



**UNIVERSIDAD DE MURCIA**

FACULTAD DE VETERINARIA

Advances in cryopreservation and non-surgical transfer  
of porcine embryos

Avances en criopreservación y  
transferencia no quirúrgica de embriones porcinos

**D. Jesús Gomis Almendro**

2013



## TESIS DOCTORAL POR COMPENDIO DE PUBLICACIONES

- 1. Non-surgical deep intrauterine transfer of superfine open pulled straw (SOPS)-vitrified porcine embryos: Evaluation of critical steps of the procedure. (2012).** Gomis J, Cuello C, Sanchez-Osorio J, Gil MA, Parrilla I, Angel MA, Maside C, del Olmo D, Vazquez JM, Roca J, Martinez EA. *Theriogenology* 78: 1339-1349.
- 2. The *in vitro* and *in vivo* developmental capacity of selected porcine monospermic zygotes. (2013).** Gil MA, Gomis J, Angel MA, Sanchez-Osorio J, Maside C, Cuello C, Parrilla I, Roca J, Vazquez JM, Martinez EA. *Theriogenology* 79: 392-398.
- 3. Effects of lipid polarisation on survival of *in vivo*-derived porcine zygotes vitrified by the superfine open pulled-straw method. (2012).** Gomis J, Cuello C, Sanchez-Osorio J, Gil MA, Parrilla I, Angel MA, Vazquez JM, Roca J, Martinez EA. *Reproduction Fertility and Development* <http://dx.doi.org/10.1071/RD12179>.
- 4. Effect of MEM vitamins and forskolin on embryo development and vitrification tolerance of *in vitro*-produced pig embryos. (2013).** Cuello C, Gomis J, Almiñana C, Maside C, Sanchez-Osorio J, Gil MA, Sanchez A, Parrilla I, Vazquez JM, Roca J, Martinez EA. *Animal Reproduction Science* 136: 296-302.
- 5. Forskolin improves the cryosurvival of *in vivo*-derived porcine embryos at very early stages using two vitrification methods. (2013).** Gomis J, Cuello C, Sanchez-Osorio J, Gil MA, Parrilla I, Angel MA, Vazquez JM, Roca J, Martinez EA. *Cryobiology* <http://dx.doi.org/10.1016/j.cryobiol>.



*Departamento de Medicina y Cirugía Animal, Facultad de Veterinaria  
Campus Regional de Excelencia Internacional “Campus Mare Nostrum”  
Universidad de Murcia*



*Este trabajo ha sido financiado por  
la Fundación Séneca  
(04543/GERM/07;09289/FPI/08),  
y el Ministerio de ciencia y Tecnología  
(AGL2009-12091; RYC-2007-00651; RYC-2008-02081)*





*A mis padres, Jose Ángel e Isabel  
y mi hermano, Jose Ángel*



*A mis abuelos y mi tía*







# Agradecimientos:

Una vez finalizada esta tesis doctoral, tengo la obligación de enfrentarme al capítulo más complicado de este trabajo, que no es otro que el de los agradecimientos. He de sintetizar en unas breves líneas mi sentida y sincera gratitud hacia las personas que me han ayudado. Sin ellas, hubiese sido del todo imposible afrontar con éxito la elaboración de este proyecto, en la que tanta ilusión he puesto.

De forma muy especial quiero dar las gracias a mi director de Tesis, el **Dr. Emilio A. Martínez**, por confiar en mí desde el primer momento en que nos conocimos, por su habilidad para orquestar un grupo tan grande y conseguir que pequeñas piezas se transformen en una gran obra de arte, por su ingenio y gran sentido del humor, y ante todo, gracias por corregir mis errores y disfrutar los momentos de “éxito”. Gracias, de corazón, por ser un verdadero maestro.

Del mismo modo, quiero destacar la labor de la **Dra. Cristina Cuello**, co-directora de esta Tesis, a la que nunca podré corresponder como merecería tantos años de conocimiento y sabiduría empleados en mi formación. Por si no fuera suficiente la deuda de gratitud que tengo con ella, me honra cada día con su personal trato y afecto. Gracias por haber podido conocerte, porque eres y serás un referente en mi vida.

Al **Dr. Jordi Roca**, por haberme ayudado a crecer, nutriéndome con sabios consejos, y por demostrar que el límite solo está en la mente.

Al **Dr. Juan María Vázquez**, por su capacidad de lucha constante, por demostrar que la distancia no es una barrera para estar cerca de los que te necesitan.

A la **Dra. María Antonia Gil**, por su infinita paciencia durante mis inicios, por inyectarme las dosis necesarias que han permitido que esté totalmente enganchado al magnífico mundo de la embriología.

A las **Dras. Xiomara Lucas, Inmaculada Parrilla y Carolina Maside**, por ser un claro ejemplo de lucha y superación, no solo en el ámbito profesional sino también en lo personal. Gracias por estar siempre dispuestas a prestar la ayuda necesaria.

Al **Dr. Jonatan Sánchez-Osorio**, mi compañero de fatigas y sobre todo mi amigo, por su capacidad de trabajo, tenacidad y entrega total a la investigación. Gracias por ayudarme desde mucho antes que llegara a esta casa. A tu lado he aprendido lo que significa trabajar en equipo.

A mis “colegas” de despacho, **Miguel Ángel y David**, por soportar a diario mi locura, por aguantarme y escucharme aún cuando no apetece, por todos los momentos vividos dentro y fuera del departamento. Es un verdadero honor teneros como amigos.

A **Tati y Diego**, mis amigos “brasileiros”, por haber formado parte en mi vida, por todo vuestro apoyo, demostrando que sois unas de las personas con mayor calidad humana que he conocido nunca. “Muito obrigado”.

A **Nacho y Carmen**, símbolos de este gran grupo de investigación, por todos sus consejos, su apoyo y sobre todo por su amistad, tanto dentro como fuera del departamento.

A las chicas del departamento, **Carmen, Lola, M<sup>a</sup> José e Isabel**, a aquellas que recién llegaron, **Cristina Martínez, Cristina Pérez y Alicia**, y a aquellos que en algún momento formaron parte de él, **Sonia y Jorge**, gracias por la ayuda que me han prestado y el enriquecimiento adquirido a nivel personal.

A los **alumnos internos** de la Unidad Docente de Reproducción Animal por su colaboración inestimable y, por permitir que haya disfrutado de esos pequeños momentos en el que pasas de ser alumno a ser profesor.

A la empresa **Agropor S.L** y a la **granja docente de veterinaria**, y muy especialmente a sus trabajadores, José Manuel, Paco, Antonio y Miguel, por permitirme disponer de los animales y por su excelente predisposición a ofrecerme su ayuda siempre que fue necesario.



He de agradecer profundamente a la **Fundación Séneca**, por proporcionarme el soporte económico durante estos cuatro años, sin el cual no hubiese podido realizar este trabajo.

A **Carlos, Ángel, Raúl, Dani, Isaac, Bea, María, Jacobo y Ángela**, por las veces que he necesitado el apoyo de un buen amigo.

A **mi familia**, porque todo lo que soy os lo debo a vosotros.

A **Balú**, más que mi perro, una proyección de mí mismo. Gracias por aportarme todas esas cosas que jamás te podría proporcionar una persona.

Lo mejor siempre se deja para el final, por ello quiero darle las gracias de forma muy especial a **Ana**, por su comprensión y apoyo incondicional durante todos estos años, por no dejarme sólo en ningún momento. Gracias de corazón por hacerme sentir vivo, porque esto es tanto tuyo como mío. Sigue siempre igual.

La vida es un conjunto de etapas con un inicio y un final, y llegado a este punto, pongo fin a una de las etapas más bonitas de mi vida. Muchas gracias a todos vosotros por haber logrado que uno de mis mayores sueños se haya hecho realidad.



*“Los científicos se esfuerzan por hacer posible lo imposible. Los políticos por hacer lo posible imposible”.*

**Bertrand Russell (1872-1970)**

*“La felicidad total del hombre consiste en disfrutar de la estimación de los demás”.*

**Blaise Pascal (1623-1662)**



# INDEX

<b>Introduction.....</b>	<b>1</b>
<b>Objectives.....</b>	<b>9</b>
<b>Extended summary.....</b>	<b>13</b>
<b>Conclusions.....</b>	<b>35</b>
<b>Resumen general.....</b>	<b>39</b>
<b>Abbreviations.....</b>	<b>71</b>
<b>References.....</b>	<b>75</b>
<b>Articles.....</b>	<b>85</b>
<b><i>Article 1</i>.....</b>	<b>87</b>
<b><i>Article 2</i>.....</b>	<b>101</b>
<b><i>Article 3</i>.....</b>	<b>111</b>
<b><i>Article 4</i>.....</b>	<b>123</b>
<b><i>Article 5</i>.....</b>	<b>133</b>
<b>Graphic appendix.....</b>	<b>143</b>
<b>Appendix.....</b>	<b>151</b>



# **INTRODUCTION**





## INTRODUCTION

The swine industry has a considerable interest in the use of embryo transfer because this technique may enable the transport of valuable genetic material with reduced cost and a minimal risk of disease transmission. However, the commercial and practical application of pig embryo transfer has been limited as a result of the necessity of surgical procedures for embryo collection and transfer and as a result of difficulties associated with the long term storage of porcine embryos using traditional cryopreservation methods. In this context, it is clear the importance of the development of effective procedures for cryopreservation of porcine embryos and the advancement of safe and efficient non-surgical embryo transfer (NET) procedures.

Despite the complex anatomy of the cervix and uterine horn of sows, a device for NET deep into one uterine horn in non-sedated sows and gilts was designed by Martinez *et al.* (2004). After the initial attempts at NET using fresh embryos, an acceptable and promising reproductive performance was achieved (Martinez *et al.* 2005). On the other hand, the cryopreservation of pig embryos has been largely ineffective due to their high sensitivity to hypothermic conditions (reviewed by Dobrinsky 2002). This fact has limited the ability of pig embryos to be cryopreserved by conventional slow-freezing methods. In contrast, remarkable results of *in vitro* and *in vivo* embryo survival after vitrification and warming of morulae and blastocysts derived *in vivo* have been obtained (Kobayashi *et al.* 1998; Holm *et al.* 1999; Dobrinsky *et al.* 2000; Misumi *et al.* 2003; Beebe *et al.* 2005, 2011; Cuello *et al.* 2008; Fujino *et al.* 2008; Sanchez-Osorio *et al.* 2010). The combined use of vitrification and NET could make embryo transfer a commercially viable technology in pigs. However, these technologies have to be tested and optimized in practice and several parameters, which may affect embryo vitrification and transfer, have to be studied in order to enhance their efficiency. The method for NET of fresh morulae and blastocysts uses a 1-mL syringe

containing the embryos, which is connected to the NET catheter. To adapt this methodology to vitrified-warmed embryos, we simplified the conventional three-step warming procedure and developed a direct (one-step dilution) warming procedure utilizing a dish. The one-step dilution method provided similar survival and hatching rates of the vitrified-warmed blastocysts (Cuello *et al.* 2004). This one-step warming procedure would be ideal for direct NET under field conditions by warming embryos directly in a 1-mL syringe. The syringe containing the embryos would be immediately connected to the NET catheter without any special manipulations. In 2005, we described the first attempts at NET using porcine blastocysts vitrified in 2  $\mu$ L of vitrification medium by the open pulled straw (OPS) procedure, described by Vajta *et al.* (1997), and warmed using one-step dilution in a syringe; an acceptable farrowing rate (42.9%) with an average of  $5.4 \pm 0.8$  piglets born was achieved (Cuello *et al.* 2005). However, further trials from our laboratory showed that when the same warming procedure was used in combination with NET of superfine OPS (SOPS)-vitrified embryos, the pregnancy rate of recipients was extremely low (unpublished results). Currently, the SOPS-vitrification method using 1  $\mu$ L of vitrification medium is performed routinely in our laboratory because the *in vitro* embryo survival rates after vitrification and warming are very high, even similar to those obtained with fresh embryos when the blastocyst stage is used (Sanchez-Osorio *et al.* 2008; Cuello *et al.* 2010). Therefore, we decided to evaluate several critical steps of the protocol used in these trials.

On the other hand, despite important advances in pig embryo cryopreservation, as mentioned above, the successful vitrification of porcine embryos has, to date, been limited to *in vivo*-derived morula and blastocyst stages (Misumi *et al.* 2003; Cuello *et al.* 2008, 2010; Fujino *et al.* 2008; Sánchez-Osorio *et al.* 2010a; Beebe *et al.* 2011). There is very little information in the literature documenting the cryosurvival of pig embryos at very early-stages of development. Effective methods for the cryopreservation of zygotes could be valuable for genetic rescue in sanitary crises that involve the extermination of all animals. In such a case, it would not be possible to choose the collection day to obtain the most suitable embryos for cryopreservation. In addition, the ability to successfully cryopreserve zygotes could be important for cloning programs. Enucleated *in vivo*-derived porcine zygotes have been successfully used for embryo reconstruction (Polejaeva *et al.* 2000). Zygotes can be used for somatic cell

reprogramming, the production of embryonic stem-cell lines and the full-term development of cloned animals (Egli *et al.* 2007). Moreover, cloned porcine embryos are typically transferred to recipients at the zygote stage (Betthausen *et al.* 2000; Lee *et al.* 2008). Vitrification may allow the long-term storage of reconstructed zygotes until the time of embryo transfer to recipients, which would facilitate research planning.

Studies on the cryopreservation of very early-stage intact porcine embryos have been limited and have yielded poor results (Esaki *et al.* 2004; Cuello *et al.* 2007). The sensitivity of these embryos to cryopreservation has been ascribed to their high cytoplasmic lipid content (Polge *et al.* 1974; Nagashima *et al.* 1994). The mechanical removal of lipid droplets by micromanipulation minimises chilling injuries in early-stage embryos and improves their tolerance to freezing (Nagashima *et al.* 1994, 1995). In addition, the combination of mechanical delipidation and vitrification facilitated the first piglets born following the transfer of pig embryos produced *in vitro* (Nagashima *et al.*, 2007). However, mechanical delipidation substantially increases the probability of pathogen transmission due to the damage inflicted on the zona pellucida (ZP) during micromanipulation (Stringfellow 1998). Lipid droplet polarisation by high-speed centrifugation is a non-invasive alternative to mechanical delipidation. Although this method seems to be useful for isolating monospermic zygotes, it has only been used by a few researchers (Han *et al.* 1999a, 1999b; Gil *et al.* 2008; Somfai *et al.* 2008, 2009), and there is little information about the effect of high-speed centrifugation method on the *in vitro* ability of selected bipronuclear (2PN) zygotes to develop to the blastocyst stage. Moreover, there are no published reports on the efficiency at which such zygotes produce viable offspring after their transfer to recipients. High-speed centrifugation does not seem to have negative effects on the embryonic developmental capacity because live piglets have been obtained after transferring vitrified delipidated blastocysts produced both *in vivo* (Beebe *et al.* 2002, 2005; Cameron *et al.* 2004) and *in vitro* (Men *et al.* 2011) using this procedure. However, to the best of our knowledge, there are no published reports on the effect of lipid polarisation by centrifugation on the cryosurvival of *in vivo*-derived porcine zygotes. Lipid polarisation by centrifugation could be a successful method for the vitrification of zygotes because it should decrease their cryosensitivity without altering their ability to develop.

It has been proposed that an alternative to increase the efficacy of lipid polarisation by centrifugation is to pre-treat zygotes with high-osmolality media to increase the perivitelline space. This pre-treatment might facilitate the complete separation of lipid droplets from the cytoplasm after centrifugation, preventing them from being reincorporated into the cytoplasm during the vitrification or culture process (Li *et al.* 2009). Live piglets have been obtained after transferring vitrified *in vitro*-produced blastocysts that were derived from zygotes subjected to hyperosmotic stress before lipid polarisation by centrifugation (Li *et al.* 2009). However, no reports are currently available on the vitrification of zygotes exposed to this double pre-treatment.

A possible way to improve vitrification tolerance of *in vivo*-derived embryos at very early-stages of development is to reduce their lipid content through chemical stimulation of lipolysis with forskolin. It has been showed that forskolin (7 $\beta$ -acetoxy-8,13-epoxy-1 $\alpha$ ,6 $\beta$ ,9 $\alpha$ -trihydroxy-labd-14-ene-11-one) reduces the lipid content of mature pig oocytes (Fu *et al.* 2011). Forskolin has also proved to increase the cryotolerance of *in vitro*-produced blastocysts (Men *et al.* 2006), which are highly cryosensitive because their increased lipid content compared with *in vivo*-derived embryos (Romek *et al.* 2009). Nevertheless, to the best of our knowledge, there are no previous reports in the literature on the influence of culture period with forskolin on the cryosurvival of *in vivo*-derived porcine embryos. It would be of great importance to assess the effects of forskolin on the embryo lipolysis under our *in vitro* culture conditions prior to be used with *in vivo*-derived embryos.

Another strategy that could improve the vitrification ability of very early-stage porcine embryos is to increase the cooling rate. The increase of the cooling rate achieved with the ultra-rapid vitrification, such as the OPS method, has been proven to be beneficial for the cryopreservation of highly sensitive embryos (Vajta *et al.* 1997). At present, the OPS cooling rate (approximately 20,000 C°/min; 7) can be doubled by using a smaller inner diameter and lower wall thickness of straws (superfine open pulled straws: SOPS; (Isachenko *et al.* 2003). A procedure that has very fast cooling rates is the solid surface vitrification (SSV) method (Dinnyes *et al.* 2000), which has been used in pigs to cryopreserve oocytes and *in vitro*-produced zygotes (Gupta *et al.* 2007; Somfai *et al.* 2006, 2010). Although piglets have been obtained from *in vivo*-derived

blastocysts vitrified using the SSV method (Beebe *et al.* 2011), no reports are currently available in the literature on the vitrification of *in vivo*-derived porcine embryos at earlier stages of development using that procedure.

Based on all stated above, the present work was designed to (1) improve the non-surgical deep intrauterine embryo transfer procedure with vitrified-warmed *in vivo*-derived morulae and blastocysts, and (2) develop an efficient and practical vitrification protocol for *in vivo*-derived porcine embryos at very early developmental stages.



# OBJECTIVES





## OBJECTIVES

The main objectives of this thesis were to improve the non-surgical deep intrauterine transfer procedure with vitrified *in vivo*-derived morulae and blastocysts to facilitate the practical application of this technology in commercial conditions, and to evaluate the effects of different vitrification protocols on the developmental ability of *in vivo*-derived porcine embryos at very early developmental stages to increase their viability after warming. With this purpose, the specific objectives contained in this thesis were:

1. Non-surgical deep intrauterine transfer with vitrified porcine morulae and blastocysts (Article 1).
  - a) Effects of two one-step warming methods (in a dish or in a 1-mL syringe) on the *in vitro* survival of SOPS-vitrified embryos.
  - b) Influence of the vitrification volume and/or the warming time on the *in vitro* survival of vitrified embryos.
  - c) Effects of the passage of embryos warmed by the one-step in a dish method through the NET catheter on their subsequent *in vitro* and *in vivo* development.
  - d) Reproductive performance of recipients following NET of vitrified embryos using the one-step warming procedure in a dish.

2. Lipid polarisation by centrifugation and cryotolerance of porcine zygotes.
  - a) *In vitro* and *in vivo* developmental competence of centrifuged selected 2PN zygotes produced *in vitro* (Article 2).
  - b) Effects of lipid polarisation by centrifugation prior vitrification on the *in vitro* cryosurvival of *in vivo*-derived zygotes (Article 3).
3. Chemical delipidation with forskolin and cryotolerance of porcine embryos.
  - a) Effects of the addition of forskolin to the culture medium on the cryotolerance of *in vitro*-produced blastocysts (Article 4).
  - b) Effects of a 24 h culture period with forskolin and/or the vitrification method on the cryotolerance of *in vivo*-derived porcine embryos at different developmental stages (2-cells, 4-cells, and blastocyst) (Article 5).

# **EXTENDED SUMMARY**



## **EXTENDED SUMMARY**

### **MATERIALS AND METHODS**

#### **Biomedical ethics**

The experimental protocols were carried out in accordance with the Directive 2010/63/EU EEC for animal experiments and were reviewed and approved by the Ethical Committee for Experimentation with Animals of the University of Murcia, Spain (Code# 407/2009).

#### **Chemicals**

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

#### **Recovery of *in vivo*-derived porcine embryos**

##### *Embryo donors*

Embryo donors were weaned crossbred sows (Landrace × Large White) between two to six parities. Animals were kept individually in crates in a mechanically ventilated confinement facility on a commercial farm (Agropor S.L., Murcia, Spain) or on the experimental farm at the University of Murcia, and were fed a commercial ration twice a day. Water was available *ad libitum*.

### *Superovulation of donors*

Superovulation was induced by the intramuscular (i.m.) administration of 1250 IU equine chorionic gonadotrophin (eCG (Foligon); Intervet, Boxmeer, The Netherlands) 24 h after weaning. Sows in estrus 48–72 h post-eCG were treated i.m. with 750 IU human chorionic gonadotrophin (hCG (Veterin corion); Divasa-Farmavic, SA, Barcelona, Spain) at the onset of estrus.

### *Detection of estrus and insemination*

Estrus detection was conducted once a day by exposing sows to a mature boar and applying manual back pressure. Females that exhibited a standing estrus reflex were considered to be in estrus. Artificial inseminations were performed 12 and 24 h after first detection of estrus with seminal doses ( $3 \times 10^9$  spermatozoa in 100 mL) prepared from semen manually collected from adult Pietrain boars and extended with Beltsville thawing solution extender (Pursel and Johnson, 1975). Seminal doses were stored for a maximum of 24 h at 17°C.

### *Embryo collection*

Embryo collection was performed surgically by laparotomy on day 2, 3, 5 or 6 of the estrous cycle (D0: onset of estrus) to obtain zygotes, 2- to 4-cells, morulae and blastocysts, respectively. Sows were sedated using azaperone (2 mg/kg body weight, i.m.). General anesthesia was induced with sodium thiopental (7 mg/kg body weight, i.v.) and maintained with isoflurane (3.5% to 5%). The reproductive tract was exposed via mid-line incision, and the corpora lutea were counted in the ovaries. Embryos were collected by flushing each oviduct with 10 mL and/or the tips of the uterine horns with 30 mL of protein-free embryo recovery medium consisting of Tyrode's lactate (TL)-HEPES-polivinyl alcohol (PVA)- modified medium (TL-HEPES-PVA; Funahashi *et al.* 2000). Collected embryos were washed three times in TL-HEPES-PVA, placed in sterile Eppendorf tubes containing 1.5 mL of the same medium and transported in a thermostatically controlled incubator at 39 °C to our laboratory within 1 h from collection. Then, embryos were evaluated under a stereomicroscope at magnifications of

60 X for morphology. Only zygotes and embryos at the 2- to 4-cell stage, morulae or blastocysts that exhibited an intact ZP, which were also graded as good or excellent with regard to morphological appearance (Merton 2002), were selected for the experiments. Furthermore, each zygote was rotated with a thin pipette until both polar bodies were clearly visualized. Only zygotes with a single cell and two visible polar bodies were used in the experiments.

### ***In vitro*-production of porcine embryos**

#### *Oocyte collection and in vitro maturation*

Ovaries from prepuberal gilts were collected from a local slaughterhouse and transported to the laboratory at 35 °C within 1 h from collection in 0.9% NaCl containing 70 µg/mL kanamycin. The medium used for the collection and washing of cumulus-oocyte complexes (COCs) was Dulbecco's phosphate-buffered saline (DPBS) medium composed of 136.89 mM NaCl, 2.68 mM KCl, 8.1 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> and 1.46 mM CaCl<sub>2</sub>·2H<sub>2</sub>O supplemented with 4 mg/mL bovine serum albumin (BSA; fraction V), 0.34 mM sodium pyruvate, 5.4 mM D-glucose and 70 µg/mL kanamycin (mDPBS). COCs were collected using an 18-gauge needle connected to a 10 mL disposable syringe or by scraping 3- to 6-mm follicles. Oocytes with a compact cumulus mass and dark, evenly granulated cytoplasm were selected and washed three times in maturation medium, and 50 to 80 oocytes were transferred into each well of a 4-well multidish (Nunc, Roskilde, Denmark) containing 500 µL of maturation medium, covered with mineral oil and cultured at 39 °C in a humidified atmosphere of 5% CO<sub>2</sub> in air. The oocyte maturation medium was BSA-free North Carolina State University (NCSU-23; Peters and Wells, 1993) supplemented with 10% (v:v) porcine follicular fluid, 0.1 mg/mL cysteine, 10 ng/mL epidermal growth factor and 5 nM 9-cis-retinoic acid. Maturation culture was initially performed for 20 to 22 h in maturation medium supplemented with 10 IU/mL eCG (Folligon, Intervet International B.V., Boxxmeer, The Netherlands) and 10 IU/mL hCG (Veterin Corion, Divasa Farmavic, S.A., Barcelona, Spain). The oocytes were then incubated for another 20 to 22 h in maturation medium without hormones.

#### *In vitro fertilization (IVF)*

After the end of the maturation period, COCs were denuded with 0.1% hyaluronidase in maturation medium by vortexing for 2 min at 1660 rotations/min and were then washed 3 times in maturation medium and three times in IVF medium. *In vitro* fertilization was performed according to the method of Gil *et al.* (2003). Briefly, groups of 30-50 denuded oocytes were placed in 50- $\mu$ L drops of fertilization medium in a 35 $\times$ 10 mm Petri dish (Falcon, Becton Dickinson Labware, Franklin Lakes, USA) under mineral oil and held at 39 °C in an atmosphere of 5% CO<sub>2</sub> in humidified air for approximately 30 min until the addition of spermatozoa. The IVF medium was essentially the same as the Tris-buffered medium used by Abeydeera and Day (1997) and was composed of 113.1 mM NaCl, 3 mM KCl, 7.5 mM CaCl<sub>2</sub>·2H<sub>2</sub>O, 20 mM Tris (crystallized free base), 11 mM glucose and 5 mM sodium pyruvate supplemented with 0.5 mM caffeine and 0.2% BSA. Semen from a mature Pietrain boar was processed and cryopreserved in 0.5-mL straws as described by Roca *et al.* (2004). For each replicate, one pool of semen was made from two straws thawed in a circulating water-bath at 37 °C for 20 sec. Then, 100  $\mu$ L of thawed semen was washed three times by centrifugation at 1900 X g for 3 min in mDPBS. The resulting pellet was resuspended in fertilization medium, and after the appropriate dilution, 50  $\mu$ L of sperm suspension was added to a 50- $\mu$ L drop of IVF medium containing the oocytes. The spermatozoa:oocyte ratio was 1000:1. The gametes were co-incubated at 39 °C in a humidified atmosphere of 5% CO<sub>2</sub> in air for 5 h. Just before fertilization, motility was assessed by placing a drop of sperm suspension on warm glass slide and examining it subjectively. Sperm motility estimated in each replicate was 50-60%.

#### *In vitro* embryo culture (IVC)

The embryo culture medium was a sequential medium based on NCSU-23 supplemented with 0.4% BSA. Presumptive zygotes were removed from the fertilization medium and washed three times in pre-equilibrated culture medium. After the removal of spermatozoa from the surface of the ZP by gentle pipetting with a glass pipette, presumptive zygotes were transferred to a 4-well multidish (30 zygotes per well), each containing 500  $\mu$ L of the same medium under mineral oil. *In vitro* culture was performed at 39 °C in a humidified atmosphere of 5% CO<sub>2</sub> in air for 13-18 h to assess the fertilization parameters or for 6 d to obtain blastocysts. Presumptive zygotes



were cultured for the first 2 d in glucose-free NCSU-23 supplemented with 0.33 mM pyruvate and 4.5 mM lactate and then in fresh NCSU-23 medium containing 5.5 mM glucose (NCSU-G) until Day 6 (Day 0=Day of IVF).

#### *Assessment of sperm penetration and embryo development*

To evaluate the maturation and fertilization parameters, 13-18 h after IVF, some presumptive zygotes were mounted on slides, fixed in a solution of acetic acid:ethanol (1:3) for 48 to 72 h at room temperature, stained with 1% lacmoid in 45% (v/v) acetic acid and examined under a phase-contrast microscope at a magnification of 400×. The oocytes were considered penetrated if they contained one or more swollen sperm heads and/or male pronuclei with their corresponding sperm tails and two polar bodies. The fertilization parameters evaluated were: maturation rate (number of oocytes with chromosomes at metaphase II and pronuclear zygotes with extruded polar bodies/total oocytes), penetration rate (number of oocytes penetrated/total inseminated), monospermy (number of oocytes containing only one male pronucleus/total penetrated), number of spermatozoa/oocyte (mean number of spermatozoa in penetrated oocytes), and fertilization efficiency (number of monospermic oocytes/total oocytes inseminated). At Days 2 and 6 after IVF, the cleavage rate (percentage of oocytes divided to 2 to 4 cells/total cultivated) and blastocyst formation rate (percentage of the number of blastocysts/total cultivated) were evaluated under a stereomicroscope. An embryo with a clear blastocoel was defined as a blastocyst.

#### **Vitrification and warming**

Embryos were washed twice in TL-HEPES-PVA at 39 °C before vitrification. Groups of 4 to 6 embryos were vitrified by the method described by Berthelot *et al.* (2000) and modified by Cuello *et al.* (2008). Embryo handling was performed in the laboratory at ambient temperature (22-24 °C), and all vitrification media were maintained at 39 °C. Vitrification and warming were performed using chemically defined media (Sanchez-Osorio *et al.* 2010). The basic medium for vitrification and warming (TCM-PVA) was TCM199-HEPES supplemented with 0.1% (wt/vol) PVA. For vitrification, embryos were washed twice in TCM-PVA and were sequentially equilibrated in the first vitrification medium (TCM-PVA + 7.5% Me<sub>2</sub>SO + 7.5%

ethylene glycol) for 3 min and in the second vitrification medium (TCM-PVA + 16% Me<sub>2</sub>SO + 16% ethylene glycol + 0.4 M sucrose) for 1 min. During the last step, the embryos vitrified by the SOPS method were placed in a 1- $\mu$ L drop and loaded into the narrow end of a SOPS straw (Minitüb, Tiefenbach, Germany) by capillary action. Subsequently, straws containing the embryos were plunged horizontally into liquid nitrogen (LN<sub>2</sub>). Embryos vitrified by the SSV method were placed in a 1- $\mu$ L drop onto the fine hook at the end of a plastic fiberplug (CryoLogic, Mulgrave, Australia). The drop was vitrified by direct contact with the surface of a metal cube, which was pre-cooled by partial immersion in LN<sub>2</sub>. The droplet and hook were then covered with a cooled plastic sleeve, placed into a cooled storage cane, and stored submerged in LN<sub>2</sub>.

After storage in LN<sub>2</sub> for at least one month, the containers were removed and warmed by the one-step warming method in a dish (Cuello *et al.* 2004; Sanchez-Osorio *et al.* 2008) or in a 1-mL syringe (Cuello *et al.* 2005) according to the experimental design. Briefly, for the one-step warming in a dish, the straws and the fiberplugs containing the embryos were vertically submerged in a well of a 4-well multi-dish plate (Nunc A/C, Roskilde, Denmark) containing 400  $\mu$ L of TCM-PVA supplemented with 0.13 M sucrose (TCM-S) and equilibrated for 5 min. For one-step warming in a syringe, the narrow end of the straws was introduced vertically inside the tip of a 1-mL syringe (warming syringe) containing 400  $\mu$ L of TCM-S. After warming, embryos were cultured *in vitro* or transferred to recipients. All warming media were held at 39 °C.

### ***In vitro* embryo culture and assessment of *in vitro* embryo development and total cell number**

Embryos were cultured *in vitro* according to the experimental design in a 4-well multi-dish plate containing 500  $\mu$ L of embryo culture medium composed of NCSU-23 (Peter and Wells 1993) supplemented with 0.4% BSA and 10% fetal calf serum at 39 °C in humidified air with 5% CO<sub>2</sub>. Embryos were morphologically evaluated every 24 h during the culture using a stereomicroscope to determine their developmental progression. Embryos that progressed during the *in vitro* culture to the blastocyst stage and displayed a normal or thinning ZP with an excellent or good appearance were considered viable. Vitrified blastocysts that reformed their blastocoelic cavities after warming showing excellent or good morphology during culture were also considered

viable. The blastocyst formation rate was defined as the ratio of viable full and early blastocysts to the total number of cultured embryos. The hatching rate was defined as the ratio of hatched embryos to the total number of viable embryos after culture. The total hatching rate was defined as the ratio of hatched embryos to the total number of cultured embryos. At the end of the culture period, blastocysts were fixed in 4% paraformaldehyde in phosphate-buffered saline (PBS) for 30 min at room temperature (22–24 °C) to assess the total cell number. Fixed embryos were washed with PBS containing 3 mg mL<sup>-1</sup> BSA, placed on a slide in 4 µL Vectashield (Vector, Burlingame, CA, USA) containing 10 µg mL<sup>-1</sup> Hoechst 33342 (H-33342) and covered with a coverslip. Embryos were examined with fluorescence microscopy using an excitation filter of 330–380 nm. The total number of nuclei stained with H-33342 and displaying blue fluorescence was counted. All cell counts were performed by the same observer.

## **Embryo transfer**

### *Recipients*

Crossbred (Landrace × Large White) cyclic sows and gilts with a normal weight with respect to their breed and age were used in the experiments. Females were allocated individually to crates in a mechanically ventilated confinement facility on a commercial farm (Agropor S.L., Murcia, Spain) or on the experimental farm at the University of Murcia, and were fed a commercial ration twice a day. Water was available *ad libitum*.

### *Non-surgical embryo transfer (NET)*

The NET was conducted in asynchronous (-24 h to the embryo collection time) recipients using the method described by Martinez *et al.* (2004). Naturally cycling sows and gilts were housed in gestation crates. Six hours before transfer, each recipient received a single i.m. injection of Clamoxyl<sup>®</sup> LA (15 mg amoxicillin/kg, Pfizer, Spain). After thorough cleaning and disinfecting of the perineal area of the females, a commercial artificial insemination spirette with a flexible catheter (ART.NR: 19295/0200; Deep Blue<sup>®</sup> embryo transfer catheter, Minitüb, Tiefenbach, Germany) was inserted through the vagina into the cervix. The spirette was used to assist in the

insertion and manipulation of the flexible catheter. The catheter was moved through the cervical canal and propelled forward along one uterine horn as far as possible. Before insertions were performed, the inner tubing of the catheter was rinsed with 500  $\mu$ L TL-HEPES-PVA at 39 °C using a 1-mL disposable syringe. During the insertion of the embryo transfer catheter through the cervix a light positive pressure using the 1-mL syringe with medium was applied to avoid filling of the catheter inner tubing with cervical mucus and the catheter was flushed with 300  $\mu$ L TL-HEPES-PVA when the tip of the catheter reached the uterine body. When the flexible catheter was completely inserted into one uterine horn, a 1-mL syringe (embryo transfer syringe) or a Tom Cat catheter (according to the experimental design) containing the embryos was connected to the NET catheter, and the contents were introduced into the catheter. Finally, an additional volume of 300  $\mu$ L TL-HEPES-PVA was used to force the embryos out from the catheter into the uterus. Correct positioning of the catheter was assumed if no bends or kinks in the catheter were present after its removal.

#### *Laparoscopic embryo transfer*

*In vitro*-produced zygotes were transferred into naturally cycling gilts on the first day of standing estrus. For embryo transfer, the gilts were anesthetized with sodium thiopental (Lab. Abbot, Madrid, Spain; 7 mg/Kg body weight, i.v.) and maintained with isoflurane (3.5-5%) and placed in a Trendelenburg position at an angle of approximately 20° above horizontal. A 1.5 cm incision was made close to the umbilicus, and an 11-mm trocar was inserted into the peritoneal cavity. After CO<sub>2</sub> insufflation, a 0° rigid laparoscope was inserted through the trocar. Two accessory ports were placed in the right and left parts of the hemi abdomen to provide access for the atraumatic grasping forceps and the embryo transfer needle. After grasping one oviduct, 30 embryos were injected close to the ampulla using a Chiba needle (22 G/0.7×200 mm) connected to a 1 mL syringe containing the embryos in 100  $\mu$ L of transfer medium. The average duration of embryo transfer was 5-7 min.

#### **Pregnancy diagnosis**

Pregnancy was diagnosed by transcutaneous ultrasonography. All pregnant gilts were allowed to continue to term and farrowing rates and litter sizes were recorded. The

development rate was calculated as the number of total piglets born compared to the number of embryos transferred to farrowed recipients. The ratio of the number of live-born piglets to the number of embryos transferred to farrowed recipients was used as the embryo survival rate.

### **Statistical analysis**

All data editing and statistical analyses were performed using SPSS Statistics 19 (IBM Corporation, New York, USA), and differences were considered significant at  $P < 0.05$ . Prior to analysis, proportional data were modeled according to the binary model of parameters as described by Fisz [16]. Results are expressed as the least squares mean  $\pm$  SEM (Articles 1 and 4) or mean values  $\pm$  SEM (Articles 2, 3 and 5). Data from all replicates were assessed using an ANOVA with a MIXED procedure (Articles 1, 2, 3, 4 and 5) or Chi-square test with Yate's corrections when required (Article 2). When the ANOVA revealed a significant effect, values were compared using the Bonferroni test.

## **EXPERIMENTAL DESIGN AND RESULTS**

### **Objective 1: Non-surgical deep intrauterine transfer with vitrified porcine morulae and blastocysts (Article 1).**

#### **Experiment 1. Effects of two one-step warming methods (in a dish or in a 1-mL syringe) on the *in vitro* survival of SOPS-vitrified embryos.**

##### *Experimental design*

A total of 62 morulae and 35 blastocysts were obtained from 7 donor sows in three replicates. Embryos from each donor were vitrified and equally and randomly allocated to the following two experimental groups: 1) Dish group, in which vitrified embryos were warmed by the one-step method in a dish; and 2) Syringe group, in which vitrified embryos were warmed by the one-step method in a syringe using a 1-mL embryo-tested Cook syringe. After warming, embryos were evaluated for morphologic appearance and developmental progression during culture as described above. The time

from the extraction of the straw from the LN<sub>2</sub> to the immersion of the tip of the straw into the warming medium in the dish or syringe was recorded.

### *Results*

Analysis of variance showed that one-step warming in a syringe of the vitrified embryos had a lower ( $P < 0.05$ ) survival ( $60.5 \pm 10.4\%$ ) and hatching rates ( $39.6 \pm 9.5\%$ ) in comparison with embryos warmed in a dish ( $85.4 \pm 10.6\%$  and  $69.0 \pm 8.4\%$ , respectively). One-step warming in a syringe required more time ( $P < 0.001$ ) than that required by one-step warming in a dish ( $1.6 \pm 0.1\text{s}$  vs  $0.6 \pm 0.1\text{s}$ ). These results indicate that the one-step warming method in a syringe significantly decreases the *in vitro* embryo development.

### **Experiment 2. Influence of the vitrification volume and/or the warming time on the *in vitro* survival of vitrified embryos.**

#### *Experimental design*

We designed a 2 X 2 factorial experiment, including two vitrification volumes (1 and 2  $\mu\text{L}$ ) and two warming times ( $<1$  and 1.5-2 s). Straws from the first warming time were removed from the LN<sub>2</sub> and introduced immediately in the warming medium being the time required for warming always  $<1$  s. Straws from the second warming time were held at ambient temperature in air for 1 s after removal from the LN<sub>2</sub>, and subsequently immersed in warming medium, in this case the overall time required for warming was between 1.5 and 2 s. A total of 144 morulae and 84 blastocysts were obtained from 14 donor sows in three replicates. Embryos from each donor were vitrified and equally and randomly allocated to each of the four experimental groups. In all groups, the embryos were warmed using the one-step procedure in a dish. After warming, embryos were evaluated for morphologic appearance and developmental progression during culture as described above.

### *Results*

The warming time and the interaction between the vitrification volume and warming time had a significant effect on the embryo survival rate ( $P < 0.002$  and  $P < 0.006$ , respectively). In contrast, the volume of vitrification did not affect this parameter. When the highest vitrification volume (2  $\mu\text{L}$ ) was used, the time spent from the extraction of the straw from the  $\text{LN}_2$  to the immersion of the tip of the straw into the warming medium did not affect the *in vitro* development of embryos. However, that time was determinant in the groups vitrified with low volume (1  $\mu\text{L}$ ). In these groups, a warming time of  $<1$  s was compatible with high survival ( $90.9 \pm 6.0\%$ ), but a warming time between 1.5 and 2 s dramatically decreased ( $P < 0.003$ ) the *in vitro* development capability of the embryos ( $58.9 \pm 6.1\%$ ). No differences were observed in the embryo hatching rates among groups (range:  $60.6 \pm 7.9\%$  to  $76.1 \pm 6.7\%$ ).

### **Experiment 3. Effects of the passage of embryos warmed by the one-step in a dish method through the NET catheter on their subsequent *in vitro* and *in vivo* development.**

#### Experiment 3.1 (*in vitro* embryo development):

##### *Experimental design*

Fourteen sows were used as embryo donors in a total of three replicates. Blastocysts ( $n = 174$ ) collected from each donor were vitrified and randomly allocated to the following three experimental groups: 1) Dish group, in which vitrified embryos were warmed in a dish; 2) Dish + Tom Cat group, in which vitrified embryos were warmed in a dish and then loaded into a Tom Cat catheter; and 3) Dish + Tom Cat + NET catheter group, in which vitrified embryos were warmed in a dish, loaded into a Tom Cat catheter and then passed through the NET catheter. Some fresh blastocysts from each donor ( $n = 60$ ) were not vitrified and were loaded into a Tom Cat catheter and passed through the NET catheter (fresh group). After treatments, fresh and vitrified-warmed embryos were cultured to evaluate their *in vitro* development.

##### *Results*

Neither the NET catheter nor the Tom Cat catheter had a damaging effect on either the fresh or vitrified-warmed embryos. No differences in survival (range:  $90.8 \pm 4.0\%$  to  $100.0 \pm 4.5\%$ ) or hatching rates (range:  $76.2 \pm 9.7\%$  to  $85.3 \pm 11.0\%$ ) were observed among the groups.

### Experiment 3.2 (in vivo embryo development):

#### *Experimental design*

A total of 28 recipient sows were used in this experiment. Morulae and early blastocysts ( $n = 411$ ) were obtained from 25 donor sows, and embryos from each donor were equally and randomly allocated to the following three experimental groups: 1) Dish group, in which vitrified embryos ( $n = 194$ ) were warmed with the one-step warming method in a dish, loaded into a Tom Cat catheter and transferred to recipients ( $n = 13$ ); 2) Syringe group, in which vitrified embryos ( $n = 88$ ) were warmed by the one-step method directly in a 1-mL Cook syringe, which was connected to the NET catheter and then transferred to recipients ( $n = 6$ ); and 3) Fresh group, in which fresh embryos ( $n = 129$ ) were loaded into a 1-mL Cook syringe and transferred to 9 recipients. An average of 15 fresh or vitrified blastocysts were transferred to each of recipients. Twenty four h after the NET, recipients were subjected to a laparotomy, as described above, and the transferred embryos were recovered by flushing each uterine horn with 60 mL TL-HEPES-PVA. Recovered embryos were evaluated under a stereomicroscope at magnifications of 60X to assess their *in vivo* viability. *In vivo* survival and hatching rates were defined as described above for *in vitro* culture. Unhatched embryos classified as viable were then cultured for 48 h to evaluate their *in vitro* development. The embryo developmental stage at 24 h after NET and at 48 h of *in vitro* culture was considered linear for the purposes of statistical analysis and was scored as follows: 1, morula-early blastocyst (a compact morula and a blastocyst with an incipient visible blastocoele); 2, full blastocyst (a blastocyst with a well-defined blastocoele, inner cell mass and a completely discernible trophoblast); 3, expanded blastocyst (a blastocyst with an overall increased diameter and a thinned ZP); and 4, hatching or hatched blastocyst (a blastocyst with broken or absent ZP).

#### *Results*



Similar embryo recovery rates were obtained among the groups (range:  $70.8 \pm 4.2\%$  to  $77.2 \pm 6.1\%$ ) 24 h after NET. The embryo survival and the hatching rates from the fresh group ( $94.0 \pm 4.1\%$  and  $36.8 \pm 7.8\%$ , respectively) were higher ( $P < 0.05$ ) than those achieved after NET of vitrified embryos warmed in a dish ( $80.4 \pm 3.4\%$  and  $14.2 \pm 7.2\%$ , respectively). All the embryos recovered after NET from the syringe group were found to have degenerated. The *in vitro* survival rates of viable fresh and vitrified-warmed embryos recovered 24 h after NET and cultured *in vitro* for an additional 48 h were similar (range:  $98.3 \pm 1.1\%$  to  $99.9 \pm 1.1\%$ ). However, the hatching rate in the fresh group ( $71.4 \pm 5.2\%$ ) was higher ( $P < 0.01$ ) than in the dish group ( $43.5 \pm 5.6\%$ ). No embryos from the syringe group were cultured because all of them were found to have degenerated at recovery. The developmental stage of embryos 24 h after NET from the fresh group ( $3.4 \pm 0.1$ ) was higher ( $P < 0.001$ ) than that of embryos from the dish group ( $2.4 \pm 0.1$ ). The mean final developmental stage achieved after 48 h of culture of viable embryos recovered after NET was lower ( $P < 0.001$ ) in the dish group ( $3.2 \pm 0.1$ ) than in the fresh group ( $3.7 \pm 0.1$ ).

#### **Experiment 4. Reproductive performance of recipients following NET of vitrified embryos using the one-step warming procedure in a dish.**

##### *Experimental design*

Donor sows ( $n = 34$ ) and recipient gilts ( $n = 11$ ) were used to determine the reproductive performance following NET of vitrified embryos using the dish warming procedure described in Experiment 3.2. An average of 35 vitrified-warmed blastocysts were loaded into a Tom Cat catheter, which was connected to the NET catheter, and transferred to each of recipients. Beginning 12 days after NET, the recipients were checked daily for signs of estrus. Pregnancy was diagnosed at Days 21 to 25 after transfer by transcutaneous ultrasonography. All pregnant recipients were allowed to carry litters to term, and the farrowing rate, litter size, and litter weight at birth were recorded. The embryo survival rate was calculated as the ratio of the number of live-born piglets to the number of embryos transferred to all recipients (overall embryo survival rate) or to farrowed recipients (embryo survival rate at farrowing).

### Results

No vaginal discharges were observed after the NET procedure in any of the recipients. One recipient was excluded from the analysis because a kink was detected in the catheter after its removal, indicating that the insertion of the catheter was not correct. Regular returns to estrus (19–23 days) were observed in four of the recipients, and the remaining recipients were diagnosed as being pregnant. One of the recipients diagnosed as pregnant returned to estrus on Day 30. The remaining five recipients came to term (50% farrowing rate) and farrowed an average of  $10.4 \pm 0.9$  piglets (range: 8 to 13), of which an average of  $0.4 \pm 0.2$  were born dead. The average weight of the piglets at birth was  $1.6 \pm 0.2$  kg, and no morphologic abnormalities were observed. Embryo survival was 14.9% overall and was 28.6% in the gilts that farrowed.

### **Objective 2: Lipid polarisation by centrifugation and cryotolerance of porcine zygotes.**

#### **Experiment 1. *In vitro* and *in vivo* developmental competence of centrifuged selected 2PN zygotes produced *in vitro* (Article 2).**

##### *Experimental design*

Firstly, the experiment was designed to evaluate the *in vitro* embryonic development of 2PN zygotes to the blastocyst stage. After centrifugation and selection, 57 selected 2PN zygotes in 3 replicates were cultured separately. Non-centrifuged, non-selected zygotes (n= 125) were used as the control group. In each replicate, some presumptive zygotes from the control group were fixed and stained to evaluate the fertilization parameters.

Presumptive zygotes were placed in 500  $\mu$ L of embryo culture medium containing 20 mM Hepes in 1.5 mL sterile eppendorf tubes and centrifuged at 15,000 X g at 37 °C for 20 min to polarize the cytoplasmic lipid droplets and permit the visualization of pronuclei. Batches of 20 zygotes were examined in droplets of the same medium under an inverted microscope (Nikon Eclipse TE2000-S, Japan) at a magnification of 200X on a warm plate at 37 °C. The pronuclei were counted, and each zygote was individually

classified as 2PN. The reliability of the selection method was first evaluated using a lacmoid staining method, and the actual number of pronuclei was counted using a phase-contrast microscope.

Secondly, a total of 20 gilts were used as recipients to evaluate the *in vivo* developmental competence of centrifuged selected 2PN. Thirty 2PN or control zygotes were laparoscopically transferred into one oviduct of each recipient (10 recipients per group) in 5 replicates. In each replicate, some presumptive zygotes from the control group were fixed and stained to evaluate the fertilization parameters. The time elapsed between zygote selection and transfer was 1 h.

### Results

The fertilization parameters of the control group ( $n = 72$ ) were  $81.9 \pm 4.6\%$ ,  $49.1 \pm 6.6\%$  and  $40.3 \pm 5.8\%$  for sperm penetration, monospermy and fertilization efficiency, respectively.

The control group ( $65.6 \pm 4.3\%$ ) showed a lower ( $P < 0.003$ ) cleavage rate than that in the 2PN zygotes ( $93.0 \pm 3.4\%$ ). The blastocyst formation rate was higher ( $P < 0.003$ ) in 2PN zygotes than in the control zygotes ( $80.7 \pm 5.3\%$ ,  $24.0 \pm 3.8\%$ , respectively). Similarly, the total cell number per blastocyst was higher ( $P < 0.05$ ) for blastocysts obtained from 2PN zygotes ( $39.6 \pm 2.1$ ) compared with those obtained from the control zygotes ( $32.2 \pm 2.3$ ).

On the other hand, a 70% and 60% of recipients became pregnant after the transfer of 2PN and control zygotes, respectively. The non-pregnant recipients returned to estrus at Days 21-24 post-estrus. Two of the pregnant gilts from the control group lost their pregnancies at days 31 and 54, respectively. The average number of piglets born per recipient farrowed did not differ between groups, but the efficiency (survival of embryos transferred in all recipients) was higher ( $P < 0.01$ ) for the 2PN zygote group (9.3%). All of the resulting live-born piglets developed normally without any health problems.

## Experiment 2. Effects of lipid polarisation pre-treatments prior vitrification on the *in vitro* cryosurvival of *in vivo*-derived zygotes (Article 3).

### *Experimental design*

Zygotes from each donor were equally and randomly assigned to one of the following three experimental groups: 1) vitrified control (VTC) group, zygotes (n = 94) were vitrified, warmed and cultured *in vitro*; 2) centrifugation (CT) group, zygotes (n = 90) were centrifuged (20min, 15 000g, 39 °C), vitrified, warmed and cultured *in vitro* or 3) hyperosmotic–centrifugation (H–CT) group, zygotes (n = 90) were equilibrated in the high-osmolality medium for 6 min and then centrifuged (20min, 15 000g, 39 °C), vitrified, warmed and cultured *in vitro*. Some zygotes (n = 43) from each donor were cultured without being vitrified to evaluate their *in vitro* development (fresh control (FC) group). All embryos were evaluated for morphology, integrity of the ZP, developmental progression to the blastocyst stage and total blastocyst cell number, as described above.

### *Results*

Zygotes were obtained from 13 superovulated sows. ANOVA showed no influence of the vitrification pretreatment on any of the parameters evaluated. The blastocyst formation rates for fresh zygotes ( $87.5 \pm 5.3\%$ ) were higher ( $F$ -value = 14.8;  $P$ , 0.001) than those achieved in the vitrified groups (range:  $35.4 \pm 5.3\%$  to  $48.2 \pm 5.6\%$ ). No differences were observed in the total cell number of blastocysts derived from fresh or vitrified zygotes after being cultured *in vitro* (range:  $34.9 \pm 2.8$  to  $44.1 \pm 2.8$ ). In all experimental groups, there was a low percentage of hatched blastocysts at the end of the *in vitro* culture period (range:  $1.2 \pm 1.2$  to  $5.0 \pm 3.5\%$ ), with no differences between groups. The percentage of zygotes with ZP damage after warming did not differ between vitrification groups, but fresh zygotes did not exhibit cracks in the ZP. The blastocyst formation rates in the vitrification groups are more widely distributed for the 25th and 75th percentiles (18.7 and 62.5%, 5.0 and 52.6% and 14.3 and 66.7% for the VTC, CT and H–CT groups, respectively) compared with those obtained in the FC group (66.7 and 100%). ANOVA showed that the embryo donor had a significant effect ( $F$ -value = 4.1;  $P$ , 0.05) on the number of vitrified zygotes that

showed ZP damage after warming and the blastocyst formation rates, but not on the total blastocyst cell number or the hatching rates (range:  $0.0 \pm 0.0$  to  $9.1 \pm 9.1\%$ ).

### **Objective 3. Chemical delipidation with forskolin and cryotolerance of porcine embryos.**

#### **Experiment 1. Effects of the addition of forskolin to the culture medium on the cryotolerance of *in vitro*-produced blastocysts (Article 4).**

##### *Experimental design*

A preliminary experiment was first performed to investigate whether the addition of forskolin increases the lipolytic activity of *in vitro*-produced porcine blastocysts under our experimental conditions. A total of 1200 Day 5 *in vitro*-produced embryos were used in four replicates and the glycerol concentration in the culture medium was determined at 0, 6 and 24 h after the addition of 0 or 10  $\mu\text{M}$  forskolin. Subsequent, the effects of the addition of forskolin to the *in vitro* embryo culture medium on the embryo cryosurvival after SOPS vitrification and warming were examined. For this purpose, a total of 4000 COCs from five replicates were used. After 44 h of maturation, the oocytes were fertilized, and presumptive zygotes were cultured. Some presumptive zygotes ( $n = 716$ ) were fixed 18 h after fertilization to evaluate the fertilization parameters. At Day 5 of IVC, embryos were equally and randomly allocated into two *in vitro* culture groups: embryos cultured for 24 h with 0 or 10  $\mu\text{M}$  forskolin. At Day 6 of IVC, the blastocyst formation rate was assessed, and blastocysts were vitrified ( $n = 459$ ) as described above. A random subset of blastocysts was not vitrified (fresh blastocysts;  $n = 546$ ). Fresh and vitrified blastocysts were cultured in NCSU-G for an additional 24 h, and then the embryo survival rate was evaluated. Viable blastocysts were fixed in order to assess the total cell number of Day 7 blastocysts.

Glycerol levels in the IVC medium were determined using the EnzyChrom Glycerol Assay Kit (BioAssay Systems, CA, USA) and a fluorometric procedure, which has a linear detection range of 2 to 50  $\mu\text{M}$  glycerol. This assay uses a single working reagent that combines glycerol kinase, glycerol phosphate oxidase and color reactions in one step. The fluorescence intensity of the reaction product is directly proportional to

the glycerol concentration in the sample. In order to evaluate embryo glycerol release to the embryo culture medium, Day 5 embryos were washed twice in NCSU-G to remove the mineral oil. Groups of 150 embryos were then cultured in open Eppendorf tubes containing 40  $\mu\text{L}$  NCSU-G with or without 10  $\mu\text{M}$  forskolin at 39  $^{\circ}\text{C}$  in a humidified atmosphere of 5%  $\text{CO}_2$  in air. At 0, 6 and 24 h after the addition of forskolin, 10  $\mu\text{L}$  of medium from each experimental group was removed and frozen at -20  $^{\circ}\text{C}$  until glycerol content measurement. To measure the glycerol content, 10- $\mu\text{L}$  samples of culture medium were mixed with 100  $\mu\text{L}$  of working reagent in a black 96-well plate and incubated at room temperature for 20 min. Next, the fluorescence was measured in a plate reader at  $\lambda_{\text{ex}}=530$  nm and  $\lambda_{\text{em}}=585$  nm. The molar glycerol concentration was calculated using a glycerol standard curve constructed with serial dilutions of a 100 mM glycerol standard.

### Results

The glycerol standard curve represents glycerol concentrations from 1 to 30  $\mu\text{M}$  with a linear relationship ( $y = 58.7x$ ) and a very high correlation coefficient ( $R^2 = 0.996$ ) between glycerol concentration and relative fluorescence units (RFUs). The concentration of glycerol increased ( $P < 0.001$ ) with the time of culture in both the control and forskolin-cultured embryos. The addition of 10  $\mu\text{M}$  forskolin to the culture medium resulted in an increase ( $P < 0.001$ ) in glycerol concentration compared to the control after 24 h of IVC ( $11.1 \pm 0.6$  compared with  $7.6 \pm 0.3$   $\mu\text{M}$ , respectively). There was also a time effect ( $P < 0.01$ ) on the interaction of forskolin and glycerol concentration.

The addition of forskolin to the culture medium enhanced ( $P < 0.03$ ) the vitrification survival of Day 6 blastocysts ( $44.7 \pm 2.3\%$ ) compared to embryos cultured without forskolin ( $34.1 \pm 2.4\%$ ). The vitrification procedure compromised ( $P < 0.01$ ) embryo viability compared to the fresh groups. Blastocysts from all vitrified and fresh groups had similar total cell numbers (range:  $37.3 \pm 1.4$  to  $41.6 \pm 2.1$ ).

**Experiment 2. Effects of a 24 h culture period with forskolin and/or the vitrification method on the cryotolerance of *in vivo*-derived porcine embryos at different developmental stages (2-cell, 4-cell, and blastocyst) (Article 5).**

### *Experimental design*

To determine the influence of the vitrification method and/or the pre-treatment with forskolin on the *in vitro* survival of vitrified embryos, we designed a 2 x 2 factorial experiment with 2 levels of vitrification (SOPS and SSV) and 2 levels of forskolin (0 and 10  $\mu\text{M}$ ). Each one of the different embryo developmental stages evaluated (2-cell, 4-cell, and blastocyst) was subjected to the same experimental design. Three replicates for each developmental stage were performed. Embryos from each donor were randomly allocated to each of the four experimental groups. Immediately after collection, all embryos were cultured for 24 h in 500  $\mu\text{L}$  of embryo culture medium, containing 0 or 10  $\mu\text{M}$  forskolin, at 39 °C in humidified air with 5%  $\text{CO}_2$ . Subsequently, random subsets of the embryos were vitrified by the SOPS or SSV methods, stored in LN2, warmed and cultured *in vitro* to evaluate their developmental progression. The remaining embryos were not vitrified (fresh controls). Fresh and vitrified-warmed 2-cell, 4-cell, and blastocyst were cultured for additional 96 h, 72 h and 24 h, respectively. At the end of the culture period, all embryos were evaluated for developmental progression to the blastocyst stage and total blastocyst cell number as described above.

### *Results*

Embryos were obtained from a total of 37 donors, of which 14, 10, and 13 were used to obtain zygotes, 2- to 4-cell embryos and morulae, respectively. The overall mean number of corpora lutea in donor sows was  $29.4 \pm 1.2$ . The ratio of collected embryos to the total number of corpora lutea counted was 88.9%. The total number of embryos collected was 967, of which 10 (1.0%) were unfertilized oocytes and degenerated embryos, 356 (36.8%) were zygotes, 270 (27.9%) were 2- to 4-cell embryos, 289 (30%) were morulae, and 42 (4.3%) were blastocysts. After 24 h of culture, 98.9, 97.8 and 100% of zygotes, 2- to 4-cell embryos, and morulae, respectively, had progressed to the 2-cell, 4-cell, and blastocyst stage, respectively. Pre-treatment with forskolin had a significant effect ( $P < 0.01$ ) on the blastocyst formation rates and the final developmental stage for the vitrified 2-cell and 4-cell embryos, respectively. The vitrification method and the interaction between the vitrification method and forskolin did not affect any of the parameters evaluated for 2- and 4-cell

embryos. Therefore, the data from both vitrification methods were pooled for subsequent analyses. For 2- and 4-cell embryos, the blastocyst formation rates of the fresh control groups (range:  $91.8 \pm 3.9\%$  to  $92.0 \pm 3.9\%$  and  $88.4 \pm 6.4\%$  to  $92.0 \pm 5.5\%$ , respectively) were higher ( $P < 0.003$ ) than those achieved in the vitrification groups (range:  $56.7 \pm 4.4\%$  to  $71.5 \pm 3.9\%$  and  $26.2 \pm 4.3\%$  to  $43.6 \pm 4.7\%$ , respectively), regardless of the forskolin pre-treatment. Although chemical delipidation with forskolin showed a positive effect on the *in vitro* survival of vitrified-warmed embryos, no significant differences were observed for this parameter in the fresh groups. The means of the final developmental stage of vitrified-warmed 2-cell ( $1.5 \pm 0.06$ ) and 4-cell ( $1.4 \pm 0.13$ ) embryos derived from zygotes and 2- to 4-cell embryos, respectively, and cultured without forskolin were significantly ( $P < 0.05$ ) lower than those of their vitrified-warmed counterparts that were treated with forskolin ( $1.7 \pm 0.05$  and  $1.8 \pm 0.07$ , respectively) and those of the fresh groups ( $1.83 \pm 0.08$  and  $1.95 \pm 0.13$ , respectively). No differences were observed in the total cell number of full blastocysts (range:  $24.9 \pm 3.2$  to  $39.4 \pm 3.1$ ) and early blastocysts (range:  $18.8 \pm 0.7$  to  $23.5 \pm 2.7$ ) derived from vitrified 2- and 4-cell embryos pre-treated with 0 or 10  $\mu\text{M}$  forskolin compared with their fresh counterparts (range:  $33.4 \pm 3.7$  to  $43.5 \pm 3.5$  and  $20.4 \pm 2.4$  to  $26.0 \pm 2.0$  for full and early blastocysts, respectively). In all experimental (vitrified and fresh) groups of 2- and 4-cell embryos there was a low percentage of hatched blastocysts at the end of the *in vitro* culture period (range:  $4.2 \pm 2.0$  to  $6.5 \pm 3.7\%$  and  $7.1 \pm 4.0$  to  $15.0 \pm 8.2\%$ , respectively), with no differences among groups. The vitrification method, the pre-treatment with forskolin and their interaction did not affect any of the parameters evaluated for vitrified blastocysts derived from morulae cultured *in vitro* for 24 h. For fresh groups treated with 0 or 10  $\mu\text{M}$  forskolin, the blastocyst formation rates ( $96.4 \pm 3.5\%$  and  $96.6 \pm 3.3\%$ , respectively), the final embryo developmental stage ( $2.4 \pm 0.1$  and  $2.6 \pm 0.1$ , respectively), the hatching rates ( $55.5 \pm 9.7\%$  and  $58.6 \pm 9.3\%$ , respectively), and the total cell number ( $74.1 \pm 3.3$  and  $73.4 \pm 3.0$ , respectively) were similar to those achieved in their vitrified counterpart groups.



# CONCLUSIONS



## CONCLUSIONS

1. The one step warming in a 1-mL syringe has deleterious effects on the *in vitro* and *in vivo* post-warming viability of SOPS-vitrified porcine morulae and blastocysts. Contrary, the one-step warming in a dish did not interfere with the *in vitro* or *in vivo* embryo development, and provides acceptable farrowing rates and litter sizes when combined with NET.
2. There were not deleterious effects of centrifugation on *in vitro* and *in vivo* development of porcine zygotes produced *in vitro*.
3. More than 40% of *in vivo*-derived zygotes can be successfully cryopreserved by SOPS vitrification. Lipid polarisation by centrifugation prior vitrification did not improve the *in vitro* developmental ability of *in vivo*-derived porcine zygotes after vitrification and warming.
4. The chemical delipidation with 10  $\mu$ M forskolin for 24 h prior to vitrification improves the cryotolerance of *in vitro*-produced blastocysts and *in vivo*-derived 2- and 4-cell porcine embryos. In contrast, forskolin did not affect the cryosurvival of *in vivo*-derived blastocysts.
5. Vitrification is a promising procedure for the cryopreservation of *in vivo*-derived porcine embryos at very early-stages (zygotes, 2-cells and 4-cells).



# **RESUMEN GENERAL**



## INTRODUCCIÓN

La industria porcina tiene un gran interés por la transferencia de embriones, ya que esta técnica permite el transporte de material genético de gran valor con unos costes reducidos, y con un mínimo riesgo de transmisión de enfermedades. Sin embargo, la aplicación comercial y práctica de la transferencia de embriones en la especie porcina se ha visto limitada debido a la necesidad de utilizar procedimientos quirúrgicos, tanto para la recolección como para la transferencia de los embriones y, como resultado de las dificultades asociadas al almacenamiento a largo plazo de los embriones porcinos utilizando métodos tradicionales de criopreservación. En este contexto, es evidente la importancia de desarrollar métodos eficaces para la criopreservación de los embriones porcinos, así como del desarrollo y mejora de la transferencia de embriones por vía no-quirúrgica.

A pesar de la complejidad anatómica del cérvix y de los cuernos uterinos de la cerda, Martínez, *et al.* (2004) diseñaron un dispositivo para realizar la transferencia intrauterina profunda de embriones por vía no-quirúrgica, utilizando cerdas nulíparas y sin ningún tipo de sedación. Después de los primeros intentos de transferencia vía no-quirúrgica con embriones frescos, se ha logrado un rendimiento reproductivo aceptable y prometedor (Martínez *et al.* 2005).

Por otra parte, la criopreservación de embriones porcinos ha sido ineficaz debido a su alta sensibilidad a las bajas temperaturas (revisado por Dobrinsky 2002). Este hecho ha limitado la capacidad de dichos embriones para ser criopreservados por los métodos convencionales de congelación lenta. Por el contrario, se han obtenido notables resultados en la supervivencia *in vitro* e *in vivo* después de la vitrificación y el calentamiento de mórulas y blastocistos obtenidos *in vivo* (Kobayashi *et al.* 1998; Holm *et al.* 1999; Dobrinsky *et al.* 2000; Misumi *et al.* 2003; Beebe *et al.* 2005, 2011; Cuello *et al.* 2008; Fujino *et al.* 2008, Sánchez-Osorio *et al.* 2010).

El uso combinado de la vitrificación y de la transferencia de embriones vía no-quirúrgica podría hacer de la transferencia de embriones una tecnología comercialmente viable en la especie porcina. Sin embargo, estas tecnologías tienen que ser probadas y optimizadas en la práctica y varios parámetros, que pueden afectar a la vitrificación y a la transferencia de embriones, deben ser estudiados con el fin de mejorar su eficiencia.

El método para realizar la transferencia no-quirúrgica con mórulas y blastocistos frescos requiere del uso de una jeringa de 1-mL que contiene a los embriones, la cual se conecta al catéter de transferencia. Para adaptar este método a los embriones vitrificados-calentados, hemos simplificado el procedimiento convencional del calentamiento en tres pasos, desarrollando un método de calentamiento directo (dilución en un solo paso) utilizando un pocillo. Este método de dilución en un solo paso ha proporcionado unas tasas similares de supervivencia y de eclosión en blastocistos vitrificados-calentado (Cuello *et al.* 2004). Este método de calentamiento en un solo paso sería ideal para la transferencia de embriones vía no-quirúrgica en condiciones de campo, ya que los embriones pueden calentarse directamente en una jeringa de 1-mL. La jeringa que contiene los embriones se conectaría inmediatamente al catéter de transferencia sin ninguna manipulación especial. En 2005, describimos el primer intento de transferencia de embriones vía no-quirúrgica utilizando blastocistos porcinos vitrificados en 2  $\mu$ L de medio de vitrificación mediante el método de la pajuela abierta y estirada (OPS), descrito por Vajta *et al.* (1997), calentados en una sola etapa con una jeringa; lográndose una tasa de parto aceptable (42,9%) con un promedio de  $5,4 \pm 0,8$  lechones nacidos (Cuello *et al.* 2005). Sin embargo, otros ensayos posteriores realizados en nuestro laboratorio mostraron que cuando se utiliza el mismo método de calentamiento en combinación con la transferencia vía no-quirúrgica de embriones vitrificados mediante el método Superfina-OPS (SOPS), la tasa de gestación fue extremadamente baja (resultados no publicados). Actualmente, el método de vitrificación mediante SOPS utilizando 1  $\mu$ L de medio de vitrificación se lleva a cabo rutinariamente en nuestro laboratorio, ya que las tasas de supervivencia embrionaria *in vitro* después de la vitrificación y el calentamiento son muy altas, incluso similares a las obtenidas con los embriones frescos cuando se utiliza el estadio de blastocisto (Sánchez-Osorio *et al.* 2008; Cuello *et al.* 2010). Por lo tanto, decidimos evaluar los pasos críticos del protocolo de calentamiento utilizado en estos ensayos.



Por otro lado, a pesar de los importantes avances en la criopreservación de los embriones de la especie porcina, como se ha mencionado anteriormente, el éxito de la vitrificación con embriones porcinos, hasta la fecha, se ha limitado a los estadios de mórula y blastocisto producidos *in vivo* (Misumi *et al.* 2003; Cuello *et al.* 2008, 2010; Fujino *et al.* 2008; Sánchez-Osorio *et al.* 2010a; Beebe *et al.* 2011). Existe poca información en la literatura documentando la criosupervivencia de embriones porcinos en estadios de desarrollo muy tempranos. Métodos eficaces para criopreservar cigotos podrían ser valiosos para el rescate genético durante las crisis sanitarias que implican el sacrificio de todos los animales. En este caso, no sería posible elegir el día de recolección para obtener los embriones más adecuados para su criopreservación. Además, la capacidad de crio-preservar cigotos con éxito podría ser importante para los programas de clonación. Los cigotos porcinos enucleados obtenidos *in vivo* han sido utilizados con éxito para la reconstrucción de embriones (Polejaeva *et al.* 2000). Los cigotos se puede usar para la reprogramación de células somáticas, la producción de células madre embrionarias y el desarrollo a término de los animales clonados (Egli *et al.* 2007). Además, los embriones porcinos clonados típicamente se transfieren a las receptoras en el estadio de cigoto (Bethausser *et al.* 2000; Lee *et al.* 2008). La vitrificación puede permitir el almacenamiento a largo plazo de los cigotos reconstruidos hasta el momento de la transferencia del embrión a las receptoras, lo que facilitaría la planificación de la investigación.

Los estudios sobre la criopreservación de embriones porcinos en estadios muy tempranos son escasos y han dado resultados pobres (Esaki *et al.* 2004; Cuello *et al.* 2007). La sensibilidad de estos embriones para la crioconservación ha sido atribuida a su elevado contenido en lípidos (Polge *et al.* 1974; Nagashima *et al.* 1994). La eliminación mecánica de las gotas lipídicas mediante micromanipulación, minimiza las lesiones por frío en los estadios embrionarios tempranos y mejora su tolerancia a la congelación (Nagashima *et al.* 1994, 1995). Además, la combinación de la delipidación mecánica y la vitrificación ha dado lugar a los primeros lechones nacidos tras la transferencia de embriones porcinos producidos *in vitro* (Nagashima *et al.*, 2007). Sin embargo, la delipidación mecánica aumenta considerablemente la probabilidad de transmisión de patógenos debido a los daños causados sobre la zona pelúcida durante la micromanipulación (Stringfellow 1998). La polarización de las gotas lipídicas mediante

centrifugación a alta velocidad es una alternativa no invasiva a la delipidación mecánica. Aunque este método parece ser útil para seleccionar cigotos monospermicos, sólo ha sido utilizado por algunos investigadores (Han *et al.* 1999a, 1999b; Gil *et al.* 2008; Somfai *et al.* 2008, 2009), y hay poca información sobre el efecto del método de centrifugación de alta velocidad sobre la capacidad *in vitro* de cigotos bipronucleares (2PN) para desarrollarse hasta el estadio de blastocisto. Además, no hay referencias sobre la eficiencia de los cigotos 2PN para producir lechones viables después de su transferencia a una receptora. La centrifugación a altas velocidades parece no tener efectos negativos sobre la capacidad de desarrollo de los embriones, ya que se han obtenido camadas vivas de lechones a partir de la transferencia de blastocitos, tanto derivados *in vivo* (Beebe *et al.* 2002, 2005; Cameron *et al.* 2004) como producidos *in vitro* (Men *et al.* 2011), usando este procedimiento. Sin embargo, no hay artículos publicados sobre el efecto de la polarización lipídica mediante centrifugación sobre la criosupervivencia de cigotos porcinos obtenidos *in vivo*. La polarización lipídica por centrifugación podría ser un método exitoso para la vitrificación de cigotos, ya que esto debería disminuir su criosensibilidad, sin alterar su habilidad para desarrollarse.

Se ha propuesto que una alternativa para incrementar la eficacia de la polarización lipídica por centrifugación. Esta alternativa consiste en pre-tratar a los cigotos con medios de alta osmolalidad para aumentar el espacio perivitelino. Este pre-tratamiento podría facilitar la separación completa de las gotas de lípidos en el citoplasma después de la centrifugación, evitando así que sean reincorporados en el citoplasma durante los procesos de vitrificación o cultivo (Li *et al.* 2009). Se han obtenido lechones vivos después de transferir blastocistos vitrificados producidos *in vitro*, los cuales habían sido sometidos durante el estadio de cigoto a un estrés hiperosmótico antes de la polarización lipídica por centrifugación (Li *et al.* 2009). Sin embargo, en la actualidad no hay información disponible sobre la vitrificación de cigotos expuestos a este doble pre-tratamiento.

Una posible vía para mejorar la tolerancia a la vitrificación de los embriones producidos *in vivo* en estadios muy tempranos de desarrollo es reducir su contenido lipídico a través de la estimulación química de la lipólisis mediante forskolín. Se ha demostrado que el forskolín (7 $\beta$ -acetoxi-8,13-epoxi-1 $\alpha$ , 6 $\beta$ , 9 $\alpha$ -trihidroxi-DAL-14-eno-11-ona) reduce el contenido lipídico de los ovocitos porcinos maduros (Fu *et al.* 2011).

El forskolín también ha incrementado la criotolerancia de los blastocistos producidos *in vitro* (Men *et al.* 2006), que son altamente criosensibles debido a su alto contenido en lípidos comparado con los embriones obtenidos *in vivo* (Romek *et al.* 2009). A pesar de esto, no existen publicaciones previas en la literatura sobre la influencia del periodo de cultivo con forskolin sobre la criosupervivencia de los embriones porcinos obtenidos *in vivo*. Sería de gran importancia evaluar los efectos del forskolín sobre la lipólisis, bajo nuestras condiciones de cultivo *in vitro*, antes de ser usado con los embriones obtenidos *in vivo*.

Otra estrategia que podría mejorar la habilidad en la vitrificación de los embriones porcinos en estadios muy tempranos es incrementar la velocidad de enfriamiento. La vitrificación ultra-rápida, como es el método OPS, ha resultado ser beneficiosa para la criopreservación de los embriones altamente sensibles (Vajta *et al.* 1997), ya que es un procedimiento que incrementa la velocidad de enfriamiento. Actualmente, la velocidad de enfriamiento del método OPS (aproximadamente 20.000 °C / min; 7) puede ser doblada utilizando pajuelas más finas y de menor diámetro (SOPS; Isachenko *et al.* 2003). Otro procedimiento que tiene una velocidad de enfriamiento muy evada es el método de vitrificación en superficie sólida (SSV; Dinnyes *et al.* 2000), el cual se ha usado en porcino para criopreservar ovocitos y cigotos producidos *in vitro* (Gupta *et al.* 2007; Somfai *et al.* 2006, 2010). Aunque se han obtenido lechones a partir de blastocistos obtenidos *in vivo* (Beebe *et al.* 2011) vitrificados por el método SSV, no hay artículos disponibles en la literatura sobre la vitrificación de embriones porcinos obtenidos *in vivo* en estadios tempranos de desarrollo con este método.

Basándonos en todo lo expuesto anteriormente, el presente trabajo fue diseñado con el objetivo de (1) mejorar la transferencia intrauterina profunda vía no-quirúrgica de embriones vitrificados-calentados obtenidos *in vivo* y, (2) desarrollar un protocolo de vitrificación eficiente y práctico para los estadios tempranos de desarrollo de embriones porcinos obtenidos *in vivo* y aumentar su viabilidad después del calentamiento.

## OBJETIVOS

Los objetivos principales de esta tesis fueron mejorar el procedimiento de la transferencia intrauterina profunda vía no-quirúrgica con embriones vitrificados obtenidos *in vivo*, facilitando así la aplicación práctica de esta tecnología en condiciones comerciales, y evaluar los efectos de diferentes protocolos de vitrificación sobre la capacidad de desarrollo de los embriones porcinos obtenidos *in vivo* en estadios muy tempranos, aumentado su viabilidad después del calentamiento. Con este propósito, los objetivos principales que contiene esta tesis fueron:

1. Transferencia intrauterina profunda vía no-quirúrgica con mórulas y blastocistos vitrificados (Artículo 1).
  - a) Evaluar los efectos de dos métodos de calentamiento en una sola etapa (en una placa o en una jeringuilla de un 1mL) sobre la supervivencia *in vitro* de los embriones vitrificados mediante el método SOPS.
  - b) Estudiar la influencia del volumen de vitrificación y/o el tiempo de calentamiento sobre la supervivencia *in vitro* de los embriones vitrificados.
  - c) Evaluar los efectos del paso de los embriones calentados por el método en una sola etapa en una placa, a través del catéter de transferencia de embriones vía no-quirúrgica sobre su posterior desarrollo *in vivo* o *in vitro*.
  - d) Determinar el rendimiento reproductivo de las receptoras después de la transferencia vía no-quirúrgica de embriones vitrificados utilizando el método de calentamiento de una etapa en una placa.

2. Polarización lipídica por centrifugación y criotolerancia de los cigotos porcinos.
  - a) Estudiar la capacidad de desarrollo *in vitro* e *in vivo* de los cigotos 2PN producidos *in vitro*, centrifugados y seleccionados (Artículo 2).
  - b) Investigar los efectos de la polarización lipídica mediante centrifugación, antes de la vitrificación, sobre la criosupervivencia *in vitro* de los cigotos obtenidos *in vivo* (Artículo 3).
  
3. Delipidación química con forskolín y criotolerancia de los embriones porcinos.
  - a) Estudiar los efectos de la adición de forskolín al medio de cultivo sobre la criotolerancia de los blastocistos producidos *in vitro* (Artículo 4).
  
  - b) Evaluar los efectos de un periodo de cultivo de 24 h con forskolín y/o el método de vitrificación sobre la criotolerancia de los embriones porcinos obtenidos *in vivo* en diferentes estadios de desarrollo (2 células, 4 células y blastocisto) (Artículo 5).

## MATERIAL Y MÉTODOS

### Ética biomédica

Todos los procedimientos experimentales fueron realizados de acuerdo con la Directiva 2010/63/EU EEC para la experimentación animal, y fueron previamente evaluados y aprobados por el Comité Bioético de la Universidad de Murcia, España (Código# 407/2009).

### Reactivos químicos

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

## Obtención *in vivo* de embriones porcinos

### *Donantes*

Para la obtención de los embriones se emplearon cerdas híbridas (Landrace x Large White) procedentes del destete y con un número de partos comprendido entre 2 y 6. Las cerdas procedían de una granja comercial (Agropor S.L, Las Torres de Cotillas, Murcia, España) o de la granja experimental de la Universidad de Murcia, en cuyas instalaciones se mantuvieron alojadas en jaulas individuales en el interior de una nave con ventilación controlada. La alimentación consistía en una ración comercial proporcionada en dos tomas diarias, mientras que el agua era administrada *ad libitum*.

### *Tratamiento de superovulación*

El tratamiento de superovulación consistió en la administración intramuscular (i.m.) de 1250 UI de gonadotropina coriónica equina (eCG Foligón); Intervet, Boxmeer, Holanda) 24 h después del destete. Las cerdas que estaban en estro 48-72 h después de la administración de eCG fueron tratadas con 750 UI (i.m) de gonadotropina coriónica humana (hCG (Veterin corion); Divasa-Farmavic, S.A, Barcelona, España) desde el inicio del celo.

### *Detección del estro e inseminaciones*

La detección del estro se realizó mediante la exposición de las cerdas a la presencia de un verraco adulto y la detección del reflejo de inmovilización por parte de un operario con amplia experiencia. Las cerdas donantes fueron inseminadas artificialmente 12 y 24 horas después del inicio del estro. Para ello se emplearon dosis de inseminación preparadas con semen fresco obtenido de al menos dos verracos maduros de raza Pietrain con fertilidad contrastada. Las dosis se prepararon con una concentración de  $3 \times 10^9$  espermatozoides diluidos con BTS (Bestville Thawing Solution; Pursel and Johnson, 1975) hasta un volumen final de 100 mL. Las dosis seminales se conservaron un máximo de 24 h a 17°C.

### *Obtención de embriones*

La recogida de embriones se realizó mediante laparotomía de las cerdas donantes, los días 2, 3, 5 ó 6 del ciclo (Día 0= Inicio de celo), con el fin de obtener embriones en estadio de cigoto, 2-4 células, mórula y blastocisto, respectivamente. Para ello las donantes se sedaron mediante azaperona (2mg/kg de peso vivo, i.m). A continuación, se indujo la anestesia general mediante la inyección intravenosa de tiopental sódico (7mg/kg de peso vivo, i.v) a nivel del pabellón auricular. La anestesia fue mantenida vía inhalatoria con isofluorano (3'5-5%) mediante un circuito cerrado. Se realizó una incisión ventromedial con el fin de localizar y exponer el tracto reproductivo de la cerda. Una vez exteriorizado, se procedió al recuento del número de cuerpos lúteos presentes en cada ovario. A continuación, se realizó el lavado de los oviductos con 10 mL y/o de la primera porción de los cuernos uterinos utilizando 30 mL de medio libre de proteínas consistente en TL-HEPES-PVA (Funahasi y cols. 2000). Los embriones recogidos se lavaron tres veces con medio de recogida y se colocaron en tubos eppendorf que contenían 1'5 mL del mismo medio. Posteriormente, se transportaron al laboratorio dentro de un incubador con temperatura controlada a 39°C, en la hora siguiente al momento de la recogida. Una vez en el laboratorio, los embriones se evaluaron morfológicamente con la ayuda de un estereomicroscopio a 60 aumentos. Solamente aquellos cigotos y embriones en el estadio de 2 a 4 células, morulas o blastocistos que exhibieron una zona pelúcida íntegra, y fueron clasificados morfológicamente como buenos o excelentes (Merton 2002), se seleccionaron para las experiencias. Además, cada cigoto fue manipulado con la pipeta hasta que se pudieron visualizar ambos cuerpos polares. Únicamente, los cigotos que presentaron una sola célula y dos cuerpos polares totalmente visibles fueron usados en las experiencias.

### **Producción *in vitro* de embriones porcinos**

#### *Recolección y maduración de los complejos cúmulus-ovocito*

Los ovocitos utilizados para la realización de la presente tesis se obtuvieron de ovarios procedentes de cerdas prepuberales sacrificadas en un matadero industrial. Los ovarios fueron transportados al laboratorio a 35°C en una solución salina (0'9% NaCl) con Kanamicina (70 µg/mL), en la hora posterior de su recolección. Los complejos

cúmulus-ovocito (COCs) fueron obtenidos por aspiración de folículos antrales de tamaño medio (3 a 6 mm de diámetro) usando una aguja de 18 g conectada a una jeringa de 10 mL. Para la recolección y el lavado de COCs se utilizó una solución salina fosfatada de Dulbecco (DPBS, Dulbecco's phosphate-buffered saline), compuesta por 136.89 mM NaCl, 2.68 mM KCl, 8.1 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> and 1.46 mM CaCl<sub>2</sub>·2H<sub>2</sub>O mM, suplementada con 4 mg/mL albúmina sérica bovina (BSA; fracción V), 0'34 sodium pyruvate, 5.4 mM D-glucose and 70 µg/mL kanamycin. Se seleccionaron aquellos ovocitos que presentaban varias capas de células del cúmulus y un citoplasma uniformemente granuloso. Los ovocitos seleccionados fueron lavados 3 veces en medio de maduración. El medio de maduración de los ovocitos fue NCSU-23 North Carolina State University libre de BSA (Peters and Wells, 1993), suplementado con 10% (v/v) fluido folicular porcino (FF), 0'8 mM cisteína, 10 ng/mL factor de crecimiento epidérmico y 5 nM 9-ácido cis-retinoico. El FF porcino fue obtenido mediante aspiración de los folículos entre 3 y 6 mm de ovarios procedentes del matadero, como ha sido descrito anteriormente. Posteriormente, este FF fue centrifugado a 1500 x g durante 30 min a 15°C. El sobrenadante resultante fue filtrado a través de filtros de 0'8, 0'45 y 0'22 µm, alicuotándolo y almacenándolo a -20°C hasta su utilización. La maduración *in vitro* de los COCs se llevó a cabo en placas de 4 pocillos (Nunc, Roskilde, Dinamarca). En cada pocillo se colocaron grupos de 50 a 80 COCs en 500 µL de medio de maduración suplementado con 10 UI/mL de eCG (Foligon) y 10 UI/mL de hCG (Veterin corion), durante las primeras 20-22 h. Posteriormente, estos COCs se pasaron a medio de maduración sin hormonas durante las siguientes 20-22 h. Los pocillos estaban cubiertos de aceite mineral y la maduración se realizó en una atmósfera de 5% de CO<sub>2</sub> en aire, a 39°C y con una humedad relativa del 95-100%.

#### *Fecundación in vitro*

Tras la maduración, se procedió a la denudación de los COCs con una solución de un 0'1% de hialuronidasa en medio de maduración mediante agitación con un vórtex durante 2 min a 1660 vueltas/min. A continuación los ovocitos se lavaron tres veces en medio de maduración. Posteriormente, los ovocitos denudados fueron lavados tres veces más en medio de fecundación, el cual estaba previamente equilibrado en el incubador. El medio de fecundación fue Tris-buffered médium modificado (mTBM), compuesto por 113'1 mM NaCl, 3 mM KCL, 7'5 mM CaCl<sub>2</sub>·2H<sub>2</sub>O, 20 mM Tris, 11 mM glucosa y



5 mM piruvato sódico suplementado con 0'5 mM cafeína y 0'2% BSA (Abeydeera y Day, 1997). La fecundación *in vitro* se realizó como describen Gil y cols. (2003), grupos de 30 a 50 ovocitos desnudos se distribuyeron en gotas de 50  $\mu$ L de medio de fecundación en placas Petri de 35x10 mm (Falcon, Becton Dickinson Labware, Franklin Lakes, USA). Las gotas se cubrieron con aceite mineral y se mantuvieron en el incubador (5% CO<sub>2</sub> en aire, 39°C), durante aproximadamente 30 min hasta la adición de los espermatozoides. El semen fue procesado y criopreservado en pajuelas de 0'5 mL, basándose en el método descrito por Roca y cols. (2004). Para cada replicado, se utilizó un pool de semen procedente de dos pajuelas descongeladas en un baño a 37°C durante 20 seg. Posteriormente, 100  $\mu$ L del pool del semen descongelado fue lavado tres veces mediante centrifugación a 1900 x g durante 3 min en mDPBS. El pellet resultante fue resuspendido en mTBM, de manera que cada 50  $\mu$ L de esta suspensión espermática contenía 30000 espermatozoides. A continuación, 50  $\mu$ L de esta suspensión espermática se añadió a la gota de fecundación que contenía a los ovocitos. El ratio espermatozoide:ovocito fue de 1000:1. Los gametos fueron coincubados bajo una atmósfera de 5% CO<sub>2</sub>, a 39°C y con una humedad relativa de 95-100% durante 5 h. Justo antes de la fecundación, se procedió a la evaluación de la motilidad espermática, poniendo una gota de la suspensión espermática sobre un porta calentado, examinándolo de forma subjetiva. La motilidad espermática estimada en cada replicado fue del 50-60%.

#### *Cultivo in vitro*

Tras la fecundación *in vitro*, los cigotos se lavaron tres veces en medio de cultivo de embriones (NCSU-23 con 0'4% BSA) preequilibrado, y a continuación se colocaron en grupos de 30 cigotos por pocillo en placas multidish, que contenían 500  $\mu$ L del mismo medio cubierto de aceite mineral. Los cigotos se cultivaron bajo una atmósfera de 5% CO<sub>2</sub>, a 39°C y humedad relativa de 95-100% durante 13-18 h para evaluar los parámetros de fecundación, y durante 6 días para evaluar el desarrollo embrionario. Los embriones se cultivaron en NCSU-23 libre de glucosa suplementado con 0'3 mM piruvato y 4'5 mM lactato durante las primeras 48 h, y transcurrido ese tiempo el medio se reemplazó por NCSU-23 con glucosa hasta el final del cultivo.

#### *Análisis de los parámetros de penetración espermática y desarrollo embrionario*

Para evaluar los parámetros de maduración y fecundación, un grupo de cigotos elegidos al azar se montaron sobre portaobjetos y se fijaron mediante una solución de acético:etanol (1:3) durante 48-72 h a temperatura ambiente. Posteriormente, los cigotos se tiñeron con 1% lacmoid en 45% (v/v) de ácido acético y fueron examinados bajo un microscopio de contraste de fase a 400 aumentos. Los ovocitos se consideraron como penetrados cuando tenían una o más de una cabeza de espermatozoide descondensada y/o la presencia de pronúcleo masculino, estando presente su correspondiente flagelo y los dos cuerpos polares. Los parámetros de fecundación evaluados fueron los siguientes: maduración (número de ovocitos con los cromosomas en metafase II y cigotos pronucleares con cuerpo polar extrusionado/ovocitos totales), penetración (número de ovocitos penetrados/total de ovocitos inseminados), monospermia (número de ovocitos que contiene sólo un pronúcleo masculino/total de ovocitos penetrados), número de espermatozoides/ovocito (número medio de espermatozoides por ovocito penetrado), y eficiencia de la fecundación (número de ovocitos monospermicos/total de ovocitos inseminados). Los parámetros de valoración del desarrollo y calidad embrionaria fueron evaluados en día 2 y en día 7 después de la fecundación, mediante un estereomicroscopio. Se evaluaron los siguientes parámetros: embriones divididos (número de 2-4 células/total cultivados) y formación de blastocistos (número de blastocistos/total cultivados), respectivamente. Sólo aquellos embriones con 2-4 células fueron considerados como divididos, y sólo aquellos embriones con un claro blastocele fueron considerados como blastocistos.

### **Vitrificación y calentamiento**

Los embriones se lavaron dos veces con medio de recogida (TL-HEPES-PVA) a 39°C antes de proceder a la vitrificación. Grupos de 4 a 6 embriones fueron vitrificados según el protocolo descrito por Berthelot y *cols.* (2000), modificado por Cuello y *cols.* (2008). La manipulación de los embriones se realizó en un laboratorio a temperatura ambiente (22-24°C) y, todos los medios de vitrificación fueron mantenidos a 39°C. Tanto la vitrificación como el calentamiento se llevó a cabo utilizando medios químicamente definidos (Sánchez-Osorio y *cols.* 2010). El medio base utilizado para la vitrificación y el calentamiento (TCM-PVA) fue TCM199-HEPES suplementado con 0'1% PVA. Para la vitrificación, los embriones fueron lavados dos veces en TCM-PVA y

fueron secuencialmente equilibrados en el primer medio de vitrificación (TCM-PVA + 7'5% Me<sub>2</sub>SO + 7'5% ethylene glycol) durante 3 minutos, a continuación se pasaron al segundo medio de vitrificación (TCM-PVA + 16% Me<sub>2</sub>SO + 16% ethylene glycol + 0'4 M sacarosa) donde se mantuvieron durante un minuto. Durante este último paso, los embriones se colocaron en una gota de 1μL del segundo medio de vitrificación, que fue cargada por capilaridad en el extremo adelgazado de una pajuela superfina OPS (SOPS; Miniüb, Alemania). Transcurrido el minuto, la pajuela con los embriones se sumergió directamente en posición horizontal en N<sub>2</sub>L. Por otro lado, los embriones que se vitrificaron por el método de superficie sólida (SSV) se colocaron en una gota de 1μL sobre el extremo curvado de las fiberplug (Cyologic, Mulgrave, Australia). Esta gota, con los embriones se vitrificó inmediatamente por contacto directo con la superficie de un cubo de acero que estaba sumergido parcialmente en N<sub>2</sub>L. Una vez se realizó la vitrificación, tanto la fiberplug se almacenó en N<sub>2</sub>L.

Tras el almacenamiento durante un mes en N<sub>2</sub>L, los embriones vitrificados fueron calentados en una sola etapa en una placa (Cuello y cols. 2004; Sánchez-Osorio y cols. 2008) o en una jeringuilla de 1mL (Cuello y cols. 2005), según el diseño experimental. Por lo tanto, para el calentamiento en una sola etapa en placa, las pajuelas o las fiberplugs se sumergieron durante 5 minutos en un pocillo de una placa multidish, el cual contenía 400 μL de TCM-PVA suplementado con 0'13 M sacarosa (TCM-S). Para el calentamiento en una sola etapa en jeringuilla, el extremo más delgado de las pajuelas SOPS se introdujo verticalmente en el interior del agujero de una jeringa de 1mL, donde se conecta a la aguja (jeringuilla de calentamiento) que contenía 400 μL de TCM-S. Después del calentamiento, los embriones se cultivaron *in vitro* o se transfirieron a las receptoras. Todos los medios de calentamiento se mantuvieron a 39 °C.

### **Cultivo *in vitro* de los embriones y evaluación de su desarrollo y número total de células**

Los embriones se cultivaron *in vitro* en placas de 4 pocillos con 500 μL de medio de cultivo compuesto por NCSU-23 (Peter and Wells 1993) suplementado con 0'4% BSA and 10% de suero fetal bovino. El cultivo se realizó en una estufa a 39°C y 5% CO<sub>2</sub>. Durante el cultivo, los embriones se evaluaron cada 24 h con la ayuda de un estereomicroscopio. La viabilidad de los embriones se determinó en base a su capacidad

para desarrollarse *in vitro* hasta el estadio de blastocisto. Los blastocistos vitrificados que reformaron su blastocele tras el calentamiento y presentaron una zona pelúcida normal o adelgazada y una morfología buena o excelente, se consideraron viables. La tasa de formación de blastocistos fue definida como la relación entre el número de blastocistos y blastocistos tempranos viables con respecto al número total de embriones cultivados. La tasa de eclosión se estableció como la proporción entre el número de embriones eclosionados en relación al número total de embriones viables después del cultivo. La tasa de eclosión total fue definida como la relación entre el número de embriones eclosionados con respecto al número total de embriones cultivados. Tras el cultivo, los blastocistos se fijaron en paraformaldehído al 4% en solución salina fosfatada (PBS) durante 30 minutos a temperatura ambiente para poder evaluar el número total de células en cada uno de ellos. A continuación, los embriones fijados se depositaron en microgotas de 4  $\mu$ L de Vectashield (Vector, Burlingame, USA) suplementado con 10  $\mu$ g/mL de Hoechst 33342 (H-33342). Las gotas se colocaron sobre un portaobjetos y se cubrieron con un cubreobjetos. Los embriones fueron evaluados con un microscopio de fluorescencia usando un filtro de excitación de 330-380 nm. El número total de células se determinó mediante conteo de los núcleos que se identificaron por emitir fluorescencia azul.

## Transferencia de embriones

### *Receptoras*

Para la transferencia de los embriones se emplearon cerdas multíparas y cerdas nulíparas híbridas (Landrace x Large White). Las cerdas se alojaron en jaulas individuales en una nave de una granja comercial (Agropor S.L., Murcia, España) o de la granja experimental de la Universidad de Murcia, la nave tenía ventilación controlada. La alimentación consistía en una ración comercial proporcionada en dos tomas diarias, mientras que el agua se administraba *ad libitum*.

### *Transferencia de embriones vía no-quirúrgica*

Las transferencias de embriones vía no-quirúrgica se realizaron en receptoras que presentaban una asincronía de -24 h con respecto a las donantes de embriones,

mediante el método descrito por Martínez y cols. (2004). Las receptoras utilizadas fueron cerdas multíparas y nulíparas que presentaron un estro natural, sin ningún tipo de tratamiento de superovulación. Estos animales estaban alojados en jaulas individuales. Seis horas antes de realizar las transferencias, a cada receptora se le administró una inyección de Clamoxyl<sup>®</sup> LA (15 mg amoxicilina/kg, Pfizer, España). Posteriormente, una vez realizada la limpieza y desinfección de la región perineal, se introdujo un catéter comercial de inseminación artificial a través de la vagina hasta llegar al cérvix. Este catéter de inseminación contenía a su vez un catéter flexible en su interior (ART.NR:19295/0200; Deep Blue<sup>®</sup> catéter de transferencia de embriones, Minitüb, Tiefenbach, Alemania). Una vez insertado el catéter de inseminación en los primeros pliegues cervicales, el catéter flexible fue empujado delicadamente a través del canal cervical hasta conseguir atravesar todos los pliegues del cérvix y llegar lo más profundo posible del interior de uno de los cuernos uterinos. Antes de proceder a la inserción de catéter de transferencia, el tubo interno de dicho catéter se lavó con 500  $\mu$ L de TL-HEPES-PVA a 39°C con la ayuda de una jeringuilla desechable de 1mL. Durante la inserción del catéter de transferencia de embriones a través del cérvix hubo que mantener una presión positiva mediante una jeringuilla de 1mL que contenía medio de transferencia. Esto evitó que el tubo interno del catéter fuera taponado por el moco cervical. Una vez que el catéter de transferencia pasó totalmente los pliegues del cérvix, y alcanzó el cuerpo de útero se procedió a un nuevo lavado del tubo interno con 300  $\mu$ L de TL-HEPES-PVA. En cuanto el catéter de transferencia progresó completamente, situándose en el interior de uno de los cuernos uterinos, se le conectó una jeringuilla de 1 mL (jeringuilla de transferencia) o un catéter Tom Cat (de acuerdo con el diseño experimental) que contenían a los embriones. Una vez conectado al catéter de transferencia, se procedió a la transferencia de los embriones. Finalmente, un volumen adicional de 300  $\mu$ L de TL-HEPES-PVA fue inyectado a través del catéter de transferencia para favorecer la transferencia de los embriones. Para valorar si la posición del catéter en el interior del cuerno uterino era correcta, éste no debía presentar ningún pliegue o bucle en el momento de su retirada.

#### *Transferencia de embriones vía laparoscópica*

La transferencia de los cigotos producidos *in vitro* se llevó a cabo en cerdas nulíparas que no fueron sometidas a ningún tratamiento de superovulación. Dichas

transferencias se realizaron durante su primer día del estro. Para realizar las transferencias, las cerdas receptoras tuvieron que ser anestesiadas con tiopental sódico (Lab. Abbot, Madrid, España; 7 mg/kg de peso vivo, i.v) y mantenidas en una posición Trendelenburg con un ángulo aproximado de 20°. Posteriormente, se realizó una incisión de 1,5 cm cerca del ombligo para poder introducir un trocar de 11-mm en el interior de la cavidad peritoneal. A continuación, se procedió a insuflar con CO<sub>2</sub> dicha cavidad introduciendo un laparoscopio rígido a través del trocar. Por otro lado, se colocaron dos puertos accesorios tanto en el lado derecho como en el izquierdo del abdomen. A través de estos puertos se introdujeron las pinzas atraumáticas y la aguja de transferencia de embriones. Una vez localizado uno de los oviductos, 30 embriones fueron transferidos con la ayuda de una aguja Chiba (22 G/0.7x200 mm) conectada a una jeringuilla de 1 mL con 100 µL de medio de transferencia. La duración media de la transferencia de embriones fue de 5-7 minutos.

### **Diagnóstico de gestación**

El diagnóstico de gestación se realizó mediante ecografía transabdominal. Las cerdas gestantes fueron llevadas a término con el fin de evaluar la tasa de partos y el tamaño de las camadas. La tasa de desarrollo fue calculada como el número total de lechones nacidos en relación con el número de embriones transferidos en las cerdas paridas. La tasa de supervivencia embrionaria se estableció como el número de lechones nacidos vivos en relación con el número de embriones transferidos en las cerdas paridas. La eficiencia se definió como la proporción de lechones nacidos vivos con respecto al número de embriones transferidos en todas las receptoras.

### **Análisis estadístico**

El análisis estadístico se realizó empleando el programa SPSS, versión 19 (IBM corporación, Nueva York, USA). Las diferencias se consideraron significativas para  $P < 0,05$ . Los valores de supervivencia y eclosión fueron transformados en base al modelo binomial de parámetros descrito por Fisz (1980). Los resultados obtenidos fueron expresados como medias  $\pm$  error estándar de la media (SEM; Artículos 2, 3 y 5) o bien como medias de mínimos cuadrados  $\pm$  SEM (Artículos 1 y 4). Los datos correspondientes a los diferentes repicados fueron analizados mediante ANOVA

(Artículos 1, 2, 3, 4 y 5). También se ha utilizado el test de Chi cuadrado con la corrección de Yates (Artículo 2). Cuando el ANOVA reveló la existencia de un efecto significativo, los valores fueron comparados mediante el Test Bonferroni.

## DISEÑO EXPERIMENTAL Y RESULTADOS

**Objetivo 1: Transferencia intrauterina profunda vía no-quirúrgica con mórulas y blastocistos vitrificados (Artículo 1).**

**Experimento 1. Efectos de dos métodos de calentamiento en una sola etapa (en una placa o en una jeringuilla de un 1mL) sobre la supervivencia *in vitro* de los embriones vitrificados mediante el método SOPS.**

### *Diseño Experimental*

Un total de 62 mórulas y 35 blastocistos fueron obtenidos a partir de 7 cerdas donantes en tres replicados. Los embriones procedentes de cada donante se vitrificaron y distribuyeron de forma aleatoria en dos grupos experimentales: 1) Grupo Placa, en el cual los embriones vitrificados fueron calentados mediante el método en una sola etapa utilizando una placa; y 2) Grupo Jeringuilla, en el que los embriones vitrificados fueron calentados mediante el método en una sola etapa utilizando una jeringuilla Cook de 1 mL testada embriológicamente. Después del calentamiento, se procedió a evaluar el desarrollo de los embriones durante el cultivo *in vitro*, como se ha descrito anteriormente. Además, también se midió el tiempo que se tarda desde que extraemos una pajuela del N<sub>2</sub>L hasta que sumergimos el extremo de la pajuela en la que se encuentran envasados los embriones en el medio de calentamiento en los dos sistemas de calentamiento, placa o jeringuilla.

### *Resultados*

El análisis de varianza mostró que los embriones vitrificados y calentados en una jeringuilla mediante el método en una sola etapa tuvieron unas tasas de supervivencia ( $60.5 \pm 10.4\%$ ) y de eclosión ( $39.6 \pm 9.5\%$ ) más bajas ( $P < 0.05$ ) que aquellos

embriones calentados en una placa ( $85'4 \pm 10'6\%$  y  $69'0 \pm 8'4\%$ , respectivamente). El calentamiento en una sola etapa utilizando una jeringuilla requirió más tiempo ( $P < 0'001$ ) que el calentamiento en placa ( $1'6 \pm 0'1s$  contra  $0'6 \pm 0'1s$ ). Estos resultados indican que el calentamiento en una sola etapa utilizando una jeringuilla disminuye significativamente el desarrollo *in vitro* de los embriones.

## **Experimento 2. Influencia del volumen de vitrificación y/o el tiempo de calentamiento sobre la supervivencia *in vitro* de los embriones vitrificados.**

### *Diseño Experimental*

Se diseñó un experimento factorial 2 X 2, incluyendo dos volúmenes de vitrificación (1 y 2  $\mu\text{L}$ ) y dos tiempos de calentamiento ( $<1$  y 1'5-2s). Las pajuelas que corresponden al primer tiempo de calentamiento fueron aquellas que se sacaron del  $\text{N}_2\text{L}$  e inmediatamente se introdujeron en el medio de calentamiento, tardando siempre  $<1$  seg. Las pajuelas que corresponden al segundo tiempo de calentamiento fueron aquellas que después de sacarlas del  $\text{N}_2\text{L}$ , se mantuvieron en el aire durante 1 s a temperatura ambiente, para posteriormente introducirlas en el medio de calentamiento. En este caso, el tiempo requerido fue entre 1'5 y 2 seg. Un total de 144 mórulas y de 84 blastocistos fueron obtenidos a partir de 14 cerdas donantes en tres replicados. Los embriones procedentes de cada donante se vitrificaron y fueron igual y aleatoriamente distribuidos entre cada uno de los cuatro grupos experimentales. En todos los grupos, los embriones se calentaron en una placa mediante el calentamiento en una sola etapa. Después del calentamiento, se evaluó el desarrollo de los embriones durante el cultivo.

### *Resultados*

El tiempo de calentamiento y la interacción entre el volumen de vitrificación y el tiempo de calentamiento afectó significativamente a la tasa de supervivencia embrionaria ( $P < 0'002$  y  $P < 0'006$ , respectivamente). Por el contrario, el volumen de vitrificación no afectó este parámetro. Cuando se utilizaron los volúmenes de vitrificación más altos (2  $\mu\text{L}$ ), el tiempo requerido desde la extracción de la pajuela del  $\text{N}_2\text{L}$  hasta la inmersión de la punta de dicha pajuela en el medio de calentamiento no



afectó el desarrollo *in vitro* de los embriones. Sin embargo, ese tiempo si fue determinante en los grupos de embriones vitrificados con volúmenes bajos (1µL). En estos grupos, un tiempo de calentamiento de <1 s fue compatible con una alta supervivencia ( $90'9 \pm 6'0\%$ ), pero un tiempo de calentamiento entre 1'5 y 2 s disminuyó dramáticamente ( $P < 0'003$ ) la capacidad de desarrollo *in vitro* de los embriones ( $58'9 \pm 6'1\%$ ). No se observaron diferencias entre ningún los grupos con respecto a las tasas de eclosión embrionaria (rango: de  $60'6 \pm 7'9\%$  a  $76'1 \pm 6'7\%$ ).

### **Experimento 3. Efectos del paso de los embriones calentados por el método en una sola etapa en una placa, a través del catéter de transferencia de embriones vía no-quirúrgica sobre su posterior desarrollo *in vivo* o *in vitro*.**

*Experimento 3.1 (desarrollo in vitro de los embriones):*

#### *Diseño experimental*

En un total de tres replicados se utilizaron 14 cerdas donantes. Los blastocistos (n = 174) recogidos en cada donante fueron vitrificados y distribuidos aleatoriamente entre los siguientes tres grupos experimentales: 1) Grupo Placa, en el que los embriones vitrificados se calentaron en una placa; 2) Grupo Placa + Tom cat, en el que los embriones vitrificados fueron calentados en una placa y después se cargaron en el interior de un catéter Tom cat; 3) Grupo Placa + Tom cat + catéter de transferencia no-quirúrgica, en el que los embriones vitrificados fueron calentados en una placa, cargados en el interior de un catéter Tom cat y posteriormente fueron pasados por el catéter de transferencia. Algunos embriones frescos de cada donante (n = 60) no se vitrificaron y fueron cargados directamente en el catéter Tom cat y posteriormente pasados por el catéter de transferencia (Grupo frescos). Después de los tratamientos, los embriones frescos y vitrificados se cultivaron para evaluar su desarrollo *in vitro*.

#### *Resultados*

Ni el catéter de transferencia ni el catéter Tom cat tuvieron un efecto perjudicial sobre los embriones frescos o vitrificados-calentados. No se observaron diferencias

entre grupos para las tasas de supervivencia (rango: de  $90'8 \pm 4'0\%$  a  $100'0 \pm 4'5\%$ ) y de eclosión (rango: de  $76'2 \pm 9'7\%$  a  $85'3 \pm 11'0\%$ ).

*Experimento 3.2 (desarrollo in vivo de los embriones):*

*Diseño experimental*

Para este experimento se utilizó un total de 28 receptoras. Mórulas y blastocistos tempranos (n= 411) fueron obtenidos a partir de 25 cerdas donantes. Los embriones de cada donante fueron igual y aleatoriamente distribuidos entre los siguientes tres grupos experimentales: 1) Grupo Placa, en el cual los embriones vitrificados (n = 194) fueron calentados mediante el método en una sola etapa utilizando una placa, cargados en un catéter Tom cat, y finalmente transferidos a las cerdas receptoras (n = 13); Grupo Jeringuilla, en el que los embriones vitrificados (n = 88) fueron calentados mediante el método en una sola etapa utilizando una jeringuilla Cook de 1 mL, conectados al catéter de transferencia no-quirúrgica, y finalmente transferidos a las cerdas receptoras (n = 6); y 3) Grupo Frescos, en el que los embriones frescos (n = 129) fueron cargados en una jeringuilla Cook de 1 mL y transferidos a 9 receptoras. Cada transferencia se llevó a cabo con una media de 15 embriones frescos o vitrificados. Veinticuatro horas después de las transferencias de embriones, las receptoras fueron sometidas a laparotomía, como se describió anteriormente, y los embriones transferidos fueron recuperados mediante el lavado de los cueros uterinos con 60 mL de TL-HEPES-PVA. Los embriones recuperados se observaron a través de un estereomicroscopio a 60 aumentos para evaluar su viabilidad *in vivo*. Las tasas de supervivencia y eclosión *in vivo* se definieron de la misma forma que las descritas anteriormente para el cultivo *in vitro*. Además, aquellos embriones no eclosionados clasificados como viables se cultivaron durante 48 h para evaluar su desarrollo *in vitro*. El estadio de desarrollo embrionario 24 h después de la transferencia y 48 h después del cultivo *in vitro* se consideró lineal para el análisis estadístico, puntuándose de la siguiente forma: 1, mórula-blastocisto temprano (una mórula compacta y un blastocisto con un incipiente blastocele); 2, blastocisto (un blastocisto con un blastocele bien definido, masa celular interna y un trofoblasto completamente diferenciado); 3, blastocisto expandido (un blastocisto de gran diámetro con una zona pelúcida delgada); y 4, blastocisto eclosionando o eclosionado (un blastocisto con la zona pelúcida rota o inexistente).

### Resultados

Las tasas de recuperación de embriones 24 h después de la transferencia fue similar entre grupos (rango:  $70'8 \pm 4'2\%$  a  $77'2 \pm 6'1\%$ ). Las tasas de supervivencia embrionaria y de eclosión del grupo frescos ( $94'0 \pm 4'1\%$  y  $36'8 \pm 7'8\%$ , respectivamente) fue mayor ( $P < 0'05$ ) que las logradas después de la transferencia no-quirúrgica de embriones vitrificados y calentados en placa ( $80'4 \pm 3'4\%$  y  $14'2 \pm 7'2\%$ , respectivamente). Todos los embriones recuperados después de la transferencia que pertenecían al grupo Jeringuilla estaban degenerados. Las tasas de supervivencia *in vitro* tanto de los embriones viable frescos, como las de los vitrificados-calentados recuperados 24 h después de la transferencia y cultivados *in vitro* 48 h, fue similar (rango: de  $98'3 \pm 1'1\%$  a  $99'9 \pm 1'1\%$ ). Sin embargo, la tasa de eclosión en el grupo frescos ( $71'4 \pm 5'2\%$ ) fue más alta ( $P < 0'01$ ) que en la de los embriones del grupo placa ( $43'5 \pm 5'6\%$ ). No se cultivó ningún embrión del grupo Jeringuilla porque todos ellos estuvieron degenerados en el momento de la recolección. El estadio de desarrollo de los embriones del grupo fresco ( $3'4 \pm 0'1$ ) 24 h después de la transferencia fue más alto ( $P < 0'001$ ) que el de los embriones del grupo Placa ( $2'4 \pm 0'1$ ). El estadio de desarrollo final, tras 48 h de cultivo, que alcanzaron los embriones viables recuperados después de la transferencia, fue más bajo ( $P < 0'001$ ) en el grupo Placa ( $3'2 \pm 0'1$ ) que en el grupo de los frescos ( $3'7 \pm 0'1$ ).

### **Experimento 4. Rendimiento reproductivo de las receptoras después de la transferencia vía no-quirúrgica de embriones vitrificados utilizando el método de calentamiento de una etapa en una placa.**

#### *Diseño experimental*

Para determinar el rendimiento reproductivo de las transferencias no-quirúrgicas de embriones vitrificados y calentados en una placa (Experimento 3.2), se utilizaron 34 cerdas donantes y 11 receptoras. Para ello, una media de 35 blastocistos vitrificados-calentados fueron cargados en un catéter Tom cat, el cual se conectó a su vez al catéter de transferencia, para finalmente ser transferidos a las receptoras. Estas receptoras se revisaron para ver si presentaban signos del estro, comenzando 12 días después de la

transferencia. El diagnóstico de gestación se realizó en los días 21-25 después de realizar las transferencias. Las cerdas gestantes pudieron llegar hasta el parto, pudiendo evaluar la tasa de partos, el tamaño de las camadas y el peso de los lechones al nacimiento. La tasa de supervivencia embrionaria se estableció como el número de lechones nacidos vivos en relación con el número de embriones transferidos en las cerdas paridas. La eficiencia se definió como la proporción de lechones nacidos vivos con respecto al número de embriones transferidos en todas las cerdas receptoras.

### *Resultados*

Ninguna de las cerdas receptoras presentó descargas después de realizar las transferencias. Una de las receptoras se excluyó del análisis debido a que al retirar el catéter de transferencia apareció un bucle, indicando que la inserción de dicho catéter no fue correcta. Cuatro de las receptoras presentaron un retorno al estro de forma regular (19-21 días), permaneciendo gestantes el resto de las receptoras. Una de las receptoras diagnosticada como gestante salió en celo en el día 30. Las cinco cerdas restantes llegaron a parir (tasa de parto del 50%), con una media de  $10.4 \pm 0.2$  lechones nacidos (rango de 8 a 13 lechones), de los cuales el  $0.4 \pm 0.2$  nacieron muertos. El peso medio de los lechones al nacimiento fue de  $1.6 \pm 0.2$  kg, sin presentar ninguna malformación. La eficiencia y la supervivencia embrionaria fue del 14.9% y del 28.6%, respectivamente.

## **Objetivo 2: Polarización lipídica por centrifugación y criotolerancia de los cigotos porcinos.**

### **Experimento 1. Habilidad del desarrollo *in vitro* e *in vivo* de los cigotos 2PN producidos *in vitro*, centrifugados y seleccionados (Artículo 2).**

#### *Diseño experimental*

En primer lugar, este experimento se diseñó para evaluar el desarrollo embrionario *in vitro* de los cigotos 2PN hasta llegar al estadio de blastocisto. Después de ser sometidos a una centrifugación y selección, 57 cigotos 2PN fueron cultivados por separado. Esto mismo se realizó en tres replicados. Los cigotos que no se centrifugaron,

ni seleccionaron se utilizaron como grupo control. En cada uno de los replicados, algunos de los presuntos cigotos pertenecientes al grupo control fueron fijados y teñidos para poder evaluar los parámetros de fecundación.

Los presuntos cigotos se pusieron en el interior de tubos eppendorf de 1'5 mL con 500  $\mu$ L de medio de cultivo con 20 mM. Posteriormente, se centrifugaron durante 20 min a 15000 X g y una temperatura de 37°C. De esta forma se pudo realizar la polarización de las gotas lipídicas intracitoplasmáticas y, así poder visualizar los pronúcleos. Grupos de 20 cigotos en gotas del mismo medio fueron examinados bajo un microscopio invertido (Nikon Eclipse TE2000-S, Japón) a 200X aumentos sobre una placa térmica a 37°C. Cada cigoto fue clasificado individualmente como 2PN, según el número de pronúcleos que presentaban. Para visualizar los pronucleos, los cigotos se tiñeron en primer lugar con lacmoid, y posteriormente fueron analizados bajo un microscopio de contraste de fase.

La segunda parte de este experimento fue evaluar la capacidad de desarrollo *in vivo* de los cigotos 2 PN seleccionados. Para ello, un total de 20 cerdas nulíparas se utilizaron como receptoras (10 receptoras por grupo) durante 5 replicados. Las transferencias se llevaron a cabo vía laparoscópica, transfiriendo en el oviducto de cada receptora 30 cigotos (2PN o controles). En cada replicado, algunos presuntos cigotos pertenecientes al grupo control fueron fijados y teñidos para evaluar los parámetros de fecundación. El tiempo invertido entre la selección de los cigotos y las transferencias fue de 1 h.

### *Resultados*

Los parámetros de fecundación del grupo control (n = 72) fueron de un 81'9  $\pm$  4'6%, un 49'1  $\pm$  6'6% y un 40'3  $\pm$  5'8% para la penetración, monospermia y eficiencia, respectivamente.

El grupo control (65'6  $\pm$  4'3%) mostró una tasa de división más baja (P < 0'003) que el grupo 2PN (93'0  $\pm$  3'4%). La tasa de formación de blastocistos fue mayor (P < 0'003) en los cigotos 2PN que en los cigotos control (80'7  $\pm$  5'3% vs 24'0  $\pm$  3'8%, respectivamente). De igual manera, el número total de células fue más alto (P < 0'05)

para los blastocistos procedentes de los cigotos 2PN ( $39'6 \pm 2'1$ ) comparado con aquellos obtenidos desde los cigotos control ( $32'2 \pm 2'3$ ).

Por otro lado, el 70% y el 60% de las receptoras permanecieron gestantes después de realizar las transferencias de los cigotos del grupo 2 PN y control, respectivamente. Las receptoras que no quedaron gestantes tuvieron un retorno al estro durante los días 21-24 post-estro. Dos de las receptoras diagnosticadas como gestantes, pertenecientes al grupo control, perdieron la gestación en el día 31 y 54, respectivamente. No hubo diferencias entre grupos con respecto al número medio de lechones nacidos por receptora. Sin embargo, la eficiencia fue más alta ( $P < 0'01$ ) para el grupo de los cigotos 2PN (9'3%). Todos los lechones nacidos presentaron un desarrollo normal sin ningún tipo de problemas de salud.

### **Experimento 2. Efectos de la polarización lipídica mediante centrifugación, antes de la vitrificación, sobre la criosupervivencia *in vitro* de los cigotos obtenidos *in vivo* (Artículo 3).**

#### *Diseño experimental*

Los cigotos obtenidos en cada donante fueron igual y aleatoriamente asignados en cada uno de los siguientes grupos experimentales: (1) Grupo vitrificados control (VTC), donde los cigotos ( $n = 94$ ) fueron vitrificados, calentados y cultivados *in vitro*; (2) Grupo centrifugación (CT), donde los cigotos ( $n = 90$ ) fueron centrifugados (20 min, 15000 g, 39°C), vitrificados, calentados y cultivados *in vitro*; o (3) Grupo centrifugación-hiperosmótico (H-CT), donde los cigotos ( $n = 90$ ) se equilibraron en un medio de alta osmolalidad durante 6 min, y posteriormente fueron centrifugados (20 min, 15000 g, 39°C), vitrificados, calentados y cultivados *in vitro*. Algunos cigotos ( $n = 43$ ) se cultivaron sin ser vitrificados para evaluar su desarrollo *in vitro* (grupo control fresco). A todos los embriones se les evaluó la morfología, la integridad de la zona pelúcida, el desarrollo embrionario hasta llegar al estadio de blastocisto y el número total de células, como se ha descrito anteriormente.

#### *Resultados*

Los cigotos se obtuvieron a partir de 13 cerdas superovuladas. El ANOVA no mostró ninguna influencia del pretratamiento de vitrificación sobre ninguno de los parámetros evaluados. La tasa de formación de blastocistos para los cigotos frescos ( $87.5 \pm 5.3\%$ ) fue mayor ( $F$ -valor = 14.8;  $P$ , 0.001) que aquella alcanzada por los grupos vitrificados (rango: de  $35.4 \pm 5.3\%$  a  $48.2 \pm 5.6\%$ ). No se observaron diferencias con respecto al número total de células de los blastocistos procedentes de los cigotos frescos o vitrificados que se cultivaron *in vitro* (rango:  $34.9 \pm 2.8$  a  $44.1 \pm 2.8$ ). El porcentaje de blastocistos eclosionados al final del periodo de cultivo *in vitro* fue baja en todos los grupos experimentales (rango: de  $1.2 \pm 1.2\%$  a  $5.0 \pm 3.5\%$ ), sin mostrar ninguna diferencia entre grupos. El porcentaje de cigotos con la zona pelúcida dañada después del calentamiento fue similar entre los grupos vitrificados, pero los cigotos frescos no mostraron ninguna fractura en la zona pelúcida. La tasa de formación de blastocistos en los grupos vitrificados está más ampliamente distribuida por los percentiles 25 y 75 ( $18.7$  y  $62.5\%$ ,  $5.0$  y  $52.6\%$  y  $14.3$  y  $66.7\%$  para los grupos VTC, CT y H-CT, respectivamente) comparado con aquellas obtenidas en el grupo control fresco ( $66.7$  y  $100\%$ ). El ANOVA mostró que la donante de embriones tuvo un efecto significativo ( $F$ -valor = 4.1;  $P$ , 0.05) sobre el número de cigotos vitrificados que presentaron la zona pelúcida dañada después del calentamiento, y sobre las tasas de formación de blastocistos. Sin embargo, no tuvo ningún efecto sobre el número total de células por blastocisto o sobre las tasas de eclosión (rango: de  $0.0 \pm 0.0\%$  a  $9.1 \pm 9.1\%$ ).

### **Objetivo 3: Delipidación química con forskolín y criotolerancia de los embriones porcinos.**

#### **Experimento 1. Efectos de la adición de forskolín al medio de cultivo sobre la criotolerancia de los blastocistos producidos *in vitro* (Artículo 4).**

##### *Diseño experimental*

Una experiencia preliminar se llevó a cabo para investigar si la adición de forskolín incrementa la actividad lipolítica de los blastocistos producidos *in vitro* bajo nuestras condiciones experimentales. Para llevar a cabo esta experiencia, se utilizaron un total de 1200 embriones producidos *in vitro* en D5. Este mismo diseño se repitió

durante cuatro replicados. La concentración de glicerol en el medio de cultivo se determinó a las 0, 6 y 24 h posteriores a la adición de 0 ó 10  $\mu\text{M}$  de forskolín. Posteriormente, se examinaron los efectos de la adición de forskolín en el medio de cultivo *in vitro*, sobre la criosupervivencia embrionaria después de la vitrificación y el calentamiento utilizando el método SOPS. Para ello, se utilizaron un total de 4000 COCs en 5 replicados. Después de 44 h de maduración, se procedió a la fecundación de los ovocitos, y cultivo de los presuntos cigotos. Alguno de estos presuntos cigotos ( $n = 716$ ) fue fijado 18 h después de la fecundación para evaluar los parámetros de fertilidad. En el día 5 del cultivo *in vitro*, los embriones fueron igual y aleatoriamente distribuidos en dos grupos de cultivo *in vitro*: embriones cultivados durante 24 h con 0 ó 10  $\mu\text{M}$  de forskolín. La tasa de formación de blastocistos se evaluó al día 6 del cultivo *in vitro*, y los blastocistos fueron vitrificados ( $n = 459$ ) como se ha descrito anteriormente. Un conjunto de blastocistos, elegidos al azar, no fue vitrificado (blastocistos frescos;  $n = 546$ ). Tanto los blastocistos frescos como los vitrificados se cultivaron en NCSU-G durante un tiempo adicional de 24 h, evaluando así la tasa de supervivencia embrionaria. Los blastocistos viables fueron fijados para calcular el número total de células en los blastocistos de Día 7.

Los niveles de glicerol en el medio de cultivo *in vitro* se determinaron mediante un kit enzimático (EnzyChrom Glycerol Assay Kit; BioAssay Systems, CA, USA) y un sistema fluorométrico capaz de detectar rangos de 2 a 50  $\mu\text{M}$  de glicerol. La intensidad de fluorescencia que emite el producto de la reacción es directamente proporcional a la concentración de glicerol en la muestra. Para poder medir la cantidad de glicerol que liberan los embriones en el medio de cultivo, se procedió a lavar dos veces a los embriones de Día 5 en NCSU-G. Una vez eliminado los restos de aceite mineral, grupos de 150 embriones se cultivaron en tubos eppendorf abiertos que contenían 40  $\mu\text{L}$  de NCSU-G con o sin 10  $\mu\text{M}$  de forskolín. Este cultivo se llevó a cabo a 39°C y 5%  $\text{CO}_2$ . A las 0, 6 y 24 h de la adición del forskolín, se procedió a coger una muestra de 10  $\mu\text{L}$  de medio de cada grupo experimental. Una vez obtenidas las muestras, se congelaron a -20°C hasta el día de su medición. Para llevar a cabo la medición de la cantidad de glicerol, se tuvieron que mezclar los 10  $\mu\text{L}$  de medio de cultivo de las muestras con 100  $\mu\text{L}$  del reactivo del kit. Esta mezcla se llevó a cabo en una placa negra de 96 pocillos a temperatura ambiente durante 20 min. El siguiente paso fue medir la fluorescencia en un lector de placas a una  $\lambda_{\text{ex}}=530$  nm y  $\lambda_{\text{em}}=585$  nm. La concentración molar de glicerol



se calculó utilizando una curva estándar, creada a partir de diluciones seriadas de una muestra de 100 mM de glicerol estándar.

### *Resultados*

La curva estándar del glicerol representa una relación lineal ( $y = 58'7x$ ) de concentraciones de glicerol que van de 1 a 30  $\mu\text{M}$  y un coeficiente de correlación muy alto ( $R^2 = 0'996$ ) entre la concentración de glicerol y las unidades relativas de fluorescencia (RFUs). La concentración de glicerol aumentó ( $P < 0'001$ ) con el tiempo de cultivo, tanto en el control como en los embriones cultivados con forskolín. La adición de 10  $\mu\text{M}$  de forskolín al medio de cultivo incrementó ( $P < 0'001$ ) la concentración de glicerol comparándolo con el grupo control después de 24 h de cultivo *in vitro* ( $11'1 \pm 0'6 \mu\text{M}$  vs  $7'6 \pm 0'3 \mu\text{M}$ , respectivamente). También hubo un efecto del tiempo ( $P < 0'01$ ) sobre la interacción del forskolín y la concentración del glicerol.

La adición de forskolín al medio de cultivo aumentó ( $P < 0'03$ ) la supervivencia a la vitrificación de los blastocistos de Día 6 ( $44'7 \pm 2'3\%$ ) comparado con los embriones cultivados sin forskolín ( $34'1 \pm 2'4\%$ ). La vitrificación comprometió ( $P < 0'01$ ) la viabilidad de los embriones, comparado con el grupo fresco. Los blastocistos, tanto del grupo vitrificado como del grupo fresco tuvieron un número total de células similar (rango: de  $37'3 \pm 1'4$  a  $41'6 \pm 2'1$ ).

**Experimento 2. Efectos de un periodo de cultivo de 24 h con forskolín y/o el método de vitrificación sobre la criotolerancia de los embriones porcinos obtenidos *in vivo* en diferentes estadios de desarrollo (2 células, 4 células y blastocisto) (Artículo 5).**

### *Diseño experimental*

Este experimento se realizó para determinar la influencia del método de vitrificación y/o el pretratamiento con forskolín sobre la supervivencia *in vitro* de los embriones vitrificados. Para ello, se diseñó un experimento 2 X 2 factorial con 2 niveles de vitrificación (SOPS y SSV) y dos niveles de forskolín (0 y 10  $\mu\text{M}$ ). Cada uno de los diferentes estadios de desarrollo embrionarios evaluados (2 células, 4 células y

blastocisto) estuvo sujeto al mismo diseño experimental. Para cada estadio de desarrollo se realizaron 3 replicados. Los embriones procedentes de diferentes donantes fueron aleatoriamente distribuidos en cada uno de los cuatro grupos experimentales. Inmediatamente después de la recolección, todos los embriones fueron cultivados durante 24 h en 500  $\mu$ L de medio de cultivo, con 0 ó 10  $\mu$ M. Posteriormente, grupos de embriones elegidos al azar fueron vitrificados por el método SOPS o por el método SSV, almacenados en N<sub>2</sub>L, calentados y cultivados *in vitro* para evaluar su desarrollo. El resto de los embriones no se vitrificó (control fresco). Los embriones frescos como vitrificados-calentados en el estadio de 2 células, 4 células y blastocistos fueron cultivados adicionalmente durante 96 h, 72 h y 24 h, respectivamente. Al final del periodo de cultivo, todos los embriones se evaluaron para determinar el desarrollo embrionario hasta el estadio de blastocisto, así como el número total de células en cada blastocisto.

### Resultados

Los embriones se obtuvieron a partir de un total de 37 donantes, de las cuales 14, 10 y 13 se usaron para obtener cigotos, 2-4 células y mórulas, respectivamente. La media de cuerpos lúteos en cada donante fue de  $29.4 \pm 1.2$ . La tasa de recuperación de embriones en relación al número de cuerpos lúteos fue del 88.9%. El número total de embriones recogidos fue de 967, de los cuales 10 (1.0%) fueron ovocitos y embriones degenerados, 356 (36.8%) fueron cigotos, 270 (27.9%) fueron embriones en 2-4 células, 289 (30%) fueron mórulas, y 42 (4.3%) fueron blastocistos. Después de 24 h de cultivo, el 98.9, 97.8 y 100% de los cigotos, 2-4 células y mórulas, respectivamente, progresaron al estadio de 2 células, 4 células y blastocisto, respectivamente. El pretratamiento con forskolín tuvo un efecto significativo ( $P < 0.01$ ) sobre la tasa de formación de blastocistos y el estadio final de desarrollo para los embriones vitrificados en estadio de 2 células y 4 células, respectivamente. El método de vitrificación y la interacción entre el método de vitrificación y el forskolín no afectó ningún parámetro evaluado para los embriones en el estadio de 2 células y 4 células. Por lo tanto, los resultados obtenidos de ambos métodos de vitrificación se mezclaron para análisis siguientes. La tasa de formación de blastocistos de los embriones frescos en el estadio de 2 células y 4 células (rango: de  $91.8 \pm 3.9\%$  a  $92.0 \pm 3.9\%$  y de  $88.4 \pm 6.4\%$  a  $92.0 \pm 5.5\%$ , respectivamente) fue más alta ( $P < 0.003$ ) que aquella alcanzada por los grupos

sometidos a la vitrificación (rango: de  $56.7 \pm 4.4\%$  a  $71.5 \pm 3.9\%$  y de  $26.2 \pm 4.3\%$  a  $43.6 \pm 4.7\%$ , respectivamente), independientemente del pretratamiento con forskolín. Aunque la delipidación química con forskolín mostró un efecto positivo sobre la supervivencia *in vitro* de los embriones vitrificados-calentados, no se observaron diferencias significativas para este parámetro en los grupos frescos. El estadio final de desarrollo de los embriones vitrificados-calentados en 2 células ( $1.5 \pm 0.06$ ) y en 4 células ( $1.4 \pm 0.13$ ), procedentes de los cigotos y los embriones en 2-4 células, respectivamente, y cultivados sin forskolín fue más bajos ( $P < 0.05$ ) que el de sus homólogos vitrificados-calentados pretratados con forskolín ( $1.7 \pm 0.05$  y vs  $1.8 \pm 0.07$ , respectivamente), así como el de los grupos frescos ( $1.83 \pm 0.08$  y vs  $1.95 \pm 0.13$ , respectively). No hubo diferencias con respecto al número total de células en los blastocistos (rango: de  $24.9 \pm 3.2$  a  $39.4 \pm 3.1$ ) y en los blastocistos tempranos (rango: de  $18.8 \pm 0.7$  a  $23.5 \pm 2.7$ ) procedentes de los 2 y 4 células pretratados con 0 ó 10  $\mu\text{M}$ , comparado con sus homólogos frescos (rango: de  $33.4 \pm 3.7$  a  $43.5 \pm 3.5$  y de  $20.4 \pm 2.4$  a  $26.0 \pm 2.0$  para blastocistos y blastocistos tempranos, respectivamente). En todos los grupos experimentales (frescos y vitrificados) de embriones en 2 y 4 células hubo un porcentaje muy bajo de blastocistos eclosionados al final del cultivo *in vitro* (rango: de  $4.2 \pm 2.0$  a  $6.5 \pm 3.7\%$  y de  $7.1 \pm 4.0$  a  $15.0 \pm 8.2\%$ , respectivamente), sin diferencias entre dichos grupos. El método de vitrificación, el pretratamiento con forskolín y su interacción no afectó ninguno de los parámetros evaluados para el grupo de blastocistos vitrificados, procedentes de las mórulas cultivadas *in vitro* durante 24 h. Para el grupo fresco tratado con 0 ó 10  $\mu\text{M}$  de forskolín, la tasa de formación de blastocistos ( $96.4 \pm 3.5\%$  y  $96.6 \pm 3.3\%$ , respectivamente), el estadio final de desarrollo ( $2.4 \pm 0.1$  y  $2.6 \pm 0.1$ , respectivamente), la tasa de eclosión ( $55.5 \pm 9.7\%$  y  $58.6 \pm 9.3\%$ , respectivamente), y el número total de células ( $74.1 \pm 3.3$  y  $73.4 \pm 3.0$ , respectivamente) fue similar a aquellas logradas en sus grupos homólogos vitrificados.

## CONCLUSIONES

1. El calentamiento en una sola etapa en una jeringuilla de 1mL tiene un efecto perjudicial sobre viabilidad post-calentamiento *in vitro* e *in vivo* de las mórulas y blastocistos porcinos vitrificados con el método SOPS. Por el contrario, el calentamiento en una sola etapa en placa no interfiere con el desarrollo *in vitro*

- e *in vivo* de los embriones, proporcionando aceptables tasas de parto y tamaños de camada cuando es combinada con la transferencia de embriones vía no-quirúrgica.
2. La centrifugación no ejerce ningún efecto perjudicial sobre el desarrollo *in vitro* e *in vivo* de los cigotos porcino producidos *in vitro*.
  3. Más del 40% de los cigotos obtenidos *in vivo* pueden ser criopreservados con éxito mediante la SOPS-vitrificación. La polarización de lípidos mediante centrifugación, antes de la vitrificación, no mejora la habilidad de desarrollo *in vitro* de los cigotos porcinos obtenidos *in vivo* después de la vitrificación y el calentamiento.
  4. La delipidación química con forskolín durante 24 h, antes de la vitrificación, mejora la criotolerancia de los blastocistos producidos *in vitro* y de los embriones porcinos obtenidos *in vivo* en el estadio de 2 y 4 células. Por el contrario, el forskolín no afecta la criosupervivencia de los blastocistos obtenidos *in vivo*.
  5. La vitrificación es un procedimiento prometedor para la criopreservación de los embriones porcinos obtenidos *in vivo* en los estadios de desarrollo muy tempranos (cigotos, 2 células y 4 células).

# ABBREVIATIONS



## ABBREVIATIONS

**BSA:** bovine serum albumin

**COCs:** cumulus-oocyte complexes

**DPBS:** Dulbecco's phosphate-buffered saline

**eCG:** equine chorionic gonadotrophin

**H-33342:** Hoechst 33342

**hCG:** human chorionic gonadotrophin

**IVC:** *In vitro* culture

**IVF:** *In vitro* fertilization

**LN<sub>2</sub>:** Liquid nitrogen

**mDPBS:** Modified Dulbecco's phosphate-buffered saline medium

**Me<sub>2</sub>SO:** Dimethyl sulfoxide

**NCSU-23:** BSA-free North Carolina State University

**NCSU-G:** NCSU-23 medium containing 5.5 mM glucose

**NET:** Non-surgical embryo transfer

**PBS:** phosphate-buffered saline

**2PN:** Bipronuclear

**SOPS:** Superfine open pulled straw

**SSV:** Solid surface vitrification

**TCM-PVA:** TCM199-HEPES supplemented with 0.1% PVA

**TCM-S:** TCM-PVA supplemented with 0.13 M sucrose

**TL-HEPES-PVA:** Tyrode's lactate-HEPES-poliviny alcohol

**ZP:** Zona pellucida





# REFERENCES



## REFERENCES

Abeydeera L.R., Day B.N. (1997). Fertilization and subsequent development *in vitro* of pig oocytes inseminated in a modified tris-buffered medium with frozen-thawed ejaculated spermatozoa. *Biol. Reprod.* **57**, 729-734.

Beebe L.F.S., Cameron R.D.A., Blackshaw A.W., Verrall R.G. (2002). Vitrification of zona pellucida intact embryos and birth of piglets using the Vit-Master. In: Proceedings of the 17<sup>th</sup> International Pig Veterinary Society Congress, Ames, Iowa, USA, p. 64.

Beebe L.F.S., Cameron R.D.A., Blackshaw A.W., Kates H.L. (2005). Changes to porcine blastocyst vitrification methods and improved litter size after transfer. *Theriogenology* **64**, 879–90.

Beebe L.F.S., Bouwman E.G., McIlfatrick S.M., Nottle M.B. (2011). Piglets produced from *in vivo* blastocysts vitrified using the Cryologic Vitrification Method (solid surface vitrification) and a sealed storage container. *Theriogenology* **75**, 1453-1488.

Berthelot F., Martinat-Botté F., Locatelli A., Perreau C., Terqui M. (2000). Piglets born after vitrification of embryos using the open pulled straw method. *Cryobiology* **41**, 116-124.

Betthausen J., Forsberg E., Augenstein M., Childs L., Eilertsen K., Enos J., Forsythe T., Golueke P., Jrgella G., Koppang R., Lesmeister T., Mallon K., Mell G., Misica P., Pace M., Pfister M., Strelchenko N., Voelker G., Watt S., Thompson S., Bishop M. (2000). Production of cloned pigs from *in vitro* systems. *Nature Bio.* **18**, 1055–1059.

Bormann C.L., Onger E.M., Krisher R.L. (2003). The effect of vitamins during maturation of caprine oocytes on subsequent developmental potential *in vitro*. *Theriogenology* **59**, 1373-80.

Cameron R. D. A., Beebe L. F. S., Blackshaw A. W., Keates H. L. (2004). Farrowing rates and litter size following transfer of vitrified porcine embryos into a commercial herd. *Theriogenology* **61**, 1533-1543.

Cuello C., Gil M.A., Parrilla I., Tornel J., Vázquez J.M., Roca J., Berthelot F., Martinat-Botté F., Martínez E.A. (2004). *In vitro* development following one-step dilution of OPS-vitrified porcine blastocysts. *Theriogenology* **62**, 1144-1152.

Cuello C., Berthelot F., Martinat-Botté F., Venturi E., Guillouet P., Vázquez J.M., Roca J., Martínez E.A. (2005). Piglets born after non-surgical deep intrauterine transfer of vitrified blastocysts in gilts. *Anim. Reprod. Sci.* **85**, 275-286.

Cuello C., Gil M.A., Almiñana C., Sánchez-Osorio J., Parrilla I., Caballero I., Vázquez J.M., Roca J., Rodríguez-Martínez H., Martínez E.A. (2007). Vitrification of *in vitro* cultured porcine two-to-four cell embryos. *Theriogenology* **68**, 258-264.

Cuello C., Sánchez-Osorio J., Almiñana C., Gil M.A., Perals M.L., Lucas J., Roca J., Vázquez J.M., Martínez E.A. (2008). Effect of the cryoprotectant concentration on the *in vitro* embryo development and cell proliferation of OPS-vitrified porcine blastocysts. *Cryobiology* **56**, 189-194.

Cuello C., Sánchez-Osorio J., Almiñana C., Gil M.A., Parrilla I., Roca J., Vázquez J.M., Martínez E.A. (2010). Superfine open pulled Straw vitrification of porcine blastocysts does not require pretreatment with cytochalasin B and/or centrifugation. *Reprod. Fertil. Dev.* **22**, 808-817.

Dinnyes A., Dai Y., Jiang S., Yang X. (2000). High developmental rates of vitrified bovine oocytes following parthenogenetic activation, *in vitro* fertilization, and somatic cell nuclear transfer. *Biol. Reprod.* **63**, 513-518.

Dobrinsky J.R., Pursel V.G., Long C.R., Johnson L.A. (2000). Birth of piglets after transfer of embryos cryopreserved by cytoskeletal stabilization and vitrification. *Biol. Reprod.* **62**, 564-570.

Dobrinsky J.R. (2002). Advancements in cryopreservation of domestic animal embryos. *Theriogenology* **57**, 285-302.

Egli D., Rosains J., Birkhoff G., Eggan K. (2007). Developmental reprogramming after chromosome transfer into mitotic mouse zygotes. *Nature* **447**, 679-685.

Esaki R., Ueda H., Kurome M., Hirakawa K., Tomii R., Yoshioka H., Ushijima H., Kuwayama M., Nagashima H. (2004). Cryopreservation of Porcine Embryos Derived from *In Vitro*-Matured Oocytes. *Biol. Reprod.* **71**, 432-437.

Fisz M. (1980). Some probability distributions. In: De Krieger R, editor. Probability Theory and Mathematical Statistics. New York: John Wiley & Sons, p. 129-74.

Fu X.W., Wu G.Q., Li J.J., Hou Y.P., Zhou G.B., Suo L., Wang Y.P., Zhu S.E. (2011). Positive effects of Forskololn (stimulator of lipolysis) treatment on cryosurvival of *in vitro* matured porcine oocytes. *Theriogenology*. **75**, 268-275.

Fujino Y., Kojima T., Nakamura Y., Kobayashi H., Kikuchi K., Funahashi H. (2008). Metal mesh vitrification (MMV) method for cryopreservation of porcine embryos. *Theriogenology* **70**, 809-817.

Funahashi H., Ekwall H., Rodríguez-Martínez H. (2000). Zona reaction in porcine oocytes fertilized *in vivo* and *in vitro* as seen with scanning electron microscopy. *Biol. Reprod.* **63**, 1437-1442.

Gil M.A., Abeydeera L.R, Day B.N., Vazquez J.M., Roca J., Martínez E.A. (2003). Effect of the volumen of medium and number of oocytes during *in vitro* fertilization on embryo development in pigs. *Theriogenology* **60**, 767-776.

Gil M.A., Sánchez-Osorio J., López J.J., Almiñana C., Cuello C., Parrilla I., Roca J., Vázquez J.M., Martínez E.A. (2008). Use of Centrifugation of Presumptive Zygotes to select Porcine Monospermic Blastocysts. *Reprod. Dom. Anim.* **43**, 79. (12th Annual Conference of the European Society of Domestic Animal Reproduction: Utrecht, Netherlands).

Gupta M.K., Uhm S.J., Lee H.T. (2007). Cryopreservation of immature and *in vitro* matured porcine oocytes by solid surface vitrification. *Theriogenology* **67**, 238–248.

Han Y.M., Abeydeera L.R., Kim J.H., Moon H.B., Cabot R.A, Day B.N, Prather R.S. (1999a). Growth retardation of inner cell mass cells in polyspermic porcine embryos produced *in vitro*. *Biol. Reprod.* **60**, 1110-1113.

Han Y.M., Wang W.H., Abeydeera L.R., Petersen A.L., Kim J.H., Murphy C., Day B.N., Prather R.S. (1999b). Pronuclear location before the first cell division determines ploidy of polyspermic pig embryos. *Biol. Reprod.* **61**, 1340-1346.

Holm P., Vajta G., Macháty Z., Schmidt M., Prather R.S., Greve T., Callesen H. (1999). Open Pulled Straw (OPS) vitrification of porcine blastocysts: simple procedure yielding excellent *in vitro* survival, but so far no piglets following transfer. *Cryo-letters* **20**, 307-10.

Isachenko V., Folch J., Isachenko E., Nawroth F., Krivokharchenko A., Vajta G., Dattena M., Alabart J.L. (2003). Double vitrification of rat embryos at different developmental stages using an identical protocol, *Theriogenology* **60**, 445-452.

Kobayashi S., Takei M., Kano M., Tomita M., Leibo S.P. (1998). Piglets produced by transfer of vitrified porcine embryos after stepwise dilution of cryoprotectants. *Cryobiology* **36**, 20-31.

Lee E., Estrada J., Piedrahita J. A. (2008). A comparative study on the efficiency of two enucleation methods in pig somatic cell nuclear transfer: effects of the squeezing and the aspiration methods. *Anim. Biotechnol.* **19**, 71–79.

Li R., Murphy C.N., Spate L., Wax D., Isom C., Rieke A., Walters E.M., Samuel M., Prather R.S. (2009). Production of piglets after cryopreservation of embryos using a centrifugation-based method for delipidation without micromanipulation. *Biol. Reprod.* **80**, 563-571.

Martínez E.A., Caamaño J.N., Gil M.A., Rieke A., McCauley T., Cantley T., Vázquez J.M., Roca J., Vázquez J.L., Didion B.A., Murphy C.N., Prather R.S., Day B.N. (2004). Successful nonsurgical deep uterine embryo transfer in pigs. *Theriogenology* **61**, 137-146.

Martínez E.A., Vázquez J.M., Roca J., Cuello C., Gil M.A., Parrilla I., Vázquez J.L. (2005). An update on reproductive technologies with potential short-term application in pig production. *Reprod. Domest. Anim.* **40**, 300-309.

Mazur P., Leibo S.P., Seidel G.E. (2008). Cryopreservation of germplasm of animals used in biological and medical research: importance, impact, status, and future directions. *Biol. Reprod.* **78**, 2-12.

Men H., Agca Y., Riley L.K., Critser J.K. (2006). Improved survival of vitrified porcine embryos after partial delipitation through chemically stimulated lipolysis and inhibition of apoptosis. *Theriogenology* **66**, 2008–2016.

Men H., Zhao C., Si W., Murphy C.N., Spate L., Liua Y., Walters E.M., Samuel M.S., Prather R.S., Critser J. K. (2011). Birth of piglets from *in vitro*-produced, zona-intact porcine embryos vitrified in a closed system. *Theriogenology* **76**, 280-289.

Merton S., in: A. Van Soom, M Boerjan (Eds.), Morphological evaluation of embryos in domestic species. Assessment of mammalian embryo quality, Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, 2002, p. 33-5.

Misumi K., Suzuki M., Sato S., Saito N. (2003). Successful production of piglets derived from vitrified morulae and early blastocysts using a microdroplet method. *Theriogenology* **60**, 253-260.

Nagashima H., Kashiwazaki N., Ashman R.J., Grupen C.G., Seamark R.F., Nottle M.B. (1994). Removal of cytoplasmic lipid enhances the tolerance of porcine embryos to chilling. *Biol. Reprod.* **51**, 618–622.

Nagashima H., Kashiwazaki N., Ashman R.J., Grupen C.G., Nottle M.B. (1995). Cryopreservation of porcine embryos. *Nature* **374**, 416.

Nagashima H., Hiruma K., Saito H., Tomii R., Ueno S., Nakayama N., Matsunari H., Kurome M. (2007). Production of live piglets following cryopreservation of embryos derived from *in vitro*-matured oocytes. *Biol. Reprod.* **76**, 900-905.

Naruse K., Quan Y.S., Choi S.M., Park C.S., Jin D.J. (2007a). Treatment of porcine oocytes with MEM vitamins during *in vitro* maturation improves subsequent blastocysts development following nuclear transfer. *J. Reprod. Develop.* **53**, 679-684.

Naruse K., Kim H.R., Shin Y.M., Chang S.M., Leem H.R., Park C.S., Jin D.I. (2007b). *Theriogenology* **67**, 407-412.

Peters R.M., Wells K.D. (1993). Culture of pig embryos. *J. Reprod. Fertil.* **48**, 61-73.

Polejaeva I., Chen S.H., Vaught T.D., Page R.L., Mullins J., Ball S., Dai Y., Boone J., Walker S., Ayares D.L., Colman A., Campbell K.H. (2000). Cloned pigs produced by nuclear transfer from adult somatic cells. *Nature* **407**, 86-90.

Polge C., Wilmut I., Rowson L.E.A. (1974). The low temperature preservation of cows, sheep and pig embryos. *Cryobiology* **11**, 560.

Prather R.S., Hawley R.J., Carter D.B., Lai L., Greenstein J.L. (2003). Transgenic swine for biomedicine and agriculture. *Theriogenology* **59**, 115-123.

Pursel V.G., Johnson L.A. (1975). Freezing of boar spermatozoa: fertilizing capacity with concentrated semen and a new thawing procedure. *J. Anim. Sci.* **40**, 99-102.

Roca J., Gil M.A., Hernandez M., Parrilla I., Vazquez J.M., Martinez E.A. (2004). Survival and fertility of boar spermatozoa after freeze-thawing in extender supplemented with butylated hydroxitoluene. *J. Androl.* **25**, 397-405.



- Romek M., Gajda B., Krzysztofowicz E., Smorag Z. (2009). *Reprod. Domest. Anim.* **44**, 24-32.
- Sánchez-Osorio J., Cuello C., Gil M.A., Almiñana C., Parrilla I., Caballero I., García E.M., Vázquez J.M., Roca J., Martínez E.A. (2008). Factors affecting the success rate of porcine embryo vitrification by the Open Pulled Straw method. *Anim. Reprod. Sci.* **108**, 334-44.
- Sánchez-Osorio J., Cuello C., Gil M.A., Parrilla I., Maside C., Almiñana C., Lucas X., Roca J.M., Vázquez J.M., Martínez E.A. (2010). Vitrification and warming of *in vivo*-derived porcine embryos in a chemically defined medium. *Theriogenology* **73**, 300-308.
- Shabankareh H.K., Kafilzadeh F., Soltani L. (2011). Treatment of ovine oocytes with certain water-soluble vitamins during *in vitro* maturation (IVM). *Small. Ruminant. Res.* **1004**, 139-145.
- Sirard M.A., Richard F., Blondin P., Robert C. (2006). Contribution of the oocyte to embryo quality. *Theriogenology* **7**, 126-136.
- Somfai T., Dinnye's A., Sage D., Marosa'n M., Carnwath J.W., Ozawa M., Kikuchi K., Niemann H. (2006). Development to the blastocyst stage of parthenogenetically activated *in vitro* matured porcine oocytes after solid surface vitrification (SSV). *Theriogenology* **66**, 415-422.
- Somfai T., Kashiwazaki N., Ozawa M., Nakai M., Maedomari N., Noguchi J., Kaneko H., Nagai T., Kikuchi K. (2008). Effect of centrifugation treatment before vitrification on the viability of porcine mature oocytes and zygotes produced *in vitro*. *J. Reprod. Develop.* **54**, 149-155.
- Somfai T., Ozawa M., Noguchi J., Kaneko H., Nakai M., Maedomari N., Ito J., Kashiwazaki N., Nagai T., Kikuchi K. (2009). Live piglets derived from *in vitro*-produced zygotes vitrified at the pronuclear stage. *Biol. Reprod.* **80**, 42-49.

Somfai T., Noguchi J., Kaneko H., Nakai M., Ozawa M., Kashiwazaki N., Egerszegi I., Rátky J., Nagai T., Kikuchi K. (2010). Production of good-quality porcine blastocysts by *in vitro* fertilization of follicular oocytes vitrified at the germinal vesicle stage, *Theriogenology* **73**, 147–156.

Stringfellow D.A. (1998). Recommendations for the sanitary holding of *in vivo* derived embryos. In 'Manual of the International Embryo Transfer Society. (Eds Stringfellow, D. A., and Seidel, S. M.) pp. 79-84.

Vajta G., Booth P.J., Holm P., Greve T., Callesen H. (1997). Successful vitrification of early stage bovine *in vitro* produced embryos with Open Pulled Straw (OPS) method. *Cryo-Lett* **18**, 191-95.

# GRAPHIC APPENDIX

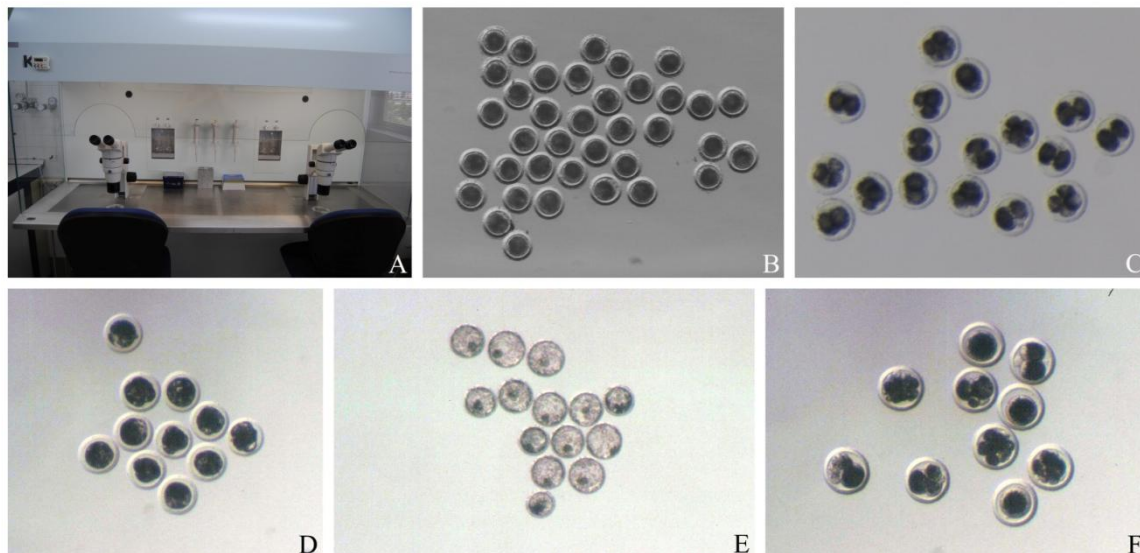


## GRAPHIC APPENDIX



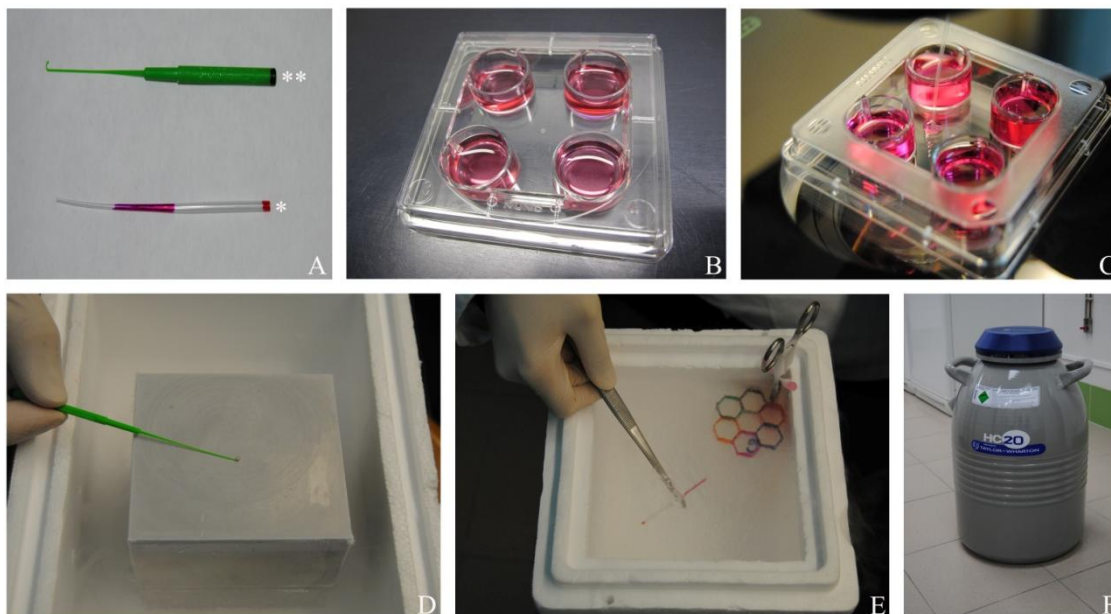
**Figure 1**

**Embryo Collection.** A, Weaned crossbred sows were housed individually in crates in a mechanically ventilated confinement facility. B, General anesthesia was induced with sodium thiopental (7 mg/kg body weight, i.v.). C, General anesthesia was maintained with isoflurane (3.5–5%). D, A mid-line incision was carried out to expose the reproductive tract. E, Embryos were collected by flushing the oviduct and/or the tip of each uterine horn with 30 mL of embryo recovery medium. F, Recovery medium was placed into a Petri dish and embryos were located and evaluated using a stereomicroscope at magnifications of 10x and 60x, respectively, to verify their developmental stage and quality grade. G, Collected embryos were transported in a thermostatically controlled incubator (39°C).



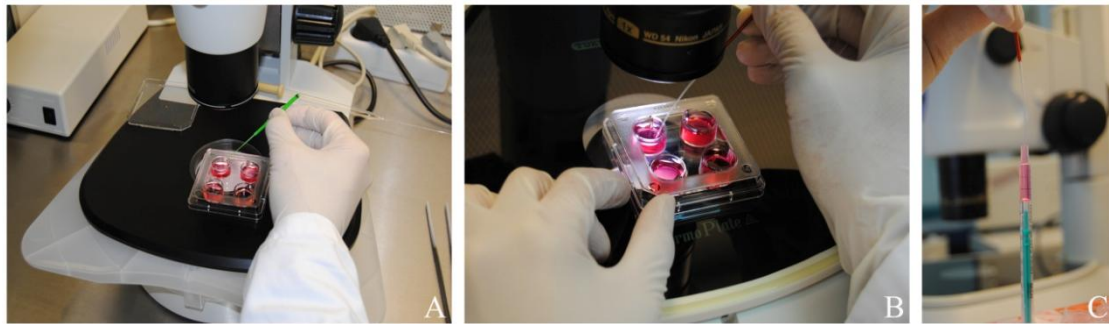
**Figure 2**

**Embryo selection.** A, Stereomicroscopes (Nikon, SMZ 800) used for embryo handling. B, Fresh zygotes. C, Fresh embryos at 2-4 cells stage. D, Fresh embryos at morula stage. E, Fresh embryos at blastocysts stage. F, Day 6 (Day 0: onset of estrus) fresh embryos classified as unfertilized oocytes or degenerate embryos.



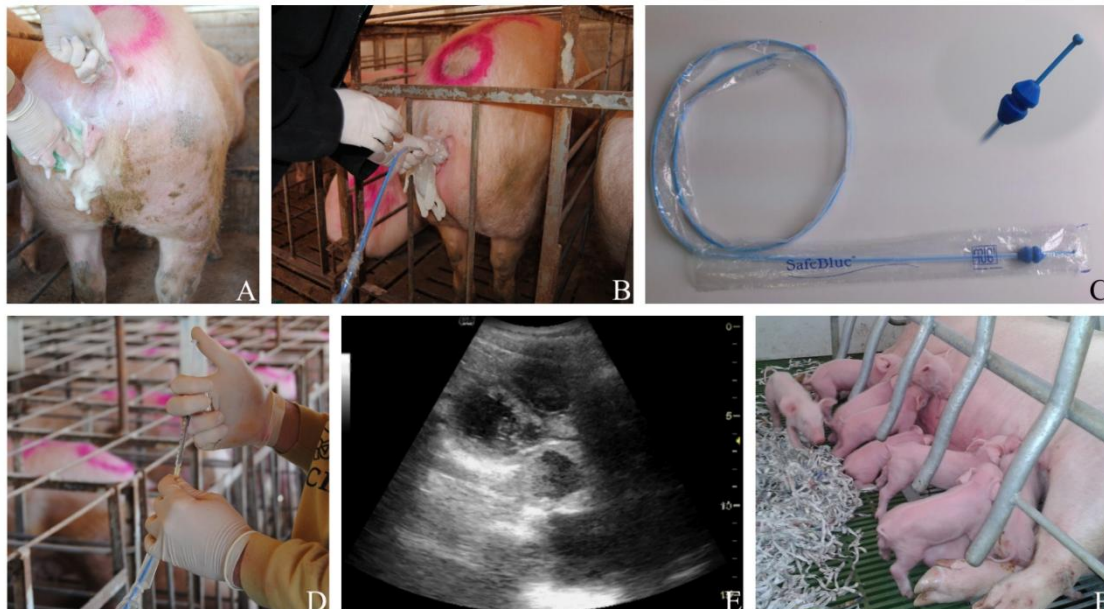
**Figure 3**

**Vitrification.** A, Superfine Open Pulled Straws (one asterisk) and Cryologic fiberplug (two asterisks). B, Four-well multidish with vitrification solutions. C, Embryos were placed in a 1.5–2  $\mu$ l drop and loaded into a SOPS by capillary action. D, Solid surface vitrification method. E) Straw was plunged horizontally into LN<sub>2</sub>. F, Straws and fiberplugs with embryos were storage in a LN<sub>2</sub> tank.



**Figure 4**

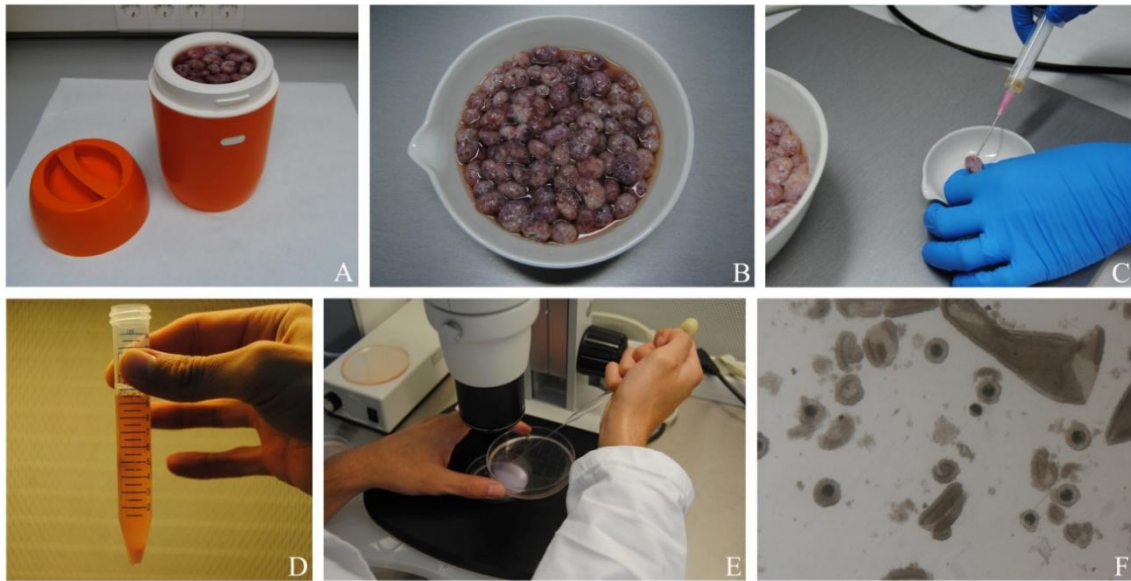
**Warming.** A, One-step warming method in a plate of embryos cryopreserved by the solid surface vitrification method. B, One-step warming method in a plate of embryos cryopreserved by the SOPS vitrification method. C, One-step warming method in a syringe (Cook®) of embryos vitrified by the SOPS method.



**Figure 5**

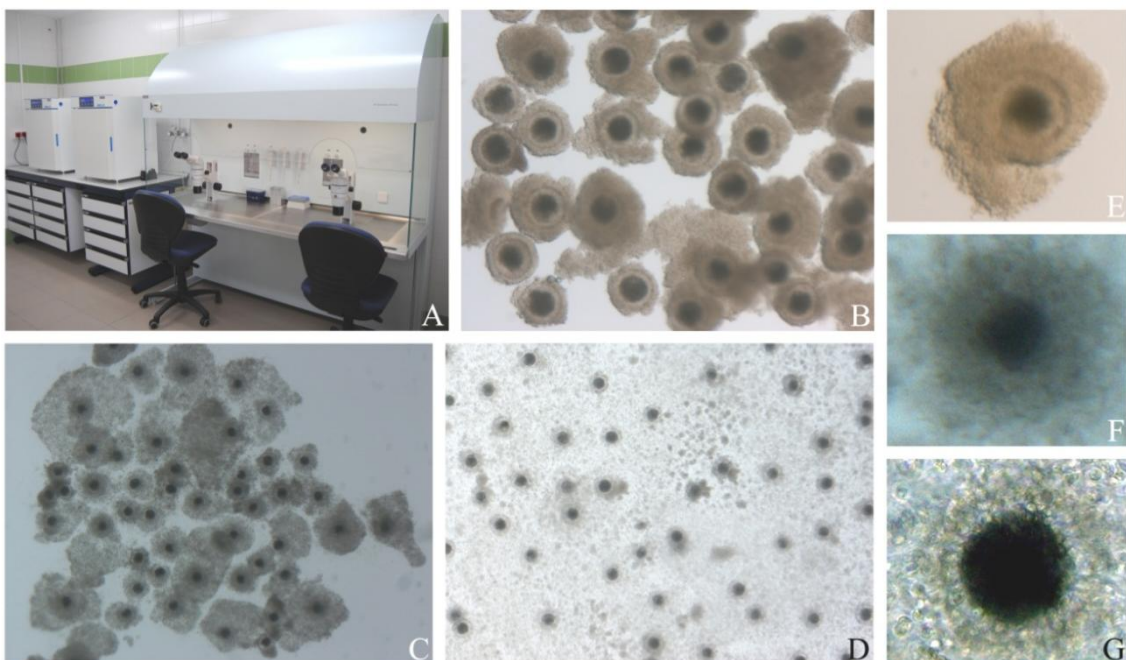
**Non-surgical embryo transfer.** A, cleaning of perineal area; B, insertion of the non-surgical embryo transfer catheter; C, detail of a non-surgical embryo transfer catheter; D, 1mL embryo transfer syringe connected to the non-surgical embryo transfer catheter; E, image of pregnancy by ultrasonography; F, piglets born after non-surgical transfer of vitrified-warmed porcine embryos.





**Figure 6**

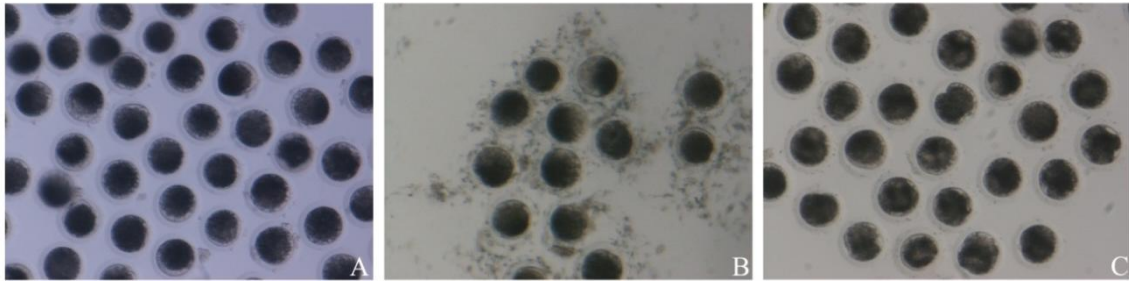
**Collection of cumulus-oocytes complexes.** A and B, ovaries from prepubertal gilts; C, aspiration of follicles to obtain cumulus-oocytes complexes; D, sedimentation of follicular fluid; E, visualization of follicular liquid content under stereomicroscope; F, selection of oocytes with a compact cumulus mass and a evenly granulated cytoplasm.



**Figure 7**

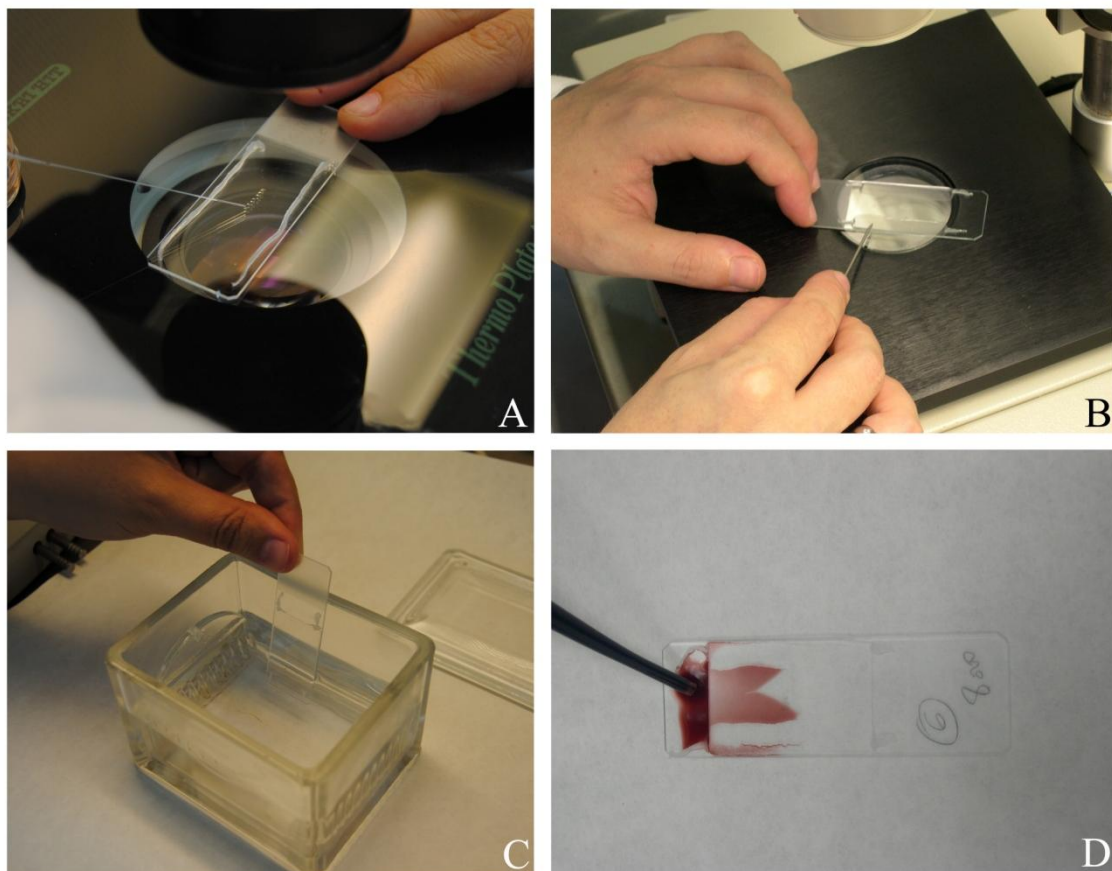
***In vitro* maturation.** A, *in vitro* fertilization laboratory; B, immature cumulus-oocytes complexes; C, cumulus-oocytes complexes after 20 h of *in vitro* maturation; D, cumulus-oocytes complexes after 40 h of *in vitro* maturation; E, detail of immature cumulus-oocyte complex; F, cumulus-oocyte complex after 20 h of *in vitro* maturation; G, detail of cumulus-oocytes complexes after after 40 h of *in vitro* maturation.





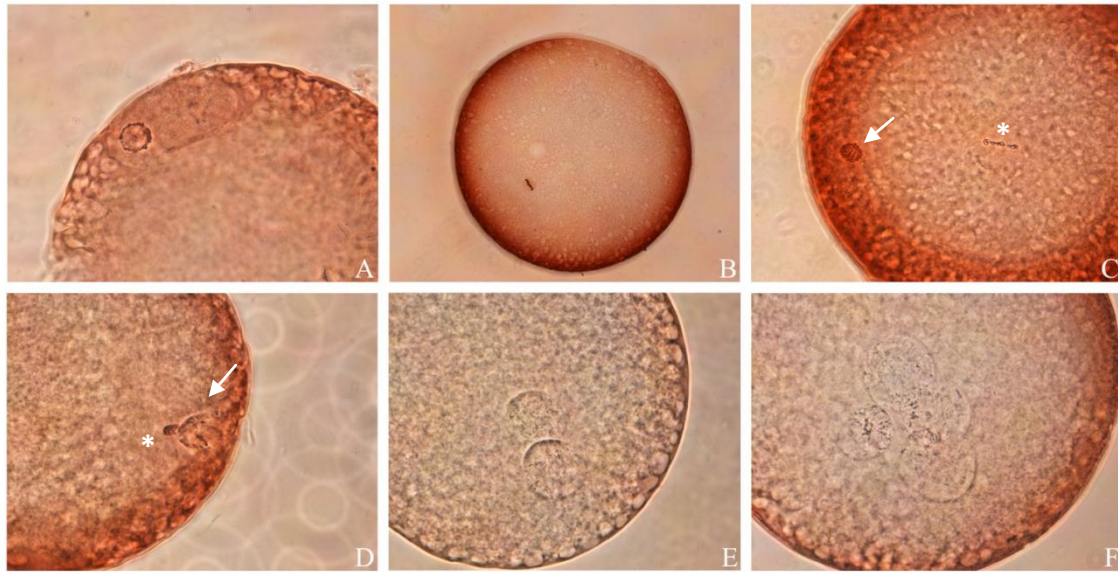
**Figure 8**

***In vitro* fertilization.** A, denuded *in vitro* matured-oocyte before *in vitro* fertilization; B, oocytes and spermatozoa bound to the zona pellucida after 6 h of *in vitro* fertilization; C, presumptive zygote after 18 h of *in vitro* fertilization.



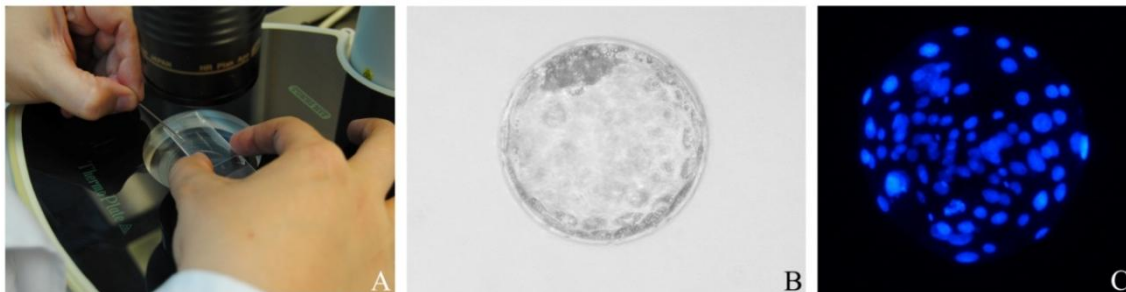
**Figure 9**

**Fixation and staining to assess the maturation and the fertilization parameters.** A and B, oocytes or presumptive zygotes mounted on slides with vaseline; C, fixation in a solution of acetic acid: ethanol (1:3); D, staining with Lacmoid in 45% (v/v) acetic acid.



**Figure 10**

**Maturation and Fertilization parameters.** A, inmature oocyte at germinal vesicle; B, inmature oocyte with metaphase plate; C, *in vitro* matured oocyte with metaphase plate (arrow) and visible first polar body (asterisk); D, *in vitro* matured oocyte with one pronuclei (arrow) and one spermatozoa head (asterisk); E, monospermic zygote with two pronuclei; F, polyspermic zygote with four pronuclei.



**Figure 11**

**Assesment of total number of cells rate in blastocysts .** A, Embryos were placed on a slide in 4  $\mu\text{L}$  of Vectashield containing 10  $\mu\text{g}/\text{mL}$  of H-33342 and were covered and flattened with a cover slip; B, Expanded blastocyst fixed in 0.4% paraformaldehyde in PBS; C, Fluorescent image of Hoechst 33342 of expanded blastocyst after *in vitro* culture.

# APPENDIX



ISI Web of Knowledge<sup>SM</sup>Journal Citation Reports<sup>®</sup>

2011 JCR Science Edition

**MARKED JOURNAL LIST**

Sorted by: Journal Title

Abbreviated Journal Title	ISSN	2011 Total Cites	Impact Factor	5-Year Impact Factor	Immediacy Index	2011 Articles	Cited Half-life	Eigenfactor <sup>®</sup> Score	Article Influence <sup>®</sup> Score
ANIM REPROD SCI	0378-4320	5284	1.750	1.966	0.178	219	6.8	0.00958	0.449
CRYOBIOLOGY	0011-2240	3191	2.062	2.199	0.231	78	>10.0	0.00441	0.525
REPROD FERT DEVELOP	1031-3613	2555	2.109	2.329	0.465	86	7.0	0.00491	0.587
THERIOGENOLOGY	0093-691X	11511	1.963	2.274	0.341	387	8.2	0.01608	0.504



## (Artículo 1) Theriogenology

### Abstract

Previous trials achieved extremely poor results when using the one-step warming method in a syringe in combination with non-surgical deep intrauterine transfer (NET) of superfine open pulled straw (SOPS)-vitrified embryos. This study aimed to assess the effect of the warming procedure on the in vitro and in vivo development of SOPS-vitrified embryos. The effect of the passage of the vitrified-warmed (VW) embryos through the NET catheter was also evaluated. Groups of 4 to 6 morulae and blastocysts, collected from weaned sows, were SOPS-vitrified in 1  $\mu$ L of vitrification medium, warmed by the one-step warming method in a dish or in a 1-mL syringe and cultured in vitro for 48 h to evaluate the embryo survival (ES) and hatching rates (HR). Warming in syringe had a deleterious effect ( $P < 0.05$ ) on the in vitro ES ( $60.5 \pm 10.4\%$ ) and HR ( $39.6 \pm 9.5\%$ ) of VW embryos in comparison with embryos warmed in a dish ( $85.4 \pm 10.6\%$  and  $69.0 \pm 8.4\%$ , respectively). This decreased embryonic development was due to the increased time required between the removal of the straws from the liquid nitrogen and the contact of the embryos with the warming medium when the warming was performed in a syringe in comparison with that for the warming in a dish. After verifying that the passage of VW embryos through the NET catheter does not have a damaging effect on their further in vitro development, the negative effect of warming in a syringe was also confirmed after NET. Fifteen fresh and SOPS-vitrified embryos warmed in a syringe or in a dish were transferred to each recipient ( $n = 28$ ) and recovered 24 h later to assess their developmental progression. All embryos from the syringe group were found to have degenerated at recovery. The in vivo ES and HR from the dish group ( $80.4 \pm 3.4\%$  and  $14.2 \pm 7.2\%$ , respectively) were lower ( $P < 0.05$ ) than those from the fresh group ( $94.0 \pm 4.1\%$  and  $36.8 \pm 7.8\%$ , respectively). Combining the warming in a dish and the NET procedure, 35 VW embryos were transferred to each of 10 gilts. Five recipients farrowed an average of  $10.4 \pm 0.9$  piglets. In conclusion, the method of one-step warming in a syringe has a negative effect on the in vitro and in vivo viability of SOPS-vitrified porcine embryos. In addition, NET of SOPS-vitrified embryos warmed by the one-step method in a dish showed promising reproductive performance of recipients. However, despite the great potential of this technology, further developments are required for large-scale commercial applications.

Url: [http://www.theriojournal.com/article/S0093-691X\(12\)00327-5/abstract](http://www.theriojournal.com/article/S0093-691X(12)00327-5/abstract)

## **(Artículo 2): Theriogenology**

### Abstract

In this study, we evaluated the *in vitro* and *in vivo* developmental capacity of selected monospermic zygotes produced *in vitro*. Cumulus-oocyte complexes were matured *in vitro* and inseminated with frozen-thawed spermatozoa. Thirteen hours after insemination, presumptive zygotes were centrifuged at 15,000  $\times g$  for 20 minutes to polarize the lipids in the cytoplasm and permit the visualization of pronuclei. Then, the oocytes were individually classified as bipronuclear (2PN) or polypronuclear (three or more pronuclei, PPN). To examine embryo development, 102 selected zygotes were cultured for 7 days. There were no differences in cleavage rate (93.0% and 88.9% for 2PN and PPN zygotes, respectively). However, the blastocyst formation rate was higher ( $P < 0.003$ ) in 2PN (80.7%) zygotes than in PPN (53.3%) zygotes. The control (noncentrifuged, nonselected zygotes) group showed lower ( $P < 0.003$ ) cleavage rate and blastocyst formation than the 2PN and PPN zygotes. In a second experiment, 2PN zygotes and control zygotes were transferred (30 zygotes per transfer) by laparoscopy into the oviducts of recipient gilts (10 recipients per group) on the first day of standing estrus. The farrowing rates were 70% and 40% for transfers made with 2PN and control zygotes, respectively. The average number of piglets born per recipient farrowed did not differ between groups ( $4.9 \pm 0.6$  and  $4.5 \pm 1.2$ , respectively), but the efficiency (number of live piglets per total transferred embryos) was higher ( $P < 0.01$ ) for 2PN zygotes than for the control group (9.3% and 4.0%, respectively). These results demonstrate the effectiveness of centrifugation for the selection of monospermic zygotes as a procedure to improve *in vitro* embryo production in pigs. In addition, the results indicate that the laparoscopic technique described here is a simple and effective procedure for transferring embryos into one oviduct.

Url: [http://www.theriojournal.com/article/S0093-691X\(12\)00575-4/abstract](http://www.theriojournal.com/article/S0093-691X(12)00575-4/abstract)



### **(Artículo 3): Reproduction, fertility and Development**

#### Abstract

This study aimed to evaluate the post-warming in vitro viability of intact porcine zygotes vitrified using the superfine open pulled-straw (SOPS) method and to investigate whether cryotolerance is increased by lipid polarisation before vitrification. In vivo-derived zygotes ( $n = 317$ ) were either untreated before SOPS vitrification or subjected to one of the following pre-treatments: (1) centrifugation (20 min, 15 000g) or (2) equilibration in high-osmolality medium (6 min, 400 mOsm kg<sup>-1</sup>) followed by centrifugation. Vitrified-warmed and non-vitrified fresh zygotes were cultured in vitro for 120 h. There were no differences in the blastocyst formation rates between the vitrification groups (from  $35.4 \pm 5.3\%$  to  $48.2 \pm 5.6\%$ ), but fresh zygotes exhibited higher ( $P < 0.001$ ) blastocyst formation rates ( $87.5 \pm 5.3\%$ ) than did vitrified-warmed zygotes. The total blastocyst cell number was similar among all groups (from  $34.9 \pm 2.8$  to  $44.1 \pm 2.8$ ). In conclusion, SOPS vitrification is a promising method for the cryopreservation of untreated in vivo-derived porcine zygotes. Neither lipid polarisation by centrifugation nor exposure to a high-osmolality medium followed by centrifugation affected the post-warming in vitro viability of zygotes. Our study also demonstrated that the donor is an important factor in determining the success of vitrification for in vivo-derived porcine zygotes.

Url: <http://www.publish.csiro.au/paper/RD12179>

## **(Artículo 4): Animal Reproduction Science**

### Abstract

The aims of this study were (1) to determine the effect of in vitro maturation (IVM) medium supplementation with MEM vitamins on in vitro embryo development and sensitivity to vitrification of Day 6 blastocysts and (2) to evaluate whether the addition of forskolin to in vitro culture (IVC) medium enhances blastocyst survival following Super Open Pulled Straw (SOPS) vitrification. Cumulus-oocyte complexes (COCs; n=4000) were matured with 0.0% or 0.05% (v/v) MEM vitamins. After 44h of IVM, the oocytes were in vitro fertilized, and presumptive zygotes were cultured. At Day 5 of IVC, embryos from both experimental groups were cultured for 24h with 0 or 10 $\mu$ M forskolin, achieving a 2x2 factorial design. The blastocyst formation rate was assessed on Day 6, and subsets of samples from the four experimental groups were vitrified (n=469) or kept fresh (n=546). Fresh and vitrified-warmed blastocysts were cultured for 24h prior to embryo survival and total blastocyst cell number assessment. The MEM vitamins increased (P<0.001) the blastocyst formation rate at Day 6, but they did not affect embryo survival after vitrification. In contrast, the addition of forskolin to the culture medium enhanced (P<0.05) the blastocyst vitrification tolerance. The total blastocyst cell number was similar among the groups. In conclusion, supplementation with 0.05% MEM vitamins improved the blastocyst formation rate, and the addition of 10 $\mu$ M forskolin to the culture medium increased survival in Day 6 in vitro-produced blastocysts after SOPS vitrification.

Url: [http://www.animalreproductionscience.com/article/S0378-4320\(12\)00352-1/abstract](http://www.animalreproductionscience.com/article/S0378-4320(12)00352-1/abstract)

**(Artículo 5): Cryobiology****Abstract**

This study was aimed to determine the effect of forskolin on the viability of in vivo-derived porcine embryos vitrified by the superfine open pulled straw (SOPS) or solid surface vitrification (SSV) methods at the 2-cell, 4-cell, and blastocyst stages. Zygotes, 2- to 4-cell embryos, and morulae were obtained from superovulated sows. After collection, embryos were cultured for 24h with 0 or 10 $\mu$ M forskolin and then vitrified using the SOPS and SSV method, or not vitrified (fresh controls). Fresh and vitrified-warmed 2-cells, 4-cells, and blastocysts were cultured for additional 96h, 72h and 24h, respectively. At the end of the culture, embryos were evaluated for progression to the blastocyst stage and total cell number. The vitrification method did not affect any of the parameters evaluated for any embryo stage. Forskolin increased ( $P<0.01$ ) the blastocyst formation and the final developmental stage of vitrified 2- and 4-cell embryos. However, these embryos exhibited lower ( $P<0.003$ ) blastocyst formation rates than their fresh counterparts. The total cell number and hatching rate were similar in both groups (vitrified and fresh) of 2- and 4-cell embryos. Vitrified blastocysts exhibited viabilities, final developmental stages, hatching rates, and total cell numbers that were similar to those of their fresh counterparts, regardless of the addition of forskolin. In conclusion, the SOPS and SSV methods are suitable for the cryopreservation of in vivo-derived 2- to 4-cell porcine embryos. Pre-treatment with forskolin for 24h before vitrification improves the cryotolerance of 2- and 4-cell porcine embryos.

Url: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0011224012002799>