidad para disminuir la proporción donante:receptora es realizar un tratamiento de superovulación (SO) a las hembras donantes. Previamente, el celo de estas hembras debe ser sincronizado para optimizar la eficiencia de la recogida de embriones. Los tratamientos de sincronización y SO más efectivos dependerán del tipo de donante que se vaya a utilizar. Básicamente, en los programas de ET se pueden utilizar como donantes de embriones tres tipos de hembras: cerdas prepuberales, cerdas nulíparas cíclicas y cerdas destetadas.

En las cerdas prepuberales, los tratamientos de SO no sólo inducen la sincronización del celo y la ovulación, sino que también aumentan la tasa de ovulación y el número de embriones en comparación con los obtenidos en cerdas nulíparas [10]. Sin embargo, estos tratamientos también provocan un alto porcentaje (25-50%) de ovocitos y/o embriones degenerados [11,12] y producen una elevada variabilidad individual en la respuesta superovulatoria [13]. Por estas razones, se desaconseja la utilización de estas hembras como donantes de embriones.

La búsqueda de un método eficaz para sincronizar el celo y la ovulación en cerdas nulíparas cíclicas comenzó hace más de 50 años [14]. El método más efectivo para la sincronización del celo en este tipo de cerdas consiste en inhibir la secreción de gonadotropinas hipofisarias durante un período de 14 a 20 días, lo que permite la regresión de los cuerpos lúteos y, al mismo tiempo, impide el crecimiento de nuevos folículos y la ovulación [15]. Al final del tratamiento, la secreción de gonadotropinas se reanuda de forma

sincrónica en todos los animales tratados. Aunque se han probado numerosos tratamientos progestacionales, el progestágeno sintético altrenogest (ALT), comercializado como Regumate en Europa y como Matrix en Norteamérica, es la única sustancia progestacional autorizada para su uso en cerdas en Europa y Norteamérica, siendo utilizada habitualmente en la industria porcina para sincronizar el estro en las cerdas nulíparas. Este progestágeno utilizado a una dosis de 15 a 20 mg/día/cerda por vía oral durante 14 a 18 días suprime el desarrollo folicular, y las hembras normalmente manifiestan los síntomas típicos del celo entre 5 y 7 días tras finalizar el tratamiento [16-18]. Cuando se utilizan cerdas nulíparas cíclicas como donantes de embriones, una vez finalizado el tratamiento de sincronización del estro se debe utilizar un tratamiento de SO. La administración de gonadotropina coriónica equina (eCG) tras el tratamiento de sincronización aumenta la tasa de ovulación, pero también provoca una respuesta ovulatoria inconsistente y un aumento de las pérdidas embrionarias entre los días 24 y 40 de gestación [19,20] sin influir en el tamaño de la camada en comparación con los controles (sin tratamiento de SO) [21,22]. Desafortunadamente, sólo un estudio ha evaluado el efecto de un tratamiento combinado de sincronización y SO en cerdas nulíparas sobre el desarrollo embrionario en el día 6 del ciclo [23]. Los resultados de este estudio, sin embargo, no pueden considerarse concluyentes ya que no incluyeron un grupo control (sin superovulación) en el diseño experimental. Estos autores especularon con la posibilidad de que un porcentaje de ovocitos ovulados tras los tratamientos fueran inmaduros y, por tanto, no fueron fecundados. Confirmando esta especulación, en experimentos de nuestro laboratorio (datos no publicados) se obtuvo cerca de un 40% de ovocitos inmaduros en el día 6 del ciclo de cerdas nulíparas que fueron superovuladas con 1000 UI de eCG al finalizar el tratamiento de sincronización. Por lo tanto, es necesario realizar más investigaciones sobre el uso combinado de ambos tratamientos para obtener el máximo rendimiento de las nulíparas utilizadas como donantes de embriones en los programas de ET.

La mayoría de las cerdas destetadas muestran un celo fértil en los 7 días posteriores al destete. Por ello, el destete se considera un método fisiológico excepcionalmente eficaz para sincronizar el celo y la ovulación en un grupo de cerdas. Un tratamiento de SO mediante la administración de eCG y gonadotropina coriónica humana (hCG) administradas 24 h después del destete y al inicio del celo, respectivamente, aumenta la tasa de ovulación y el número de embriones viables y transferibles, todo ello sin afectar negativamente al porcentaje de

ovocitos no fecundados ni a la calidad de los embriones obtenidos [24]. Además, este tratamiento tampoco implica ningún efecto negativo sobre la fertilidad o la prolificidad tras la NET de embriones superovulados [24,25]. Por lo tanto, las cerdas destetadas constituyen una opción sumamente interesante para su utilización como donantes de embriones dado que el destete es un método sencillo y natural para la sincronización el celo, y la SO de este tipo de hembras reduce el ratio donante:receptora, mejorando, por tanto, la eficiencia de los programas de ET. Sin embargo, los programas de ET requieren con frecuencia un número de cerdas donantes considerablemente superior al que se puede obtener en un solo destete, por lo que es esencial poder combinar cerdas de diferentes destetes.

El celo post-destete puede retrasarse usando ALT [26] sin efectos negativos sobre la ovulación y el desarrollo embrionario-fetal [27,28]. La administración de ALT durante 7 o 14 días se utiliza frecuentemente en las explotaciones porcinas para retrasar el inicio del celo una o dos semanas. Este procedimiento permitiría disponer de un lote adecuado de cerdas donantes para la ET, y además reduciría el número de hembras que no pueden ser utilizadas debido a que presentan el celo post-destete fuera del rango de tiempo adecuado, ya que, por razones prácticas, en los programas de ET sólo se utilizan cerdas con un intervalo destete-celo específico (3-5 días) [6]. Sin embargo, aún se desconoce el impacto de la administración por breves periodos de tiempo de ALT en combinación con un tratamiento de superovulación en cerdas destetadas sobre la cantidad y calidad de los embriones producidos. Además, el uso combinado de tratamientos de sincronización del estro y de SO podría inducir alteraciones moleculares cuyos efectos aún no han sido estudiados. Está demostrado que las hormonas desempeñan un papel fundamental en la fisiología reproductiva al influir en la expresión génica. En particular, los mRNA que codifican los receptores hormonales están regulados frecuentemente por sus hormonas correspondientes a través de mecanismos de retroalimentación autorreguladores [29,30]. Aunque el uso de tratamientos hormonales para retrasar el celo en combinación con la SO puede influir en la estabilidad y expresión de los mRNA, se desconoce el impacto que esos tratamientos hormonales puedan tener sobre la expresión génica en los ovarios y el endometrio de las cerdas, así como en los embriones resultantes, y las consecuencias potenciales sobre la fisiología reproductiva.



## OBJETIVOS

El objetivo principal de esta tesis fue evaluar la eficacia de un tratamiento de sincronización del estro de corta duración combinado con un tratamiento de SO en cerdas destetadas utilizadas como donantes de embriones en los programas de ET. Con este fin, los objetivos específicos contenidos en esta tesis fueron investigar el impacto de combinar esos tratamientos hormonales sobre:

1. El inicio del celo y la respuesta ovulatoria, las características ováricas, los resultados reproductivos y la calidad y cantidad de los embriones en el día 6 del ciclo (artículo 1).
2. Los parámetros reproductivos y los cambios de expresión génica en los ovarios y el endometrio en el día 6 del ciclo (artículo 2).
3. Los cambios de expresión génica en los blastocitos supervivientes en el día 6 del ciclo (artículo 3).

## MATERIAL Y MÉTODOS

### Metodología general

#### 1. *Animales*

Este estudio se llevó a cabo en una explotación porcina (Agropor SL, Murcia, España). El día del destete se seleccionaron aleatoriamente cerdas multíparas (Landrace x Large-White) con un periodo de lactación de 21 a 24 días. Los animales fueron alojados en jaulas individuales con condiciones ambientales de humedad y temperatura controladas a través de un sistema de ventilación forzada. Como donantes de semen se utilizaron verracos Duroc (de 2 a 3 años) alojados en un centro de AI de producción de dosis seminales (AIM Ibérica, Murcia, España). Los animales tuvieron acceso ad libitum al agua y fueron alimentados de acuerdo con sus necesidades nutricionales. Los experimentos se llevaron a cabo siguiendo la Directiva 2010/63/UE sobre experimentación animal. El estudio fue revisado y aprobado por el Comité de Ética para la experimentación con animales de la Universidad de Murcia (Código: 486/2018).

#### 2. *Tratamientos hormonales, detección del celo e inseminación artificial*

Las cerdas se sincronizaron mediante la administración oral de ALT (Regumate<sup>®</sup>, Merck Sharp & Dohme Animal Health, S.L., Salamanca, España) a una dosis de 20 mg por cerda y día. Las cerdas se superovularon con 1.000 UI de eCG i.m. (Foligon, Intervet, Boxmeer, Países Bajos). La detección del celo se realizó una vez al día por personal entrenado, en presencia de verracos vasectomizados, comenzando el último día del tratamiento de sincronización o el día del destete. Al inicio del celo, las cerdas fueron tratadas con 750 UI de hCG i.m. (Veterin Corion, Divasa, Farmavic S.A., Barcelona, España) e inseminadas a las 6 h y 24 h después del inicio del celo. Se utilizó la AI estándar con dosis seminales, frescas o almacenadas durante un máximo de 24 h a 18°C, conteniendo  $3 \times 10^9$  espermatozoides extendidos en 90 mL de diluyente BTS (solución de descongelación de Beltsville) [31].

### 3. *Intervención quirúrgica y obtención de embriones*

Los procedimientos quirúrgicos y de obtención de embriones se llevaron a cabo en el día 6 del ciclo (día 0 = inicio del celo) siguiendo los protocolos de nuestro laboratorio [31]. Las cerdas fueron sedadas y luego anestesiadas con azaperona (i.m.; 2 mg/kg de peso corporal; Stresnil®, Landegger Strasse, Austria) y tiopental sódico (i.v.; 7 mg/kg de peso corporal; B. Braun VetCare SA, Barcelona, España), respectivamente. La anestesia se mantuvo con isoflurano (3% - 5%; IsoFlo®, Madrid, España). Tras la exposición del aparato reproductor, se examinaron los ovarios para determinar su respuesta a los tratamientos hormonales, contándose el número de cuerpos lúteos en ambos ovarios. En cada cerda se registró la presencia de quistes foliculares y de ovarios poliquísticos. Los embriones se recuperaron lavando la punta de cada cuerno uterino con el medio modificado Tyrode lactato-HEPES-alcohol polivinílico (THP) [6,33] a 37°C, y se registró el número de ovocitos no fecundados y de embriones viables y degenerados en cada cerda.

#### Metodología específica

La metodología específica utilizada en cada uno de los artículos de la tesis para alcanzar los objetivos previstos fue la siguiente:

#### **ARTÍCULO 1. Un tratamiento breve de altrenogest post-destete seguido de un tratamiento de superovulación reduce las tasas de gestación y la eficiencia en la producción de embriones en cerdas multíparas**

##### *1. Evaluación de ovocitos y embriones degenerados*

Para la evaluación nuclear, los ovocitos no fecundados y los embriones degenerados se fijaron con acético-alcohol, se tiñeron con lacmoid y se evaluaron microscópicamente, siguiendo el procedimiento descrito por nuestro grupo [34]. Los ovocitos con presencia de la cromatina rodeada por una membrana nuclear se consideraron ovocitos inmaduros en estadio de vesícula germinal (VG), y los ovocitos con los cromosomas organizados en metafase y con la presencia del primer corpúsculo polar extruido se consideraron ovocitos maduros en estadio de metafase II. Las estructuras degeneradas con múltiples núcleos teñidos se consideraron embriones degenerados.

## 2. *Evaluación de la calidad embrionaria*

La evaluación de la calidad embrionaria se llevó a cabo mediante el estudio de la morfología, el número de células de la masa interna (ICM) y de células del trofoectodermo (TE), la apoptosis y la criotolerancia.

### 2.1. *Morfología*

El estado de desarrollo y la calidad de los embriones se evaluaron con un estereomicroscopio. Las estructuras unicelulares se consideraron ovocitos. Los embriones insuficientemente desarrollados se consideraron embriones degenerados. Los embriones que presentaron un estadio de desarrollo adecuado para su edad (día 6: mórulas y blastocistos) y una morfología buena o excelente según los criterios de la Sociedad Internacional de Transferencia de Embriones [35] se consideraron viables.

### 2.2. *Número de células en los blastocistos: tinción diferencial*

El número total de células (TCN) y el número de células de la ICM y del TE de embriones en estadio de blastocisto se evaluaron siguiendo un procedimiento de inmunofluorescencia [36]. Los embriones viables se fijaron en paraformaldehído, se permeabilizaron con Triton X-100 y Tween 20 y se incubaron secuencialmente en HCl y Tris-HCl. A continuación, se lavaron, se colocaron en una solución de bloqueo y se volvieron a lavar antes de incubarlos con un anticuerpo primario (CDX-2) que se une específicamente a las células del TE. Posteriormente, los embriones se lavaron de nuevo, se incubaron con Alexa Fluor R 568- anticuerpo secundario de cabra contra IgG de ratón, se transfirieron a microgotas que contenían una solución Vectashield-Hoechst 33342 y se examinaron con un microscopio de fluorescencia para contar los núcleos teñidos con Hoechst (TCN; fluorescencia azul) y las células TE (fluorescencia roja).

### 2.3. *Apoptosis celular*

La apoptosis se determinó en embriones en estadio de mórula utilizando el kit APO-BrdUTM TUNEL Assay Kit (A23210; Invitrogen, Oregon, EE.UU.) siguiendo un protocolo descrito anteriormente [37]. Brevemente, los embriones viables se fijaron en paraformaldehído y se permeabilizaron con Triton X-100 y Tween 20. Los embriones para el control positivo se incubaron en Dnasa I. A continuación, las mórulas control y

experimentales se transfirieron a un medio PBS-BSA con Tween 20 y se incubaron en medio de reacción TUNEL. Por último, los embriones se lavaron, se colocaron en microgotas de solución Vectashield-Hoechst 33342 y se examinaron mediante microscopía de fluorescencia. Las células con núcleos verdes fluorescentes se clasificaron como TUNEL+. La proporción de células TUNEL+ respecto al total de núcleos teñidos con Hoechst (fluorescencia azul) fue el índice apoptótico.

#### *2.4. Criotolerancia*

La criotolerancia se utilizó como marcador de la calidad embrionaria y como posible predictor de la capacidad de desarrollo embrionario. Embriones en estadio de mórula de cada grupo se vitrificaron en las 3 h siguientes a la obtención embrionaria, tal como se ha descrito previamente [4]. Brevemente, los embriones se lavaron en medio THP y se incubaron en primer lugar en THP que contenía 7,5% de dimetilsulfóxido (DMSO) y 7,5% de etilenglicol (EG) y posteriormente en THP que contenía 16% de DMSO, 16% de EG y 0,4 M de sacarosa. Grupos de 5 a 6 embriones se cargaron en pajuelas OPS (open pull Straw) y se sumergieron en nitrógeno líquido. Tras el almacenamiento, los embriones se calentaron en medio THP suplementado con 0,13 M de sacarosa y se cultivaron durante 24 h en medio NCSU-23 [38] suplementado con albúmina sérica bovina (0,4%) y suero fetal de ternera (10%) a 38,5°C en un 5% de CO<sub>2</sub> en aire. Se consideraron viables aquellas mórulas que alcanzaron el estadio de blastocisto con una morfología excelente o buena al final del cultivo. La tasa de supervivencia se definió como la proporción de embriones viables tras el calentamiento respecto al número total de embriones cultivados.

**ARTÍCULO 2. Los tratamientos combinados de sincronización y superovulación afectan negativamente a la viabilidad embrionaria posiblemente por la subexpresión de genes implicados en los pathways de señalización WNT/ $\beta$ -catenina y Notch en el endometrio porcino.**

##### *1. Obtención de muestras de tejidos*

Las laparotomías se realizaron el día 6 como se ha mencionado anteriormente. Se extrajeron muestras de tejido de la porción mesometrial del cuerno uterino izquierdo y de

todo el ovario izquierdo. Las muestras se lavaron con medio THP, se congelaron y se almacenaron a -80 °C hasta la extracción del RNA.

## 2. *Extracción del RNA total*

El aislamiento del RNA total se realizó como se ha descrito anteriormente [38]. Brevemente, las muestras de endometrio u ovario se disolvieron en 1 mL de reactivo TRIzol (Thermo Scientific, Waltham, MA, EE.UU.) con un Tissuelyser II (Qiagen, Hilden, Alemania) y se centrifugaron. El sobrenadante se incubó con bromocloropropano, se centrifugó de nuevo y se volvió a incubar con isopropanol y solución de precipitación de RNA. El precipitado se mezcló con 1 mL de etanol al 75% y se centrifugó, y el precipitado resultante se secó al aire y se disolvió en 30 µL de agua libre de RNasa. La cantidad y la integridad del RNA se midieron con un Bioanalyzer 2100 (Agilent, Santa Clara, EE.UU.). Todas las muestras de RNA tuvieron una calidad satisfactoria, con un número de integridad del RNA (RIN) >8.

## 3. *Secuenciación del RNA (RNA-seq)*

Se utilizó la técnica RNA-Seq para identificar aquellos genes expresados diferencialmente (DEG) entre los grupos. Las bibliotecas se generaron siguiendo un procedimiento previamente establecido [39] usando el TruSeq Stranded mRNA Library Prep Kit (Illumina, San Diego, CA, EE.UU.) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Brevemente, el RNA total se diluyó en agua libre de nucleasas y, tras su purificación y fragmentación, el RNAm se convirtió en una biblioteca de DNAC mediante un proceso de reparación de extremos, la adición de una única base "A" al extremo 3' y la ligación de adaptadores de Illumina. Los productos se purificaron y enriquecieron por PCR para producir la biblioteca de DNAC bicatenario final. Se utilizó el kit NextSeq 500/550 High Output v2.5 (150 ciclos) para la secuenciación de la biblioteca (configuración de secuenciación de 2 × 75 bp paired-end). Los conjuntos de datos brutos se depositaron en el Sequence Read Archive con el número de acceso PRJNA862977 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/bioproject/862977862977>).

## 4. *Análisis de los datos de secuenciación*

Las lecturas limpias se alinearon con el genoma porcino (SusScrofa 10.2) mediante el método Spliced Transcripts Alignment to a Reference (STAR) [40]. La normalización de

los datos se realizó mediante el método Robust Multichip Average (RMA) [41]. El análisis de datos se realizó con el software Partek Genomics Suite & Partek Pathways (Partek Incorporated, St. Louis, EE.UU.). Se utilizó un ANOVA unidireccional para detectar los DEGs entre grupos con los valores de corte del valor de P y valor de cambio (fold change; FC) fijados en 0,05 y 2, respectivamente. Los análisis de ontología génica (GO) y enriquecimiento de pathways de los DEGs se realizaron utilizando las bases de datos DAVID (base de datos de anotación, visualización y descubrimiento integrado), KEGG (Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes) y DICE (base de datos de expresión celular inmunitaria). El análisis de enriquecimiento se realizó utilizando g:Profiler (versión e106\_eg53\_p16\_65fcd97) con el método de corrección de pruebas múltiples g:SCS aplicando un umbral de significación de 0,05 [42]. Las conexiones de red entre genes se realizaron utilizando el software STRING (v11.0), disponible en línea en <https://string-db.org> [43].

#### 5. Validación de RNA-Seq

Los datos de RNA-Seq se validaron mediante PCR cuantitativa en tiempo real (RT-qPCR) de seis DEGs seleccionados. Las muestras de RNA utilizadas para el ensayo RT-qPCR fueron las mismas utilizadas para el análisis RNA-Seq. Los primers fueron sintetizados comercialmente y probados (Bio Rad, Hercules, CA, EE.UU.). El RNA total se transcribió inversamente en DNAC utilizando el kit de transcripción inversa de DNAC de alta capacidad (Applied Biosystems, Foster City, CA). La RT-qPCR se realizó en reacciones de 10  $\mu$ L con 5  $\mu$ L de mezcla maestra PowerUp SYBR Green (Applied Biosystems, CA, EE.UU.), 50 nM de cada conjunto de primers, 1  $\mu$ L de DNAC y agua. Todas las reacciones se llevaron a cabo utilizando el sistema de detección de PCR en tiempo real (QuantStudio 5, Thermo Fisher, Waltham, MA, EE.UU.). Cada muestra para cada gen se corrió por duplicado. Los niveles de expresión relativa de los genes se cuantificaron utilizando el método  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  y dos genes de referencia, gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa (GAPDH) y beta-actina (ACTB).

**ARTÍCULO 3: El uso de un breve tratamiento de sincronización tras el destete, combinado con la superovulación, tiene efectos moderados sobre la expresión génica de los blastocistos porcinos supervivientes.**

*1. Extracción de RNA total*

Se utilizó el RNeasy Micro Kit (Qiagen Ibérica, Madrid, España) para la extracción del RNA total de blastocitos siguiendo las instrucciones del fabricante. La concentración y la calidad del RNA extraído se determinaron con el bioanalizador 2100 (Agilent, Santa Clara, CA, EE.UU.). El RIN de cada muestra fue superior a 8,5.

*2. Procesamiento de microarrays*

Las diferencias de expresión génica entre los grupos se determinaron con el GeneChip Porcine Gene 1.1 ST Array Strip (901798, Affymetrix, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, EE.UU.). Se produjo ss-DNAc a partir de 800 pg de RNA total de cada muestra utilizando el GeneChip WT Pico Reagent Kit (P/N 902623; Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, EE.UU.) siguiendo las recomendaciones del fabricante. La cantidad y la calidad del DNAc se comprobaron mediante Nanodrop y Bioanalyzer. Se limpiaron las dianas de ss-DNAc después de su fragmentación y etiquetado terminal, y se incluyeron 3,75 µg de ss-DNAc fragmentado y biotinilado en la mezcla de hibridación, utilizando el kit GeneAtlas Hybridization, Wash and Stain para WT Array Strips (Affymetrix, P/N 901667) siguiendo las recomendaciones del fabricante. Las preparaciones resultantes se hibridaron con la tira de arrays (Porcine Gene 1.1 ST Array Strip) durante 20 h a 48°C. Tras la incubación, los arrays se lavaron, tiñeron y escanearon utilizando el GeneAtlas System (Affymetrix). A continuación, los datos se analizaron mediante la consola de comandos de expresión de Affymetrix, y todas las muestras superaron los criterios de calidad.

*3. Análisis de los datos de microarrays*

Los datos se normalizaron mediante el método RMA [41]. La interpretación estadística y funcional de los datos se llevó a cabo utilizando el software de Partek Genomics Suite y Partek Pathways. Se utilizó el análisis de componentes principales (PCA) como herramienta exploratoria para examinar las variaciones del transcriptoma entre las muestras. Los DEGs entre grupos se detectaron mediante ANOVA unidireccional con un



valor  $p$  no ajustado  $< 0,05$  y un FC 1,5. La identificación de conjuntos de genes sobrerrepresentados (GO y pathways) en la lista de DEGs se basó en la base de datos KEGG [44] utilizando la prueba exacta de Fisher.

#### 4. Validación de los resultados de los microarrays

Un total de 7 DEGs, 5 sobre-regulados (CHSY1, CSGALNACT2, CTPS1, RDH10, SPTLC2) y 2 infra-regulados (GSTK1, ATG4C) se examinaron mediante RT-qPCR para confirmar los resultados de los microarrays utilizando el mismo RNA extraído para el análisis de los microarrays. El DNAc se generó utilizando el kit de síntesis de DNAc de primera cadena Maxima H Minus (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, EE.UU.). Se utilizó el software Primer Express v3.0.1 (Applied Biosystems, Foster City, CA, EE.UU.) para diseñar los primers, que fueron sintetizados comercialmente. El ensayo de RT-qPCR se llevó a cabo con el kit iTaq Universal SYBR Green Supermix (Applied Biosystems, Foster City, CA, EE.UU.) en 10  $\mu$ L (incluyendo 2  $\mu$ L de DNAc y 500 nM de cada primer). Para las reacciones se utilizó un sistema de PCR en tiempo real QuantStudio 5 (Applied Biosystems). La especificidad de cada RT-qPCR se evaluó realizando un análisis de curva de fusión, que se incorporó a cada reacción de PCR. Los niveles de expresión de cada gen se cuantificaron [23] y se normalizaron con respecto a los genes de referencia ACTB y MRPL46 (Proteína Ribosomal Mitocondrial L46). El análisis de los datos de RT-qPCR se llevó a cabo utilizando el paquete IBM SPSS Statistics versión 28.0.1.1 (IBM, Chicago, IL, EE.UU.), considerándose la significación estadística para un valor  $p$  inferior a 0,05 y evaluándose mediante la prueba T de Student.

#### 5. Análisis estadístico

El análisis de los resultados de RNA-Seq y microarrays se ha descrito en sus respectivas secciones. El análisis estadístico del resto de datos se realizó con los paquetes estadísticos IBM SPSS (IBM, Chicago, IL, EE.UU.) y GraphPad PRISM versión 8.0 (GraphPad Software, Inc., San Diego, CA). Para comparar los datos porcentuales se utilizó la prueba del Chi-cuadrado con la corrección de Yates cuando fue necesario. Las variables continuas se analizaron mediante la prueba de Shapiro-Wilk para comprobar el supuesto de normalidad y se compararon con el test de ANOVA. Se realizaron las pruebas de Bonferroni o Tukey cuando fue necesario para los análisis post hoc. El estadio de desarrollo

embrionario se clasificó subjetivamente en una escala de 1-4 de la siguiente manera: 1, mórula; 2, blastocisto temprano; 3, blastocisto; y 4, blastocisto eclosionando o eclosionado. Los intervalos entre el final del tratamiento ALT o el destete y el inicio del celo y el estadio de desarrollo embrionario se compararon con la prueba no paramétrica de Kruskal-Wallis y, cuando fue necesario, se realizaron comparaciones de dos en dos con la prueba U de Mann-Whitney. Un valor  $P < 0,05$  se consideró significativamente diferente. Todos los datos se expresaron como media  $\pm$  desviación estándar (DE) y porcentajes.

## DISEÑO EXPERIMENTAL Y RESULTADOS

### **ARTÍCULO 1: Un tratamiento breve de altrenogest post-destete seguido de un tratamiento de superovulación reduce las tasas de gestación y la eficiencia en la producción de embriones en cerdas multíparas**

#### Diseño experimental

Para agrupar el celo y la SO de las cerdas destetadas en días diferentes, evaluamos el efecto de un tratamiento de sincronización a corto plazo combinado con un tratamiento de SO sobre los parámetros reproductivos y la calidad y cantidad de los embriones producidos. Para ello, las cerdas fueron tratadas con ALT durante 14 (grupo SS-14; N = 26), 7 (grupo SS-7; N = 31) y 4 (grupo SS4; N = 32) días, comenzando el tratamiento el día siguiente al destete. Las cerdas se superovularon con eCG 24 h después de la última administración de ALT y se les administró hCG al inicio del celo. Cerdas no tratadas con ALT pero superovuladas con eCG 24 h después del destete y hCG al inicio del celo (grupo SC; N = 37) y cerdas con celo natural post-destete (grupo C; N = 34) se utilizaron como grupos control.

Se evaluó el intervalo entre el final del tratamiento de sincronización (grupos SS) o el destete (grupos SC y C) y el inicio del celo. Las cerdas que mostraron signos de celo fueron inseminadas y sometidas a laparotomía el día 6 para examinar sus ovarios y recoger sus embriones.

Durante la laparotomía, se evaluó el número de cuerpos lúteos y el número y tamaño de los quistes ováricos en cada ovario. Tras los lavados uterinos, también se registró el número de embriones viables, ovocitos no fecundados, embriones degenerados y el estadio de desarrollo embrionario. Por último, se determinaron las tasas de recuperación y de fecundación. Para determinar la calidad de los embriones, se evaluó la proporción de células de la MCI y del TE, el índice de apoptosis y la criotolerancia. Las cerdas que no mostraron signos de celo 10 días después del final del tratamiento con ALT o del destete también fueron sometidas a una laparotomía para evaluar el estado de sus ovarios. Este experimento se repitió seis veces, evaluando un total de 160 cerdas (de 26 a 37 cerdas por grupo). Todas las cerdas de cada replicado se inseminaron con dosis seminales del mismo verraco.

## Resultados

Hubo un efecto significativo del tratamiento sobre el intervalo desde la retirada del ALT (grupos SS) o desde el destete (grupos SC y C) hasta el inicio del celo y sobre el porcentaje potencial de gestación relativo a las cerdas que mostraron celo o relativo a todas las cerdas de cada grupo. El porcentaje de cerdas que mostraron el celo dentro de los 10 días tras el tratamiento o el destete no se vio afectado estadísticamente por el tratamiento, pero osciló entre el 80,8 y el 87,5% en los grupos SS y entre el 93,7 y el 94,1% en los grupos control. El intervalo desde el destete hasta el inicio del celo fue más corto ( $P < 0,05$ ) para las cerdas control (grupos SC y C) ( $3,8 \pm 0,7$  y  $4,2 \pm 0,7$  días, respectivamente) que el intervalo desde la retirada de ALT hasta el celo ( $5,2 \pm 1,1$ ,  $5,3 \pm 0,6$  y  $5,1 \pm 0,8$  días, para los grupos SS-14, SS-7 y SS-4, respectivamente). La tasa de gestación en cerdas que mostraron celo se vio afectada por la duración del tratamiento con ALT. Las cerdas del grupo SS-14 presentaron un porcentaje de gestación en el día 6 del ciclo (66,7%) menor ( $P < 0,01$ ) en comparación con las cerdas de los grupos control (97,2 y 96,9% para los grupos SC y C, respectivamente). Globalmente, la eficiencia de gestación estimada, es decir el porcentaje de cerdas gestantes en relación con el número total de cerdas destetadas en cada grupo, se vio afectada negativamente por el tratamiento con ALT. La eficiencia fue significativamente menor en las cerdas SS (rango 53,8%-73,3%;  $P < 0,05$ ) que en las cerdas control (94,6% y 91,2% para los grupos SC y C, respectivamente).

El tratamiento de sincronización-SO afectó al desarrollo de ovarios poliquísticos, los cuales sólo se observaron en cerdas pertenecientes a los tres grupos SS. Ninguna de estas cerdas presentó cuerpos lúteos en sus ovarios, y la mayoría de los quistes eran mayores de 2 cm. Mientras que las cerdas control y las cerdas del grupo SS-4 que no mostraron signos de celo tuvieron ovarios funcionales con presencia de múltiples cuerpos lúteos y sin alteraciones de los oviductos ni de los cuernos uterinos, el 60% de las cerdas SS-14 y SS-7 presentaron anomalías reproductivas en forma de flujo vaginal y/o ovarios poliquísticos. El tratamiento de sincronización y SO no sólo aumentó ( $P < 0,05$ ) el porcentaje de cerdas con quistes ováricos (rango de 57,7-65,5%) en comparación con las cerdas control (~30%), sino que también aumentó ( $P < 0,05$ ) el número de quistes ováricos por cerda ( $3,1 \pm 2,2$  y  $3,4 \pm 1,5$  en las cerdas SS-14 y SS-7, respectivamente, y  $1,2 \pm 0,4$  y  $1,4 \pm 0,5$  en las cerdas control SC y C, respectivamente).

La respuesta ovulatoria fue similar en los grupos tratados hormonalmente (rango:  $28,5 \pm 6,5$  a  $34,1 \pm 10,7$  cuerpos lúteos) y mayor ( $P < 0,05$ ) que en las cerdas C no tratadas ( $22,2 \pm 4,3$  cuerpos lúteos).

No hubo diferencias en las tasas de recuperación de embriones entre los grupos (rango:  $84,0 \pm 16,4\%$  a  $87,1 \pm 14,5\%$ ). El número medio de embriones viables recuperados (mórulas compactas y blastocistos no eclosionados) fue mayor ( $P < 0,05$ ) en el grupo SC ( $26,4 \pm 6,1$ ) que en los grupos SS y C ( $\sim 19,0$ ). Sin embargo, el estadio de desarrollo de estos embriones fue similar entre los grupos. Hubo diferencias entre grupos en el número medio de ovocitos y embriones degenerados, que fue casi 5 veces mayor ( $P < 0,05$ ) en los grupos SS (rango:  $6,3 \pm 5,6$  a  $7,4 \pm 6,4$ ) que en los grupos control ( $1,9 \pm 2,3$  y  $1,4 \pm 1,4$  para los grupos SC y C, respectivamente). Las tasas de fecundación en cerdas gestantes fueron casi 20 puntos porcentuales inferiores ( $P < 0,05$ ) (rango:  $72,5 \pm 22,7\%$  a  $74,4 \pm 18,3\%$ ) en las cerdas de los grupos SS que en las cerdas control ( $93,5 \pm 7,8\%$  y  $92,4 \pm 7,1\%$  para los grupos SC y C, respectivamente). La eficiencia global de la producción de embriones, es decir, el número medio de embriones viables obtenidos a partir del número total de cerdas en cada tratamiento fue similar en los grupos SS (rango:  $10,0 \pm 11,3$  a  $14,7 \pm 11,0$ ) y en el grupo C no tratado ( $16,0 \pm 7,6$ ), pero mucho menor que en las cerdas SC ( $25,0 \pm 8,4$ ). En cuanto a la distribución de las estructuras recogidas clasificadas como ovocitos o embriones degenerados, el 68,1%, el 8,7% y el 23,2% de estas estructuras fueron ovocitos inmaduros en estadio GV, ovocitos maduros en estadio de metafase II y embriones degenerados, respectivamente, en las cerdas de los grupos SS. Estos datos fueron muy diferentes ( $P < 0,05$ ) en las cerdas de los grupos control, donde el porcentaje de ovocitos inmaduros fue del 0,0% y el de embriones degenerados del 85,8%.

El TCN, y el número de células de la ICM y del TE, así como la proporción ICM/TCN fueron similares en los blastocistos viables, independientemente del tratamiento. Las tasas de apoptosis en las mórulas de los distintos grupos experimentales también fueron similares. Los tratamientos tampoco afectaron a la criotolerancia de las mórulas vitrificadas y calentadas en términos de supervivencia post-calentamiento y estado de desarrollo embrionario tras 24 h de cultivo.

**ARTÍCULO 2: Los tratamientos combinados de sincronización y superovulación afectan negativamente a la viabilidad embrionaria posiblemente por la subexpresión de genes implicados en los pathways de señalización WNT/ $\beta$ -catenina y Notch en el endometrio porcino.**

### Diseño experimental

En este experimento se evaluaron los patrones de expresión génica en endometrio y ovario tras un tratamiento de corta duración con ALT tras el destete seguido de un tratamiento de SO en comparación con un procedimiento de SO convencional y con el celo natural. Las cerdas fueron tratadas con ALT durante 7 días, comenzando el día del destete y superovuladas con eCG 24 h después de la última administración de ALT y hCG al inicio del celo (sincronización y SO, grupo SS-7; n = 6). Las cerdas superovuladas tratadas con eCG 24 h después del destete y hCG al inicio del celo (control de SO, grupo SC; n = 6) y las cerdas con celo natural post-destete (control natural, NC; n = 6) constituyeron los dos grupos control.

Las cerdas en celo se inseminaron con dosis de semen del mismo verraco y se les practicó una laparotomía el día 6 para examinar los ovarios y recoger y evaluar los embriones. Se anotaron los embriones viables, los ovocitos no fecundados y los embriones degenerados, y también se registraron las tasas de recuperación y fecundación. Se recogieron muestras del cuerno uterino y del ovario de cada cerda, se congelaron directamente en nitrógeno líquido y se conservaron a -80 °C hasta su uso posterior para el análisis del transcriptoma. Se analizaron un total de 30 muestras correspondientes a 5 muestras de ovarios y 5 muestras de tejido endometrial de cada uno de los tres grupos evaluados.

### Resultados

Aunque el número medio de cuerpos lúteos por ovario fue mayor en los grupos SS-7 y SC que en el grupo NC ( $39,8 \pm 10,2$ ,  $38,3 \pm 11,1$  y  $23,2 \pm 3,8$ , respectivamente;  $P < 0,05$ ), se observó una disminución ( $P < 0,05$ ) de las tasas de fecundación ( $75,1 \pm 15,2\%$ ,  $93,8 \pm 7,6\%$  y  $91,8 \pm 6,9\%$ , respectivamente) y un aumento del número de ovocitos y embriones degenerados ( $9,2 \pm 4,3$ ,  $2,0 \pm 2,4$  y  $1,5 \pm 1,4$ , respectivamente) en el grupo SS-7 en comparación con los grupos SC y NC. En consecuencia, se recogieron más embriones transferibles ( $P < 0,02$ ) en el grupo SC ( $29,0 \pm 1,8$ ) que en los grupos SS-7 ( $22,0 \pm 3,9$ ) y control ( $17,5 \pm 4,7$ ).

En el presente estudio, observamos 675 y 1.583 DEGs en el grupo SS-7 en comparación con los grupos SC y NC en muestras de endometrio y ovario, respectivamente. De este conjunto general de genes, 530 estuvieron infra-regulados (54 de ellos tuvieron un  $FC < 10$ ) y 145 fueron sobre-regulados (29 con un  $FC > 10$ ) en el endometrio. Al comparar el grupo SS-7 con los grupos SC y NC a nivel del ovario se observó un total de 42 transcritos infra-regulados (9 con un  $FC < 10$ ) y 1.541 transcritos sobre-regulados (124 con un  $FC > 10$ ).

Todos los DEGs se clasificaron en las siguientes tres categorías principales de GO: procesos biológicos, componentes celulares y funciones moleculares. Del conjunto general de DEGs en las cerdas SS-7 en comparación con las cerdas SC y NC, una elevada proporción de genes estuvieron enriquecidos en grupos funcionales relacionados con la proliferación y comunicación celular, con procesos metabólicos, procesos de desarrollo, señalización célula a célula, producción de energía, etc. En concreto, 43 y 31 genes de las muestras de ovario y endometrio, respectivamente, se asignaron a categorías funcionales asociadas con la progresión del ovocito y el desarrollo embrionario uterino a partir de la información recuperada de las bases de datos KEGG y DAVID.

La combinación de tratamientos de sincronización y SO indujo la activación de varios genes con funciones potenciales en la foliculogénesis y en la progresión del ovocito (por ejemplo,  $Insr$ -FC: 3,3;  $P < 0,02$ ,  $Esr1$ -FC: 21,1;  $P < 0,04$ ). Además, encontramos un fuerte enriquecimiento de genes asociados con las vías de señalización Wnt/ $\beta$ -catenina y Notch en el endometrio de cerdas SS-7 en comparación con lo observado en el endometrio de las cerdas SC y NC, lo cual está relacionado con respuestas endometriales perjudiciales para el desarrollo de los embriones. Entre los transcritos implicados en la señalización Wnt/ $\beta$ -catenina, encontramos una infra-regulación de  $Ctnnb1$  (FC: -2,2;  $P < 0,02$ ),  $Ccny$  (FC: -2,3;  $P < 0,01$ ),  $Rbpj$  (FC: -3,1;  $P < 0,01$ ;  $Mib1$  (FC: -2,6;  $P < 0,04$ ), entre otros.

Los resultados del RNA-Seq se validaron mediante RT-qPCR utilizando un total de seis genes. Estos genes presentaron patrones de expresión similares con ambos métodos, lo que demuestra que los resultados de RNA-Seq fueron fiables.

### **ARTÍCULO 3: El uso de un breve tratamiento de sincronización tras el destete, combinado con la superovulación, tiene efectos moderados sobre la expresión génica de los blastocistos porcinos supervivientes**

#### Diseño experimental

Los animales se incluyeron en uno de los tres grupos siguientes: Grupo SS7 (n = 6), cerdas a las que se administró ALT durante 7 días desde el día del destete y se superovularon con eCG 24 h después de finalizar el tratamiento con ALT y con hCG al inicio del celo; grupo SO (n = 6), cerdas no tratadas con ALT se superovularon con eCG 24 h después del destete y con hCG al inicio del celo; grupo control (n = 6), cerdas destetadas que presentaron un celo natural. Un total de 18 cerdas en tres replicados (6 cerdas por grupo) fueron inseminadas con dosis seminales procedentes del mismo verraco. En el día 6 del ciclo, las cerdas se sometieron a cirugía para la recogida de embriones. El análisis del transcriptoma se realizó en embriones en estadio de blastocisto temprano y blastocisto no expandido con una morfología excelente o buena. Estos estadios embrionarios se distribuyeron equitativamente en cada uno de los tres grupos. Cinco blastocistos de cada cerda de cada grupo se colocaron en un tubo que contenía 5 µL de PBS, se congelaron en nitrógeno líquido y se almacenaron a -80°C hasta su posterior análisis. Se realizaron 18 análisis de microarrays (6 para cada grupo), y los resultados se validaron mediante RT-qPCR, que incluyó tres replicados biológicos y tres técnicos para cada gen.

#### Resultados

Los datos sobre recuperación embrionaria, fecundación y viabilidad embrionaria en animales de los grupos SS7, SO y control se publicaron en el artículo 2 de esta tesis.

El análisis del transcriptoma mostró que 172 y 97 transcritos se expresaron de forma diferencial en los embriones de los grupos SS7 y SO en relación con los embriones del grupo control. Entre ellos, 85 (48 y 37 estuvieron sobre-regulados e infra-regulados, respectivamente) y 36 (8 y 28 sobre-regulados e infra-regulados, respectivamente) transcritos fueron anotados como genes conocidos en los embriones SS7 y SO, respectivamente.

El PCA de todos los genes separó las muestras de los grupos SS7 y SO de las muestras del control. Los tres primeros ejes del PCA representaron el 51,6% (SS7 frente al control) y el



50,1% (SO frente al control) de la varianza de los datos, mientras que el primer eje representó el 24,3% y el 25,3%, respectivamente. Basándose en el análisis de conglomerados jerárquicos, los DEGs entre los embriones SS7 y los embriones control se segregaron de forma clara en dos grupos, pero esta segregación no fue tan evidente para los DEGs entre los embriones SO y los embriones control.

Según la base de datos KEGG, los DEGs se incluyen en tres categorías GO principales: procesos biológicos, componentes celulares y funciones moleculares. Mientras que la mayoría de los DEGs de los embriones SS7 se asociaron a procesos biológicos como el crecimiento celular, la desintoxicación y la proliferación de poblaciones celulares, los DEGs de los embriones SO se relacionaron con la organización de componentes celulares, la localización, y los procesos de organismos multicelulares. La entidad anatómica celular fue la categoría más representada dentro de los componentes celulares tanto en los embriones SS7 como en los embriones SO. Los genes más abundantes fueron aquellos implicados en las funciones moleculares tales como la actividad catabólica, la actividad antioxidante y la unión (embriones SS7) o la unión y la actividad transportadora (embriones SO). En general, se detectaron más genes sobre-regulados e infra-regulados en los embriones SS7 y SO, respectivamente, en cada una de las funciones biológicas.

Para identificar los pathways KEGG significativos, se consideraron listas de datos que incluyeron todos los DEGs (ALL), los DEGs sobre-regulados (UP) y los DEGs infra-regulados (DOWN). En el tratamiento SS7, encontramos seis, dos y cinco pathways enriquecidos en las listas ALL, UP y DOWN, respectivamente, lo que dio como resultado ocho pathways afectados específicamente por el tratamiento. En el tratamiento SO, sólo dos, uno y tres pathways estuvieron enriquecidos en las listas ALL, UP y DOWN, respectivamente, con un total de cuatro pathways influidos por el tratamiento.

El análisis KEGG de los pathways en la lista UP de embriones SS7 frente a embriones control mostró un enriquecimiento de pathways asociados a la biosíntesis de glicanos (biosíntesis de glicosaminoglicanos-condroitín sulfato/dermatán sulfato) y pathways metabólicos, y estos pathways comprendieron genes (CHSY1, CSGALNACT2, CTPS1, RDH10 y SPTLC2) que afectan a los principales procesos reproductivos. Seis pathways, metabolismo de xenobióticos por citocromo P450, metabolismo de fármacos-citocromo P450, metabolismo del glutatión, carcinogénesis química, lisosoma y biosíntesis de terpenoides, estuvieron

enriquecidos en la lista DOWN de los embriones SS7 frente a los del control y contuvieron genes (GSTK1, GSTO1, ASAH1, SUMF1 y FDPS) determinantes para las funciones celulares.

La comparación entre los embriones SO y los embriones control proporcionó sólo uno (citotoxicidad mediada por natural killer cells) y tres (secreción ácida del conducto colector, autofagia y biosíntesis de N-glicanos) pathways enriquecidos en las listas UP y DOWN, respectivamente, y estos pathways incluyeron genes (HCST, ATP6V1B1, ATG4C y MAN1A2) sin relación aparente con la reproducción.

Los resultados de los microarrays fueron validados mediante RT-qPCR utilizando siete genes. Los resultados demostraron la fiabilidad del análisis de microarrays.

## CONCLUSIONES

1. La combinación del tratamiento de sincronización con ALT y el tratamiento de SO con eCG fue eficaz para retrasar el celo post-destete y para inducir la superovulación en cerdas multíparas destetadas.
2. La combinación del tratamiento de sincronización con ALT y el tratamiento superovulatorio con eCG afectó negativamente el intervalo hasta el inicio del celo, el estado ovárico, la tasa de gestación, la mayoría de los parámetros reproductivos evaluados y la eficiencia total de la producción de embriones.
3. Los tratamientos hormonales (sincronización combinada con superovulación) tienen el potencial de alterar los patrones de expresión génica a nivel del ovario y del endometrio, desencadenando un desarrollo folicular y un crecimiento de los ovocitos inadecuados.
4. Los tratamientos hormonales provocaron la desregulación en los tejidos reproductivos de genes implicados en dos pathways metabólicos críticos para el desarrollo embrionario: los pathways de señalización Wnt/ $\beta$ -catenina y Notch.
5. El impacto de los tratamientos de sincronización-SO sobre el número de pathways alterados y sobre el número y FC de los DEGs en los blastocistos supervivientes de día 6 fue moderado en comparación con los blastocistos control obtenidos de cerdas destetadas con celo natural.
6. Los efectos adversos observados sobre la fecundación, la producción de embriones y los perfiles de expresión génica de los ovarios y del endometrio tras la aplicación combinada de los tratamientos de sincronización y SO desaconsejan su utilización en programas de TE.



# **ABREVIATIONS/ ABREVIATURAS**

---



**ABREVIATIONS/ABREVIATURAS**

AI:	Artificial insemination/inseminación artificial
ACTB:	Beta-actin/beta-actina
ALT:	Altrenogest/altrenogest
BSA:	Bovine serum albumin/Albúmina sérica bovina
BTS:	Beltsville thawing solution/diluyente de descongelación Beltsville
DAVID:	Database for annotation, visualization and integrated discovery/base de datos de anotación, visualización y descubrimiento integrado
DEGs:	Differentially expressed genes/genes expresados diferencialmente
DICE:	Database of Immune Cell Expression/base de datos de expresión celular inmunitaria
DMSO:	Dimethyl sulfoxide/dimetil sulfóxido
eCG:	Equine corionic gonadotropin/gonadotropina coriónica equina
EG:	Ethylene glycol/etilenglicol
ET:	Embryo transfer/transferencia de embriones
FC:	Fold change/fold change
GO:	Gene ontology/ontología de genes
GV:	Germinal vesicle/vesícula germinal
hCG:	Human corionic gonadotropin/gonadotropina coriónica humana
ICM:	Inner cell mass/masa celular interna
KEGG:	Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes/enciclopedia de genes y genomas
NCSU:	North Carolina State University/ Universidad del Estado de Carolina del Norte
NET:	Non-surgical ET/ET no quirúrgica
PBS:	Phosphate buffered saline/solución tampón de fosfato

PCA:	Principal component analysis/análisis de componentes principales
RIN:	RNA integrity Number/número de integridad del RNA
RMA:	Robust Multichip Average/Robust Multichip Average
RNA-seq:	RNA sequencing/secuenciación del RNA
RT-qPCR:	Real-time quantitative PCR/PCR cuantitativa en tiempo real
SO:	Superovulation/superovulación
STAR:	Spliced Transcripts Alignment to a Reference/Spliced Transcripts Alignment to a Reference
TCN:	Total cell number/número total de células
TE:	Trophectoderm cells/células del trofoectodermo



# REFERENCES/REFERENCIAS

---



**REFERENCES/REFERENCIAS**

1. 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.
2. 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*, 1–9, doi:10.1038/srep10587.
3. Martinez, C.A.; Nohalez, A.; Parrilla, I.; Lucas, X.; Sanchez-Osorio, J.; Roca, J.; Cuello, C.; Rodriguez-Martinez, H.; Martinez, E.A.; Gil, M.A. Simple storage (CO<sub>2</sub>-free) of porcine morulae for up to three days maintains the in vitro viability and developmental competence. *Theriogenology* **2018**, *108*, 229–238, doi:10.1016/j.theriogenology.2017.12.001.
4. Cuello, C.; Martinez, C.A.; Nohalez, A.; Parrilla, I.; Roca, J.; Gil, M.A.; Martinez, E.A. Effective vitrification and warming of porcine embryos using a pH-stable, chemically defined medium. *Sci. Rep.* **2016**, *6*, 33915, doi:10.1038/srep33915.
5. Martinez, C.A.; Cambra, J.M.; Nohalez, A.; Parrilla, I.; Sanchez-Osorio, J.; Roca, J.; Rodriguez-Martinez, H.; Gil, M.A.; Martinez, E.A.; Cuello, C. Porcine blastocyst viability and developmental potential is maintained for 48 h of liquid storage at 25 °C without CO<sub>2</sub> gassing. *Theriogenology* **2019**, *135*, 46–55, doi:10.1016/j.theriogenology.2019.06.003.
6. 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*, doi:10.1371/journal.pone.0104696.
7. Dyck, G.W. Puberty, post-weaning estrus and estrous cycle length in Yorkshire and Lacombe swine. *Can. J. Anim. Sci.* **1971**, *51*, 135–140, doi:10.4141/cjas71-018.
8. Caárdenas, H.; Pope, W.F. Control of ovulation rate in swine. *J. Anim. Sci.* **2002**, *80*, E36–E46, doi:10.2527/animalsci2002.0021881200800ES10007x.
9. 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.
10. Ziecik, A.; Biallowicz, M.; Kaczmarek, M.; Demianowicz, W.; Riopérez, J.; Wasielak, M.; Bogacki, M. Influence of estrus synchronization of prepubertal gilts on embryo quality. *J. Reprod. Dev.* **2005**, *51* 3, 379–384.
  11. Holtz, W.; Schlieper, B. Unsatisfactory results with the transfer of embryos from gilts superovulated with PMSG and hCG. *Theriogenology* **1991**, *35*, 1237–1249, doi:https://doi.org/10.1016/0093-691X(91)90369-O.
  12. Wallenhorst, S.; Holtz, W. Embryo collection in prepubertal gilts and attempts to develop an improved embryo transfer technique. *Vet. Rec.* **2002**, *150*, 749–751, doi:10.1136/vr.150.24.749.
  13. Brüßow, K.P.; Torner, H.; Kanitz, W.; Rátky, J. In vitro technologies related to pig embryo transfer. *Reprod. Nutr. Dev.* **2000**, *40*, 469–480, doi:10.1051/rnd:2000111.
  14. Ulberg, L.C.; Grummer, R.H.; Casida, L.E. The Effects of Progesterone upon Ovarian Function in Gilts. *J. Anim. Sci.* **1951**, *10*, 665–671, doi:10.2527/jas1951.103665x.
  15. Estill, C. Current Concepts in Estrus Synchronization in Swine. *Proc Am Soc Anim Sci* **1999**, *77*, doi:10.2527/jas2000.77E-Suppl1m.
  16. Martinat-Botte, F.; Bariteau, F.; Forgerit, Y.; Macar, C.; Moreau, A.; Terqui, M.; Signoret, J.P. Control of oestrus in gilts II. Synchronization of oestrus with a progestagen, altrenogest (Regumate): Effect on fertility and litter size. *Anim. Reprod. Sci.* **1990**, *22*, 227–233, doi:https://doi.org/10.1016/0378-4320(90)90063-L.
  17. Martinat-Botté, F.; Bariteau, F.; Forgerit, Y.; Macar, C.; Poirier, P.; Terqui, M. Synchronization of oestrus in gilts with altrenogest: effects on ovulation rate and foetal survival. *Anim. Reprod. Sci.* **1995**, *39*, 267–274, doi:https://doi.org/10.1016/0378-4320(95)01396-H.
  18. Kirkwood, R. Pharmacological intervention in swine reproduction.; 1998.
  19. Martinat-Botté, F.; Venturi, E.; Guillouet, P.; Driancourt, M.A.; Terqui, M. Induction and synchronization of ovulations of nulliparous and multiparous sows with an injection of gonadotropin-releasing hormone agonist (Receptal). *Theriogenology* **2010**, *73*, 332–342, doi:10.1016/j.theriogenology.2009.09.017.
  20. Furstoss, V.; Berthelot, F.; Plat, M.; Venturi, E.; Royer, E.; Elleboudt, F.; Martinat-Botté,

- F. Genetic and non-genetic parameters related to embryo production in superovulated Large White (LW) gilts. *Anim. Reprod. Sci.* **2012**, *134*, 177–183, doi:10.1016/j.anireprosci.2012.08.019.
21. Estienne, M.J.; Harper, A.F.; Horsley, B.R.; Estienne, C.E.; Knight, J.W. Effects of P.G. 600 on the onset of estrus and ovulation rate in gilts treated with Regu-mate. *J. Anim. Sci.* **2001**, *79*, 2757–2761, doi:10.2527/2001.79112757x.
  22. Horsley, B.R.; Estienne, M.J.; Harper, A.F.; Purcell, S.H.; Baitis, H.K.; Beal, W.E.; Knight, J.W. Effect of P.G. 600 on the timing of ovulation in gilts treated with altrenogest. *J. Anim. Sci.* **2005**, *83*, 1690–1695, doi:10.2527/2005.8371690x.
  23. Rátky, J.; Brüssow, K.P.; Solti, L.; Torner, H.; Sarlós, P. Ovarian response, embryo recovery and results of embryo transfer in a Hungarian native pig breed. *Theriogenology* **2001**, *56*, 969–978, doi:10.1016/s0093-691x(01)00623-9.
  24. Angel, M.A.; Gil, M.A.; Cuello, C.; Sanchez-Osorio, J.; Gomis, J.; Parrilla, I.; Vila, J.; Colina, I.; Diaz, M.; Reixach, J.; et al. The effects of superovulation of donor sows on ovarian response and embryo development after nonsurgical deep-uterine embryo transfer. *Theriogenology* **2014**, *81*, 832–839, doi:10.1016/j.theriogenology.2013.12.017.
  25. Hazeleger, W.; Bouwman, E.G.; Noordhuizen, J.P.; Kemp, B. Effect of superovulation induction on embryonic development on day 5 and subsequent development and survival after nonsurgical embryo transfer in pigs. *Theriogenology* **2000**, *53*, 1063–1070, doi:10.1016/S0093-691X(00)00252-1.
  26. Kraeling, R.R.; Webel, S.K. Current strategies for reproductive management of gilts and sows in North America. *J. Anim. Sci. Biotechnol.* **2015**, *6*, 3, doi:10.1186/2049-1891-6-3.
  27. Patterson, J.; Wellen, A.; Hahn, M.; Pasternak, A.; Lowe, J.; DeHaas, S.; Kraus, D.; Williams, N.; Foxcroft, G. Responses to delayed estrus after weaning in sows using oral progestagen treatment. *J. Anim. Sci.* **2008**, *86*, 1996–2004, doi:10.2527/jas.2007-0440.
  28. van Leeuwen, J.J.J.; Williams, S.I.; Kemp, B.; Soede, N.M. Post-weaning Altrenogest treatment in primiparous sows; the effect of duration and dosage on follicular development and consequences for early pregnancy. *Anim. Reprod. Sci.* **2010**, *119*, 258–264, doi:10.1016/j.anireprosci.2010.02.008.
  29. Béchet, D. Control of gene expression by steroid hormones. *Reprod. Nutr. Dev.* **1986**,

- 26, 1025–1055, doi:10.1051/rnd:19860701.
30. Ing, N.H. Steroid hormones regulate gene expression posttranscriptionally by altering the stabilities of messenger RNAs. *Biol. Reprod.* **2005**, *72*, 1290–1296, doi:10.1095/biolreprod.105.040014.
31. 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.
32. Martinez, C.A.; Nohalez, A.; Parrilla, I.; Vazquez, J.L.; Roca, J.; Cuello, C.; Rodriguez-Martinez, H.; Martinez, E.A.; Gil, M.A. Surgical embryo collection but not nonsurgical embryo transfer compromises postintervention prolificacy in sows. *Theriogenology* **2017**, *87*, 316–320, doi:10.1016/j.theriogenology.2016.09.009.
33. Funahashi, H.; Ekwall, H.; Rodriguez-Martinez, H. Zona reaction in porcine oocytes fertilized in vivo and in vitro as seen with scanning electron microscopy. *Biol. Reprod.* **2000**, *63*, 1437–1442, doi:10.1095/biolreprod63.5.1437.
34. 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.
35. Martinez, C.A.; Gil, M.A.; Parrilla, I.; Martinez, E.A.; Cuello, C. Protocol for Porcine Embryo Transfer. Part 1: Embryos Produced In Vivo. In *Manual of the International Embryo Transfer Society*; International Embryo Transfer Society 2441 Village Green Place Champaign, Illinois 61822 USA, 2020; pp. 3a1-3a9.
36. 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.
37. Brison, D.R.; Schultz, R.M. Increased incidence of apoptosis in transforming growth factor alpha-deficient mouse blastocysts. *Biol. Reprod.* **1998**, *59*, 136–144, doi:10.1095/biolreprod59.1.136.
38. Petters RM; Wells KD.; Petters, R.M.; Wells, K.D. Culture of pig embryos. *J. Reprod. Fertil. Suppl.* **1993**, *48*, 61–73.
39. Martinez, C.A.; Ruber, M.; Rodriguez-Martinez, H.; Alvarez-Rodriguez, M. Pig Pregnancies after Transfer of Allogeneic Embryos Show a Dysregulated

- Endometrial/Placental Cytokine Balance: A Novel Clue for Embryo Death?  
*Biomolecules* **2020**, *10*, doi:10.3390/biom10040554.
40. Dobin, A.; Davis, C.A.; Schlesinger, F.; Drenkow, J.; Zaleski, C.; Jha, S.; Batut, P.; Chaisson, M.; Gingeras, T.R. STAR: ultrafast universal RNA-seq aligner. *Bioinformatics* **2013**, *29*, 15–21, doi:10.1093/bioinformatics/bts635.
41. Bolstad, B.M.; Irizarry, R.A.; Åstrand, 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.
42. Raudvere, U.; Kolberg, L.; Kuzmin, I.; Arak, T.; Adler, P.; Peterson, H.; Vilo, J. g:Profiler: a web server for functional enrichment analysis and conversions of gene lists (2019 update). *Nucleic Acids Res.* **2019**, *47*, W191–W198, doi:10.1093/nar/gkz369.
43. Szklarczyk, D.; Gable, A.L.; Lyon, D.; Junge, A.; Wyder, S.; Huerta-Cepas, J.; Simonovic, M.; Doncheva, N.T.; Morris, J.H.; Bork, P.; et al. STRING v11: protein-protein association networks with increased coverage, supporting functional discovery in genome-wide experimental datasets. *Nucleic Acids Res.* **2019**, *47*, D607–D613, doi:10.1093/nar/gky1131.
44. Kanehisa, M. The KEGG database. *Novartis Found. Symp.* **2002**, *247*, 91–103, doi:10.1002/0470857897.ch8.





# **PUBLICATIONS/ PUBLICACIONES**

---



**Artículo 1**

**Título:** A short-term altrenogest treatment post-weaning followed by superovulation reduces pregnancy rates and embryo production efficiency in multiparous sows

**Revista:** Frontiers in Veterinary Science

**Autores:** Henar Gonzalez-Ramiro<sup>1,2</sup>, Cristina Cuello<sup>1</sup>, Josep M. Cambra<sup>1</sup>, Alejandro Gonzalez-Plaza<sup>1</sup>, Juan M. Vazquez<sup>1</sup>, Jose L. Vazquez<sup>1</sup>, Heriberto Rodriguez-Martinez<sup>3</sup>, Maria A. Gil<sup>1</sup>, Alejandro Lucas-Sanchez<sup>2</sup>, Inmaculada Parrilla<sup>1</sup> and Emilio A. Martinez<sup>1</sup>

**Filiación:**

<sup>1</sup>Department of Medicine and Animal Surgery, Faculty of Veterinary Medicine, International Excellence Campus for Higher Education and Research, Institute for Biomedical Research of Murcia, University of Murcia, Murcia, Spain

<sup>2</sup>Department of Research and Development, Grupo Agropor I+D+I, AIE, Murcia, Spain,

<sup>3</sup>Department of Biomedical & Clinical Sciences (BKV), BKH/Obstetrics & Gynaecology, Faculty of Medicine and Health Sciences, Linköping University, Linköping, Sweden

**Abstract:**

Although embryo transfer (ET) is a biotechnology ready for the swine industry, there are factors to be solved, the availability of embryo donors as one. Multiparous sows as donors ought to be considered since weaning is a natural and efficient method for estrus synchronization. In addition, superovulation treatments at weaning are effective in increasing the efficiency of donor embryo production. However, ET programs typically require more donors than those available from a single weaning, imposing grouping several weanings to establish a batch for ET. Since short-term administration of Altrenogest is effective in delaying estrus after weaning without effects on ovulation and embryo development, we investigated how Altrenogest combined with superovulation would affect reproductive parameters and embryo quality and quantity of weaned multiparous donor sows. The sows were administered Altrenogest from the day of weaning for 14 (SS-14 group; N = 26), 7 (SS-7 group; N = 31) and 4 (SS-4 group; N = 32) days. The sows were superovulated with eCG 24 h after the last

administration of Altrenogest and with hCG at the onset of estrus. Sows not treated with Altrenogest that were superovulated with eCG 24 h post-weaning and hCG at the onset of estrus (SC group; N = 37) and sows with natural estrus after weaning (C group; N = 34) were used as control groups. The percentage of sows showing estrus within 10 days was not affected by the treatment, but the interval from Altrenogest withdrawal to estrus was longer ( $P < 0.05$ ) in the SS groups than the interval from weaning to estrus in the controls. SS treatments increased ( $P < 0.05$ ) the percentage of sows with ovarian cysts and the development of polycystic ovaries. The pregnancy and the fertilization rates, and the overall embryo production efficiency were also negatively affected by the SS treatments ( $P < 0.05$ ). Interestingly, almost 70% of the structures classified as unfertilized oocytes or degenerated embryos in sows from the SS groups were immature oocytes.

In conclusion, although superovulation of weaned sows was highly efficient, short-term administration of Altrenogest in combination with superovulation had negative effects on most of the reproductive parameters assessed, particularly affecting the overall efficiency of pregnancy and embryo production.

**Dirección URL:** <https://doi.org/10.3389/fvets.2021.771573>

**Artículo 2**

**Título:** Combined synchronization and superovulation treatments negatively impact embryo viability possibly by the downregulation of WNT/ $\beta$ -catenin and Notch signaling genes in the porcine endometrium

**Revista:** Journal of Animal Science

**Autores:** Henar Gonzalez-Ramiro<sup>1</sup>, Inmaculada Parrilla<sup>1</sup>, Josep Miquel Cambra<sup>1</sup>, Alejandro Gonzalez-Plaza<sup>1</sup>, Maria Antonia Gil<sup>1</sup>, Cristina Cuello<sup>1</sup>, Emilio A. Martinez<sup>1</sup>, Heriberto Rodriguez-Martinez<sup>2</sup>, and Cristina A. Martinez<sup>3</sup>

**Filiación:**

<sup>1</sup>Department of Medicine and Animal Surgery, Faculty of Veterinary Medicine, University of Murcia, Murcia 30100, Spain

<sup>2</sup>Department of Biomedical & Clinical Sciences (BKV), BKH/Obstetrics & Gynaecology, Linköping University, Linköping 58225, Sweden

<sup>3</sup>Department of Animal Reproduction, National Institute for Agriculture and Food Research and Technology (INIA), Madrid 28006, Spain

**Abstract:**

The combination of estrus synchronization and superovulation treatments introduces molecular modifications whose effects are yet to be disclosed. Here, reproductive parameters and gene expression changes in ovaries and endometrium were explored on day 6 after artificial insemination (AI), when synthetic progestin altrenogest (ALT) was combined with gonadotropins. Sows were administered ALT for 7 d beginning on the day of weaning and superovulated with equine chorionic gonadotropin (eCG) 24 h later and human chorionic gonadotropins (hCG) at the onset of estrus (SS-7 group; n = 6). The controls were either superovulated sows with eCG 24 h postweaning and hCG at the onset of estrus (SC group; n = 6) or sows with postweaning spontaneous estrus (NC group; n = 6). Ovary examination and embryo and tissue collection were performed in all sows via laparotomy on day 6 post-AI. RNA-Seq was conducted to analyze differentially expressed genes (DEGs) between groups.

Statistical analysis of the reproductive parameters was conducted with ANOVA and Tukey post hoc tests. DEGs were analyzed with an ANOVA (fold changes  $\geq 2$  or  $\leq 2$ , P value  $< 0.03$ ) the number of corpora lutea ( $39.8 \pm 10.2$  and  $38.3 \pm 11.1$  in SS-7 and SC sows, respectively) compared with that in the NC group ( $23.1 \pm 3.8$ ). In contrast, embryo viability significantly decreased ( $P < 0.003$ ) in response to SS-7 treatment ( $75.1\% \pm 15.2\%$ ) compared to SC and NC groups ( $93.8 \pm 7.6\%$  and  $91.8 \pm 6.9\%$ , respectively). RNA-Seq analyses revealed 675 and 1,583 DEGs in the SS-7 group compared to both SC and NC groups in endometrial and ovarian samples, respectively. Interestingly, many genes with key roles in the Wnt/ $\beta$ -catenin and Notch signaling pathways were differentially expressed in SS-7 sows relative to SC and NC groups (e.g., *Ctnnb1*, *Myc*, *Gli3*, *Scyl2*, *Ccny*, *Daam1*, *Ppm1n*, *Rbpj*, and *Usp8*). A key finding in this study was the downregulation of  $\beta$ -catenin (*Ctnnb1*) gene expression in the SS-7 endometrium, suggesting that this treatment influences embryo–uterine dialogue by triggering a cascade of events leading to embryo maldevelopment. These data explain the proliferative defects in SS-7 embryos and suggest a novel mechanism of a porcine embryo–maternal crosstalk.

**Dirección URL:** <https://doi.org/10.1093/jas/skac315>

**Artículo 3**

**Título:** The Use of a Brief Synchronization Treatment after Weaning, Combined with Superovulation, Has Moderate Effects on the Gene Expression of Surviving Pig Blastocysts

**Revista:** Animals

**Autores:** Henar Gonzalez-Ramiro<sup>1,2,3</sup>, Maria A. Gil<sup>1,2</sup>, Cristina Cuello<sup>1,2</sup>, Josep M. Cambra<sup>1,2</sup>, Alejandro Gonzalez-Plaza<sup>1,2</sup>, Juan M. Vazquez<sup>1,2</sup>, Jose L. Vazquez<sup>1,2</sup>, Heriberto Rodriguez-Martinez<sup>4</sup>, Alejandro Lucas-Sanchez<sup>3</sup>, Inmaculada Parrilla<sup>1,2</sup>, Cristina A. Martinez<sup>5</sup>, and Emilio A. Martinez<sup>1,2</sup>

**Filiación:**

<sup>1</sup>Department of Medicine and Animal Surgery, Faculty of Veterinary Medicine, International Excellence Campus for Higher Education and Research, University of Murcia, 30100 Murcia, Spain;

<sup>2</sup>Institute for Biomedical Research of Murcia (IMIB-Pascual Parrilla), Campus de Ciencias de la Salud, 30120 Murcia, Spain

<sup>3</sup>Department of Research and Development, Grupo Agropor I+D+I, AIE, 30565 Murcia, Spain

<sup>4</sup>Department of Biomedical & Clinical Sciences (BKV), BKH/Obstetrics & Gynecology, Faculty of Medicine and Health Sciences, Linköping University, 58185 Linköping, Sweden;

<sup>5</sup>Department of Animal Reproduction, National Institute for Agriculture and Food Research and Technology (INIA-CSIC), 28040 Madrid, Spain

**Abstract:**

The combination of estrus synchronization and superovulation (SS) treatments causes alterations in ovarian and endometrial gene expression patterns, resulting in abnormal follicle and oocyte growth, fertilization, and embryo development. However, the impact of combined SS treatments on the transcriptome of the surviving embryos remains unidentified. In this study, we examined gene expression changes in day 6 blastocysts that survived a brief regimen of synchronization treatment combined with superovulation. The sows were included in one

of three groups: SS7 group (n = 6), sows were administered Altrenogest (ALT) 7 days from the day of weaning and superovulated with eCG 24 h after the end of ALT treatment and hCG at the onset of estrus; SO group (n = 6), ALT nontreated sows were superovulated with eCG 24 h postweaning and hCG at the onset of estrus; control group (n = 6), weaned sows displaying natural estrus. Six days after insemination, the sows underwent a surgical intervention for embryo collection. Transcriptome analysis was performed on blastocyst-stage embryos with good morphology. Differentially expressed genes (DEGs) between groups were detected using one-way ANOVA with an un-adjusted p-value < 0.05 and a fold change 1.5. The effect of SO treatment on the number of altered pathways and DEGs within each pathway was minimal. Only four pathways were disrupted comprising only a total of four altered transcripts, which were not related to reproductive functions or embryonic development. On the other hand, the surviving blastocysts subjected to SS7 treatments exhibited moderate gene expression changes in terms of DEGs and fold changes, with seven pathways disrupted containing a total of 10 transcripts affected. In this case, the up-regulation of certain pathways, such as the metabolic pathway, with two up-regulated genes associated with reproductive functions, namely RDH10 and SPTLC2, may suggest suboptimal embryo quality, while the down-regulation of others, such as the glutathione metabolism pathway, with down-regulated genes related to cellular detoxification of reactive oxygen species, namely GSTK1 and GSTO1, could depress the embryos' response to oxidative stress, thereby impairing subsequent embryo development. The gene expression changes observed in the present study in SS7 embryos, along with previous reports indicating SS7 can negatively affect fertilization, embryo production, and reproductive tract gene expression, make its use in embryo transfer programs uncommendable.

**Dirección URL:** <https://doi.org/10.3390/ani13091568>



# GRAPHIC APPENDIX

---

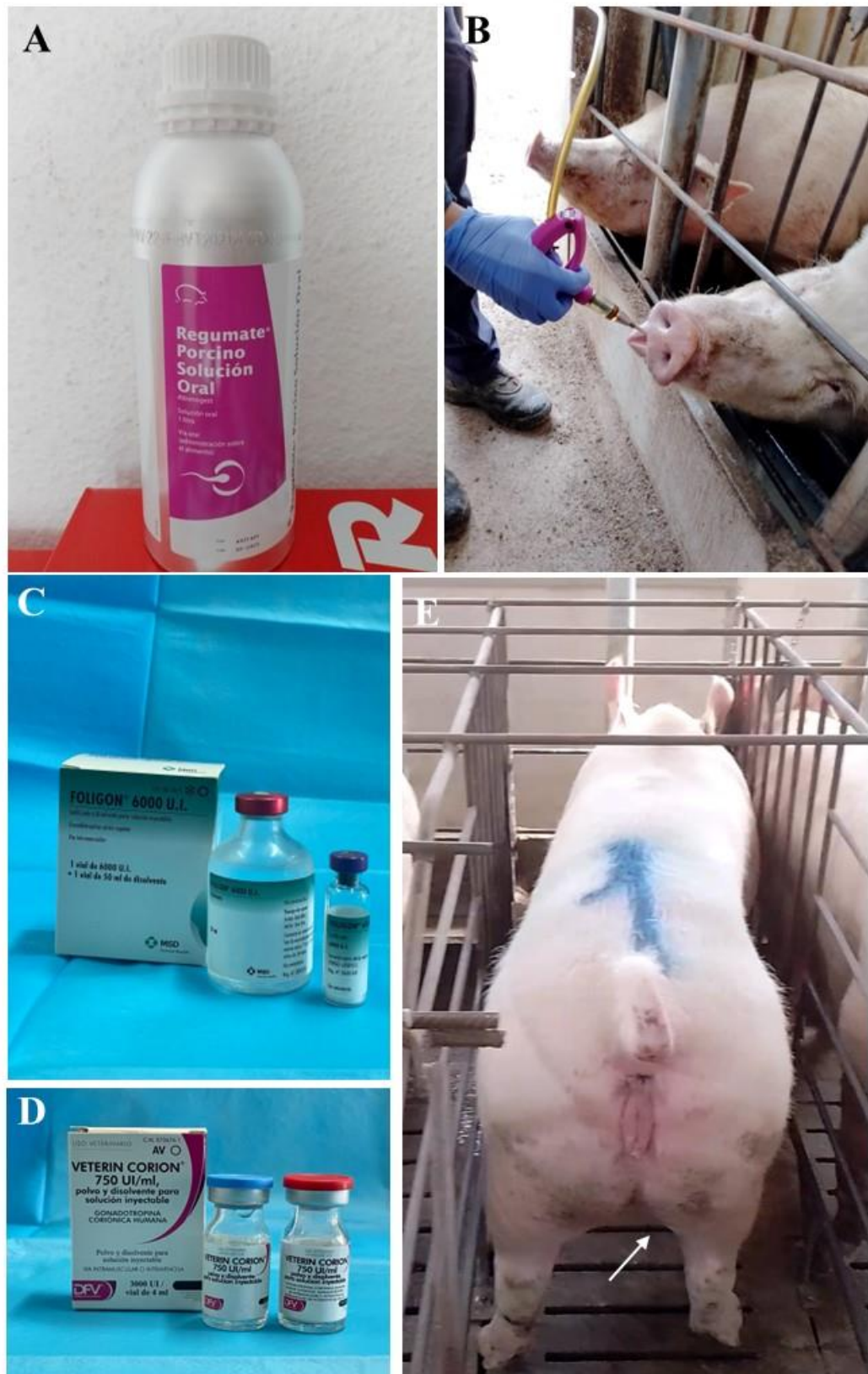




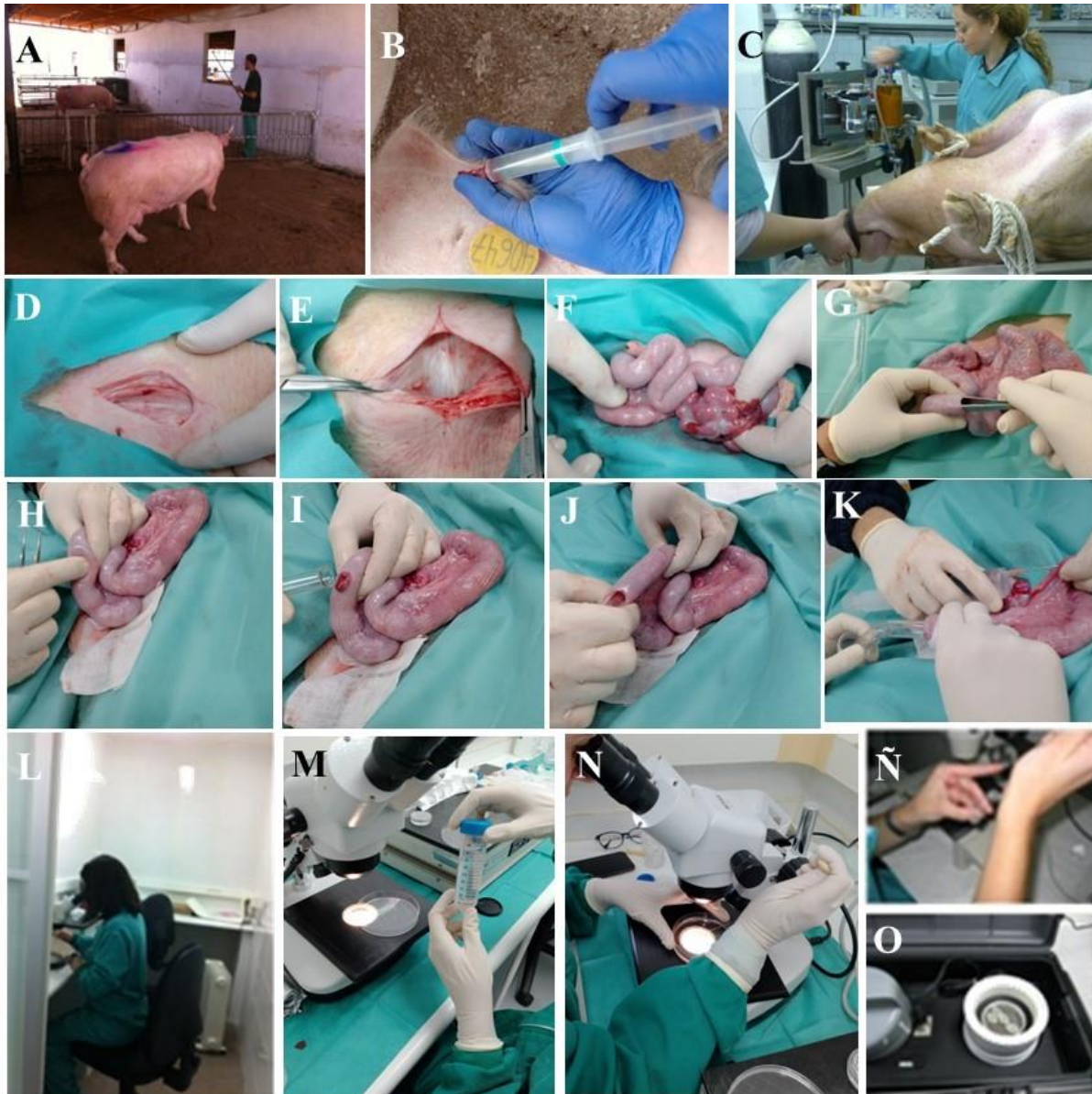
**Figure 1.** Centers where the experimental work of this thesis has been conducted. A,B: Agropor SL company. C,D: Department of Animal Medicine and Surgery. Veterinary Faculty. University of Murcia (Spain). E. Scientific and Technical Research Area, University of Murcia (ACTI). F: Department of Biomedical & Clinical Sciences (BKV). Linköping University (Sweden).



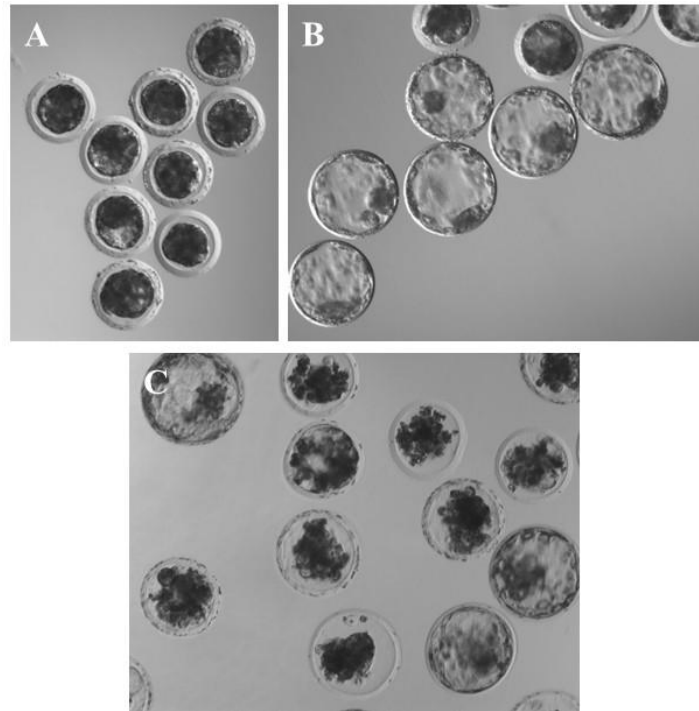
**Figure 2.** The company Agropor SL (Murcia) has a laboratory of R&D, one surgery room with capacity for two surgeon teams (A,B) and 50 crates specifically destined for the experimental animals (C,D). In addition, the company provide proper housing and management of animal facilities (E,F).



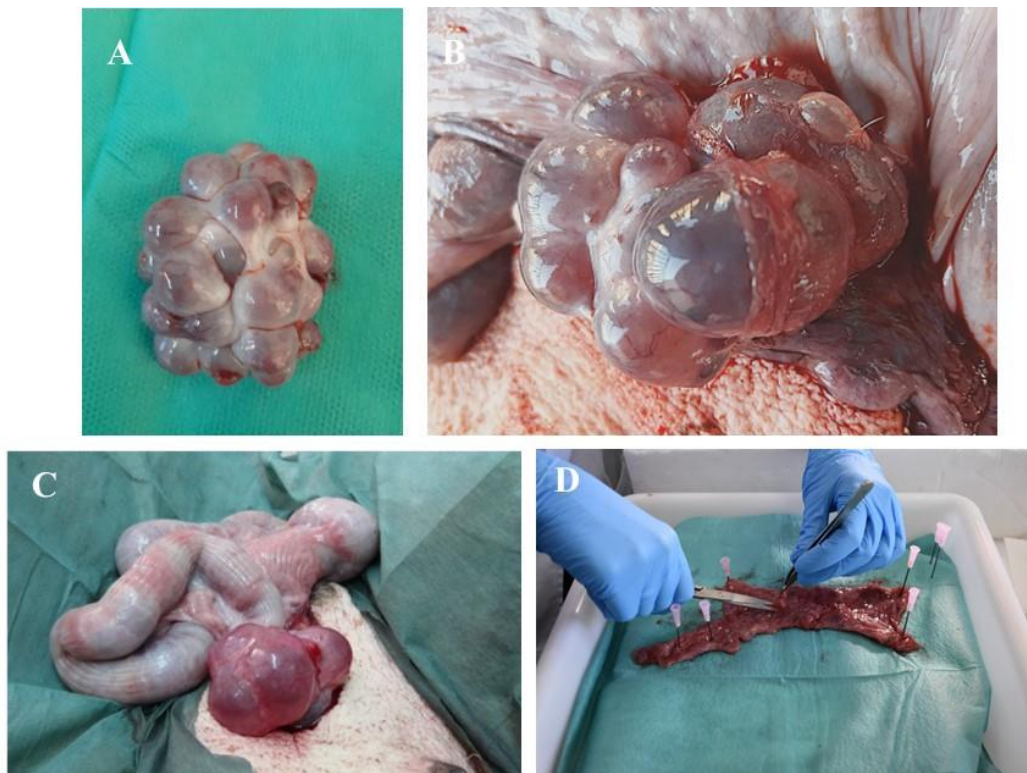
**Figure 3.** Synchronization treatment with altrenogest (A) and oral administration (B). Superovulation treatment with eCG and hCG (C, D) and intramuscular administration (arrow; E).



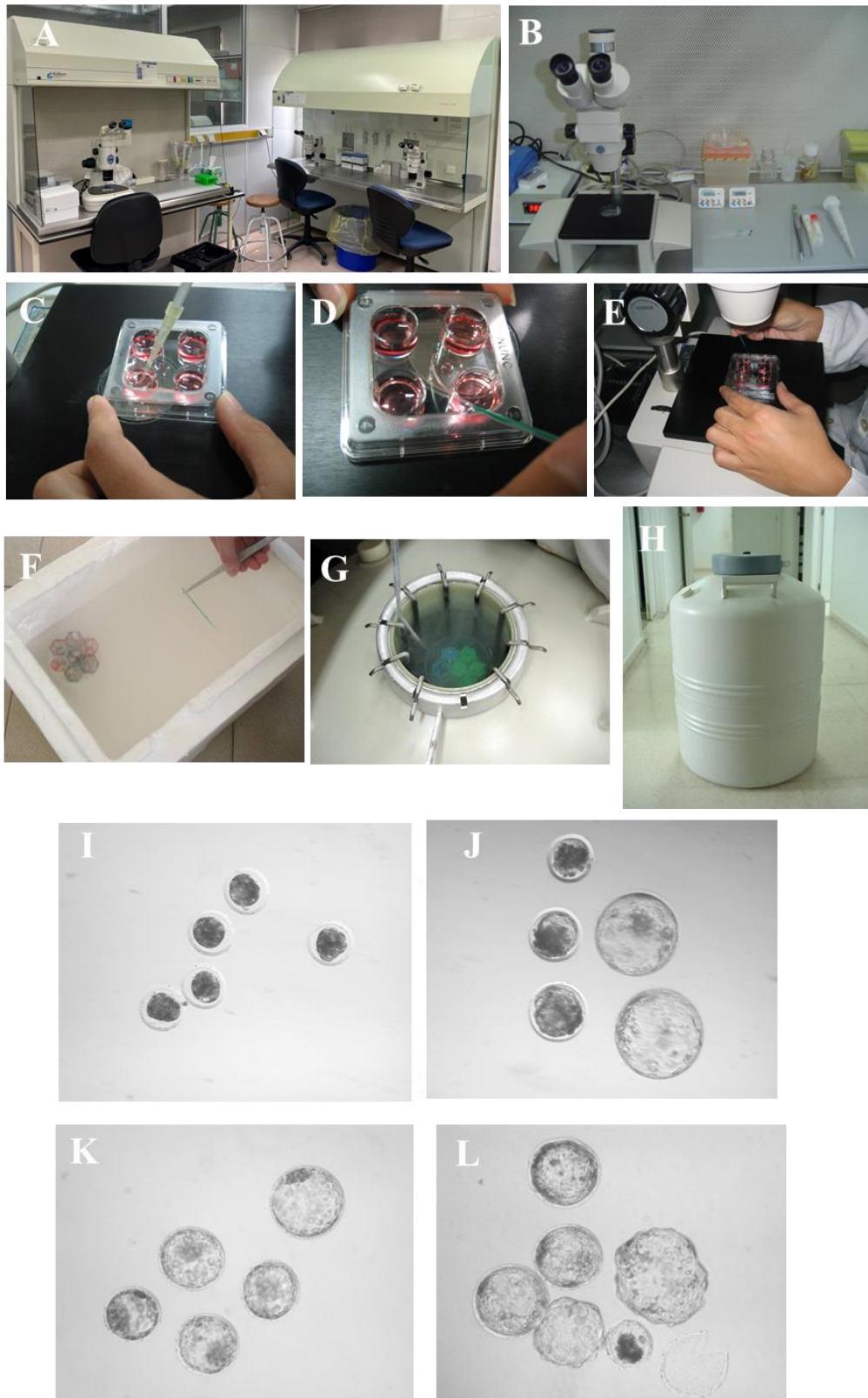
**Figure 4.** Embryo collection. The donors were sedated with azaperone and narcosis induced using sodium thiopental and maintained with 3-5% isoflurane (A-C). The donors were subjected to a mid-ventral laparotomy on day 6 of the cycle. After exposure of the genital tract, corpora lutea were counted on the ovaries (D-F). The embryos were collected as follows; a small incision in the uterine wall 30-40 cm below the uterotubal junction was performed with a blunt Adson forcep (G,H), and then, a glass cannula was inserted through the incision (I,J). A volume of 30 mL of medium was introduced into the uterine horn from the tip of the uterine horn using a syringe connected to a blunt needle (K). Recovery medium was placed into a Petri dish and embryos were located and evaluated using a stereomicroscope to verify their developmental stage and quality (L-N). Finally, the embryos were placed in Eppendorf tubes (Ñ) and transported to the laboratory of the University of Murcia at 38°C in an incubator (O).



**Figure 5.** Representative images of morphologically excellent embryos at the morula (A) and blastocyst (B) stages, as well as unfertilized oocytes or degenerated embryos (C), collected on day 6 of the cycle.



**Figure 6.** Representative images of a normal (A) and polycystic (B,C) ovaries at day 6 of the cycle. Uterine samples were recovered from the mesometrial side of a uterine horn (D).



**Figure 7.** Vitrification. The embryos were handled under sterile conditions (A,B), placed in a 1.5-2  $\mu$ L drop and loaded into a super open pull straw (SOPS) by capillary action (C-E); The straws were plunged horizontally into LN<sub>2</sub> (F) and preserved inside a LN<sub>2</sub> tank (G,H). (I-L) Representative images of postwarming development of embryos. Fresh morulae (I) and blastocysts (K) prior vitrification and 24 h post-warming (J and L, respectively).



# APPENDIX

---



## IMPACT FACTORS

### FRONTIERS IN VETERINARY SCIENCES (Article 1)

(Titles: ISO: Front.Vet. Sci/ JCR Abbrev: FRONT VET SCI)

#### Journal Information

eISSN: 2297-1769

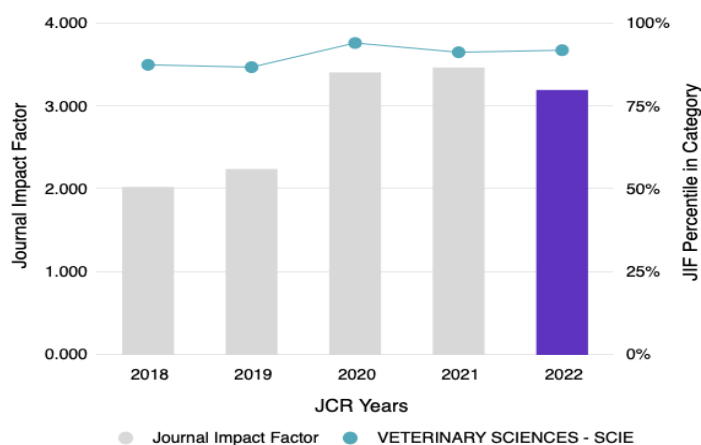
LAUSSANE. SWITZERLAND

#### Categories

Veterinary Science



### Journal Trends



Year	Key Indicators			Categories		
	Journal Impact Factor	Total Cites	Article Influence Score	Veterinary Sciences		
				Rank	Quartile	Average JIF Percentile
2018	2.029	1,036	N/A	19/161	Q1	87.6
2019	2.245	2,076	N/A	17/167	Q1	86.9
2020	3.412	5,002	0.765	16/167	Q1	94.2
2021	3.471	9,919	0.647	13/169	Q1	91.4
2022	3.2	14,967	0.647	14/171	Q1	92

\* Source: JCR (Web of Science). February, 2024

### Article Impact

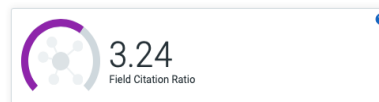
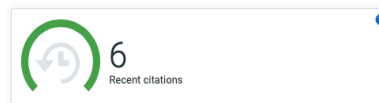
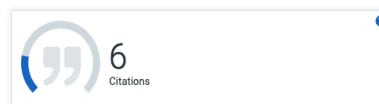


A Short-Term Altrenogest Treatment Post-weaning Followed by Superovulation Reduces Pregnancy Rates and Embryo Production Efficiency in Multiparous Sows

This publication in **Frontiers in Veterinary Science** has been cited **6 times**. 100% of its citations have been received in the past two years.

Compared to other publications in the same field, **this publication is highly cited** and has received approximately **3.24 times more citations** than average.

\* Source: Dimensions. February 2024



\* Source: Dimensions. February 2024

## JOURNAL OF ANIMAL SCIENCES (Article 2)

(Titles: ISO: J. Anim. Sci/ JCR Abbrev: J ANIM SCI)

### Journal Information

ISSN: 0021-8812

eISSN: 1525-3163

OXFORD UNIVERSITY PRESS INC.

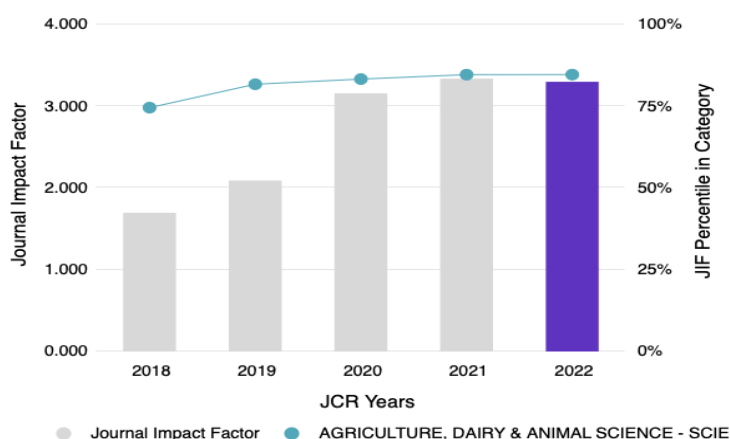
CARY, NC 27513 USA



### Categories

Agriculture, Dairy & Animal Science

### Journal Trends



Year	Key Indicators			Categories		
	Journal Impact Factor	Total Cites	Article Influence Score	Rank	Quartile	Average JIF Percentile
2018	1.697	29,427	0.492	13/78	Q1	74.590
2019	2.092	31,528	0.466	14/79	Q1	81.746
2020	3.159	38,102	0.525	11/80	Q1	83.333
2021	3.338	39,439	0.485	10/70	Q1	84.677
2022	3.3	33,920	0.547	10/79	Q1	84.7

\* Source: JCR (Web of Science). February, 2024

### Article Impact

Dimensions

Combined synchronization and superovulation treatments negatively impact embryo viability possibly by the downregulation of WNT/ $\beta$ -catenin and Notch signaling genes in the porcine endometrium

This publication in **Journal of Animal Science** has been cited **5 times**.

Compared to other publications in the same field, **this publication is highly cited** and has received approximately **4.89 times more citations** than average.

**5**  
Citations

**5**  
Recent citations

**4.89**  
Field Citation Ratio

\* Source: Dimensions. February 2024

## ANIMALS (Article 3)

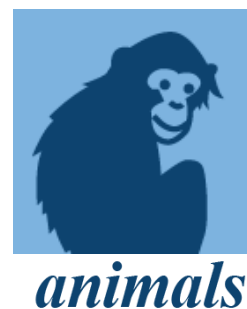
### Journal Information

ISSN: 2076-2615

eISSN: 2076-2615

MDPI

ST ALBAN-ANLAGE 66, CH-4052 BASEL, SWITZERLAND



### Titles

ISO: Animals

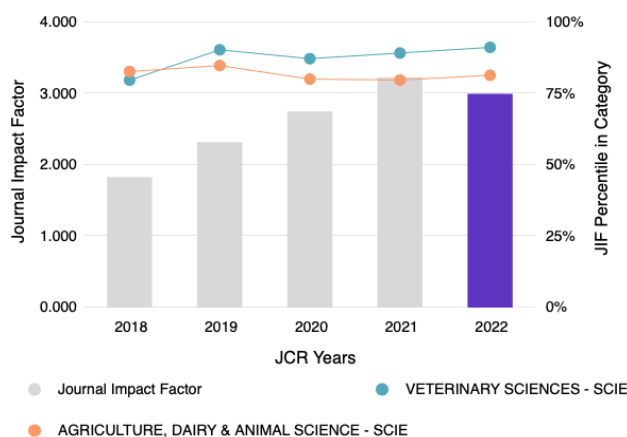
JCR Abbrev: ANIMALS-BASEL

### Categories

Agriculture, Dairy & Animal Science


Veterinary Sciences

### Journal Trends




Year	Key Indicators			Categories					
	Journal Impact Factor	Total Cites	Article Influence Score	Agriculture, Dairy & Animal Science			Veterinary Sciences		
				Rank	Quartile	Average JIF Percentile	Rank	Quartile	Average JIF Percentile
2018	1.832	1,036	N/A	11/61	Q1	82.79	29/141	Q1	79.79
2019	2.323	2,181	N/A	10/63	Q1	84.92	14/141	Q1	90.43
2020	2.752	6,875	0.458	13/63	Q1	80.16	19/146	Q1	87.33
2021	3.231	16,466	0.459	13/62	Q1	79.84	16/145	Q1	89.31
2022	3.0	27,233	0.499	12/62	Q1	81.5	13/144	Q1	91.3

### Article Impact

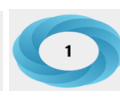


Altmetric



Dimensions

The Use of a Brief Synchronization Treatment after Weaning, Combined with Superovulation, Has Moderate Effects on the Gene Expression of Surviving Pig Blastocysts



1

Mentioned by

■ 1 X user

Readers on

■ 2 Mendeley

\* Source: Altmetric by Dimensions. February 2024



