



Región de Murcia
Consejería de Economía,
Industria e Innovación



Cristina Cuello Medina

**Vitrificación de embriones porcinos:
Factores de variación y
optimización de la técnica**

I	INTRODUCCIÓN.....	9
II	REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA	
	1. Congelación de embriones: antecedentes históricos.....	15
	2. Principios básicos de criobiología y sistemas de criopreservación.....	16
	3. Congelación de embriones porcinos.....	22
	4. Factores que afectan a la viabilidad embrionaria postdescongelación.....	27
	5. Alteraciones celulares durante la congelación.....	31
	6. Transferencia de embriones porcinos.....	33
III	MATERIAL Y MÉTODOS	
	1. Animales.....	37
	2. Reactivos químicos y medios.....	37
	3. Producción de embriones.....	37
	4. Recogida de embriones.....	38
	5. Vitrificación.....	41
	6. Calentamiento.....	42
	7. Cultivo in vitro de los embriones.....	43
	8. Diseño experimental.....	44
IV	RESULTADOS	
	1. Experiencia 1: Estudio de la morfología y de los niveles de muerte celular de blastocistos porcinos vitrificados.....	59
	2. Experiencia 2: Vitrificación de embriones porcinos en diferentes estadios de desarrollo empleando distintos procedimientos de vitrificación ultrarápida.....	74
	3. Experiencia 3: Transferencia de blastocistos vitrificados procedentes de una o dos donantes: Parámetros reproductivos el día 30 de gestación.....	76
	4. Experiencia 4: Desarrollo in vitro de blastocistos vitrificados mediante el sistema SOPS y calentados mediante un sistema directo.....	77
	5. Experiencia 5: Transferencia no quirúrgica de blastocistos porcinos vitrificados mediante el sistema OPS.....	79
V	DISCUSIÓN	
	1. Experiencia 1: Estudio de la morfología y de los niveles de muerte celular de blastocistos porcinos vitrificados.....	87
	2. Experiencia 2: Vitrificación de embriones porcinos en diferentes estadios de desarrollo empleando distintos procedimientos de vitrificación ultrarápida.....	89
	3. Experiencia 3: Transferencia de blastocistos vitrificados procedentes de una o dos donantes: Parámetros reproductivos el día 30 de gestación.....	90
	4. Experiencia 4: Desarrollo in vitro de blastocistos vitrificados mediante el sistema SOPS y calentados mediante un sistema directo.....	91

5. Experiencia 5: Transferencia no quirúrgica de blastocistos porcinos vitrificados mediante el sistema OPS.....	93
VI CONCLUSIONES	
VII RESUMEN	
VIII SUMMARY	
IX EXTENDED SUMMARY	
X BIBLIOGRAFÍA	
XI ABREVIATURAS	
XII PRODUCCIÓN CIENTÍFICA DERIVADA DE LA PRESENTE TESIS DOCTORAL	

Introducción

Durante los últimos años la tecnología de la reproducción en el ganado porcino ha experimentado un gran desarrollo, siendo los sistemas de transferencia de embriones (TE) uno de los avances con mayores expectativas. El empleo de esta técnica permite el movimiento e intercambio de material genético con un riesgo mínimo de transmisión de enfermedades y unos costes muy reducidos con respecto al transporte de animales adultos. Por otro lado, la TE es esencial para la aplicación de otras biotecnologías tales como la clonación, la obtención de animales transgénicos y la producción *in vitro* de embriones. A pesar de los progresos realizados en este campo, la aplicación práctica de esta técnica es aún muy escasa debido a la necesidad de emplear procedimientos quirúrgicos para la obtención y transferencia de los embriones, así como a las dificultades para la conservación de los embriones porcinos durante largos periodos de tiempo.

La congelación de embriones se aplica actualmente de forma rutinaria en los programas de mejora genética de diferentes especies domésticas (Leibo, 1986; Palasz y Mapletoft, 1996; Dobrinsky, 2002). Esta tecnología permite la creación de bancos de embriones y facilita el intercambio y conservación de líneas de alto valor genético. Sin embargo, la criopreservación de embriones porcinos presenta numerosas dificultades debido a su gran sensibilidad a las bajas temperaturas (Wilmot, 1972; Polge y cols., 1974; Pollard y Leibo, 1994). Actualmente, la vitrificación de embriones (Smorag y Gajda, 1994; Kasai, 1996; Vajta, 2000) ha sido propuesta y está siendo desarrollada como una alternativa a los procedimientos tradicionales de congelación lenta, que hasta el momento no ofrecen resultados satisfactorios en la especie porcina (Berthelot y cols., 2003).

La vitrificación consiste en el enfriamiento rápido de un líquido que solidifica sin formar cristales de hielo (Rall y Fahy, 1985). La solución se transforma en un "vidrio" extremadamente viscoso que mantiene la distribución iónica y molecular de un líquido (Rall, 1987). La mejora de los sistemas de vitrificación, y concretamente del método Open Pulled Straw (OPS) (Vajta y cols., 1998a), ha proporcionado experimentalmente altas tasas de gestación y parto tras la transferencia quirúrgica de embriones vitrificados (Berthelot y cols., 2000, 2001, 2002; Cameron, 2004). Sin embargo, es necesario investigar qué factores afectan a la viabilidad de los embriones vitrificados y estudiar diferentes aspectos técnicos del procedimiento antes de que esta tecnología pueda tener una aplicación comercial.

Clásicamente se ha aceptado que la vitrificación y el calentamiento posterior de los embriones afectan adversamente a la calidad embrionaria, en términos de supervivencia y de eclosión *in vitro* (Berthelot y cols., 2003). Esta pérdida de viabilidad puede deberse al daño sufrido por las estructuras biológicas, como resultado del efecto tóxico y osmótico de los crioprotectores sobre el embrión. La mayor parte de las investigaciones sobre la calidad de los embriones vitrificados se basan en evaluaciones morfológicas realizadas mediante microscopía estereoscópica, por lo que, al tratarse de evaluaciones subjetivas, el método puede llevar implícito cierta inexactitud y falta de reproducibilidad. Además, ciertas anomalías y alteraciones pueden no ser detectadas por este procedimiento, tal y como revelan estudios ultraestructurales realizados con embriones bovinos vitrificados (Vajta y cols., 1997d).

Aunque se ha estudiado con anterioridad la ultraestructura (Maddox-Hyttel y Boerjan, 2002) y los niveles de muerte celular (Pomar y cols., 2003) de embriones porcinos frescos,

aún no se han investigado estos parámetros en embriones vitrificados. El estudio de las diferencias cualitativas entre los embriones frescos y los vitrificados es esencial para optimizar estos procedimientos con el objetivo de obtener embriones vitrificados de calidad comparable a los embriones frescos y para proporcionar un mejor conocimiento de la eficiencia de la vitrificación y el calentamiento. Además, sería de suma importancia conocer si los criterios de evaluación morfológica mediante un estereomicroscopio, normalmente utilizados para evaluar la supervivencia embrionaria *in vitro*, son realmente eficaces para discernir entre diferentes grados de calidad embrionaria.

Por otra parte, se ha demostrado que la viabilidad embrionaria tras la vitrificación depende de numerosos factores entre los que destacan el estadio de desarrollo embrionario (Dobrinsky, 1997a, 2002) y la velocidad de enfriamiento y calentamiento (Arav y cols., 2002).

En estudios utilizando el sistema de congelación lenta se ha demostrado que los blastocistos eclosionados y los próximos a la eclosión toleran la congelación sin tratamientos específicos (porcentaje de supervivencia *in vitro* de 2-50%; Berthelot y cols., 2003), mientras que las mórulas y los blastocistos tempranos no sobreviven a estos procedimientos de congelación (Nagashima, 1989; Dobrinsky, 1997a). La vitrificación ha permitido obtener mejores resultados de viabilidad embrionaria tras el calentamiento (30% a 90%) cuando se emplean embriones en estadio de blastocisto temprano a blastocisto eclosionado (Kuwayama y cols., 1997; Kobayashi y cols., 1998b; Holm y cols., 1999; Berthelot y cols., 2000). Sin embargo, aunque las mórulas toleran la vitrificación, los porcentajes de supervivencia y eclosión *in vitro* continúan siendo inferiores a las obtenidas con blastocistos (Berthelot y cols., 2003).

La velocidad de enfriamiento parece ser otro factor clave en la vitrificación de embriones porcinos. Un incremento de la velocidad de enfriamiento disminuye el daño por frío (Rall, 1987; Weber y cols., 1992; Dobrinsky y Johnson, 1994) y a su vez podría permitir una reducción de la concentración de crioprotectores (Vajta, 2000). Hasta ahora, los embriones de diferentes especies se han vitrificado en pajuelas de 0'25 ml; estas pajuelas limitan la velocidad de enfriamiento a menos de 2.500°C/min (Rall, 1987). El éxito de los procedimientos de vitrificación ha mejorado sustancialmente con el desarrollo de nuevos envases para los embriones, como las pajuelas "open pulled" (OPS; Vajta y cols., 1997c, 1998a). Estas pajuelas son pajuelas de 0'25 ml adelgazadas que permiten el incremento de la velocidad de enfriamiento aproximadamente 8 veces con respecto a las pajuelas tradicionales de 0'25 ml. Más recientemente, la velocidad de enfriamiento alcanzada con el sistema OPS se ha aumentado con el uso de pajuelas con un diámetro interno aún inferior y una pared más delgada ("superfine open pulled straws": SOPS; Isachenko y cols., 2003a) que las pajuelas OPS. También se ha desarrollado un nuevo sistema (Vit-Master®; Minitüb, Alemania), mediante el cual la temperatura del nitrógeno líquido desciende hasta -210°C aplicando presión negativa (Arav, 1998). Estos dos procedimientos incrementan la tasa de enfriamiento aproximadamente cuatro veces con relación a la que se alcanza con el sistema OPS en nitrógeno líquido normal (Arav y cols., 2002), por lo que su aplicación podría mejorar la eficiencia de la vitrificación de embriones en diferentes estadios de desarrollo.

Aunque es sabido que muchos factores afectan la eficiencia *in vivo* de la transferencia de embriones frescos (Youngs, 2000), poco se conoce acerca de los factores que afectan a la eficiencia de la transferencia de embriones vitrificados. Recientemente, diferentes investigadores han transferido por vía quirúrgica una mezcla de embriones porcinos vitrificados procedentes de varias donantes, obteniendo una tasa de parto del 80 al 100% y un tamaño de camada de 6'4 a 7'4 lechones (Berthelot y cols., 2002). Las transferencias de embriones vitrificados se realizan con un número relativamente elevado de embriones con el fin de compensar la posible pérdida de viabilidad debida a la vitrificación. Esto explica el hecho de que, aunque en ocasiones podría ser más interesante transferir embriones vitrificados procedentes de una única donante para conocer el origen de la descendencia, generalmente se transfiera una mezcla de 16 a 38 embriones procedentes de varias donantes (Kobayashi, 1998a, 1998b; Cameron y cols., 2000; Dobrinsky, 2000; Berthelot y cols., 2000, 2002; Cameron y cols., 2004). Por ello, es necesario estudiar si la mezcla de embriones de varias donantes tiene un efecto sobre la eficiencia de la transferencia de embriones vitrificados, con relación a las transferencias efectuadas con embriones de una sola donante.

Es evidente que el perfeccionamiento y simplificación de las técnicas de vitrificación de embriones porcinos supondrá un importante impulso a la TE en esta especie. En este sentido, la necesidad de personal entrenado y equipo óptico para la descongelación y manipulación de los embriones, así como los procedimientos quirúrgicos de transferencia son aspectos técnicos que deberían ser mejorados para que la transferencia de embriones porcinos vitrificados pueda tener aplicación práctica.

Con respecto a los sistemas de descongelación, los métodos convencionales para el calentamiento de embriones vitrificados con el sistema OPS requieren diferentes lavados con soluciones decrecientes de un soluto impermeable como la sacarosa, con el fin de eliminar los crioprotectores empleados durante la vitrificación (Vajta y cols., 1998a; Berthelot y cols., 2000, 2001, 2002; Cameron y cols., 2004). Desde que Leibo (1984) introdujo un método para la descongelación directa de embriones bovinos congelados con sistemas tradicionales, se han desarrollado con éxito otros métodos de calentamiento y transferencia directa de embriones vitrificados bovinos (Vajta y cols., 1995; Saha y cols., 1996) y ovinos (Baril y cols., 2001; Isachenko y cols., 2003b). Estos sistemas, al no necesitar el uso de un microscopio, son ideales para su aplicación en condiciones de granja. Su empleo para el calentamiento de embriones porcinos vitrificados simplificaría sustancialmente el procedimiento de transferencia. Así, los embriones se podrían calentar directamente en una jeringuilla que posteriormente se conectaría al catéter de transferencia quirúrgica o no quirúrgica sin manipulaciones específicas.

Por otro lado, en la actualidad se están desarrollando procedimientos prometedores de TE vía no quirúrgica (Hazeleger y Kemp, 1994, 200) que pueden ser apropiados para su uso en condiciones de granja, y que ofrecen nuevas perspectivas a la TE. Diferentes autores han publicado tasas de partos entre 33% y 64% y tamaños de camada entre 3'1 y 6'7 lechones después de la transferencia de embriones frescos vía no quirúrgica en receptoras no sedadas (Hazeleger y Kemp, 2001). Mediante estos procedimientos los embriones son transferidos en el cuerpo o inicio de un cuerno uterino. Sin embargo, se ha

demostrado, mediante transferencias quirúrgicas, que esa localización es menos apropiada para los embriones que la mitad o el último tercio del cuerno uterino (Wallenhorst y Holtz, 1999). Recientemente, se ha diseñado un nuevo sistema de transferencia no quirúrgica mediante el cual los embriones se depositan directamente en la profundidad de un cuerno uterino de receptoras no sedadas (Martínez y cols., 2001a, 2002, 2004). Utilizando este procedimiento se ha alcanzado una tasa de gestación del 70'8% y un tamaño de camada de 6'9 lechones transfiriendo embriones frescos (Martínez y cols., 2004).

El desarrollo de la vitrificación de embriones porcinos en conjunción con un método práctico de TE vía no quirúrgica, permitirá numerosas aplicaciones desde el punto de vista de la investigación, la medicina, la producción animal y la mejora genética. La finalidad del presente trabajo ha sido estudiar distintos aspectos que pueden afectar a la eficiencia de la vitrificación y a la transferencia de embriones vitrificados en la especie porcina. Para ello se realizaron cinco experiencias con los siguientes objetivos específicos:

1. Evaluar la calidad de los blastocistos porcinos frescos y vitrificados en términos de morfología, número total de células y niveles de muerte celular, y comparar estos parámetros con el estudio morfológico realizado mediante microscopía estereoscópica.
2. Comparar tres sistemas de vitrificación ultrarrápida (OPS, SOPS y Vit-Master-SOPS) con el fin de determinar la influencia de la velocidad de enfriamiento en el desarrollo *in vitro* de embriones porcinos vitrificados en distinto estadio de desarrollo (mórula, blastocisto temprano o blastocisto expandido).
3. Verificar si la mezcla de embriones de dos donantes puede afectar a los resultados de la transferencia de blastocistos porcinos vitrificados y conocer la tasa de gestación y la supervivencia embrionaria *in vivo* después de la transferencia quirúrgica de blastocistos procedentes de una o de dos donantes.
4. Comparar el desarrollo *in vitro* de embriones porcinos vitrificados con el sistema SOPS y calentados mediante el sistema convencional (tres etapas) y un protocolo de calentamiento directo (una etapa).
5. Determinar la tasa de parto y el tamaño de camada obtenidas tras la transferencia no quirúrgica en la profundidad de un cuerno uterino de blastocistos porcinos vitrificados/calentados.

**Revisión
bibliográfica**

1. Congelación de embriones: antecedentes históricos

La criobiología comenzó a desarrollarse a principios del siglo XX, siguiendo el principio de que la cristalización del agua intracelular y el daño causado por el frío son las principales causas de muerte celular a bajas temperaturas (Mazur, 1984). A principios de los años 40 se iniciaron los primeros estudios sistemáticos sobre el uso de agentes crioprotectores para la congelación de células y gametos (Luyet y Geheño, 1940; Chang y Walton, 1940). Algunos años más tarde Polge y cols. (1949) descubrieron el efecto crioprotector del glicerol, este hecho supuso un verdadero impulso al progreso de la criobiología y a su aplicación en la tecnología de la reproducción.

En 1972 Whittingham y cols. consiguieron congelar embriones de ratón y un año más tarde Wilmut y Rowson (1973) obtuvieron una gestación a partir de la transferencia de embriones bovinos congelados y descongelados. Estas experiencias se consideran el inicio de la criopreservación de embriones mamíferos. Desde entonces, se han realizado numerosas investigaciones con el fin de optimizar esta tecnología y adaptarla a diferentes especies habiéndose conseguido descendencia viva tras la transferencia de embriones (TE) en muchas de ellas (Tabla 1). Sin embargo, mientras que en algunos animales domésticos la congelación de embriones es hoy en día un procedimiento que se emplea de forma rutinaria en los programas de TE, la aplicación de esta tecnología en la especie porcina es muy limitada.

Tabla 1. Primera descendencia obtenida a partir de la transferencia de embriones congelados y descongelados en diferentes especies.

Murinos	Whittingham y cols.	1972
Bovina	Wilmut y Rowson	1973
Lepóridos	Bank y Maurer	1974
Ovina	Willdean y cols.	1978
Caprina	Bilton y Moore	1978
Equina	Yamamoto y cols.	1982
Humana	Zeilmaker y cols.	1984
Porcina	Hayashi y cols.	1988

El desarrollo de la criopreservación de embriones porcinos ha presentado numerosas dificultades debido a la especial sensibilidad al frío que presentan los embriones de esta especie (Pollard y Leibo, 1994; Dobrinsky, 1997a). Wilmut (1972) fue el primero en describir este fenómeno al observar que los embriones porcinos sometidos a temperaturas entre 15°C y 20°C eran capaces de implantarse tras la transferencia quirúrgica, pero que cuando se enfriaban a 5°C ó 10°C no se desarrollaban *in vivo*. Polge y cols. (1974) verificaron estos resultados y establecieron que 15°C era la temperatura crítica. Además, se demostró que la velocidad de enfriamiento hasta esa temperatura crítica no afecta a la viabilidad embrionaria (Wilmut, 1986). Las experiencias realizadas por Green y cols. (1984), Pollard y Leibo (1994) y Leibo y cols. (1996) confirmaron que la pérdida de viabilidad embrionaria no se producía a 15°C sino cuando la temperatura descendía por

debajo de este límite. La sensibilidad de los embriones porcinos al frío no se observa en embriones bovinos, ovinos o de animales de laboratorio (Dobrinsky, 1993), y es comparable a la especial sensibilidad de los espermatozoides de verraco a las bajas temperaturas (Pursel y cols., 1973). Por lo que podría tratarse de un fenómeno específico de especie.

Desde finales de los años 80, numerosos autores han congelado embriones porcinos mediante sistemas de congelación equilibrada (lenta o convencional), puestos a punto para la especie bovina (Dobrinsky, 1997a; Berthelot y cols., 2003), y en los que los embriones alcanzan su equilibrio osmótico antes de comenzar el descenso de la temperatura. Sin embargo, la viabilidad embrionaria tras la descongelación ha sido muy reducida y las camadas obtenidas a partir de la transferencia de embriones congelados escasas. El desarrollo de la vitrificación aplicada a la congelación de embriones (Rall y Fahy, 1985) supuso una alternativa a los sistemas de congelación equilibrada. La vitrificación es un proceso simple y económico que ha permitido la obtención de aceptables tasas de gestación y partos tras la transferencia de embriones porcinos vitrificados/calentados (Berthelot y cols., 2003). Hasta el momento, parece ser el sistema más adecuado para criopreservar los embriones de esta especie.

Actualmente, las investigaciones sobre criopreservación de embriones en diferentes especies tienen como objetivo la simplificación de los procedimientos de congelación y descongelación, la mejora de la viabilidad embrionaria postdescongelación y el desarrollo de soluciones crioprotectoras efectivas y no tóxicas para los embriones. Entre los avances realizados con el fin de simplificar el sistema de congelación y descongelación de embriones destacan los sistemas de congelación rápida, la vitrificación y la descongelación en una etapa.

2. Principios básicos de criobiología y sistemas de criopreservación

Aunque los embriones están constituidos por un conjunto de células, para su criopreservación se aplican los principios de la criobiología originalmente estudiados en células aisladas (Schneider, 1986). Los principios de la criopreservación son similares para todas las células, siendo el punto más importante la eliminación del agua intracelular antes de que ésta congele, ya que la formación y crecimiento de los cristales de hielo provoca importantes daños mecánicos sobre orgánulos y membranas (Mazur, 1977).

El agua es el componente fundamental de las células vivas, y por tanto de los embriones, de forma que los cambios físico-químicos que sufre el agua intra y extracelular, debido al descenso de la temperatura por debajo de 0°C, van a ser claves en el proceso de criopreservación. El punto crítico del proceso de congelación no es la temperatura de almacenamiento en nitrógeno líquido (-196°C), sino atravesar una zona intermedia de temperatura (-5°C a -16°C) que puede ser letal para las células (Mazur, 1984). Aunque durante el almacenamiento en nitrógeno líquido (-196°C) puede tener lugar la formación de radicales libres o la rotura de macromoléculas, no existen evidencias de muerte celular ni alteraciones genéticas o cromosómicas debidas al almacenamiento a -196°C (Ashwood-Smith y Friedman, 1979).

La congelación de embriones es un estado de conservación indefinido a muy bajas temperaturas, en el cual el metabolismo y otras funciones celulares del embrión no existen o están enormemente reducidas, siendo posible reestablecer estas funciones tras la descongelación (Dobrinisky, 2000). Se distinguen dos sistemas de congelación de embriones: congelación equilibrada y congelación no equilibrada. En la congelación equilibrada (lenta o convencional) los embriones se deshidratan parcialmente y alcanzan el equilibrio osmótico antes de que comience el descenso de la temperatura y lo mantienen durante el enfriamiento. En la congelación no equilibrada tiene lugar una deshidratación parcial del embrión sin que éste alcance el equilibrio osmótico. Esto ocurre antes del enfriamiento rápido en la vitrificación o en un breve periodo de tiempo de exposición de los embriones a temperaturas inferiores a 0°C en la congelación ultra-rápida (Palma, 2001).

2.1. Congelación equilibrada

Se trata de un proceso físico-químico complejo, de intercambio de calor y agua entre las células y el medio externo que finaliza en un cambio de fase líquida a sólida (Schneider y Mazur, 1984; Aller y cols., 1995). La mayor parte de los embriones de mamíferos se congelan mediante este sistema de congelación que se fundamenta en los principios básicos de la criobiología. Se emplean concentraciones de crioprotectores permeables relativamente bajas para evitar la toxicidad de estos compuestos sobre el embrión y el choque osmótico. La velocidad de congelación es lenta para controlar el proceso de cristalización y la velocidad de descongelación es generalmente rápida para evitar la re-cristalización (Palasz y Mapletoft, 1996).

La primera fase de la congelación equilibrada (Figura 1) consiste en exponer a los embriones a concentraciones molares de crioprotectores permeables de bajo peso molecular normalmente a temperatura ambiente durante 15-25 minutos aproximadamente. Existe una gran variedad de crioprotectores y de protocolos para su adición al medio, siendo los más empleados el etilen-glicol, glicerol, dimetilsulfóxido (DMSO) o propilenglicol. Durante la fase de equilibrado con los crioprotectores los embriones se contraen como consecuencia de la pérdida de agua provocada por la hiperosmolaridad del medio extracelular, este hecho se ve favorecido por la mayor permeabilidad de los embriones al agua que a los crioprotectores (Fahning y García, 1992). Esta deshidratación parcial evitará la formación de grandes cristales de hielo intracelulares. La contracción embrionaria cesa cuando se alcanza un equilibrio entre la salida de agua y la entrada de crioprotectores permeables que sustituyen el agua intracelular (Schneider y Mazur, 1984; Mazur y Schneider, 1986; Schneider, 1986). A medida que los crioprotectores permeables penetran en el embrión, éste sufre una reexpansión parcial como resultado de la entrada de agua que intenta mantener el equilibrio osmótico (Fahning y García, 1992).

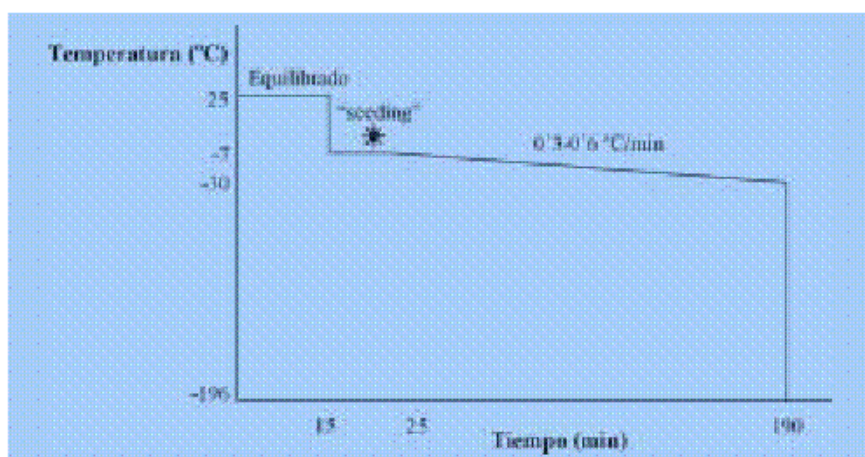
Después de la fase de equilibrado, los embriones son enfriados rápidamente desde la temperatura ambiente a 0°C. Posteriormente la temperatura desciende hasta aproximadamente -5°C, sin embargo, las células y el medio externo permanecen descongelados debido a que la presencia de solutos produce un descenso del punto de congelación. Esta

situación, que recibe el nombre de sobreenfriamiento, es altamente inestable y la formación de cristales puede iniciarse en cualquier momento (Mazur, 1990).

Cuando la temperatura desciende hasta -10°C aproximadamente se formaría hielo de manera espontánea, produciéndose un aumento brusco de la temperatura como consecuencia de la liberación del calor latente de fusión. Para evitar este fenómeno que es perjudicial para los embriones (Niemann, 1995), se induce la formación de hielo en el medio extracelular antes de que éste ocurra de manera espontánea. Esta maniobra se denomina "seeding" y se realiza entre los -5°C y -7°C aplicando unas pinzas enfriadas en nitrógeno líquido (-196°C) sobre la pajuela que contiene los embriones o de forma programada en un biocongelador (Maurer, 1978). Sin embargo, el contenido intracelular permanece sin congelar gracias a que la membrana plasmática bloquea el crecimiento de cristales de hielo en el citoplasma. El agua, que permanece sobreenfriada, tiene un mayor potencial químico que el agua externa por lo que existe un flujo de agua hacia el exterior de las células. Además, cuando el agua externa cristaliza se forma hielo puro que deja a los solutos cada vez más concentrados en la fracción líquida restante y el medio extracelular es cada vez más hiperosmótico. Estos dos fenómenos provocan la salida de agua del embrión y una nueva contracción de los mismos (Mazur, 1984; Rall, 1992). Una vez que se ha iniciado la formación de cristales de hielo, tiene lugar un descenso lento y controlado de temperatura ($0.3-0.6^{\circ}\text{C}/\text{min}$) lo que permite a los embriones responder a los cambios de osmolaridad que se producen en el medio. Esta fase continúa hasta que no se producen más cambios de volumen en el embrión. Esto ocurre alrededor de los -30°C (Rall, 1992), momento en que los embriones se sumergen en nitrógeno líquido. En algunos protocolos, la inmersión en nitrógeno líquido se realiza a -70°C (Palma, 2001). Durante esta etapa de inmersión y la posterior conservación no existen cambios en el volumen de los embriones (Rall, 1992).

En un proceso programado de enfriamiento, a medida que el sistema de refrigeración extrae calor, la temperatura baja hasta alcanzar el punto eutéctico en el que la fase líquida restante y los solutos solidifican conjuntamente. Los fenómenos que ocurren dentro de las células van a depender de la velocidad de enfriamiento. Si ésta es suficientemente lenta, las células son capaces de perder suficiente cantidad de agua, manteniéndose en equilibrio el potencial químico del medio extra e intracelular. La célula se deshidrata y no existe formación de hielo intracelular. Sin embargo, si la velocidad es demasiado lenta, la deshidratación puede ser extrema, pudiéndose llegar al colapso celular. Si el enfriamiento es demasiado rápido, la célula no pierde suficiente agua y se forman grandes cristales de hielo en su interior. Por tanto, la supervivencia celular al proceso de congelación depende de la velocidad de enfriamiento óptima, que es una velocidad intermedia que permite la deshidratación adecuada de las células y que es específica para cada tipo celular (Mazur, 1984).

Figura 1. Esquema de la velocidad de enfriamiento en un protocolo de congelación equilibrada (Palma, 2001).



La temperatura a la que se detiene la congelación lenta y se produce la inmersión en nitrógeno líquido determina la velocidad de descongelación que será necesaria aplicar. En general los embriones congelados a -30°C se descongelan rápidamente ($300^{\circ}\text{C}/\text{min}$), ya que en el momento de la inmersión en el nitrógeno líquido aún queda agua intracelular. Este agua podría recrystalizar en el intervalo crítico de temperatura (-7°C a -5°C) si la descongelación es demasiado lenta (Polge y cols., 1974). Por el contrario, los embriones que durante su congelación fueron enfriados lentamente hasta aproximadamente -70°C están mucho más deshidratados y tienen menor riesgo de sufrir recrystalización al realizar una descongelación lenta ($20^{\circ}\text{C}/\text{min}$) (Whittingham, 1980).

La descongelación de los embriones se realiza en aire a temperatura ambiente e inmersión de las pajuelas en agua atemperada generalmente a 38°C (Rall, 1992). Inmediatamente después de la descongelación, los crioprotectores deben ser eliminados para evitar el choque osmótico sobre el embrión. En principio, la extracción del crioprotector se puede realizar de manera escalonada, colocando los embriones sucesivamente en concentraciones decrecientes del crioprotector. De esta manera el crioprotector se extrae de forma lenta y progresiva y la rehidratación de las células ocurre de forma simultánea (Aller y cols., 1995). Otro sistema es extraer el crioprotector empleando soluciones de sacarosa, los crioprotectores permeables difunden pasivamente a través de las membranas del embrión mientras que la sacarosa actúa como contra-fuerza osmótica restringiendo el movimiento de agua y por tanto el choque osmótico (Fahning y García, 1992).

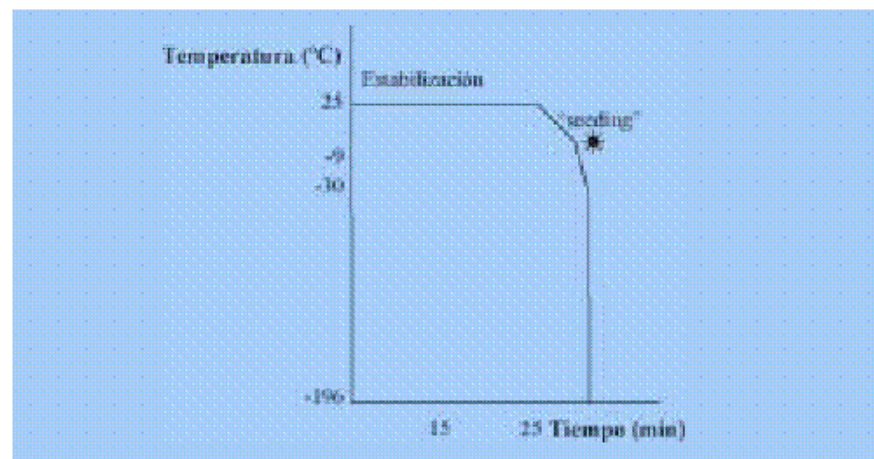
2.2. Congelación no equilibrada

Este término se emplea para designar procesos de congelación en los cuales las células en el momento de la congelación no están en equilibrio osmótico con el medio.

2.2.1. Congelación ultra-rápida

En este sistema se emplean concentraciones de crioprotectores permeables e impermeables muy elevadas y velocidades de congelación muy rápidas. Estas elevadas concentraciones de crioprotectores causan una rápida deshidratación del embrión y la congelación tiene lugar antes de que éste alcance el equilibrio osmótico con el medio. Es una congelación porque existe cristalización del agua intra y extracelular.

Figura 2. Curva de temperatura en un protocolo de congelación ultra-rápida (Palma, 2001).



En la congelación ultra-rápida (Figura 2) los embriones son deshidratados parcialmente como se ha descrito para la congelación equilibrada durante una fase de estabilización en presencia de crioprotectores. Posteriormente se someten a otra solución deshidratante que consiste en una mezcla de 2 a 4'5M de un crioprotector permeable y de un soluto impermeable, generalmente un azúcar como la sacarosa, trehalosa o galactosa (Shaw y cols., 1991; Rayos y cols., 1992). Esta segunda deshidratación permite congelar a los embriones rápidamente. Normalmente el enfriamiento se produce mediante exposición de las pajuelas a los vapores del nitrógeno líquido. Es importante que la velocidad de enfriamiento sea la adecuada de modo que el agua cristalice sin que tenga lugar el aumento de temperatura relacionado con el cambio de fase. Durante la congelación rápida, la formación de cristales de hielo en el medio extracelular provoca una nueva deshidratación como se ha descrito anteriormente. Este sistema ha sido utilizado con éxito para congelar embriones humanos (Trounson, 1986), embriones de animales de laboratorio (Takeda y cols., 1984; Takashi y Kanagawa, 1990; Zuh y cols., 1990) y embriones bovinos (Bui-Xuan-Nguyen y cols., 1984; Chupin, 1987). Sin embargo su aplicación ha sido muy limitada.

2.2.2. Vitrificación

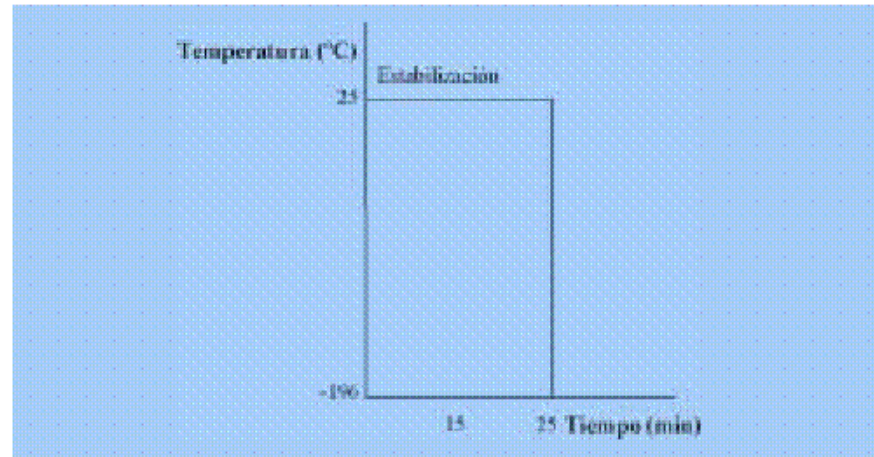
En 1985 Rall y Fahy introdujeron la vitrificación como un sistema para criopreservar embriones. Se trata de un sistema no equilibrado, pero no es una congelación propiamente dicha ya que no existe formación de cristales de hielo. La vitrificación es el rápido enfriamiento de un medio líquido en ausencia de formación de cristales de hielo. La solución se transforma en un estado sólido no estructurado similar al vidrio, de donde la técnica toma su propio nombre. Este vidrio estable y amorfo conserva la distribución iónica y molecular de una solución acuosa en un estado viscoso y superenfriado (Rall, 1987; Bautista y Kanagawa, 1998). La vitrificación tiene lugar mediante el enfriamiento muy rápido (Figura 3) de una solución con altas concentraciones de crioprotectores.

La primera condición para la vitrificación es el enfriamiento muy rápido, por lo que la vitrificación se realiza con volúmenes pequeños de muestra envasados tradicionalmente en una pajuela de 0'25 ml que se sumerge directamente en nitrógeno líquido, alcanzando una velocidad de enfriamiento de 2.500°C/min (Rall, 1987). Recientemente se han desarrollado nuevos sistemas de vitrificación y nuevos contenedores de embriones que consiguen incrementar esta velocidad de enfriamiento (Martino y cols., 1996; Vajta y cols., 1997a; Arav, 1998). Debido a que la concentración de crioprotectores necesaria para la vitrificación es muy elevada, su toxicidad es un punto importante a considerar. Uno de los principales objetivos es diseñar soluciones efectivas para la vitrificación que no sean tóxicas para las células (Vajta, 2000). Los métodos para minimizar los efectos tóxicos de los crioprotectores incluyen la elección del crioprotector adecuado, la vitrificación de los embriones en dos pasos, el equilibrado a bajas temperaturas, periodos de equilibrado cortos o el uso de sustancias como la sacarosa, trehalosa y formamida que disminuyen la toxicidad de la solución de vitrificación (Massip, 2001).

Teniendo en cuenta que la vitrificación no es una congelación ya que no existe cristalización del agua, la terminología empleada es diferente. Así cuando se habla de llevar el material biológico vitrificado de nuevo a la temperatura ambiente de laboratorio se emplea el término "calentar" y no "descongelar". Por otro lado, la "desvitrificación" no es el paso de la temperatura de vitrificación a la temperatura fisiológica para las células, sino que se refiere a la salida del estado vítreo pasando al estado cristalino, hecho que hay que evitar ya que es perjudicial para la viabilidad celular y embrionaria (Capdevielle, 1996).

Los protocolos de vitrificación incluyen una primera fase de estabilización en la que los embriones se deshidratan en presencia de altas concentraciones de crioprotectores permeables y no permeables. Durante esta etapa los embriones se contraen como consecuencia de la pérdida de agua intracelular (Rall, 1992). Posteriormente, los embriones se exponen a la solución de vitrificación en la que la concentración de crioprotectores es aún mayor, se procede al envasado y a su inmersión directa en nitrógeno líquido. El sistema de calentamiento es rápido y, al igual que en la congelación equilibrada, es necesario eliminar los crioprotectores para evitar un efecto tóxico sobre los embriones.

Figura 3. Curva de temperatura en un protocolo de vitrificación (Palma, 2001).



3. Congelación de embriones porcinos

3.1. Congelación equilibrada

Los sistemas de congelación equilibrada o congelación lenta se aplican en la actualidad con éxito en numerosas especies de mamíferos (Dobrinisky, 2002; Leibo y Songsasen, 2002). Sin embargo estos sistemas no han proporcionado resultados favorables con embriones porcinos. La viabilidad embrionaria *in vitro* obtenida tras la criopreservación de embriones mediante los sistemas de congelación lenta es muy variable (0-50%), (Kashiwasaki y cols., 1991; Cameron y cols., 1992; Fujino y cols., 1993; Mödl y cols., 1996; Nagashima y cols., 1994, 1999) y se encuentra influenciada por el estadio de desarrollo embrionario. Así, la tasa de viabilidad de blastocistos eclosionados tras la congelación y descongelación es más elevada y los resultados más constantes que los obtenidos con embriones en estadios más tempranos de desarrollo. Se ha demostrado que el empleo de ciertos tratamientos como el equilibrado con citocalasina, la centrifugación a 13.000-15.000 g (Dobrinisky y cols., 2000) o la eliminación de la fase lipídica de los embriones mediante micromanipulación antes de la congelación, permite la supervivencia de embriones de 2 a 8 células (Nagashima y cols., 1994) y mejora los resultados obtenidos *in vitro* con mórulas y blastocistos.

La transferencia de embriones congelados con los sistemas equilibrados ha proporcionado resultados desalentadores (Tabla 2). Únicamente se han realizado 18 transferencias con embriones porcinos congelados mediante sistemas equilibrados (Berthelot y cols., 2003), de las que se han obtenido solamente 2 lechones a partir de la transferencia de embriones con zona pelúcida intacta sin pretratamientos (Kosarcic y cols., 1995). Estos resultados obtenidos *in vivo* son mucho más pobres que los que se podrían esperar a partir de los resultados obtenidos *in vitro*. Sin embargo, pese a los malos resultados, estas experiencias demostraron que es posible criopreservar los embriones de esta especie, aunque ninguno de los protocolos de congelación equilibrada probados resulta eficiente para su aplicación práctica.

Tabla 2. Desarrollo *in vivo* de embriones porcinos congelados mediante sistemas de congelación lenta (Berthelot y cols., 2003).

Estado de desarrollo	Concentración de crioprotectores	Tratamiento	N° de gestaciones / N° de transferencias	Lechones / N° embriones transferidos	
2-4 células	1'5 M P+ 0'1 M S	Centrifugación + delipidación	1/1	3/39	Nagashima y cols. (1985)
Mórula	1'5 M G	Na	1/3	2/42	Kasario y cols. (1985)
Blastocisto expandido	1'5 M G + yema de huevo	Na	0/2	0/30	Fujino y cols. (1983)
Eclasionada	1'5 M G + yema de huevo	Na	1/4	1/27	Fujino y cols. (1983)
Eclasionada	1'5 M G	Na	2/7	8/141	Madl y cols. (1986)
Eclasionada	1'5 M G	Na	1/1	4/32	Kashiwazaki y cols. (1991)

P: Propandiol; S: Sacarosa; G: Glicerol.

3.2. Vitrificación

Se distinguen dos sistemas de vitrificación: la vitrificación tradicional en la que se emplean pajuelas convencionales de 0'25 ml, consiguiéndose una tasa de enfriamiento de 2.500 °C/min (Mazur y Cole, 1992; Rall y Fahy, 1985) y los sistemas de vitrificación ultrarápida en los que la velocidad de enfriamiento es superior.

3.2.1. Vitrificación en pajuelas de 0'25 ml.

Los protocolos de vitrificación consisten en un equilibrado de los embriones con altas concentraciones de crioprotectores y su inmersión directa en nitrógeno líquido (Vajta, 2000). La elevada velocidad de enfriamiento que se alcanza en este sistema presenta la ventaja de permitir un paso rápido del intervalo crítico de temperatura lo que reduce el daño de los embriones por el frío (Rall, 1987; Weber y cols., 1992; Dobrinsky y Johnson, 1994).

La vitrificación de embriones porcinos fue descrita por primera vez por Dobrinsky y cols. (2001a). Estos autores emplearon pajuelas de 0'25 ml y embriones en estadio de blastocisto, el protocolo incluía tratamientos previos a la vitrificación y posteriores al calentamiento con citocalasina B y pronasa, respectivamente. Los resultados obtenidos *in vitro* (Tabla 3) con los sistemas de vitrificación tradicional mostraron que un pretratamiento de los embriones con citocalasina B mejora la viabilidad embrionaria postdescongelación, ya que depolimeriza los microfilamentos y reduce los daños sufridos por el citoesqueleto durante el equilibrado en presencia de los crioprotectores y la vitrificación (Dobrinsky y cols., 1997b).

Tabla 3. Desarrollo *in vitro* de embriones porcinos vitrificados en pajuelas de 0'25 ml (Berthelot y cols., 2003).

Estado de desarrollo	Concentración de crioprotectores	Tratamiento	Nº de embriones evaluados	Supervivencia %	
2-4 células	7M EG + 1M S	Centrifugación Delipideación	17	50	Negashima y cols. (1998)
2-4 células	7M EG + 1M S	Centrifugación	17	8	Negashima y cols. (1998)
Blastocista	8'5M G + BSA	Na	58	0	Dabrinsky y Johnson (1994)
Blastocista temprana	8'5M G + BSA	Citocalasina	17	8	Dabrinsky y cols. (1997a)
Blastocista	8M EG + 7% PVP	Na	128	23	Kabayashi y cols. (1998b)
Blastocista	8'5M G + BSA	Na	84	27	Dabrinsky y Johnson (1994)
Blastocista	8'5M G + BSA	Citocalasina	25	80	Dabrinsky y cols. (1997a)
Blastocista	8M EG + 7% PVP	Na	108	54	Kabayashi y cols. (1998b)
Blastocista eclosionada	8'5M G + BSA	Na	84	38	Dabrinsky y Johnson (1994)
Blastocista eclosionada	8'5M G + BSA	Citocalasina	70	74	Dabrinsky y cols. (1997a)
Blastocista eclosionada	8M EG + 7% PVP	Na	131	35	Kabayashi y cols. (1998b)

EG: Etilenglicol; G: Glicerol; S: Sacarosa; BSA: Albúmina sérica bovina; PVP: Polivinilpirrolidona.

Un total de 1.278 embriones vitrificados mediante el sistema tradicional (pajuelas de 0'25 ml) han sido transferidos a 46 recipientes dando como resultado el nacimiento de 125 lechones (Berthelot y cols., 2003; Tabla 4). Los mejores resultados se han obtenido empleando citocalasina B y eliminando la zona pelúcida después del calentamiento con pronasa (Dobrinsky, 2001b). Sin embargo se ha establecido que los embriones eclosionados no son aptos para el comercio y transporte internacional al estar desprotegidos de la zona pelúcida y ser susceptibles de transportar agentes patógenos (Stringfellow y Seidel, 1998). Por este motivo, las investigaciones se centran en la vitrificación de embriones sin tratamientos previos. Únicamente existe una referencia del nacimiento de descendencia a partir de blastocistos no eclosionados vitrificados en pajuelas de 0'25 ml (Kabayashi y cols., 1998a).

Tabla 4. Desarrollo *in vivo* de embriones porcinos vitrificados en pajuelas de 0'25 ml (Berthelot y cols., 2003).

Estado de desarrollo	Concentración de crioprotectores	Tratamiento	Nº de gestaciones Nº de transferencias	Lechones / Nº Embriones transferidos	
Blastocisto	6'5 M G + BSA	Citocalsina Centrifugación Pranasa	8/11	61/330	Dabrinsky y cols. (2001)
Blastocisto expandido	6 M G + 7% PVP	No	1/1	4/20	Kabayashi y cols. (1998b)
Pari-hatching	6 M EG + 7% PVP	No	0/2	0/44	Kabayashi y cols. (1998b)
Pari-hatching	6 M EG + 7% PVP	No	3/15	11/338	Kabayashi y cols. (1998a)
Eclasionada	6'5 M G + BSA	Citocalsina	2/5	10/185	Dabrinsky y cols. (1998)
Eclasionada	6'5 M G + BSA	Citocalsina	6/12	38/361	Dabrinsky y cols. (2000)

EG: Etilenglicol; G: Glicerol; BSA: Albumina sérica bovina; PVP: Polivinilpirrolidona.

3.2.2. Vitrificación ultra-rápida

Los trabajos mencionados anteriormente fueron el origen de la vitrificación de embriones en la especie porcina. A partir de entonces se han realizado numerosas experiencias con el fin de optimizar y simplificar la técnica, para que pueda aplicarse en un futuro de forma rutinaria. Las investigaciones se han centrado en la simplificación de los protocolos, en minimizar la manipulación de los embriones y en el desarrollo de sistemas de vitrificación ultra-rápida que permiten velocidades de congelación mucho más elevadas, reduciendo así el daño por frío.

La velocidad de enfriamiento depende de varios factores tales como el volumen de medio en el que están suspendidos los embriones, el diámetro del envase de los mismos y del contacto más o menos directo entre el nitrógeno líquido y el medio que contiene los embriones. El sistema "Open Pulled Straw" (OPS) consiste en el empleo de pajuelas de 0'25 ml adelgazadas que se sumergen en el nitrógeno líquido sin sellar, lo que, unido al reducido volumen de vitrificación (2 ml), supone una velocidad de enfriamiento de 18.000°C/min (Vajta y cols., 1997a, 1998, 2000). La viabilidad *in vitro* obtenida tras la vitrificación con el sistema OPS (Tabla 5) es aparentemente superior a la obtenida mediante la vitrificación clásica (Tabla 6). Mediante este procedimiento se ha conseguido por primera vez vitrificar con éxito embriones en estadio de mórula (Vajta y cols., 1997c; Berthelot y cols., 2000).

Tabla 5. Desarrollo *in vitro* de embriones porcinos vitrificados con el sistema DPS (Berthelot, 2003).

Estado de desarrollo	Concentración de crioprotectores	Tratamiento	N.º de embriones evaluados	Supervivencia %	
Mórula	3'2M EG + 2'5M DMSO + 0'8M S	Na	10	70	Vajta y cols. (1997c)
Mórula	3'2M EG + 2'5M DMSO + 0'8M S	Na	118	12	Berthelot y cols. (2000)
Mórula	8 M EG + 7% PVP	Citocalesina Centrifugación	77	71	Beaba y cols. (2002)
Blastocista	3'2M EG + 2'5M DMSO + 0'8M S	Na	29	87	Vajta y cols. (1997c)
Blastocista	8 M EG + 7% PVP	Citocalesina	25	0	Beaba y cols. (2000)
Blastocista	8 M EG + 7% PVP	Citocalesina Centrifugación	30	77	Beaba y cols. (2000)
Blastocista expandida	3'2M EG + 2'5M DMSO + 0'8M S	Na	59	71	Halm y cols. (1999)

EG: Etilenglicol; DMSO: Dimetilsulfóxido; S: Sacarosa; PVP: Polivinilpirrolidona (g/l).

Tabla 6. Desarrollo *in vivo* de embriones porcinos vitrificados con el sistema DPS. (Berthelot y cols., 2003; modificado).

Estado de desarrollo	Concentración de crioprotectores	Tratamiento	N.º de gestaciones N.º de transferencias	Lechones / N.º Embriones transferidos	
Mórula	3'8M EG + 2'5M DMSO + 0'8M S	Na	8/10	28/200	Berthelot y cols. (2002)
Mórula	8M EG + 7% PVP	Citocalesina Centrifugación Dezonación	3/4	18/115	Beaba y cols. (2003)
Blastocista	8 M EG + 7% PVP	Citocalesina Centrifugación Dezonación	1/5	5/180	Cameron y cols. (2000)
Blastocista	3'2M EG + 2'5M DMSO + 0'8M S	Na	11/20	38/400	Berthelot y cols. (2000)
Blastocista	3'2M EG + 2'5M DMSO + 0'8M S	Na	8/10	59/200	Berthelot y cols. (2001)
Blastocista	8M EG + 7% PVP	Citocalesina Centrifugación Dezonación	17/20	123/588	Cameron y cols. (2004)
Blastocista expandida	3'2M EG + 2'5M DMSO + 0'8M S	Na	0/11	0/257	Halm y cols. (1999)

EG: Etilenglicol; DMSO: Dimetilsulfóxido; S: Sacarosa; PVP: Polivinilpirrolidona.

Asimismo, el sistema OPS ha permitido la obtención de excelentes tasas de gestación y parto (Tabla 6) tras la transferencia de embriones porcinos vitrificados/calentados no eclosionados y sin tratamientos previos (Berthelot, 2000, 2001, 2002) y el nacimiento de lechones a partir de la transferencia de mórulas vitrificadas por primera vez (Berthelot y cols., 2001). Además, este sistema permite obtener una tasa de partos del 90% y una tasa de supervivencia del 30% (Berthelot y cols., 2002), sin necesidad de tratar a los embriones previamente a la vitrificación.

Recientemente, se han desarrollado otros sistemas de vitrificación ultra-rápida que permiten aumentar la velocidad de enfriamiento. El sistema Vit-Master (Minitübe, Alemania) permite enfriar el nitrógeno líquido hasta una temperatura entre -205 y -210°C , lo que supone una velocidad de congelación de unos $100000^{\circ}\text{C}/\text{min}$ con pajuelas de $0,25$ ml. Además se han desarrollado otros envases para embriones que permiten una vitrificación ultra-rápida como las pajuelas SOPS (velocidad de enfriamiento de $36.000^{\circ}\text{C}/\text{min}$) que tienen la mitad de calibre que las pajuelas OPS, el empleo de gradillas de microscopía electrónica, la técnica "cryoloop" o la microgota que ofrecen muy buenas expectativas.

4. Factores que afectan a la viabilidad embrionaria postdescongelación

4.1. Crioprotectores y soluciones de congelación

La adición de sustancias crioprotectoras a los medios de congelación y vitrificación es esencial para prevenir el daño celular a bajas temperaturas. Sin embargo estos compuestos pueden ser perjudiciales para la viabilidad embrionaria debido a su efecto tóxico y los daños osmóticos que pueden ocasionar (Weber y Youngs, 1994).

Los protocolos de criopreservación de embriones emplean principalmente tres clases de crioprotectores: 1) Crioprotectores permeables de bajo peso molecular (<50.000 Daltons) como el metanol, etilen-glicol, propanodiol, dimetilsulfóxido, glicerol y otros alcoholes. 2) Crioprotectores no permeables de bajo peso molecular tales como la galactosa, glucosa, sacarosa, trehalosa y otros azúcares. 3) Crioprotectores no permeables de alto peso molecular (>50.000 Daltons) como la polivinilpirrolidona, polivinil alcohol, hidroxietil-starch, hialuronidato sódico y otros polímeros (Palasz y Mapletoft, 1996).

Aunque el efecto crioprotector de algunos de estos compuestos no se conoce, cada uno de los grupos de crioprotectores desempeña un papel diferente durante el proceso de criopreservación. Los crioprotectores permeables de bajo peso molecular son capaces de penetrar en el embrión a través de la membrana, aunque su permeabilidad es menor que la del agua. Su función es sustituir el agua del interior de las células antes de la congelación, minimizar los cambios de volumen que sufren las células durante la congelación e impedir la formación de cristales de hielo intracelulares (Miyake y cols., 1993). Los crioprotectores no permeables no son crioprotectores propiamente dichos, ya que no penetran en el embrión. Ejercen su función principalmente en procesos de congelación rápida, promoviendo la deshidratación de las células. Los crioprotectores de elevado peso molecular prote-

gen a los embriones de la formación de cristales de hielo, alteran el proceso de cristalización durante la congelación, de manera que los cristales que se forman son de tamaño y forma inocuos (Sommerfeld y Niemann, 1999).

Dependiendo de la permeabilidad del crioprotector utilizado y de su toxicidad, la adición se realiza a 37°C o a temperatura ambiente. Asimismo, los crioprotectores pueden añadirse o extraerse en varios pasos, aumentando o disminuyendo la concentración de crioprotector, lo que reduce el estrés osmótico sobre las células. Si la adición o la extracción se realiza en un paso, se reduce el tiempo de exposición de las células al crioprotector y, por tanto, el riesgo de toxicidad.

La congelación de embriones mediante técnicas tradicionales de congelación (congelación lenta o equilibrada) emplea un único tipo de crioprotector, generalmente el glicerol, etilen-glicol o propanodiol (Schneider, 1986; Suzuki y cols., 1990; Voelkel y Hu, 1992). Sin embargo, la vitrificación utiliza una mezcla de crioprotectores que incluye generalmente el glicerol, el etilen-glicol o propanodiol en combinación con sacarosa, trehalosa o galactosa (Palasz y Mapletoft, 1996). Es sabido que los crioprotectores tienen efectos diferentes sobre las células. Así, los polialcoholes regulan la deshidratación y protegen las estructuras proteicas, mientras que los disacáridos como la trehalosa estabilizan la estructura de las membranas. Las diferentes propiedades de los crioprotectores hacen pensar que la solución crioprotectora más efectiva debe ser una combinación de varios de ellos. Los crioprotectores más empleados hasta la década de los 90 fueron el DMSO y el propilenglicol. En la actualidad el etilenglicol es el crioprotector más común ya que ha demostrado ser menos tóxico que otros crioprotectores (Sommerfeld y Niemann, 1999). Fue empleado por primera vez por Miyamoto e Ishibashi en 1977 y 1978 (Massip 2001). Su bajo peso molecular (62'07) hace que sea muy permeable, lo que permite eliminar la dilución del crioprotector en varios pasos (Bracke y Niemann, 1995). Además, su elevada permeabilidad hace que el tiempo de exposición de los embriones al crioprotector pueda ser menor, disminuyendo así su efecto tóxico (Saha y cols., 1996a).

Existen pocas investigaciones sobre el efecto de los crioprotectores sobre los embriones porcinos. Aunque los trabajos realizados sugieren que ciertos crioprotectores son tóxicos (Weber y cols., 1992) y que dicha toxicidad varía entre crioprotectores (Weber y Youngs, 1994), es necesario continuar investigando para determinar la combinación de crioprotectores más efectiva para los embriones de esta especie. Además de los crioprotectores, se ha demostrado que la solución base en la que éstos están diluidos y la temperatura de incubación (Vajta 1996, 1999; Berthelot 2000) afectan a la viabilidad de los embriones porcinos vitrificados (Berthelot, 2000). El medio para la dilución de los crioprotectores suele ser una solución tampón con un pH estable entre 7'2 y 7'4. Aunque la solución fosfatada de Dulbecco (PBS) es la más comúnmente empleada, otros medios de cultivo de embriones como el TCM-199 o simplemente una solución salina fisiológica también se han utilizado con éxito (Palasz y Mapletoft, 1996).

4.2. Estado de desarrollo embrionario

Los embriones porcinos son extremadamente sensibles a las bajas temperaturas. Esta sensibilidad parece estar relacionada con su estado de desarrollo (Pollard y Leibo, 1994). El efecto del estado de desarrollo del embrión sobre la supervivencia de los embriones congelados ha sido confirmado en varios estudios (Cameron y cols., 1992; Dobrinsky y Johnson, 1994). De estas investigaciones se desprende que el desarrollo del embrión hasta, al menos, el estado de blastocisto expandido es esencial para que los embriones puedan tolerar la congelación equilibrada sin micromanipulación ni tratamientos previos (Dobrinsky, 2002 y Berthelot 2003). Aunque la vitrificación ha mejorado los resultados obtenidos con embriones en estadios más tempranos de desarrollo, se observa una tendencia similar en cuanto a la tolerancia a la criopreservación (Dobrinsky y Johnson, 1994; Kobayashi y cols., 1995), siendo los blastocistos expandidos los embriones vitrificados que ofrecen mejores resultados de supervivencia *in vitro* e *in vivo* (Berthelot y cols., 2003).

En general, se ha sugerido que la sensibilidad al frío de los diferentes estadios de desarrollo de los embriones porcinos está relacionada con su contenido lipídico. Así, los embriones más tempranos contienen una gran cantidad de lípidos que van disminuyendo hasta el estado de blastocisto expandido y eclosionado (Torner y cols., 1986; Niemann, 1995). Quizá un cambio cualitativo en las células o una modificación en la utilización de los lípidos podría aumentar su tolerancia a las bajas temperaturas. Una forma de determinar si el contenido lipídico del embrión está relacionado con su sensibilidad al frío consiste en eliminar los lípidos antes del enfriamiento o la congelación; este proceso recibe el nombre de "delipidación" (Nagashima y cols., 1994; 1995). Este sistema consiste en centrifugar los embriones y eliminar las vesículas lipídicas mediante micromanipulación. Con este tratamiento, aproximadamente el 60% de los embriones porcinos de 8 células sobrevivió al enfriamiento a 4°C, sin embargo, ninguno de los embriones intactos (no tratados) sobrevivió a esta temperatura. Además, los embriones totalmente delipidados mostraron mejor viabilidad que los parcialmente delipidados (Nagashima y cols., 1994). Posiblemente estos embriones delipidados fueron capaces de sintetizar nuevos lípidos o los obtuvieron del medio en el momento que los necesitaron para su posterior desarrollo (Dobrinsky, 1996). Aunque esta experiencia muestra una mejora de la tolerancia a la criopreservación mediante delipidación, esta técnica supone la micromanipulación de los embriones y por tanto la perforación de su zona pelúcida, de modo que estos embriones no serían válidos para su transporte internacional (Stringfellow y Seidel, 1998).

4.3. Velocidad de enfriamiento y de descongelación

El efecto de la velocidad de enfriamiento sobre la viabilidad de los embriones porcinos criopreservados no ha sido estudiado con detenimiento. Este factor tiene más importancia en la congelación ultra-rápida y en la vitrificación que en los sistemas de congela-

ción equilibrada. En éstos últimos, la velocidad de congelación depende del momento en el que se alcanza el equilibrio osmótico y generalmente existe una velocidad adecuada para cada tipo celular.

Numerosos estudios indican que los embriones porcinos toleran mejor la vitrificación que los procedimientos de congelación lenta. Un incremento de la velocidad de enfriamiento disminuiría el daño por frío al limitar el tiempo de exposición de los embriones al intervalo entre 15°C y -5°C que es crítico para su viabilidad (Rall, 1987; Dobrinsky y Johnson, 1994) y a su vez podría permitir una reducción de la concentración de crioprotectores empleados en la vitrificación (Vajta, 2000).

La vitrificación tradicional emplea pajuelas de 0'25 ml en las que la velocidad de enfriamiento es alrededor de 2.500°C/min (Rall, 1987). Con el fin de mejorar la eficiencia de la vitrificación se han desarrollado diferentes sistemas para aumentar la velocidad de enfriamiento, entre ellos el sistema "open pulled" OPS (Vajta y cols., 1998a). Este procedimiento consiste en el empleo de pajuelas de 0'25 ml adelgazadas, volúmenes de muestra de aproximadamente 2 ml y la inmersión directa en nitrógeno líquido, de esta forma la velocidad de enfriamiento es aproximadamente 20.000°C/min. Más recientemente, la velocidad de enfriamiento alcanzada con el sistema OPS se ha doblado mediante el uso de pajuelas SOPS con un diámetro interno aún inferior y una pared más delgada ("superfine open pulled straws": SOPS (Isachenko y cols., 2003a, 2003b) que las pajuelas OPS. Los resultados obtenidos con el sistema OPS son aparentemente mejores que los derivados del empleo de los sistemas de vitrificación tradicional (Berthelot y cols., 2003) por lo que se observa un efecto beneficioso de la velocidad de enfriamiento.

Recientemente se ha diseñado un sistema (Vit-Master®; Minitüb, Alemania) que permite un descenso de la temperatura de nitrógeno líquido hasta -210°C aplicando presión negativa (Arav, 1998). Este procedimiento incrementa la tasa de enfriamiento aproximadamente cuatro veces con relación a la que se alcanza con nitrógeno líquido normal (Arav y cols., 2002). Otros métodos como el uso de gradillas de microscopía electrónica (Martino y cols., 1996), el sistema de microgota (Papis y cols., 2000) o el cryoloop (Lane y cols., 1999), permiten un contacto aún más directo entre los embriones y el nitrógeno líquido, y por tanto la velocidad de enfriamiento durante la vitrificación es mayor. Sin embargo, únicamente se ha aplicado en embriones porcinos el sistema de microgota (Misumi y cols., 2003) que ha demostrado ser más eficiente que la vitrificación en pajuelas de 0'25 ml. No obstante, las experiencias realizadas con estos procedimientos y embriones porcinos han sido muy limitadas y es necesario continuar las investigaciones para determinar si el aumento de la velocidad de enfriamiento durante la vitrificación tiene un efecto positivo sobre la viabilidad embrionaria.

La velocidad de descongelación en la congelación tradicional, como se ha indicado anteriormente, depende de la temperatura a la que se produce la inmersión en nitrógeno líquido durante la congelación. Cuanto menor sea esta temperatura, el grado de deshidratación del embrión es mayor, por lo que permite una descongelación más lenta sin peligro de recristalización. En la vitrificación, el calentamiento siempre es rápido para evitar que el agua vitrificada cristalice en el intervalo crítico de temperatura (Palma, 2001).

5. Alteraciones celulares durante la congelación

Los procesos de congelación y vitrificación pueden alterar de forma importante la organización celular. Los cambios más importantes se deben al efecto mecánico de los cristales de hielo que se forman en la congelación, a los cambios osmóticos que tienen lugar durante estos procesos y al efecto tóxico de los crioprotectores (Vajta, 2000).

5.1. Alteraciones de los lípidos

Polge (1977) fue el primero en señalar que el daño embrionario producido por el frío estaba relacionado con un cambio en la fase lipídica de la membrana plasmática de los blastómeros. Los cambios que tienen lugar en los lípidos de membrana asociados a los cambios de temperatura suelen ser reversibles (Edidin y Petit, 1977). Sin embargo, durante la congelación, las proteínas pueden interactuar haciendo que estos cambios sean irreversibles.

El objetivo de diversas investigaciones ha sido evitar las alteraciones sufridas por la membrana citoplasmática durante la congelación. La adición de albúmina fetal bovina, que es un estabilizador de membrana, mejora el mantenimiento de la viabilidad de blastocistos porcinos expandidos y eclosionados tras la congelación (Nagashima y cols., 1988). Aunque Rubinsky y cols. (1992) sugirieron que las proteínas anticongelantes aisladas de ciertos peces del antártico preservan la estructura y la integridad de la membrana citoplasmática cuando están presentes en los medios de vitrificación, su uso en la criopreservación de embriones porcinos ha sido muy limitado. La trehalosa ha sido utilizada junto con glicerol en medios para la criopreservación de embriones porcinos (Cameron y cols., 1992); estabiliza las membranas citoplasmáticas y disminuye el choque osmótico durante la eliminación de los crioprotectores (Valdez y cols., 1991).

Los embriones porcinos presentan un elevado número de lípidos contenidos en vesículas y distribuidos por todo el citoplasma, estos lípidos son especialmente abundantes en los primeros estadios de su desarrollo (Norberg, 1976; Niimura e Ishida, 1980; Nagashima y cols., 1994) lo que parece estar relacionado, como se ha mencionado anteriormente, con la mayor sensibilidad al frío de los embriones tempranos. Se ha demostrado que la vitrificación produce ultraestructuralmente fragmentación de estas gotas lipídicas en blastocistos bovinos vitrificados. Sin embargo, a penas se conocen estas alteraciones en embriones porcinos.

5.2. Citoesqueleto

El citoesqueleto del embrión es una compleja red formada por componentes proteicos (microfilamentos de actina y microtúbulos de tubulina), distribuidos a lo largo del citoplasma de la célula (Albertini y cols., 1987; Dobrinsky, 1996). El citoesqueleto es responsable de la estructura tridimensional de la célula, regula su forma, sus movimientos y los

procesos de división celular. En general, durante la criopreservación los crioprotectores como el glicerol y el propilenglicol depolimerizan los microfilamentos y los microtúbulos del embrión. Esta depolimerización es un mecanismo para proteger los embriones durante la criopreservación y es reversible tras la descongelación, dilución de los crioprotectores, rehidratación y cultivo (Dobrinsky, 1996).

Los componentes del citoesqueleto de los embriones porcinos reaccionan de forma diferente a los crioprotectores que los embriones de otras especies (Dobrinsky, 1996). Los embriones porcinos desde el estadio de mórula al de blastocisto eclosionado sometidos a altas concentraciones de crioprotectores permanecen con los microtúbulos polimerizados.

Algunas soluciones empleadas para la vitrificación han resultado ser extremadamente tóxicas para los embriones (Weber y cols., 1992; Dobrinsky y Johnson, 1994). Se ha observado mediante técnicas de microscopía de fluorescencia que los embriones vitrificados que son dañados o destruidos por el proceso de criopreservación presentan importantes alteraciones en las membranas citoplasmáticas y citoesqueleto (Dobrinsky, 1996, 1997b, 2000). Bajo las altas concentraciones de glicerol que son necesarias para la vitrificación, los microtúbulos de los embriones desde el estadio de mórula hasta el estadio de blastocisto permanecen polimerizados durante el protocolo de vitrificación. Sin embargo, la respuesta de los microfilamentos a los crioprotectores es variable dependiendo del estadio de desarrollo del embrión. Antes de la congelación, los microfilamentos de mórulas y blastocistos tempranos se desorganizan estructuralmente por acción de los crioprotectores. Tras la descongelación y consiguiente rehidratación aparecen células lisadas, desintegración de las membranas y daño nuclear, los microfilamentos se repolimerizan de forma desorganizada y los microtúbulos presentan una intensidad de fluorescencia reducida. Sin embargo, cuando los embriones se someten únicamente a los equilibrados con los crioprotectores y no a las bajas temperaturas, se repolimerizan normalmente y los microtúbulos presentan una intensidad normal de fluorescencia. De esto se deduce que el daño irreversible que sufren los embriones en estadio de mórula y blastocisto temprano está ligado al enfriamiento hasta -196°C y no a la acción directa de los crioprotectores. En contraste, muchos de los blastocistos eclosionados empleados en estas experiencias presentaron microfilamentos polimerizados normalmente después de la rehidratación (Dobrinsky, 1996).

Con el fin de evitar las alteraciones del citoesqueleto debidas a la criopreservación se ha empleado citocalasina en los medios de vitrificación y rehidratación de los embriones. La citocalasina es un inhibidor de la formación de microfilamentos que bloquea la adición de monómeros necesaria para la formación de los microtúbulos, (Theodorophus y cols., 1994). Así inhibe la citoquinesis sin afectar la cariocinesis (Modlinski, 1980; Cuthbertson, 1983). Los tratamientos con citocalasina hacen que la membrana plasmática permanezca más elástica y de este modo los microfilamentos no se alteran durante la micro-manipulación de la célula. Con el fin de prevenir la alteración del citoesqueleto debida a la criopreservación se han realizado experiencias estabilizando el citoesqueleto de los embriones con citocalasina B (Dobrinsky y cols., 1997b, 2000; Prather y First, 1986). De este modo, protegiendo los componentes del citoesqueleto antes y después de la congelación, éstos se repolimerizarán adecuadamente. Sin embargo, la adición de citocalasina

no mejora la viabilidad de las mórulas y blastocistos tempranos tras la vitrificación aunque triplica la tasa de viabilidad *in vitro* obtenida tras la vitrificación de blastocistos expandidos y eclosionados (Dobrinsky y Jonson, 1994).

6. Transferencia de embriones porcinos

La industria porcina tiene un considerable interés por la criopreservación y transferencia de los embriones porcinos, ya que el uso conjunto de ambas tecnologías permitiría el almacenamiento y transporte de material genético de elevado valor con un riesgo mínimo de transmisión de enfermedades y a bajo coste en relación al manejo y transporte de animales adultos.

Los primeros nacimientos obtenidos a partir de la transferencia de embriones porcinos fueron descritos por Kvasnickii en el año 1951. A partir de este momento se realizaron numerosas experiencias con el fin de optimizar la técnica. En los años 60 las laparotomías se establecieron como el único medio posible para la recogida y TE (Hancock y Hovell, 1962; Dziuk, 1968). En 1968 se obtuvo la primera gestación mediante una transferencia vía no quirúrgica (Polge y Day, 1968). Sin embargo, pese a las expectativas que abrieron estos resultados, las investigaciones se vieron paralizadas por las grandes dificultades encontradas para desarrollar un sistema de transferencia no invasivo que fuera efectivo y por las limitaciones para cultivar y criopreservar a los embriones porcinos. El principal obstáculo para transferir los embriones vía no quirúrgica lo supone la compleja anatomía del útero de la cerda, debido a su largo y estrecho canal cervical y a la gran longitud y curvaturas de los cuernos uterinos.

En los años 90, la investigación sobre la transferencia no quirúrgica de embriones porcinos recibió un nuevo impulso con el desarrollo de sistemas para transferir embriones a cerdas receptoras vía no quirúrgica sin necesidad de anestesia. Empleando estos métodos se han obtenido tasas de gestación entre un 33% y un 64% y tamaños de camada de 3'1 a 6'7 lechones (Hazeleger y Kemp, 2001). Yonemura y cols. (1996) modificaron un catéter de inseminación artificial y transfirieron una media de 19 embriones por hembra en un volumen de medio de 50 ml. La tasa de partos obtenida fue de 64% y un tamaño medio de camada de 3,1 lechones. Hazeleger y Kemp (1994) diseñaron un catéter especial para realizar la transferencia mediante el cual depositaron los embriones a nivel del cuerpo del útero en un bajo volumen de medio. Transfiriendo de 28 a 30 blastocistos expandidos por cerda obtuvieron una tasa de gestación entre 46% y 71% y 11 fetos normales el día 32 de gestación. Empleando este sistema en condiciones de campo la tasa de gestación fue de un 41% y el tamaño medio de camada de 7'4 lechones (Ducro-Steeverink y cols, 2004).

Experiencias realizadas mediante transferencias quirúrgicas de embriones han estudiado el lugar más apropiado para la deposición de los embriones en el momento de la transferencia. Cuando se transfirieron blastocistos expandidos en el cuerpo del útero la tasa de gestación (12%) fue inferior a las obtenidas cuando los embriones fueron transferidos en la parte media (88%) o tercio anterior (82%) de un cuerno uterino (Wallenhorst y Holtz, 1999). Aunque los resultados obtenidos por estos autores en las transferencias

realizadas en el cuerpo del útero son extremadamente bajas y no se corresponden con transferencias no quirúrgicas realizadas a este mismo nivel (Galvin y cols., 1994; Li y cols., 1996; Hazeleger y Kemp, 1994; Hazeleger y Kemp, 1999), parece claro que el cuerno uterino es un lugar más apropiado para la deposición de los embriones. Recientemente se ha desarrollado un nuevo sistema para la transferencia no quirúrgica de embriones porcinos en el interior de un cuerno uterino en receptoras no sedadas (Martínez y cols., 2002, 2004). Empleando este procedimiento se ha alcanzado una tasa de gestación del 70'8% y un tamaño de camada de 6'9 lechones transfiriendo una media de 26 embriones frescos por receptora (Martínez y cols., 2004).

Hasta el presente se han obtenido lechones vivos mediante transferencia no quirúrgica de embriones frescos (Galvin y cols., 1994; Hazeleger y Kemp, 1994; Li y cols., 1996; Hazeleger y Kemp, 2001; Ducro-Steeverink y cols., 2001, 2004; Martínez y cols., 2004) y mediante transferencia quirúrgica de embriones vitrificados (Dobrinsky y cols., 2000, 2001a; Berthelot y cols., 2000, 2001, 2002; Beebe y cols., 2003; Cameron y cols., 2000; Kobayashi, 1998a, 1998b). Sin embargo, no se ha descrito la obtención de camadas mediante transferencia no quirúrgica de embriones vitrificados.

Material y métodos

1. Animales

1.1. Donantes de embriones

Se utilizaron como donantes de embriones cerdas nulíparas de raza Large White de una línea hiperprolífica (LWh) del INRA-Nouzilly (Francia) de 8 a 10 meses de edad y cerdas híbridas multiparas de 2 a 6 partos procedentes de una granja comercial (Dalland Hybrid ESPAÑA, Murcia, España). En ambos casos, las cerdas se alojaron en jaulas individuales en una nave con ventilación controlada y estuvieron sometidas al manejo rutinario de la granja. Las cerdas fueron alimentadas dos veces al día con una ración comercial y disponían de agua *ad libitum*.

1.2. Receptoras de embriones

Las cerdas receptoras de embriones fueron cerdas nulíparas de raza Meishan o LWh de 8 a 10 meses de edad sometidas a las mismas condiciones de alojamiento, manejo y alimentación que las cerdas donantes.

2. Reactivos químicos y medios

Todos los reactivos utilizados en este trabajo fueron de la marca Sigma Chemical Co. (España o Francia) si no se indica lo contrario.

Los medios se prepararon con agua bidestilada y purificada (Elgastat UHQPS, Elga, Inglaterra) en un ambiente controlado (cámara de flujo laminar horizontal, BH-100 de Teltar, España) y se esterilizaron con filtros de membrana de diámetro de poro de 0'22 mm (Sterivex GP, Millipore, España) con ayuda de un equipo de filtración (Steritop, Millipore, España).

3. Producción de embriones

En este trabajo se han utilizado embriones procedentes de donantes con estro espontáneo o inducido.

3.1. Detección del estro e inseminación artificial en donantes con estro espontáneo

La detección del estro se realizó una (Universidad de Murcia) o dos veces (INRA) al día con ayuda de un verraco y aplicando presión en el dorso de la cerda. Aquellas cerdas que presentaron reflejo de inmovilidad fueron diagnosticadas en estro. Las cerdas donantes de embriones se inseminaron artificialmente a las 12 y 24 horas del inicio del estro con

semen fresco procedente de verracos adultos de raza Pietrain de fertilidad probada. Las dosis empleadas para la inseminación artificial (IA) fueron de 3×10^9 espermatozoides diluidos hasta un volumen final de 100 ml con BTS (Beltsville Thawing Solution; Pursel and Johnson, 1975).

3.2. Inducción y detección del estro e inseminación artificial en donantes con estro inducido

Con el fin de sincronizar el estro, las donantes se trataron con 175 mg de Cloprostenol vía intramuscular (i.m.) (Planate®, Schering-Plough, Francia) dos veces al día (10:00 h y 16:00 h) el día 14 después de la detección del estro (D0: primer día de estro). La superovulación se estimuló mediante administración de 1.000 UI de eCG i.m. (Chrono-Gest®, Intervet, Francia) 24 h después de la segunda dosis de Cloprostenol. La ovulación se indujo con la administración de 500 UI de hCG i.m. (Chorulon®, Intervet, Francia) 48 h después del tratamiento con eCG. La detección del estro se realizó dos veces al día comenzando 16 h después del tratamiento con eCG, como se ha descrito anteriormente. Sólo las cerdas que presentaron signos de estro dentro de las 36 horas posteriores al tratamiento con hCG se seleccionaron como donantes y se inseminaron artificialmente como se ha indicado previamente.

4. Recogida de embriones

La recogida de embriones se realizó mediante lavado de los cuernos uterinos tras el sacrificio de las donantes o por vía quirúrgica.

4.1. Recogida de los embriones mediante sacrificio de las donantes

Las donantes se sacrificaron en un matadero experimental el día 5'5-6 del ciclo. Inmediatamente después del sacrificio y previamente al escaldado, se extrajeron los tractos genitales. Se realizó el recuento de los cuerpos lúteos presentes en los ovarios y se procedió al lavado de cada uno de los cuernos uterinos con 100 ml de solución salina (0'9% NaCl) enriquecida con un 2% de suero de ternero recién nacido (NBCS; Bio Whittaker, Francia). El medio de lavado se recogió en placas de Petri (Deltalab, España) y se procedió a la localización de los embriones con ayuda de un estereomicroscopio (SMZ-2T, Nikon, Japón) a 60 aumentos.

4.2. Recogida de los embriones vía quirúrgica

La recogida de los embriones vía quirúrgica se realizó mediante una laparotomía a las cerdas donantes el día 6 del ciclo. Las donantes fueron sedadas por administración de aza-

perona (Stresnil, Boehringer Ingelheim, Alemania; 2 mg/kg de peso vivo, i.m.). La anestesia general se indujo con tiopental sódico (Braun, Alemania; 7 mg/kg de peso vivo, intravenoso) y fue mantenida vía inhalatoria con halotano (Fluothane, Zeneca Pharma, Francia; 3.5-5%). Se realizó una incisión ventromedial para localizar el tracto genital. Una vez exteriorizado el útero y los ovarios, se procedió al recuento de los cuerpos lúteos y al lavado de la región anterior de cada uno de los cuernos uterinos con 30 ml de medio NCSU-23 (Peters y Wells, 1993) modificado (Tabla 7; medio básico de manejo de embriones: MB). El medio se recogió en tubos de 50 ml (Falcon, USA) cuyo contenido se vertió posteriormente en placas de Petri para proceder a la localización de los embriones como se ha descrito previamente. Los embriones se lavaron en MB, se colocaron en tubos eppendorff con 2ml de este mismo medio y se transportaron al laboratorio a 39°C en un incubador con temperatura controlada (BB-16, Heareus Instruments, Alemania). En el laboratorio los embriones se lavaron dos veces en MB y se mantuvieron en placas (Falcon, USA) con 2 ml este medio hasta el momento de la vitrificación.

Tabla 7. Composición del medio NCSU-23 modificado (medio básico de manejo de embriones: MB).

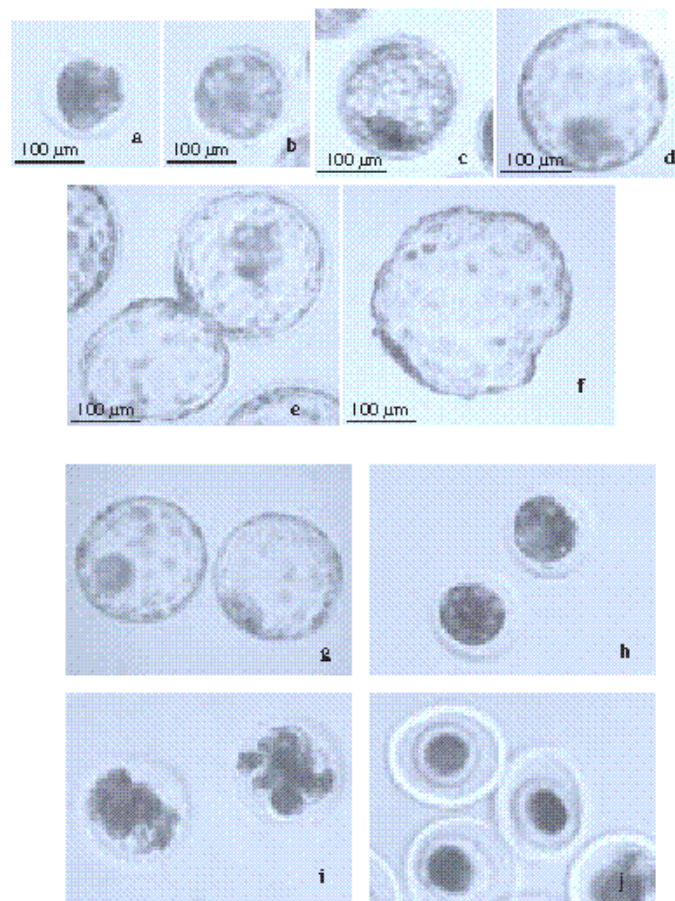
NaCl (mM)	131.80
KCl (mM)	4.78
CaCl ₂ · 2H ₂ O (Mm)	1.70
MgSO ₄ · 7H ₂ O (Mm)	1.19
NaHCO ₃ (Mm)	2
KH ₂ PO ₄ (Mm)	1.19
HEPES (Mm)	10
Glucosa (anhidra) (Mm)	5.55
Glutamina (Mm)	1
Taurina (Mm)	12
Penicilina G (mg/l)	85
Sulfato de Estreptamicina (mg/l)	50
Albumina sérica bovina (g/l)	4
pH	7.4
Osmolaridad	300-310 mOsm

4.3. Valoración de los embriones

Antes de proceder a la vitrificación, los embriones recogidos se evaluaron con ayuda de un estereomicroscopio y se clasificaron en función de su grado de desarrollo y calidad. Únicamente los embriones en estadio de mórula y blastocisto no eclosionado clasificados como excelentes o buenos según su morfología fueron utilizados en las experiencias. La calidad embrionaria se valoró atendiendo a las características morfológicas de los embriones observados con el estereomicroscopio. Los embriones fueron considerados como excelentes cuando su estado de desarrollo correspondía al día del ciclo en el que se realizó su recogida, no presentaban defectos aparentes y la zona pelúcida estaba intacta. Los

embriones clasificados como buenos tuvieron una morfología similar a los anteriores aunque contenían una pequeña cantidad de restos celulares o su morfología era ligeramente irregular. Los embriones con un desarrollo pobre teniendo en cuenta el día del ciclo en el momento de su obtención, deformes o con la mayoría de sus células anormales y los embriones de una célula fueron clasificados como embriones degenerados y ovocitos no fecundados respectivamente (Figura 4).

Figura 4. Clasificación de los embriones según su estadio de desarrollo (a-f) y de su calidad en función de sus características morfológicas (g-j): mórula (a), blastocisto temprano (b), blastocisto (c), blastocisto expandido (d), blastocisto en eclosión (e); blastocisto eclosionado (f); blastocistos excelentes (g), mórulas excelentes (h); embriones degenerados (i) ovocitos no fecundados (j).



5. Vitrificación

La vitrificación se realizó durante las 4 horas siguientes a la obtención de los embriones, siguiendo el protocolo descrito por Vajta y cols. (1998a) y modificado por Berthelot y cols. (2000), reduciendo las concentraciones de etilenglicol y dimetilsulfóxido en el segundo medio de vitrificación del 18% al 17%.

La vitrificación de los embriones se realizó en un laboratorio a temperatura ambiente (22-24°C) y la temperatura de los medios de vitrificación se mantuvo a 39°C durante todo el proceso con una placa termostática (HT300, Minitüb, Alemania). Las manipulaciones se realizaron con una pipeta de 10 ml (Eppendorf, Alemania) y con ayuda de un estereomicroscopio. El medio de dilución de los crioprotectores (TCMm; pH 7'7 y 295-300 mOsm) fue TCM199 Hepes enriquecido con un 20% de suero de ternero recién nacido. La composición de los medios de vitrificación se detalla en la tabla 8. Para el lavado y equilibrado de los embriones se utilizaron placas de cuatro pocillos (Nunc, Dinamarca) con gotas de 800 µl de cada uno de los medios.

Tabla 8. Composición de los medios de vitrificación y de dilución empleados en el calentamiento.

	V1	V2	D1	D2
	TCMm	TCMm	TCMm	TCMm
Etilenglicol (v/v)	7'5%	17%	-	-
Dimetilsulfóxido (v/v)	7'5%	17%	-	-
Sacarosa (M)	-	0'4	0'13	0'075
PH	7'8	7'9	7'7	7'7

- TCMm: TCM199 Hepes enriquecido con un 20% de suero de ternero recién nacido.

- V1 y V2: Primer y segundo medio de vitrificación.

- D1 y D2: Primer y segundo medio de dilución empleados en el calentamiento.

Los embriones, en grupos de 4 a 6, se lavaron dos veces en medio TCMm y posteriormente se introdujeron en el primer (V1) y segundo medio de vitrificación (V2) durante 3 y 1 minuto, respectivamente. Durante el último equilibrado, los embriones se colocaron en una gota de 1'5-2 ml de medio V2 y se envasaron por capilaridad en el extremo adelgazado de una pajuela OPS (open pulled straw; Minitüb, Alemania) o SOPS (superfine OPS; Minitüb, Alemania) (Figura 5). Una vez transcurrido el tiempo del segundo equilibrado se procedió a la inmersión directa de la pajuela en nitrógeno líquido.

Figura 5. Procedimiento de vitrificación seguido en las experiencias.

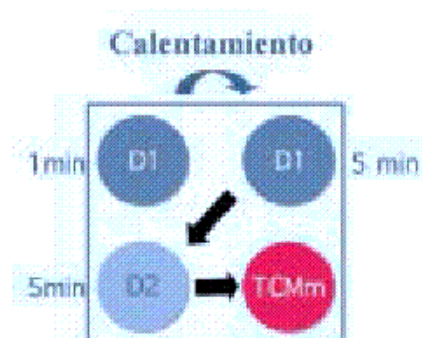


6. Calentamiento

El sistema de calentamiento utilizado fue el de varias etapas, descrito por Berthelot y cols. (2000). La composición de los medios de calentamiento figura en la tabla 8. Los sucesivos equilibrados se realizaron en placas de cuatro pocillos, iguales a las empleadas para la vitrificación, que contenían gotas de 800 µl de cada uno de los medios de dilución (D1 y D2) empleados en el calentamiento de los embriones.

Una vez extraída la pajuela del nitrógeno líquido, se mantuvo 2 segundos a temperatura ambiente y posteriormente el extremo adelgazado de la pajuela se sumergió en un pocillo que contenía medio D1. El medio ascendió en el interior de la pajuela calentando la columna de medio V2 que contenía los embriones, y éstos cayeron al pocillo por gravedad. Tras un minuto, los embriones se colocaron en otro pocillo con el mismo medio (D1) donde permanecieron 5 min. Posteriormente, los embriones se equilibraron en el segundo medio de calentamiento (D2) durante otros 5 min (Figura 6). Finalmente, los embriones se colocaron en un pocillo con TCMm y permanecieron en el interior de un incubador, a 39°C, 5% de CO₂ en aire y 95-100% de humedad relativa (BB-16, Heareus Instruments, USA), hasta el momento de su utilización.

Figura 6. Procedimiento de calentamiento de los embriones vitrificados.

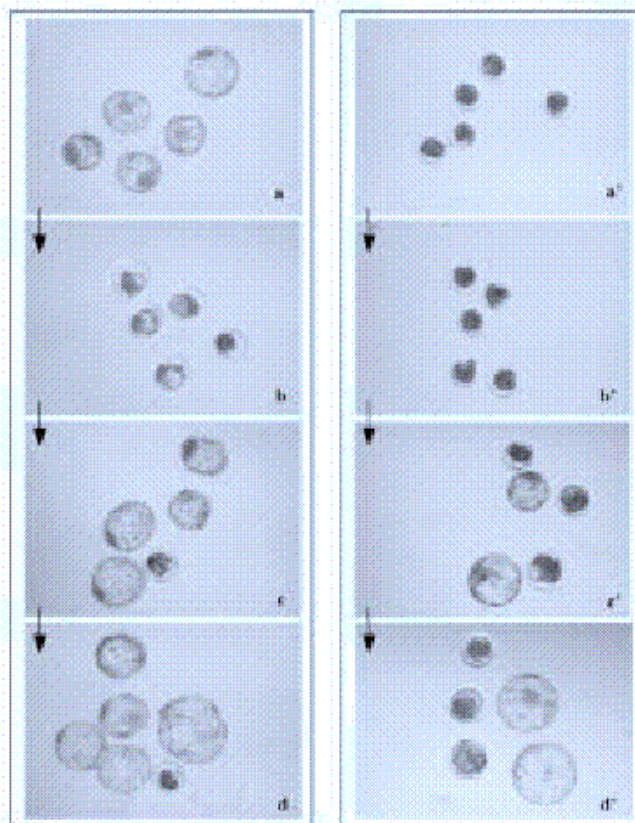


7. Cultivo *in vitro* de los embriones

El cultivo *in vitro* de los embriones se realizó en placas de 96 pocillos en gotas de 100 µl de TCM 199 enriquecido con 10% (v/v) de suero fetal de ternero, 1 mM de Glutamina, 50 mg/l de Penicilina G y 65 mg/l de Sulfato de estreptomicina. El cultivo se efectuó a 39°C, con 5% CO₂ en aire con humedad a saturación.

Durante el cultivo *in vitro* los embriones se examinaron con ayuda de un estereomicroscopio para estudiar su desarrollo (Figura 7). La viabilidad de las mórulas se evaluó en función de su capacidad para desarrollarse hasta el estadio de blastocisto. Los blastocistos vitrificados que reformaron su blastocelo después del calentamiento y aquellos blastocistos con zona pelúcida normal o adelgazada que mantuvieron una apariencia buena o excelente durante el cultivo fueron considerados viables. El porcentaje de supervivencia *in vitro* se calculó como la proporción de embriones viables con respecto al número total de embriones cultivados. El porcentaje de eclosión se determinó como el porcentaje de blastocistos eclosionados con respecto al total de embriones cultivados.

Figura 7. Blastocistos y mórulas frescos antes de la vitrificación (a y a'); blastocistos y mórulas vitrificados inmediatamente después del calentamiento (b y b') y su progresión a las 24 (c y c') y 48 horas (d y d') del cultivo *in vitro*. Nótese la contracción que sufren los embriones inmediatamente después del calentamiento y la posterior re-expansión de los embriones viables (c, c', d y d') que pueden llegar a eclosionar *in vitro* (d).

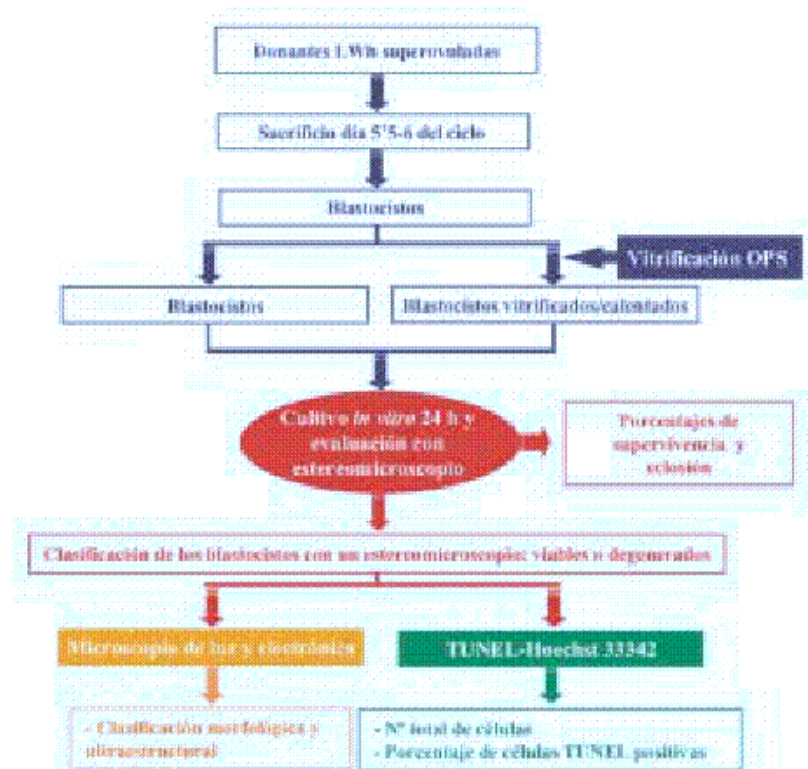


8. Diseño experimental

8.1. Experiencia 1. Estudio de la morfología y de los niveles de muerte celular de blastocistos porcinos vitrificados

Esta primera experiencia se desarrolló en los laboratorios del INRA-Nouzilly (Francia) y de la Universidad de Murcia. Este trabajo se diseñó con el objetivo de realizar un estudio cualitativo de la morfología y de los niveles de muerte celular de blastocistos porcinos frescos y vitrificados, y comparar estos métodos de evaluación con el método morfológico basado en la utilización de un estereomicroscopio.

Figura 8. Representación esquemática del diseño experimental de la experiencia 1.



El esquema experimental se representa en la figura 8. Las donantes de embriones fueron cerdas núlparas LWb ($n=9$) sincronizadas y superovuladas que se sacrificaron el día 5'5-6 del ciclo. Una vez recogidos los embriones, se seleccionaron únicamente aquellos que estaban en estado de blastocisto no eclosionado y que mostraron una morfología buena o excelente. Un grupo de embriones procedentes de cada una de las cerdas donantes no se vitrificó y se cultivó *in vitro* (embriones frescos: grupo control). El resto de los blastocistos se vitrificaron y calentaron (4 horas más tarde) siguiendo el método descrito previamente. Tanto los embriones frescos control ($n=29$) como los vitrificados/calentados

(n=125) se cultivaron *in vitro* durante un periodo de 24 h, al cabo del cual se efectuó la valoración de los mismos con ayuda de un estereomicroscopio, como se ha descrito en la metodología general, clasificándolos como viables o degenerados según sus características morfológicas. Los parámetros evaluados fueron los porcentajes de supervivencia y eclosión *in vitro*. Un grupo de blastocistos perteneciente a cada uno de los grupos de embriones (blastocistos frescos, blastocistos vitrificados viables y blastocistos vitrificados degenerados) se procesó para evaluar su ultraestructura mediante microscopía electrónica de transmisión (n=13; n=23 y n=9; respectivamente). Mientras que otro grupo de blastocistos procedentes de cada grupo de embriones fue teñido con Hoescht (H-33342) y TUNEL para determinar el número total de células y los niveles de muerte celular (n=16; n=25 y n=21; respectivamente).

8.11. Microscopía electrónica de transmisión

Los blastocistos se fijaron en una solución de glutaraldehído al 4% en una solución 0'1 M de tampón cacodilato (pH 7'2-7'4) durante 24 h a 4°C. Transcurrido el periodo de fijación los embriones se lavaron tres veces con tampón cacodilato 0'1M, posteriormente en una solución de agar al 3% y se post-fijaron en una solución de 2% de OsO₄ en tampón cacodilato durante 2 h a 20°C. Las muestras fueron deshidratadas mediante pases sucesivos en concentraciones ascendentes de etanol (70%, 96% y 99%) y embebidas en resina Epon. Las muestras se seccionaron para obtener cortes semifinos de 0'5 mm de espesor con un microtomo (Ultracut, Reichert-Jung, Austria). Los cortes semifinos se tiñeron con azul de toluidina y se observaron con un microscopio óptico (Alphaphot-2 YS2, Nikon, Japón) para realizar una primera valoración de los embriones mediante microscopía de luz. A continuación se realizaron cortes ultrafinos de 70 nm de espesor que se recogieron en gradillas de cobre y se contrastaron con 5% de acetato de uranilo (Prolabo, Francia) en agua destilada y 0'4% de citrato de plomo (Fluka, Francia) en NaOH 0'1 N. Los cortes ultrafinos se examinaron en un microscopio electrónico de transmisión (CM 10, Philips, Países Bajos y Zeiss EM/10CR, USA) para analizar de forma detallada la ultraestructura de los embriones.

8.12. Determinación de los niveles de muerte celular: Técnica TUNEL

Los núcleos con degradación del ADN se detectaron mediante la técnica de detección de muerte celular descrita por Byrne (1999) y Brison y Schultz (1997) (Terminal deoxynucleotidyl transferase Biotin-dUTP Nick end labeling: TUNEL) con mínimas modificaciones. Se empleó un kit comercial de detección de muerte celular *in situ* (In Situ Cell Death Detection Kit-Fluorescein, Roche, Alemania).

Los embriones se lavaron dos veces con PBS enriquecido con un 0'1% BSA (PBS-BSA) y se fijaron en una solución de 0'4% de paraformaldehído preparada en PBS durante 20 min a temperatura ambiente (20-25°C). Después de un lavado en PBS-BSA, los

embriones se permeabilizaron en una solución 0'5% de Triton X-100 durante 10 min, se lavaron en PBS-BSA con 0'5% de Tween durante 5 min y finalmente se equilibraron en PBS-BSA durante 10 min. Los embriones fijados y permeabilizados se subdividieron en grupo control positivo, grupo control negativo y grupo experimental. Los embriones de los grupos control fueron blastocistos frescos, estos embriones se incubaron con ADNasa I (50 Unidades internacionales/ml) en PBS-BSA durante 20 min a 38°C en la oscuridad para provocar la rotura de las cadenas de ADN. El grupo experimental (blastocistos frescos, vitrificados viables y vitrificados degenerados) no fue sometido a la incubación con ADNasa tipo I. Todos los grupos de embriones se lavaron en PBS-BSA con 0'5% de Tween durante 10 min a temperatura ambiente, el grupo control positivo y el grupo experimental fueron incubados en gotas de 10 ml que contenían la enzima terminal transferasa (TdT), Bromodioxiidina trifosfato (Br-dUTP) y anticuerpos específicos de Br-dUTP marcados con fluoresceína durante 1 h a 38°C en la oscuridad. El grupo control negativo fue incubado en las mismas condiciones pero las gotas no contenían enzima TdT.

Transcurrida una hora de incubación los embriones se lavaron en PBS-BSA durante 10 min a temperatura ambiente y se colocaron sobre un porta en gotas de 4 ml de una solución de Glicerol:PBS (3:1; v:v) con 10 mg/ml de Hoechst (H-33342). El Hoescht fue usado para teñir todos los núcleos. Finalmente los portas se mortaron con un cubreobjetos. Las muestras se evaluaron en un microscopio de fluorescencia (Eclipse E800, Nikon, Alemania), utilizando el objetivo de 100x y un filtro con 465-495 nm y 330-380 nm de excitación para la fluorescencia verde y azul respectivamente. Se realizó el conteo del número total de núcleos (núcleos teñidos con Hoechst) y del número de núcleos positivos al TUNEL. El nivel de muerte celular se calculó como el porcentaje de células positivas al TUNEL con relación al número total de células del embrión. Se consideraron blastocistos intactos aquellos en los que no se observó ningún núcleo ni área TUNEL positiva. Los blastocistos que mostraron amplias áreas positivas al TUNEL se clasificaron en dos grupos: A1, blastocistos en los que el área o áreas TUNEL positivas suponían menos de la mitad de la superficie total de embrión, y A2, embriones en los que las áreas positivas abarcaban desde la mitad a la totalidad del embrión.

8.1.3. Análisis estadístico

Los datos obtenidos fueron analizados con el paquete estadístico SPSS (1997) y las diferencias fueron consideradas significativas para $p < 0'05$. El test de análisis de varianza (ANOVA) se utilizó para estudiar el efecto del tipo de blastocisto (blastocistos frescos, vitrificados viables o vitrificados degenerados) sobre el número total de células del embrión y el nivel de muerte celular. Cuando el ANOVA reveló diferencias significativas los valores se compararon empleando el test de Tukey. Los porcentajes de supervivencia y eclosión *in vitro* de los blastocistos frescos y vitrificados se analizaron mediante el test de Chi-cuadrado.

8.2. Experiencia 2. Vitrificación de embriones porcinos en diferentes estadios de desarrollo empleando distintos procedimientos de vitrificación ultra-rápida

Esta experiencia se realizó en la Universidad de Murcia. El objetivo de este estudio fue comparar tres sistemas de vitrificación ultra-rápida (OPS, SOPS y Vit-Master-SOPS) con el fin de investigar la influencia de la velocidad de enfriamiento sobre el desarrollo *in vitro* de los embriones porcinos vitrificados/calentados en diferentes estadios de desarrollo embrionario (mórula, blastocisto temprano y blastocisto expandido).

Durante un periodo de 6 semanas, se seleccionaron 5 o 6 cerdas híbridas multiparas por semana como donantes de embriones (n=34). Los embriones se recogieron vía quirúrgica el día 6 del ciclo y se seleccionaron aquellos que se encontraban en estadio de mórula, blastocisto temprano y blastocisto expandido. El diámetro de los embriones incluida la zona pelúcida se midió con un microscopio invertido (Olympus-IX70, Alemania) provisto de un ocular graduado. Los embriones obtenidos se clasificaron y mezclaron según su estadio de desarrollo. Algunos embriones de cada cerda y de cada estadio de desarrollo se cultivaron para valorar el desarrollo *in vitro* de los embriones frescos. Los embriones restantes de cada uno de los estadios de desarrollo se distribuyeron de forma aleatoria en cada uno de los grupos experimentales de vitrificación (OPS, SOPS y Vit-Master-SOPS) siguiendo un modelo factorial 3x3 (Figura 9).

Los embriones vitrificados permanecieron almacenados en nitrógeno líquido un periodo de 15 días hasta el momento del calentamiento. Posteriormente se cultivaron *in vitro* durante 96 h para estudiar su desarrollo. La vitrificación, calentamiento, cultivo *in vitro* y evaluación de los embriones durante el cultivo se realizó como se ha descrito previamente en el apartado de metodología general. Los parámetros evaluados fueron los porcentajes de supervivencia y de eclosión *in vitro*.

Figura 9. Representación esquemática del diseño experimental de la experiencia 2.



8.2.1. Análisis estadístico

Los datos obtenidos se analizaron con el paquete estadístico SAS/STAT (1997), considerando las diferencias significativas para $p < 0.05$. El procedimiento CATMOD (Categorical Data Modeling) se utilizó para (1) analizar el efecto del sistema de vitrificación, estadio de desarrollo del embrión y la interacción de ambos parámetros en los porcentajes de supervivencia y de eclosión *in vitro*, y (2) para comparar el desarrollo *in vitro* de los embriones frescos y los embriones vitrificados/calentados. Los diámetros de los embriones de cada uno de los estadios de desarrollo se analizaron con el procedimiento GLM (General Lineal Model). Cuando el análisis de ANOVA reveló un efecto significativo, los valores se compararon con un test Tukey-Kramer para comparaciones múltiples.

8.3. Experiencia 3. Transferencia de blastocistos vitrificados procedentes de una o dos donantes: Parámetros reproductivos al día 30 de gestación

El objetivo de esta experiencia fue investigar si la mezcla de embriones procedentes de dos donantes afecta a los resultados de la transferencia quirúrgica de blastocistos porcinos vitrificados y calentados. Este trabajo se realizó en el INRA-Nouzilly (Francia).

Las donantes de embriones fueron cerdas nulparas LWb ($n=24$) sometidas a un tratamiento de sincronización y superovulación. Los embriones se recogieron tras el sacrificio de las cerdas donantes el día 5.5-6 del ciclo. Las receptoras ($n=20$) fueron cerdas de raza Meishan asincrónicas (comienzo del estro 24 h después que las donantes) con respecto a las donantes.

Para esta experiencia se seleccionaron únicamente los embriones en estadio de blastocisto que presentaban una morfología buena o excelente. Los blastocistos se vitrificaron utilizando pajuelas OPS como se ha indicado en la metodología general y permanecieron almacenados en nitrógeno líquido durante un periodo de 8 a 40 días. El día de las transferencias, los embriones se calentaron como se ha descrito previamente.

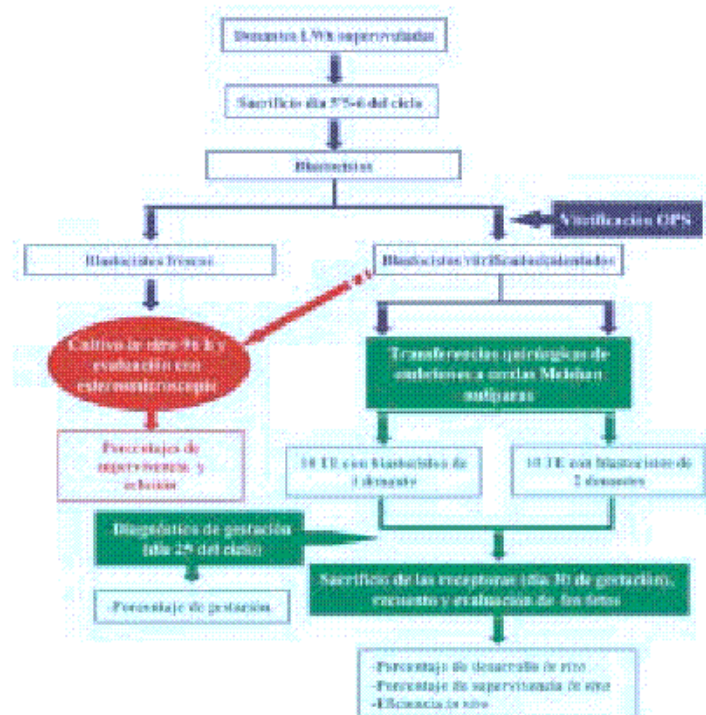
Con el fin de evaluar el desarrollo *in vitro* de los embriones vitrificados, un grupo de 37 blastocistos vitrificados/calentados procedente de todas las donantes fue cultivado *in vitro* durante un periodo de 96 h. Un grupo de blastocistos no vitrificados ($n=45$) procedente de las mismas donantes fue cultivado como grupo control. Los parámetros evaluados fueron los porcentajes de supervivencia y de eclosión obtenidos al final del cultivo *in vitro*.

Los blastocistos restantes fueron transferidos vía quirúrgica a receptoras Meishan mediante la realización de una laparotomía. La anestesia general se indujo y mantuvo con halotano (3.5-5%). El aparato genital se expuso mediante una incisión ventromedial. El número de blastocistos vitrificados/calentados transferido por recipiente fue 20. Los embriones una vez calentados, siguiendo el protocolo descrito en la metodología general y tras 30 min de equilibrado en TCMm, se colocaron en un volumen de 50 ml de TCMm dentro de un catéter de teflón (VYGON, Francia) conectado a una jeringuilla de 1 ml. Una vez exteriorizado el aparato genital, se realizó una pequeña incisión con un bisturí eléctrico

en la porción distal de uno de los cuernos uterinos, en las proximidades de la unión útero-tubárica, por la que se introdujo el catéter de teflón para depositar los embriones aproximadamente a 5 cm de la incisión. Se realizaron diez transferencias con embriones procedentes de una donante (grupo 1) y otras diez transferencias se efectuaron con una mezcla de embriones procedentes de dos donantes en las siguientes proporciones 10 + 10 (n=5); 11 + 9 (n=3) o 12 + 8 (n=2) (grupo 2).

A partir del día 12 después de las transferencias se realizó el diagnóstico del estro, como se ha descrito previamente, para detectar el retorno al estro de las cerdas no gestantes. El diagnóstico de gestación se efectuó el día 25 del ciclo mediante ecografía (100SVet, Pie Medical, Países Bajos; Martinat-Botté y cols., 2000). Todas las receptoras fueron sacrificadas el día 30 de gestación en un matadero experimental. Los fetos se extrajeron de la placenta y fueron evaluados anatómicamente. Aquellos fetos con la diferenciación de órganos propia de un mes de gestación (Drew y De Lahunta, 1986) y que mostraron buena apariencia y coloración (sin áreas necróticas o sanguinolentas) fueron considerados viables. Se contó el número total de fetos presente en cada una de las cerdas gestantes y el número de fetos viables. El desarrollo *in vivo* se determinó como la proporción entre el número de fetos y el número total de embriones transferidos. El porcentaje de supervivencia *in vivo* fue calculado como el número de fetos viables con respecto al número de embriones transferidos a las cerdas gestantes. La eficiencia *in vivo* se consideró como la proporción de fetos viables con respecto al número total de embriones transferidos a todas las receptoras (Figura 10).

Figura 10. Representación esquemática del diseño experimental de la experiencia 3.



8.3.1. Análisis estadístico

Los porcentajes de supervivencia y eclosión *in vitro* de los blastocistos frescos y vitrificados se analizaron mediante el test de Chi-cuadrado. El porcentaje de gestación de los dos grupos se comparó mediante el test de Fisher. El procedimiento GLM del SAS se empleó para determinar el efecto del origen de los embriones (una o dos donantes) sobre el número de fetos desarrollados y fetos viables el día 30 de gestación.

8.4. Experiencia 4: Desarrollo *in vitro* de blastocistos vitrificados mediante el sistema SOPS y calentados mediante un sistema directo

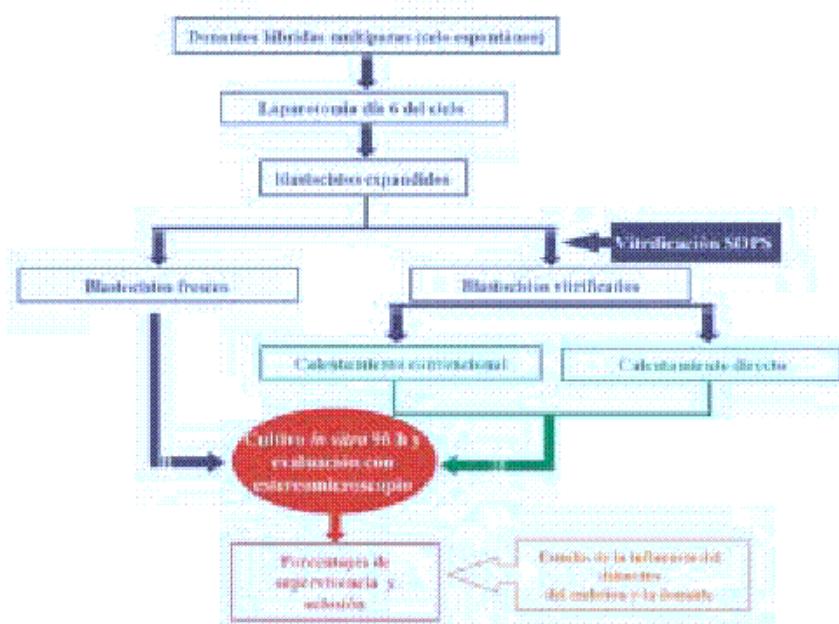
Este trabajo se realizó en la Universidad de Murcia con el fin de comparar el desarrollo *in vitro* de blastocistos porcinos vitrificados con el sistema SOPS y calentados mediante el procedimiento convencional (3 etapas) descrito por Berthelot y cols. (2000) y un procedimiento directo (una etapa).

Las donantes de embriones fueron 7 cerdas híbridas múltiparas (de 2 a 6 partos) con estro espontáneo, e inseminadas artificialmente como se ha indicado en la metodología general. Los embriones se recogieron mediante laparotomía el día 6 del ciclo, se evaluaron y clasificaron en función de su estado de desarrollo, seleccionándose únicamente blastocistos expandidos clasificados como buenos o excelentes según su morfología. El diámetro de los embriones incluida la zona pelúcida se midió con un microscopio invertido provisto de un ocular graduado.

Algunos blastocistos de cada cerda se cultivaron para estudiar el desarrollo *in vitro* de los embriones frescos ($n=20$). El resto de los embriones de cada lote (embriones recogidos de una donante) fue repartido aleatoriamente y a partes iguales en los dos grupos experimentales (calentamiento convencional y calentamiento directo) antes de la vitrificación. Tras 15 días de conservación en nitrógeno líquido, los embriones fueron calentados empleando el correspondiente protocolo de calentamiento, y posteriormente cultivados *in vitro* durante 96 h para estudiar su desarrollo (Figura 11).

El sistema convencional de calentamiento fue el descrito en la metodología general. En el sistema de calentamiento directo (una etapa) la pajuela se sumergió directamente en 400 ml de TCMm que contenía 0'13 M de sacarosa. Los embriones permanecieron en este medio durante 5 minutos y posteriormente se traspasaron al medio de cultivo de embriones.

Figura 11. Representación esquemática del diseño experimental de la experiencia 4.



8.4.1. Análisis estadístico

Los datos obtenidos fueron analizados con el paquete estadístico SPSS (1997) y las diferencias fueron consideradas significativas para $p < 0.05$. El test de ANOVA se utilizó para estudiar el efecto del procedimiento de calentamiento (convencional o directo) sobre los porcentajes de supervivencia y eclosión *in vitro* de los blastocitos vitrificados. El modelo estadístico tuvo en cuenta los siguientes factores: 1) donante de embriones (7 clases) y diámetro del embrión (tres clases: 160-180 μm , 181-200 μm y $>200 \mu\text{m}$) y las interacciones entre todos estos parámetros. Los datos de la supervivencia y eclosión *in vitro* fueron modelados de acuerdo con el modelo binomial de parámetros, como describió previamente Fiz (1980). Cuando el ANOVA reveló diferencias significativas los valores se compararon empleando el test de Tukey.

8.5. Experiencia 5: Transferencia no quirúrgica de blastocistos porcinos vitrificados mediante el sistema DPS

Esta experiencia se realizó en el INRA-Nouzilly (Francia), siguiendo el diseño experimental que se representa en la figura 14.

8.5.1. Experiencia 5a: Inserciones del catéter flexible para la transferencia no quirúrgica de embriones

Con el fin de determinar la influencia del número de estros de la cerda sobre la efectividad de la inserción de un catéter flexible descrito por Martínez y cols. (2001a, 2002, 2004) para la transferencia no quirúrgica de embriones porcinos se utilizaron 27 cerdas LWh nulíparas de 2 a 6 estros. Las inserciones se realizaron en una jaula el día 5'5-6 del ciclo estral en el propio estabulado de las cerdas sin sedación de las mismas. Una vez limpia el área perineal con agua y jabón se insertó en el cervix un catéter comercial de IA que contenía en su interior el catéter flexible de transferencia de embriones. El catéter de IA sirvió para asistir en la manipulación del catéter flexible (1'5 m de longitud, diámetro externo de 4 mm, canal de trabajo de 0'7 mm y diámetro externo de la punta del catéter 8 mm). El catéter flexible fue propulsado a través del cervix a lo largo del cuerno uterino tan profundo como fue posible.

Las cerdas fueron asignadas a tres categorías en función de su reacción durante el procedimiento (buena = sin reacción; moderada = reacción media, inquieta; y mala = máxima reacción, muy inquieta). Las dificultades durante la inserción del catéter flexible fueron evaluadas en función de la resistencia encontrada por el operador durante la manipulación del catéter flexible (1 = ninguna o ligera resistencia, 2 = resistencia moderada o severa, 3 = imposible insertar el catéter a través del cervix). Una vez finalizada la inserción del catéter flexible, el operario predijo si el extremo del catéter había alcanzado la localización deseada en el cuerno uterino dependiendo de sus sensaciones durante el procedimiento. Así, las inserciones fueron clasificadas subjetivamente como adecuadas (presumible buena posición) o inadecuadas (presumible mala posición o bucle del catéter en el interior del útero).

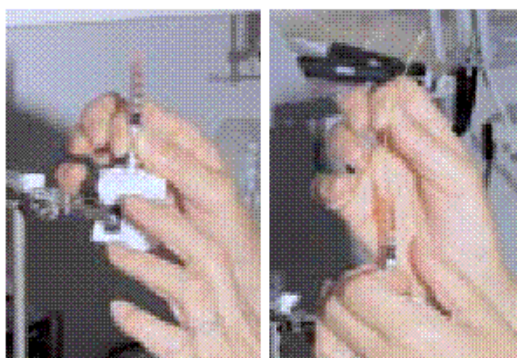
Una vez finalizada la inserción del catéter, la porción del catéter de IA y del catéter flexible que quedó en el exterior se fijó a la cola de la cerda con esparadrapo. Las cerdas se sacrificaron inmediatamente para evaluar la posición del catéter flexible en el interior del útero. Se consideró que el catéter tenía una posición correcta cuando el extremo del catéter se encontró en la profundidad de uno de los cuernos uterinos, y el catéter estaba bien adaptado a su anatomía sin pliegues ni dobleces. La posición del catéter se consideró incorrecta cuando el catéter se encontró plegado en el interior del útero.

Adicionalmente se tomaron medidas de la porción del catéter flexible que se encontraba en el interior del cuerno uterino y de la longitud total del cuerno uterino en el que se localizó el catéter. La progresión del catéter en el cuerno uterino se define como el cociente de la longitud del catéter flexible situado dentro del cuerno uterino con relación a la longitud total de dicho cuerno uterino expresado como un porcentaje. Las inserciones se clasificaron en 4 categorías en función de la progresión del catéter: inserciones realizadas en el primer (progresión de 0% a 25%), segundo (progresión de 26% a 50%), tercer (progresión de 51% a 75%), y cuarto (progresión de 76% a 100%) del cuerno uterino. Una vez extraído el catéter se examinó el estado del endometrio para evaluar el posible daño causado por el catéter flexible durante las inserciones.

8.6.2. Experiencia 5b: Transferencias no quirúrgicas de embriones vitrificados

Los embriones utilizados en esta experiencia procedían de cerdas nulíparas donantes con celo espontáneo ($n=17$) o celo inducido ($n=32$). Los embriones se obtuvieron tras el sacrificio de las donantes el día 5'5-6 del ciclo. Se seleccionaron aquellos blastocistos intactos, clasificados como buenos o excelentes según su morfología. Los blastocistos, en grupos de 4 a 6, se vitrificaron en pajuelas OPS como se ha descrito en el apartado de metodología general y se almacenaron en nitrógeno líquido durante un periodo de 1 a 18 meses. El calentamiento de los embriones fue directo (una etapa) siguiendo el protocolo desarrollado en la experiencia 4 pero adaptado a las condiciones de granja. La pajuela una vez extraída del nitrógeno líquido se mantuvo 2 s a temperatura ambiente. El extremo adelgazado de la pajuela que contenía los embriones se introdujo verticalmente en una jeringuilla de 1 ml con 400 μ l de medio D1 (Figura 12). Se descongelaron varias pajuelas en la misma jeringuilla hasta obtener el número de blastocistos ($n=20$) para realizar una transferencia. Después del calentamiento de la última pajuela los embriones se transfirieron directamente conectando la jeringuilla al catéter flexible de TE que previamente había sido insertado en la receptora.

Figura 12. Calentamiento directo de los embriones vitrificados en una jeringuilla de 1ml.



Los embriones fueron transferidos a receptoras que comenzaron el estro 24 horas después que las donantes. Las receptoras fueron 24 Meishan nulíparas con un número de estros previos a las transferencias de 4 a 6.

Las transferencias se hicieron en jaulas individuales de gestación sin sedación de las cerdas. La inserción del catéter de TE se realizó como se ha descrito en el apartado anterior con algunas modificaciones. Los parámetros evaluados durante la transferencia fueron la dificultad y la reacción de la cerda. Una vez limpia la zona perineal, se insertó un catéter de IA que contenía el catéter flexible de TE (Figura 13a). Previamente a la inserción se lavó el canal de trabajo del catéter flexible con 500 ml de TCMm a 39°C empleando para ello una jeringa de 1 ml y se lubricó con un spray de silicona (Figura 13b). El instrumental empleado para la TE fue esterilizado previamente con óxido de etileno, al menos una semana antes de la fecha de las transferencias. El catéter de IA se insertó a través de la vagina en

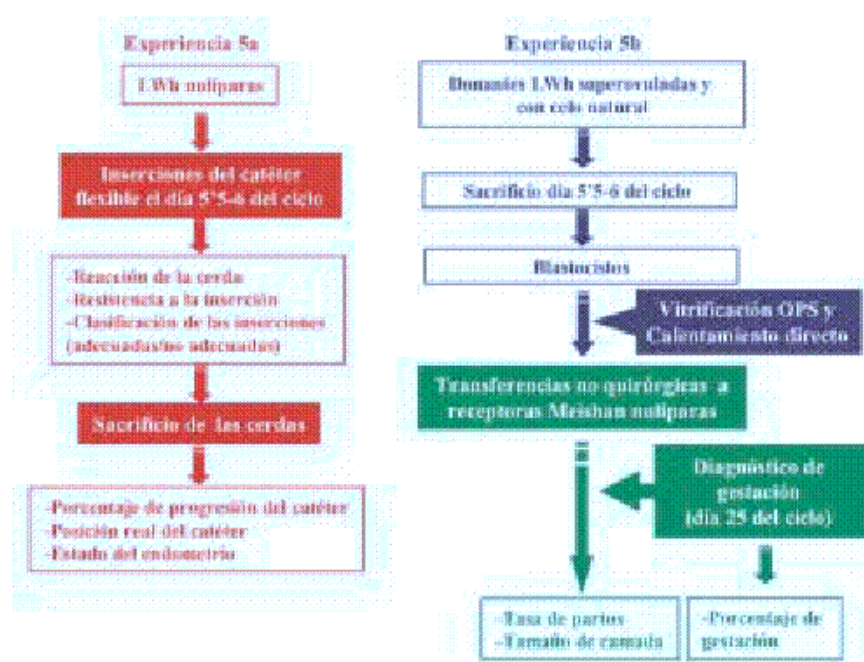
el cérvix, y sirvió de guía para la manipulación del catéter flexible que fue introducido a través del cervix hasta la porción distal de uno de los cuernos uterinos (Figura 13c y 13d). La longitud y el diámetro del extremo del catéter fueron disminuidos a 1'2 m y 4'5 mm (en lugar de 1'5 m y 8 mm), respectivamente, debido al menor tamaño del útero de las cerdas Meishan. Con el fin de evitar la obstrucción del canal de trabajo del catéter de TE con mucus cervical, se estableció presión positiva durante la inserción de catéter a través del cervix y se introdujeron 400 ml de TCMm a 39°C cuando el extremo del catéter alcanzó el cuerpo del útero. Después, se introdujo el catéter lo más profundo posible a lo largo de uno de los cuernos uterinos (Figura 13e).

Figura 13. Transferencia no quirúrgica intrauterina profunda de embriones porcinos. a) Catéter de transferencia; b, c y d) Diferentes etapas del procedimiento de inserción del catéter flexible; e) adaptación del catéter flexible al cuerno uterino de la cerda (aparato genital obtenido en matadero).



Cuando finalizó la inserción del catéter, si el operador consideró que la inserción fue adecuada, se realizó la transferencia de los embriones. Para ello conectó la jeringa de 1 ml que contenía 20 blastocistos vitrificados/calentados en 400 µl de D1 (jeringuilla de calentamiento). Una vez transferidos los embriones, el canal interno del catéter de transferencia se lavó con 400 µl de TCMm para evitar que quedaran embriones en el interior del catéter de transferencia y se retiró el catéter. La inserción se consideró correcta cuando el catéter flexible de transferencia no presentaba marcas ni dobleces.

Figura 14. Representación esquemática del diseño experimental de la experiencia 5.



A partir del día 12 después de las transferencias se evaluó el retorno al estro de las cerdas no gestantes. El diagnóstico ecográfico de gestación se realizó a partir del día 19 post-transferencia. Finalmente se valoró la tasa de partos, el tamaño de las camadas, el número de lechones nacidos vivos y su peso al nacimiento. El porcentaje de supervivencia embrionaria se consideró como la proporción de lechones nacidos vivos con respecto al número total de embriones transferidos a las receptoras gestantes.

8.5.3. Análisis estadístico

Los resultados se analizaron con el paquete informática SAS/STAT (1997) y las diferencias se consideraron significativas para $p < 0.05$. El procedimiento CATMOD se empleó para analizar: (1) El efecto del número de estros de las cerdas (3 clases: 2, 3-4 o 5-6

estros) sobre la reacción de la cerda durante el procedimiento y sobre la dificultad encontrada durante la inserción; y (2) la influencia de la dificultad en la inserción del catéter flexible sobre la reacción de las cerdas durante el procedimiento y sobre la correcta posición del catéter flexible en el interior de un cuerno uterino. La influencia del número de estros de las cerdas sobre la longitud del catéter flexible insertado, en la longitud del cuerno uterino y en la progresión del catéter flexible en el interior del cuerno uterino se analizó mediante el procedimiento GLM.

Resultados

1. Experiencia 1: Estudio de la morfología y de los niveles de muerte celular de blastocistos porcinos vitrificados

El número medio (\pm SEM) de cuerpos lúteos en las cerdas donantes ($n=9$) de embriones fue 30.9 ± 4.6 . El porcentaje de embriones recogidos con respecto al número total de cuerpos lúteos presentes en los ovarios fue 82.7%. El número total de embriones obtenidos fue 230, de los cuales 13%, 8.3%, 75.7%, y 3.0% fueron ovocitos no fecundados y embriones degenerados, mórulas, blastocistos y blastocistos eclosionados, respectivamente.

El porcentaje de supervivencia *in vitro* para los blastocistos vitrificados después de 24 horas de cultivo fue inferior ($p<0.01$) que el de los blastocistos frescos (76.0% vs 100%, respectivamente). El porcentaje de eclosión también fue menor ($p<0.01$) en el grupo de blastocistos vitrificados (12.8%) que en el grupo de blastocistos frescos (72.4%).

1.1. Morfología de los blastocistos

Como se ha indicado anteriormente los embriones frescos y vitrificados/calentados tras 24 horas de cultivo *in vitro* se evaluaron con ayuda de un estereomicroscopio siguiendo los criterios descritos en la metodología general, considerándolos viables o degenerados según su morfología. Las alteraciones morfológicas evaluadas mediante microscopía de luz y electrónica de dichos embriones, en relación con la evaluación morfológica realizada con el estereomicroscopio se muestran en la tabla 9.

Tabla 9. Clasificación de los blastocistos frescos y vitrificados en relación con la evaluación morfológica realizada con un estereomicroscopio mediante microscopía de luz y microscopía electrónica de transmisión tras 24 h de cultivo *in vitro*.

Clasificación de los embriones		Tipo de embrión (evaluación con estereomicroscopio)		
		Frescos (N) viables*	Vitrificados viables (N)	Vitrificados degenerados (N)
Microscopía de luz	Microscopía electrónica			
Intactas	Grado 0	13	0	0
Normales	Grado 1	0	18	0
Semidegeneradas	Grado 2	0	5	0
Degeneradas	Grado 3	0	0	9

* No se observaron blastocistos frescos degenerados después de 24 h de cultivo *in vitro*.

- Grado 0: No se observaron alteraciones ultraestructurales.

- Grado 1: Blastocistos que mostraron sólo ligeras diferencias comparados a los blastocistos frescos.

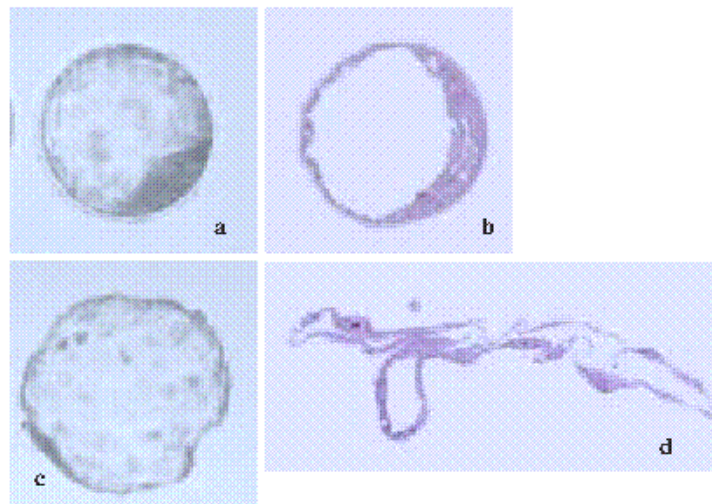
- Grado 2: Blastocistos con diferentes grados de alteraciones y abundantes restos celulares.

- Grado 3: Blastocistos desorganizadas con abundantes signos de degeneración celular.

1.1.1. Blastocistos frescos

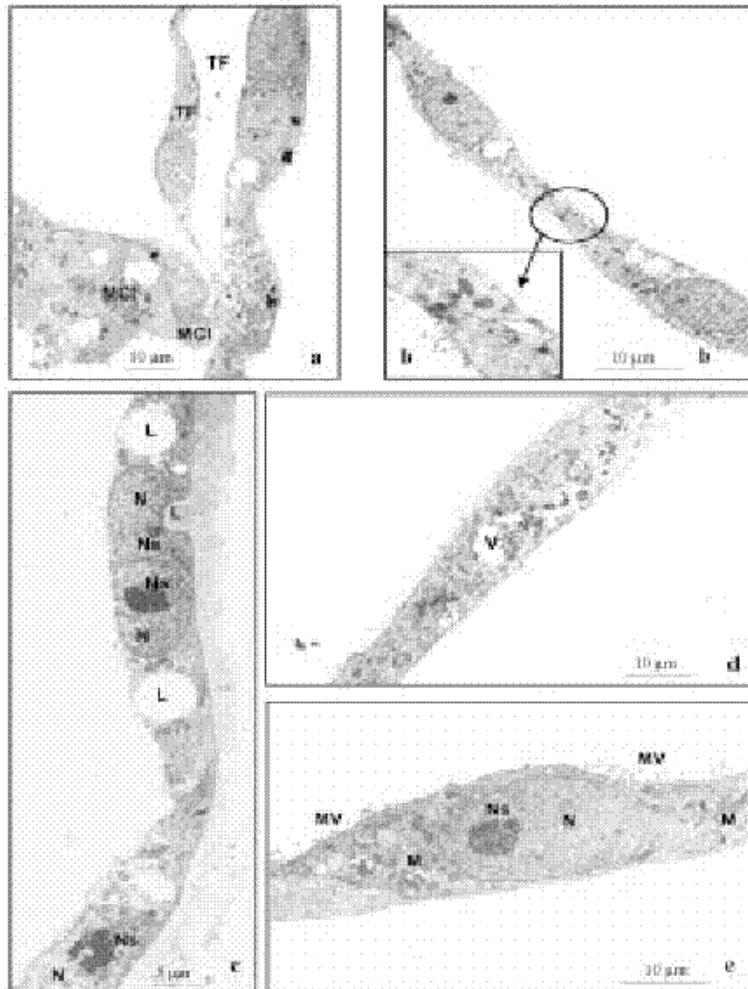
Todos los blastocistos frescos tras 24 h de cultivo *in vitro* fueron clasificados como viables con ayuda de un estereomicroscopio. Mediante microscopía de luz todos los embriones frescos fueron clasificados como intactos (Tabla 9). En dichos embriones, se observó que las células trofoectodérmicas se encontraban próximas a la zona pelúcida, delimitando un espacio perivitelino casi imperceptible y una masa celular interna (MCI) bien definida (Figura 15a y 15b). Algunos blastocistos que eclosionaron durante el cultivo (Figura 15c y 15d) presentaron una masa celular interna más aplanada, éstos últimos embriones no mantuvieron la forma esférica durante el proceso de fijación para su posterior estudio microscópico.

Figura 15. Imágenes de microscopía estereoscópica (a y c) y de microscopía de luz (b y d) de un blastocisto porcino expandido (a y b) y un blastocisto eclosionado (c y d).



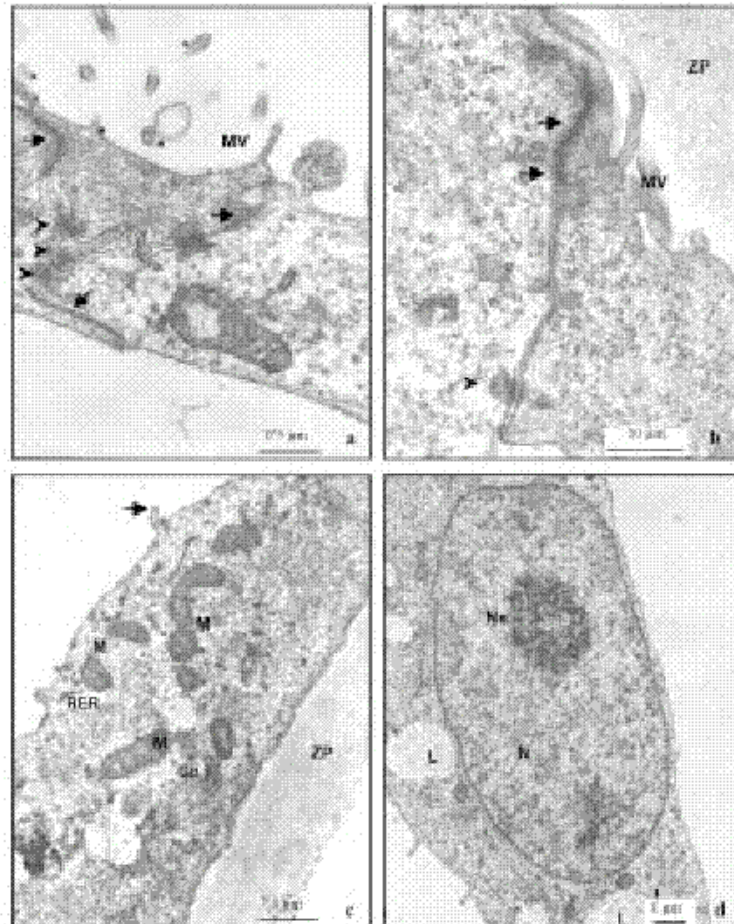
En las secciones ultrafinas observadas mediante microscopía electrónica, la mayoría de las células aparecieron normales (alteraciones grado 0). El trofoectodermo está constituido por una capa de células aplanadas que constituyen la porción más externa del embrión (Figura 16). Parte de estas células reviste la cavidad del blastocelo mientras que un menor número de ellas rodean externamente a la MCI (Figura 16a). Las células trofoectodérmicas se relacionan entre sí mediante complejos de unión perfectamente desarrollados y semejantes a los que se encuentran entre las células de revestimiento epitelial. Estos complejos de unión se componen de uniones estrechas, zonas adherentes y desmosomas, además pueden estar acompañados de interdigitaciones entre las membranas citoplasmáticas de las células adyacentes. (Figuras 17a y 17b).

Figura 16. Imágenes de microscopía electrónica de blastocistos porcinos frescos tras 24 h de cultivo *in vitro*. a) blastocisto eclosionado, se observa la masa celular interna (MCI) y el trofoectodermo (TF). b) Detalle de la unión entre dos células del TF. c) detalle de la zona de contacto de dos células del TF, una de ellas binucleada, se observan los núcleos (N) y nucleolos (Ns) y gotas lipídicas (L). d) célula del TF en la que existen agregados multivesiculares (V). e) célula del TF con numerosas microvellosidades (MV), el núcleo (N), un prominente nucleolo (Ns) y numerosas mitocondrias (M).



Es característico de estas células la presencia en la membrana plasmática de abundantes microvellosidades que presentan un eje de microfilamentos, ocupan parte del espacio perivitelino y discurren paralelas a la membrana plasmática sin penetrar en la zona pelúcida (Figuras 17b) o perpendiculares a ella en los blastocistos eclosionados (Figuras 16e y 17a). La membrana plasmática que está en contacto con el blastocelo presentaba ocasionalmente algunas prolongaciones a modo de digitaciones (Figura 17c).

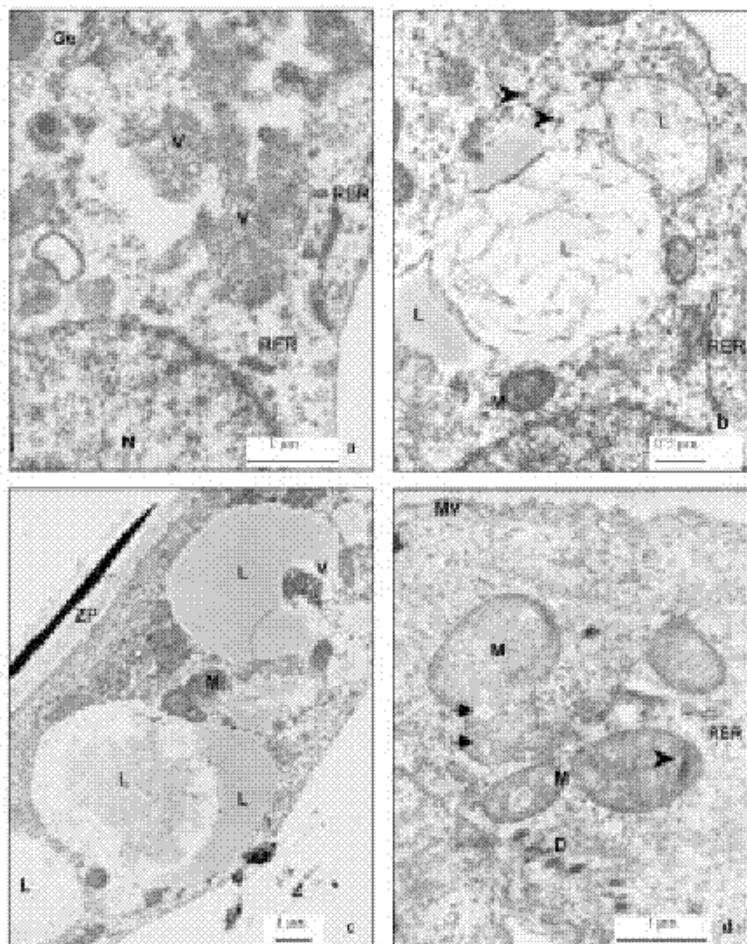
Figura 17. Imágenes de microscopía electrónica de células del trofoectodermo (TF) de blastocistos frescos tras 24 h de cultivo *in vitro* eclosionados (a y c) y expandidos (b y d). a y b) Complejos de unión compuestos por desmosomas (▶), uniones estrechas y zonas adherentes (→). Se observan microvelosidades (MV) c) detalle del citoplasma de una célula del TF con numerosas mitocondrias (M), cisternas del retículo endoplasmático rugoso (RER), del aparato de Golgi (Go) y una digitación hacia el blastocelo (←). Los blastocistos expandidos conservan la zona pelúcida (ZP). d) Célula del TF en la que se observa el núcleo (N), un nucleolo (Ns) y varias gotas lipídicas.



Las células tienen núcleos ovalados con prominentes nucleolos y abundante eucromatina (Figura 17d). En ocasiones se observan células binucleadas (Figura 16c) y algunas con núcleos que contienen varios nucleolos. Dispersos por el citoplasma se observan abundantes ribosomas libres, algunas cisternas de retículo endoplasmático rugoso, y numerosos microfilamentos que son más abundantes en las proximidades de los desmosomas y que conectan con las placas densas de los mismos (Figuras 17 y 18). El aparato de Golgi es de pequeño tamaño y suele estar constituido por un solo dictiosoma compuesto por un número reducido de cisternas (Figura 18a). Dispersos por el citoplasma se encuentran pequeñas agrupaciones de vesículas así como cuerpos multivesiculares (Figuras 16d y 18a) y cuerpos residuales con diverso grado de electrodensidad, especialmente en célu-

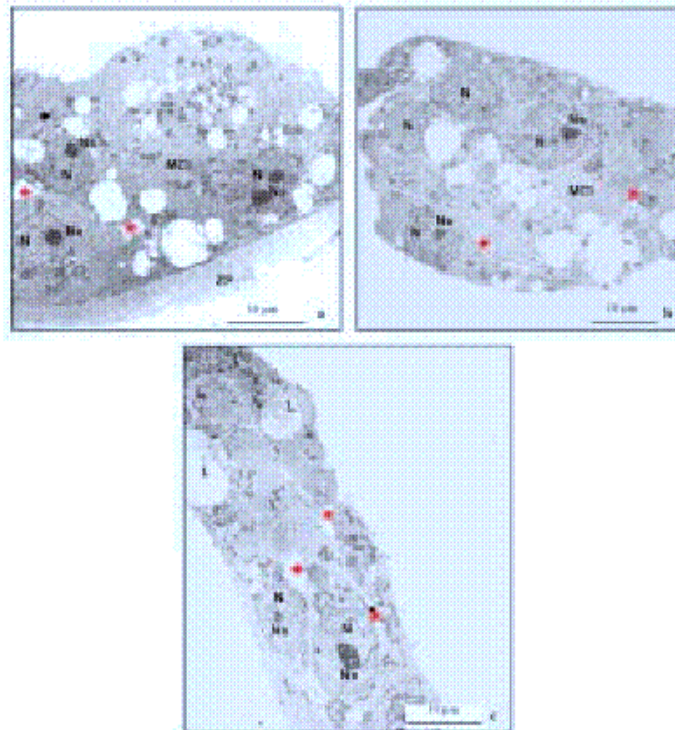
las trofoectodérmicas de blastocistos eclosionados. Las inclusiones lipídicas se presentan distribuidas por todo el citoplasma, son de tamaño variable, aparentemente más numerosas y mayores en los blastocistos expandidos que en los eclosionados. Generalmente, las gotas lipídicas se encuentran asociadas a las mitocondrias (Figuras 18b y 18c). Las mitocondrias, de morfología más bien esférica u ovalada, se distribuyen por todo el citoplasma. Presentan una matriz muy electrodensa y las crestas, de morfología transversal o tubular, no son muy numerosas (Figura 18d).

Figura 18. Imágenes de microscopía electrónica que muestran detalles del citoplasma de células trofoectodérmicas pertenecientes a blastocistos porcinos frescos tras 24 h de cultivo *in vitro*. a) Fotografía en la que se observan cisternas del retículo endoplasmático rugoso (RER) y de Golgi (Go), el núcleo (N) y agregados vesiculares (V). b) Porción del citoplasma que contiene grandes gotas lipídicas (L), RER, mitocondrias (M) y ribosomas libres (◀). c) Detalle de un blastocisto expandido en la que se puede ver la zona pelúcida (ZP), gotas lipídicas (L), mitocondrias (M) y un agregado multivesicular (V). d) Grupo de mitocondrias (M) con crestas tubulares (▶) y transversales (→), en esta porción del citoplasma se distinguen también cisternas del RER, varios desmosomas (D) y microvellosidades (MV) que limitan con la zona pelúcida.



La MCI está constituida por un conjunto de células de morfología más bien poligonal o esférica que limitan con el blastocelo, y que tienden a aplanarse en los blastocistos ecllosionados (Figura 19). Entre las células de la masa celular interna existen contactos puntuales y numerosos espacios intercelulares de tamaño variable (Figuras 19 y 20). En los contactos puntuales no existen complejos de unión diferenciados; a lo sumo, pueden observarse estructuras similares a desmosomas. La membrana plasmática de las células en estas localizaciones, así como la membrana plasmática que limita con el blastocelo, puede presentar digitaciones. Tampoco en los contactos más extensos entre las células de la MCI y las células trofoectodérmicas se aprecian complejos de unión (Figuras 20a y 20b).

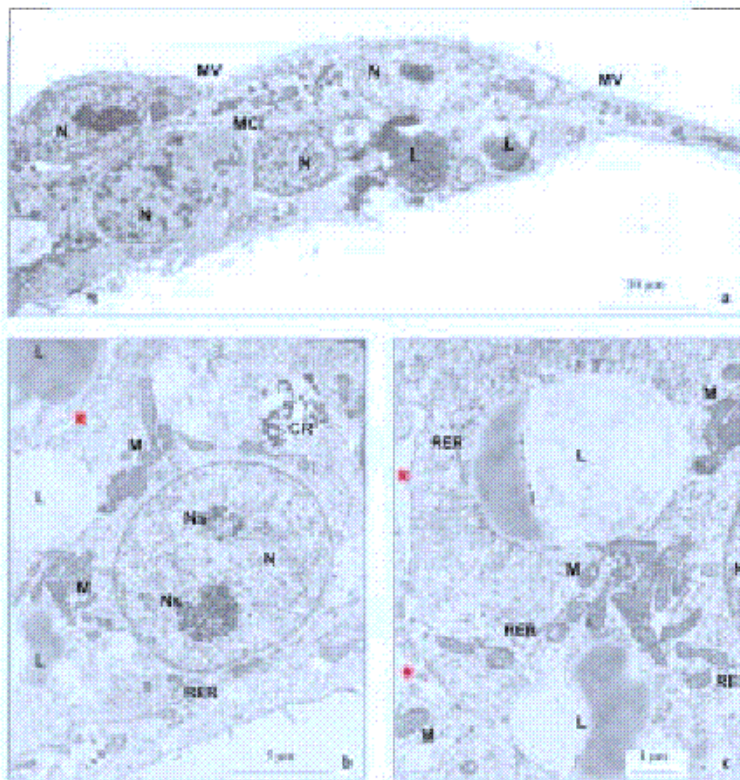
Figura 19. Imágenes de microscopía electrónica de la masa celular interna (MCI) de blastocistos porcinos frescos tras 24h de cultivo in vitro. a) Blastocisto expandido que muestra la zona pelúcida (ZP). b) Blastocisto ecllosionado. En ambas fotografías se pueden apreciar núcleos (N) y nucleolos (Ns) pertenecientes a diferentes células y numerosos espacios intercelulares (*). c) En la fotografía se observa un detalle de la masa celular interna de un blastocisto ecllosionado en el que se distinguen varios núcleos (N), nucleolos (Ns) y gotas lipídicas (L).



En la MCI los núcleos son más redondeados y muestran abundante eucromatina. Los nucleolos son prominentes y en ellos se distinguen las porciones amorfa y densa. El citoplasma es abundante en ribosomas libres y se localizan más cisternas de retículo endoplasmático rugoso que en las células del trofoectodermo (Figuras 20b y 20c). No se aprecian microfilamentos intermedios aunque es fácil encontrar microtúbulos. Las vacuolas lipídicas, más abundantes y grandes que en las células trofoectodérmicas, se distribuyen por todo el citoplasma (Figuras 19 y 20). Las mitocondrias suelen tener forma ovalada y son más lar-

gas que las de las células del trofoectodermo. Generalmente forman grupos, presentan crestas transversales que pueden mostrarse dilatadas y tienen una matriz electrodensa (Figuras 20b y 20c).

Figura 20. Imágenes de microscopía electrónica de blastocistos porcinos frescos tras 24 h de cultivo *in vitro*. a) Masa celular interna (MCI) de un blastocisto eclosionado en el que se observan las microsvelliosidades (MV), varios núcleos que corresponden a diferentes células y gotas lipídicas (L). b y c) detalles del citoplasma de células de la MCI en la que se observan gotas lipídicas (L), mitocondrias con crestas mayoritariamente transversales (M), cisternas del retículo endoplasmático rugoso (RER), un núcleo (N) con dos nucleolos (Ns) en su interior y un cuerpo residual (CR). Obsérvese la existencia de espacios intercelulares entre las células de la masa celular interna (*).

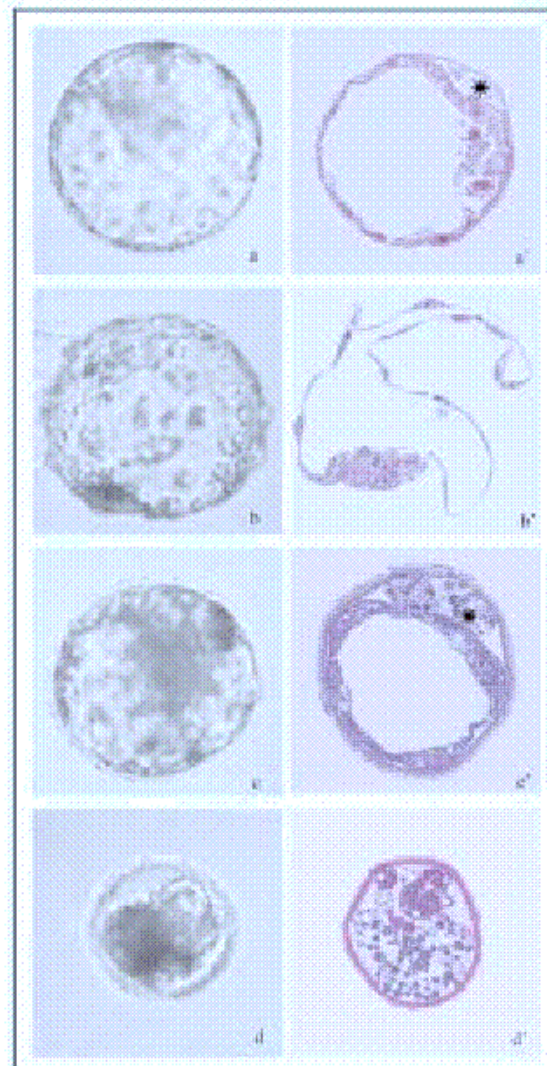


1.1.2. Blastocistos vitrificados

El estudio con microscopía de luz (Figura 21) permitió comprobar que el 78'3% (18 de 23 blastocistos) de los blastocistos clasificados estereomicroscópicamente como viables después del cultivo *in vitro* presentan características similares a los blastocistos frescos, aunque algunos de ellos mostraron restos celulares en el espacio perivitelino. Estos embriones (Figuras 21 a, a', b y b') fueron considerados como embriones normales mediante microscopía de luz (Tabla 9). El resto de los blastocistos considerados viables mediante el estereomicroscopio (5 de 23 blastocistos; 21'7%), presentaron una morfología intermedia mostrando varios grados de alteraciones y más restos celulares en el espacio

perivitelino y/o en el blastocelo. Estos últimos blastocistos (Figuras 21c y 21c') fueron considerados semi-degenerados (Tabla 9). Los blastocistos vitrificados considerados degenerados por estereomicroscopía después del cultivo *in vitro* (n=9) estaban prácticamente desintegrados. No presentaban diferenciación entre el trofoectodermo y la masa celular interna, el blastocelo estaba colapsado y contenía abundantes restos celulares. En estos embriones, el espacio perivitelino estaba dilatado y repleto de restos celulares (Figuras 21d y 21d').

Figura 21. Imágenes de microscopía estereoscópica (a, b, c y d) y de microscopía de luz (a', b', c' y d') de blastocistos porcinos vitrificados/calentados tras 24h de cultivo *in vitro*. Blastocisto expandido (a y a') y eclosionado (b y b') clasificados como normales mediante microscopía de luz. c y c') Blastocisto considerados semidegenerados mediante microscopía de luz, con abundantes restos celulares en el espacio perivitelino (★) d y d') Blastocisto degenerado que muestra pérdida de la estructura típica de un embrión.



En el estudio de microscopía electrónica de transmisión se observó que los embriones vitrificados considerados normales mediante microscopía de luz, presentaron una ultraestructura similar a los blastocistos frescos. Únicamente mostraron ligeras diferencias (alteraciones grado 1) tales como acumulación de vesículas y lisosomas secundarios en el citoplasma, fragmentación de las gotas lipídicas y ligera dilatación de algunas cisternas del retículo endoplasmático rugoso. En ningún momento se apreció pérdida de la cohesión de las células ni de la diferenciación de la masa celular interna y el trofoectodermo (Figuras 22 y 23). Algunos de estos blastocistos contenían restos celulares en el espacio perivitelino, en estas zonas las microvellosidades eran más abundantes (Figuras 22a, 23a y 23b).

Figura 22. Imagen de microscopía electrónica de blastocistos porcinos vitrificados/calentados tras 24h de cultivo *in vitro* y clasificados como normales mediante microscopía de luz. a) Detalle del trofoectodermo de un blastocisto expandido, el espacio perivitelino contiene restos celulares (RC) y un núcleo (N*) extruido. Algunas células muestran dilatación del retículo endoplasmático (*). b) Porción de la masa celular interna de un blastocisto expandido.

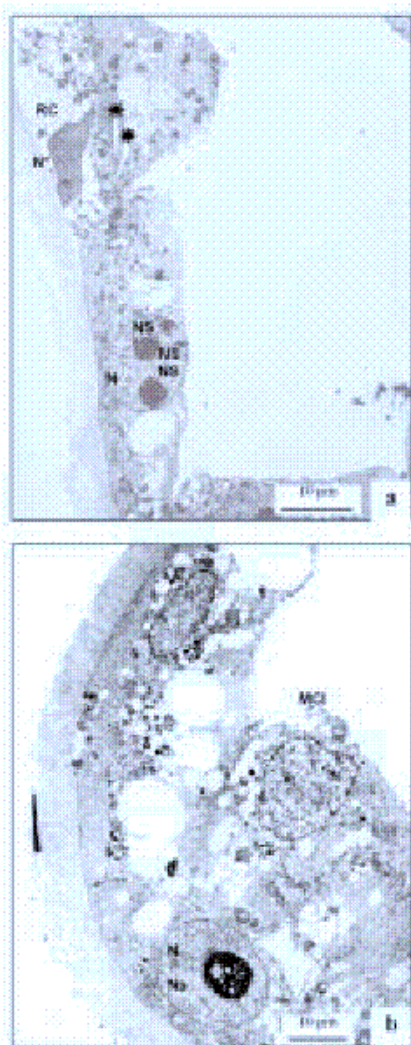
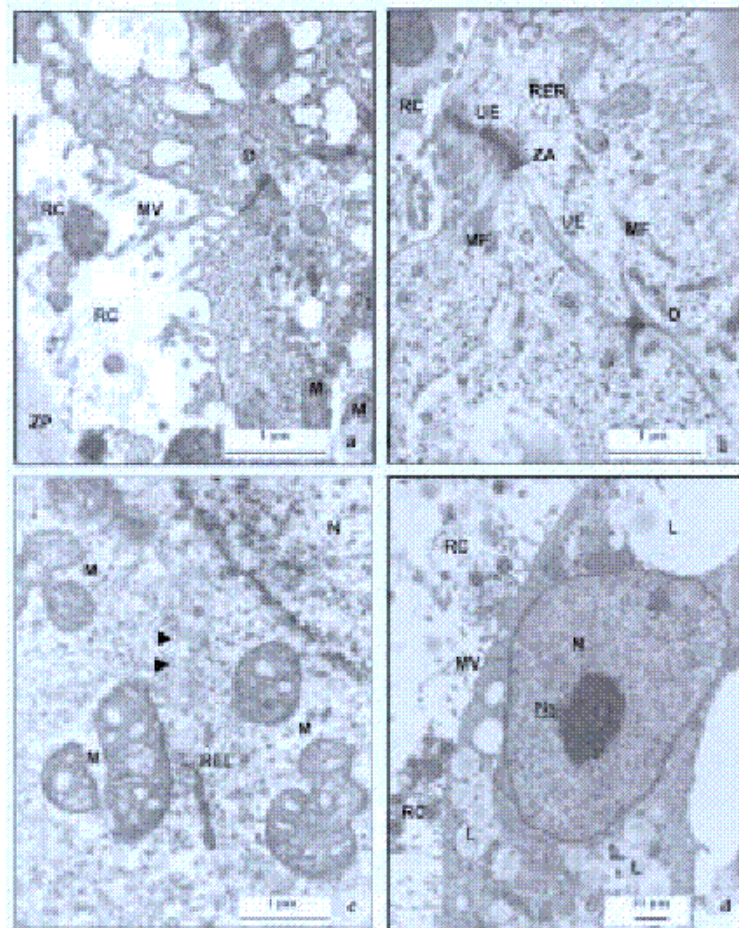


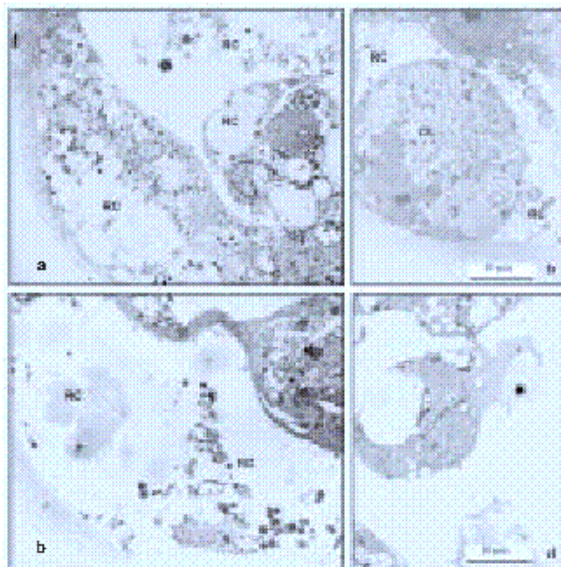
Figura 23. Imágenes de microscopía electrónica de blastocistos porcinos vitrificados/calentados tras 24h de cultivo *in vitro* clasificados como normales a) Contacto entre dos células del trofoectodermo (TF) con numerosos desmosomas (D). Restos celulares (RC), proliferación de microvelosidades (MV) y zona pelúcida (ZP). b) Complejo de unión compuesto por uniones estrechas (UE), zona adherentes (ZA) y desmosoma (D). Microfilamentos (MF) y sistemas del retículo endoplasmático rugoso (RER). Restos celulares (RC) c) Porción del citoplasma en la que se observa parte del núcleo (N), mitocondrias con crestas tubulares y transversales (M), cisternas del retículo endoplasmático liso (REL) y un microtúbulo (→). d) Célula del TF que muestra el núcleo (N) con un nucleolo (Ns), gotas lipídicas fragmentadas (L) y un aumento de las microvelosidades (MV).



Los embriones clasificados como semi-degenerados mediante microscopía de luz (Tabla 9) tenían una ultraestructura intermedia entre los embriones clasificados como normales y los degenerados. En ellos se puede apreciar una cierta gradación en las lesiones celulares que fueron clasificadas como alteraciones grado 2. Se observa que, sin perder la morfología característica del embrión, se ve incrementada la presencia de restos celulares en el espacio perivitelino, así como en el blastocelo (Figura 24a y 24b). Los restos están constituidos por diversos orgánulos entre los que predominan los lípidos, mitocondrias y algunos restos nucleares, en ocasiones se pueden observar células completas de la masa celular interna que son expulsadas al espacio perivitelino (Figura 24b). Es también habitual

observar la dilatación del retículo endoplasmático tanto en las células del trofoectodermo como de la masa celular interna. En algunos blastocistos los restos celulares son más abundantes y la separación de las células del trofoectodermo de la zona pelúcida es mayor (Figura 24c). En algunas células de la masa celular interna se observan procesos de fagocitosis, lo que indica un grado de degeneración mayor (Figura 24d). En estos últimos embriones es posible observar imágenes de núcleos de reducido tamaño y un aumento de la heterocromatina entre las células trofoectodérmicas. Las mitocondrias tienden a presentar una fuerte matriz electrodensa con disminución de las crestas (Figura 24c) y presencia de cuerpos residuales en las células de la masa celular interna.

Figura 24. Imágenes de microscopía electrónica de blastocistos porcinos vitrificados/calentados tras 24h de cultivo *in vitro* y clasificados como "semidegenerados". a, b y c) Abundantes restos celulares (RC) y una célula en el espacio perivitelino (CI). En ciertas zonas el retículo endoplasmático aparece dilatado y las mitocondrias aparecen con la matriz electrodensa y disminución del número de crestas (M). d) Proceso de fagocitosis en una célula de la masa celular interna (*).



Los embriones clasificados como degenerados mediante microscopía de luz (Tabla 9) presentan un incremento de las lesiones anteriormente descritas (alteraciones grado 3). No se conserva la morfología típica del blastocisto y existe una amplia separación de las células del trofoectodermo respecto a la zona pelúcida. En el amplio espacio perivitelino existente se observan restos celulares (Figura 25a). Las células trofoectodérmicas pueden mantener algunos complejos de unión pero tienden a perder su forma plana apareciendo más esféricas (Figura 25 a, b y c). En el citoplasma el retículo endoplasmático está dilatado y se observan amplias vacuolas (Figura 26a). Las células de la masa celular interna son poco numerosas, están separadas unas de otras, junto a algunas de morfología más bien mesenquimal de pequeño tamaño se observan otras esféricas con retículo endoplasmático rugoso ampliamente dilatado (Figura 26a), cuerpos residuales (Figura 26b) y mitocondrias degeneradas muy electrodensas (Figura 26c). Los núcleos de algunas células aparecen arrugados (Figura 26d).

Figura 25. Imágenes de microscopía electrónica de blastocistos porcinos vitrificados/calentados tras 24h de cultivo *in vivo* y clasificados como "degenerados". a) Abundantes restos celulares (RC) en el espacio perivitelino, pérdida de la morfología típica de las células. b) Masa celular interna desorganizada en la que se aprecian varios núcleos (N) y un núcleo fragmentado (N*). c) Detalle de un blastocisto degenerado.

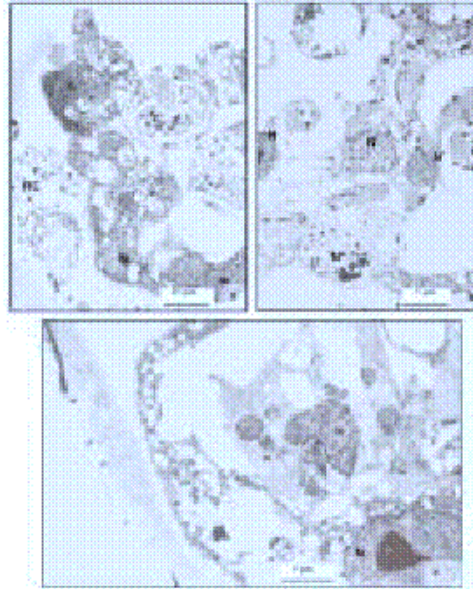
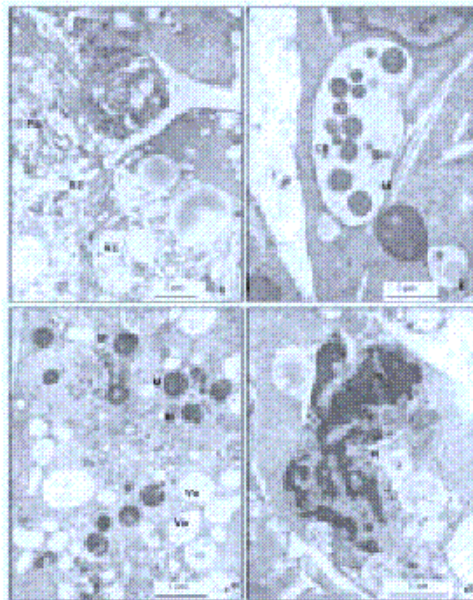


Figura 26. Imágenes de microscopía electrónica de blastocistos porcinos vitrificados/calentados tras 24h de cultivo *in vivo* y clasificados como "degenerados". a) Detalle de un blastocisto degenerado en el que aparecen las cisternas del retículo endoplasmático muy dilatadas (RE). b) Cuerpo residual (CR). c) Grupo de mitocondrias degeneradas muy electrodensas y con pérdida de crestas (M) y numerosas vacuolas (Va). d) Núcleo que muestra fragmentación del ADN (N).



1.2. Niveles de muerte celular

La tinción con H-33342 mostró que después de 24 h de cultivo los blastocistos frescos y los blastocistos vitrificados clasificados como viables con ayuda del estereomicroscopio tenían un número similar de células totales ($167'5 \pm 17'9$ y $145'5 \pm 8'8$ células, respectivamente). Sin embargo, este número fue mucho menor ($p < 0'001$) en los embriones vitrificados considerados degenerados ($45'7 \pm 4'0$).

Las imágenes de las figuras 27 y 28 corresponden a la tinción con H-33342 y a la técnica TUNEL. El porcentaje de blastocistos intactos (embriones que no mostraron células o áreas TUNEL positivas) fue mayor ($p < 0'05$) en los blastocistos frescos (37'5%) que en los blastocistos vitrificados viables (4%) o degenerados (0%). En casi el 70% de estos últimos blastocistos se observaron amplias áreas TUNEL positivas (Tabla 10), el resto mostró un porcentaje de células TUNEL positivas del $19'4 \pm 6'3$ % del total de los núcleos teñidos con H-33342. El porcentaje de células marcadas con TUNEL en relación al número total de células teñidas con Hoescht fue menor ($p < 0'001$) en blastocistos frescos ($1'1 \pm 0'3\%$) que en blastocistos vitrificados viables ($4'3 \pm 3'4\%$).

Tabla 10. Detección de los niveles de muerte celular mediante la técnica TUNEL en blastocistos porcinos frescos y vitrificados tras 24 h de cultivo *in vitro*.

Grupo experimental	Blastocistos totales	Blastocistos intactos N(%)	Blastocistos N(%)		
			Con células TUNEL positivas N (%) (rango de células)	A1	A2
Blastocistos frescos	18	8 (37'5) *	10 (52'5) (1-8)	-	-
Vitrificadas viables	25	1 (4'0) *	24 (96) (1-14)	-	-
Vitrificadas degeneradas	21	0 (0) *	7 (33'3) (1-40)	6 (28'6)	8 (38'1)

*# Diferente superíndice indica diferencias significativas para $p < 0'01$.

A1: Blastocistos que presentaron amplias áreas TUNEL positivas que ocuparon menos de la mitad del embrión.

A2: Blastocistos que presentaron amplias áreas TUNEL positivas que ocuparon la mitad o más de la mitad de la superficie del embrión.

Figura 27 Imágenes de microscopía de fluorescencia correspondientes a la tinción con Hoescht (H-33342) empleada para determinar el número total de células y a la técnica TUNEL de evaluación del nivel de muerte celular. a y a') Blastocistos porcino teñido con H-33342 empleado como control negativo en la técnica TUNEL; b y b') Blastocisto porcino fresco teñido con H-33342 control positivo a la técnica TUNEL (todas las células están marcadas con TUNEL); c y c') Blastocisto porcino fresco tras 24h de cultivo *in vitro*. Imagen de la tinción con H-33342 (c), imagen de la técnica TUNEL (c') en la que se observa el embrión eclosionando y algunas células con rotura del ADN (TUNEL positivas) que muestran intensa fluorescencia verde (marcadas con un círculo). En las imágenes correspondientes a blastocistos expandidos pueden observarse las cabezas de los espermatozoides adheridos a la zona pelúcida marcadas con Hoescht o TUNEL (flechas).

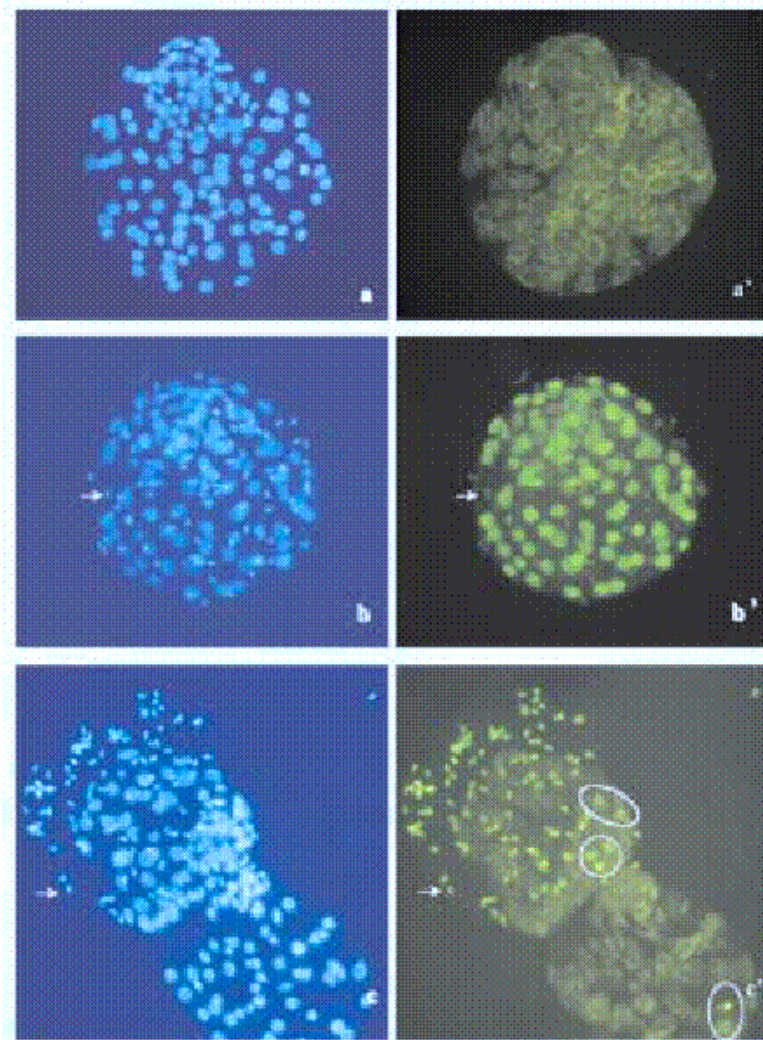
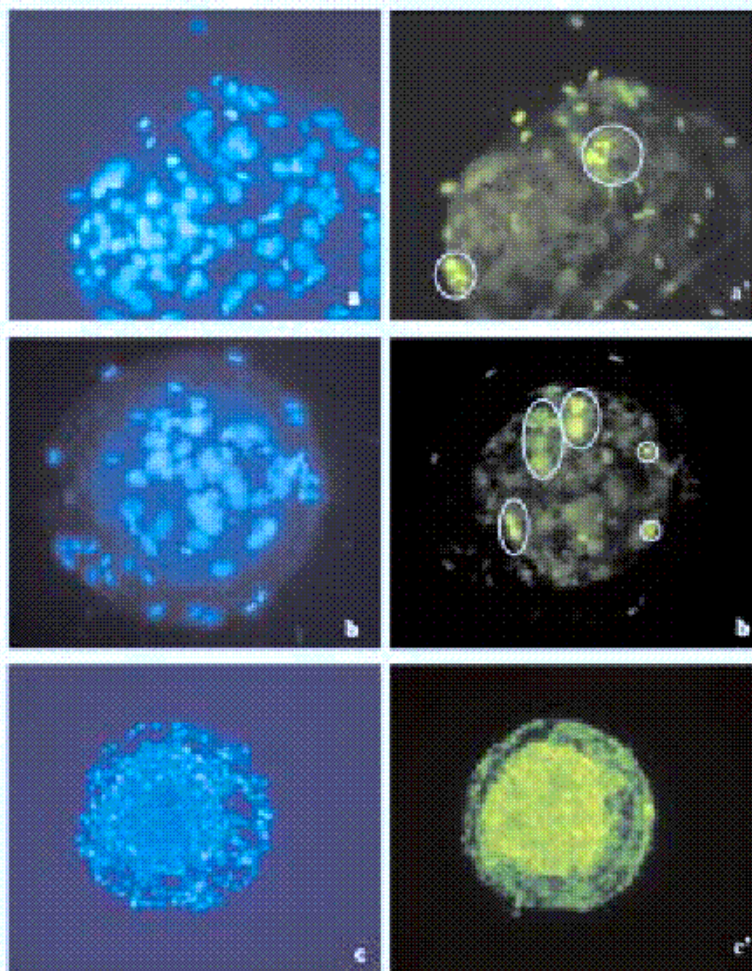


Figura 28. Imágenes de microscopía de fluorescencia correspondientes a la tinción con Hoescht (H-33342) empleada para determinar el número total de células y a la técnica TUNEL de evaluación del nivel de muerte celular de blastocistos porcinos vitrificados/calentados tras 24h de cultivo *in vitro*. a y a') Blastocisto vitrificado/calentado eclosionado clasificado como viable teñido con H-33342 en el que se observan algunas células TUNEL positivas (marcadas con un círculo). b y b') Blastocisto vitrificado/calentado clasificado como viable teñido con H-33342 con células TUNEL positivas (marcadas con un círculo). c y c') Blastocisto vitrificado/calentado clasificado como degenerado teñido con H-33342, obsérvese como el área marcada con TUNEL ocupa la totalidad del área teñida con Hoescht.



2. Experiencia 2: Vitrificación de embriones porcinos en diferentes estadios de desarrollo empleando distintos procedimientos de vitrificación ultra-rápida

En esta experiencia se utilizaron 34 cerdas como donantes de embriones. El número medio (\pm SEM) de cuerpos lúteos en las cerdas donantes de embriones fue de 19.5 ± 0.6 . El porcentaje de embriones recogidos con respecto al número total de cuerpos lúteos fue 86.0%. El número total de embriones recogidos fue 570, de los cuales 2.9%, 41.2%, 14%, 38.6% y 3.3% fueron ovocitos no fecundados y embriones degenerados, mórulas, blastocistos tempranos, blastocistos expandidos y blastocistos eclosionados, respectivamente.

El diámetro medio de los embriones pertenecientes a cada uno de los 3 estadios de desarrollo considerados fue significativamente diferente ($p < 0.01$). El diámetro medio (\pm SEM) fue 149.6 ± 0.1 μ m, 158.7 ± 0.8 μ m y 186.0 ± 1.3 μ m para las mórulas, blastocistos tempranos y blastocistos expandidos, respectivamente. Dentro de cada estadio de desarrollo, el diámetro de los embriones asignados a cada sistema de vitrificación no fue significativamente diferente ($p = 0.69$).

En la tabla 11 se representan los resultados del cultivo *in vitro* de los embriones vitrificados con cada uno de los sistemas a evaluar. El análisis de varianza mostró que el estado de desarrollo embrionario del embrión afectó a los porcentajes de supervivencia y de eclosión obtenidos *in vitro* ($p < 0.001$). Sin embargo, el sistema de vitrificación y la interacción entre ambos factores no tuvo un efecto significativo sobre estos parámetros ($p > 0.05$). El estadio de blastocisto expandido fue el que mostró la mayor supervivencia y eclosión después de la vitrificación y cultivo ($p < 0.001$), mientras que el porcentaje de blastocistos tempranos que se desarrollaron y eclosionaron durante el cultivo fue mayor que el obtenido en el estadio de mórula ($p < 0.001$).

Tabla 11. Porcentajes de supervivencia y eclosión *in vitro* de mórulas (M), blastocistos tempranos (BT) y blastocistos expandidos (B) vitrificados en pajuelas DPS, SOPS y con el sistema Vit-Master con pajuelas SOPS (Vit Master-SOPS), después del calentamiento y 96 h de cultivo *in vitro*.

Sistema de vitrificación	Estadio embrionario	Número de embriones	Supervivencia % (n)	Eclosión % (n)
OPS	M	71	58.3 (40)	25.4 (18)
	BT	22	61.8 (18)	45.5 (10)
	B	68	95.5 (63)	72.7 (48)
SOPS	M	68	57.4 (39)	29.4 (20)
	BT	13	76.9 (10)	46.2 (6)
	B	60	93.3 (56)	83.3 (50)
VitMaster-SOPS	M	71	67.8 (48)	28.8 (19)
	BT	19	94.7 (18)	79.0 (15)
	B	65	89.2 (58)	89.2 (45)

Sistema de vitrificación	Estadio embrionario	Número de embriones	Supervivencia % (n)	Eclósión % (n)
Probabilidad:				
Sistema de vitrificación			NS	NS
Estadio embrionario			0'001	0'001
Sistema de vitrificación x estadio embrionario			NS	NS

Un elevado porcentaje de blastocistos expandidos vitrificados y calentados sobrevivió al procedimiento de vitrificación, con una supervivencia (Figura 29) y porcentaje de eclósión (Figura 30) similar a aquellos obtenidos con blastocistos expandidos frescos. Sin embargo, las mórulas frescas así como los blastocistos tempranos frescos mostraron mayor porcentaje de eclósión que sus correspondientes vitrificados (Figura 30), siendo estas diferencias más pronunciadas para las mórulas ($p<0'001$) que para los blastocistos tempranos ($p<0'01$). Las mórulas vitrificadas también mostraron una pérdida de supervivencia embrionaria con respecto a las mórulas control ($p<0'05$; Figura 29).

Figura 29. Porcentaje de supervivencia de mórulas (M), blastocistos tempranos (BT) y blastocistos expandidos (B) frescos (■) y vitrificados (■) después de 96 h de cultivo *in vitro*. Los números entre paréntesis representan el número de embriones de cada grupo experimental.

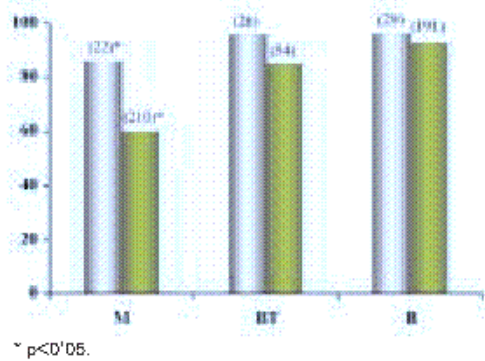
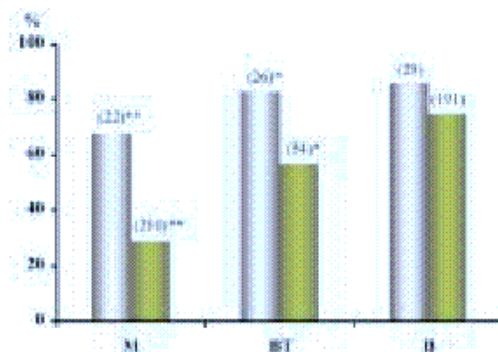


Figura 30. Porcentaje de eclósión de mórulas (M), blastocistos tempranos (BT) y blastocistos expandidos (B) frescos (■) y vitrificados (■) después de 96 h de cultivo *in vitro*. Los números entre paréntesis representan el número de embriones de cada grupo experimental.* $p<0'01$; ** $p<0'001$



3. Experiencia 3: Transferencia de blastocistos vitrificados procedentes de una o dos donantes: Parámetros reproductivos el día 30 de gestación

Los embriones se obtuvieron a partir de 24 donantes sincronizadas y superovuladas. El número medio de cuerpos lúteos fue de 32.5 ± 0.7 por cerda (media \pm SEM). El porcentaje de embriones colectados con respecto al número de cuerpos lúteos fue 81.3%. El número total de embriones obtenidos fue 634, de los cuales el 9.0%, 5.7%, 80.9% y 4.4%, fueron ovocitos no fecundados y embriones degenerados, mórulas, blastocistos y blastocistos eclosionados respectivamente.

Como se muestra en la tabla 12, la supervivencia *in vitro* de los blastocistos vitrificados/calentados tras 96 h de cultivo fue menor ($p < 0.01$) que para los embriones control (73.0% vs 93.7%, respectivamente). También se encontraron diferencias significativas ($p < 0.05$) entre el porcentaje de eclosión de los embriones vitrificados (56.8%) y el de los blastocistos frescos control (79.2%).

Tabla 12. Desarrollo *in vitro* de blastocistos porcinos frescos y vitrificados tras 96h de cultivo *in vitro*.

Tratamiento	Número de blastocistos	Supervivencia % (n)	Eclosión % (n)
Vitrificación	37	73.0 ^a (27)	56.8 ^c (21)
Control (no vitrificados)	48	93.8 ^b (45)	79.2 ^d (23)

Diferente superíndice indica diferencias significativas para $p < 0.01$ (a, b) o $p < 0.05$ (c, d).

El porcentaje de gestación obtenida en las transferencias realizadas con embriones procedentes de una sola donante (grupo 1: 70%) no fue significativamente diferente ($p > 0.05$) que la obtenida para las transferencias realizadas con una mezcla de embriones de dos donantes (grupo 2: 90%) (Tabla 13). Las receptoras no gestantes tuvieron un retorno al estro los días 21-22 del ciclo, con la excepción de una receptora del grupo 1, que retornó al estro el día 28 del ciclo.

Tabla 13. Porcentajes de gestación tras la transferencia quirúrgica de blastocistos porcinos vitrificados/calentados procedentes de 1 ó 2 donantes.

	Número de receptoras	Número de cerdas gestantes	Porcentaje de gestación
1 donante	10	7	70
2 donantes	10	9	90
Total	20	16	80

Los porcentajes de desarrollo y supervivencia *in vivo* de los blastocistos vitrificados fueron del 37.2% y 31.3%, respectivamente. No se observaron diferencias significativas

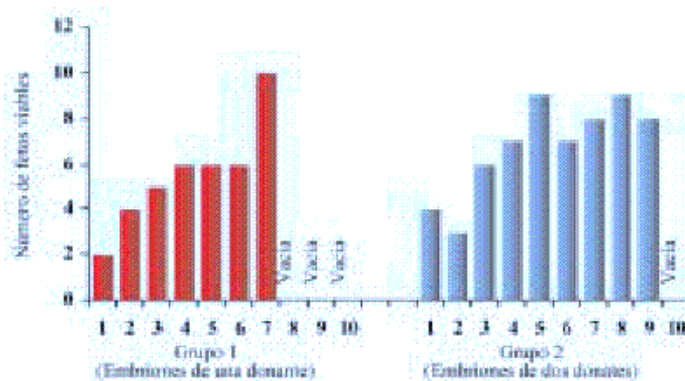
entre los grupos 1 y 2 con respecto al desarrollo *in vivo* (33'6% vs 40'0%, respectivamente), o la supervivencia *in vivo* (27'9% vs 33'9%, respectivamente). Sin embargo, la eficiencia *in vivo* fue mayor ($p<0'05$) cuando las transferencias se realizan con embriones procedentes de dos donantes (Tabla 14). El número de fetos viables el día 30 de gestación en cada una de las receptoras se representa en la figura 31.

Tabla 14. Desarrollo y supervivencia embrionarias *in vivo* el día 30 de gestación tras la transferencia quirúrgica de 20 blastocistos vitrificados/calentados procedentes de una donante (grupo 1) o de dos donantes (grupo 2).

Embriones transferidos (ET)	ET receptoras gestantes (ETG)	Desarrollo (%) (fetos / ETG)	Supervivencia (%) (fetos viables/ETG)	Eficiencia (%) (fetos viables/ET)
Grupo 1	200	140	33'6 (47/140)	23'5* (38/200)
Grupo 2	200	180	40 (72/180)	30'5* (61/200)
Total	400	320	37'2 (119/320)	25'0 (100/400)

Diferente superíndice (a,b) dentro de la misma columna indica diferencias significativas $p<0'02$.

Figura 31. Número de fetos viables el día 30 de gestación tras la transferencia de 20 blastocistos vitrificados procedentes de una (grupo 1) o dos donantes (grupo 2) por receptora.



4. Experiencia 4: Desarrollo *in vitro* de blastocistos vitrificados mediante el sistema SOPS y calentados mediante un sistema directo

Las donantes de embriones (n=7) tuvieron un número medio (\pm SEM) de cuerpos lúteos de $22'7 \pm 1'5$. El porcentaje de embriones recogidos con respecto al número total de cuerpos lúteos fue 96'9%. El número total de embriones colectados fue 154 de los cuales el 5'2%, 1'3%, 90'9% y 2'6% fueron ovocitos no fecundados y embriones degenerados, mórulas y blastocistos tempranos, blastocistos expandidos y blastocistos eclosionados, respectivamente.

El diámetro medio de los embriones obtenidos de cada una de las donantes osciló entre 166 y 200'5 μ m y fue significativamente diferente ($p<0'001$) entre donantes.

Dentro de cada donante, el diámetro medio de los embriones asignado a cada uno de los grupos experimentales (calentamiento convencional o directo) fue similar ($p=0.26$) (Tabla 15).

Tabla 15. Diámetro medio de los blastocistos expandidos vitrificados clasificados según la donante y el sistema de calentamiento.

Donante	Nº de embriones	Diámetro de los embriones (media \pm SEM) μ m		
		totales	calentamiento convencional (3 etapas)	calentamiento directo (1 etapa)
2258	18	183'1 \pm 1'4 ^a	187'0 \pm 2'B	187'2 \pm 3'9
3183	18	178'2 \pm 1'7 ^c	180'2 \pm 4'1	178'8 \pm 5'1
4308	14	188'8 \pm 1'2 ^d	184'2 \pm 1'9	188'1 \pm 3'1
4388	19	187'4 \pm 1'3 ^d	173'0 \pm 1'B	183'2 \pm 1'7
4239	19	200'5 \pm 2'2 ^a	183'8 \pm 3'9	200'2 \pm 4'3
2902	17	171'9 \pm 0'4 ^d	173'4 \pm 1'4	170'0 \pm 2'0
C401	18	175'1 \pm 2'1 ^c	184'5 \pm 2'1	171'7 \pm 2'9
Total	117	170'0 \pm 1'4	179'1 \pm 2'2	179'8 \pm 1'B

Diferentes superíndices (a,b,c,d) dentro de la misma columna indican diferencias significativas para $p<0.001$.

El análisis de varianza mostró que el procedimiento de calentamiento, el diámetro de los blastocistos expandidos y las interacciones entre los factores evaluados no afectaron ($p>0.05$) a los porcentajes de supervivencia y eclosión de los blastocistos vitrificados y calentados. Sin embargo, la donante tuvo un efecto significativo ($p<0.001$) sobre el desarrollo *in vitro* tras la vitrificación (Tabla 16).

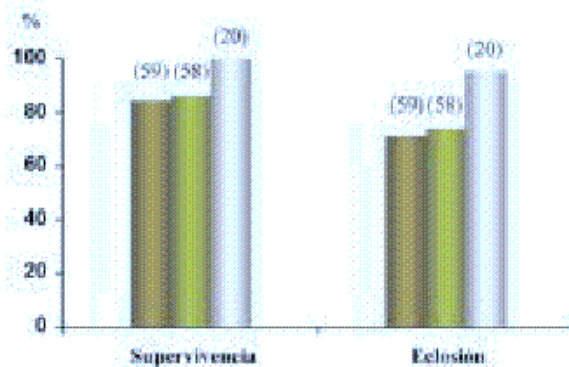
Tabla 16. Porcentajes de supervivencia y eclosión *in vitro* tras 96 h de cultivo *in vitro* de blastocistos expandidos clasificados en función de la donante de embriones.

Donante embriones	Nº de % (n)	Supervivencia % (n)	Eclosión
2258	18	100 (14) ^a	100 (14) ^a
3183	18	100 (18) ^a	93'8 (15) ^a
4308	14	100 (18) ^a	87'5 (14) ^{ab}
4388	19	89'5 (17) ^{ab}	84'2 (18) ^{ab}
4239	19	78'9 (15) ^{ab}	57'9 (11) ^{abc}
2902	17	70'8 (12) ^{ab}	41'2 (7) ^c
C401	18	82'5 (10) ^b	50'0 (8) ^{cb}

Diferentes superíndices (a,b,c) dentro de la misma columna indican diferencias significativas para $p < 0.01$.

Como se muestra en la figura 32, independientemente del procedimiento de calentamiento empleado, un elevado porcentaje de blastocistos expandidos sobrevivió al procedimiento de vitrificación. Aunque no existieron diferencias significativas, los porcentajes de supervivencia y de eclosión de los blastocistos vitrificados tendieron a ser inferiores a aquéllos obtenidos con los blastocistos frescos.

Figura 32. Porcentajes de supervivencia y eclosión de blastocistos frescos (■) y vitrificados calentados mediante el sistema convencional (■) o el sistema directo (■) tras 96 h de cultivo *in vitro*. Entre paréntesis se indica el número de embriones utilizado en cada grupo experimental.

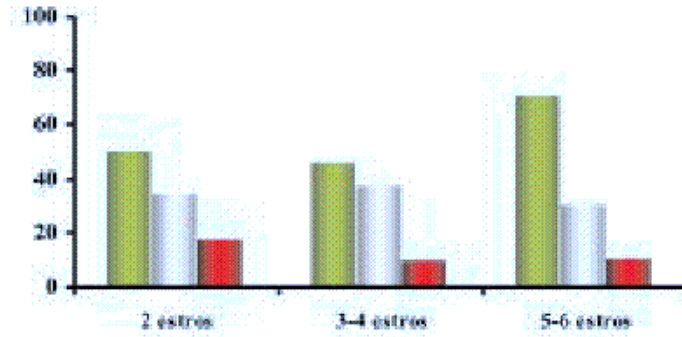


5. Experiencia 5: Transferencia no quirúrgica de blastocistos porcinos vitrificados mediante el sistema OPS

5a. Inserciones del catéter flexible para la transferencia no quirúrgica de embriones

Durante las inserciones del catéter flexible, el 88.9% de las cerdas no mostró reacción o su reacción fue moderada. La reacción de la cerda fue independiente del número de estros ($p > 0.05$) (Figura 33). El número de estros sí tuvo un efecto significativo ($p < 0.05$) sobre las dificultades encontradas durante la inserción del catéter flexible. Como muestra la figura 34, fue imposible insertar el catéter flexible a través del cuello del útero en todas las cerdas de 2 ciclos ($n=6$). En las cerdas con 3 o más estros fue posible pasar el cuello del útero y progresar en el interior de uno de los cuernos uterinos en el 80.9% de los casos.

Figura 33. Porcentaje de cerdas Large White hiperprolíficas nulíparas en su segundo (n=6), tercer-cuarto (n=10) o quinto-sexto (n=11) estro con buena (■), moderada (▨) o mala (■) reacción durante la inserción intrauterina del catéter flexible.



Las dificultades durante la inserción no influyeron ($p>0.05$) en la reacción de la cerda ni en la posición del catéter en el interior del cuerno uterino. El catéter flexible se insertó correctamente en el interior de un cuerno uterino en el 71.4% de las cerdas con 3 o más estros. Los valores predictivos de la localización del catéter se resumen en la tabla 17.

Figura 34. Dificultades encontradas (ninguna o ligera resistencia: ■; moderada o severa resistencia: ▨; imposible de insertar a través del cérvix: ■) durante la inserción intrauterina profunda de un catéter flexible en cerdas Large White hiperprolíficas nulíparas en su segundo (n=6), tercer-cuarto (n=10) o quinto-sexto (n=11) estro. Diferentes superíndices entre grupos indican diferencias significativas ($p<0.01$).

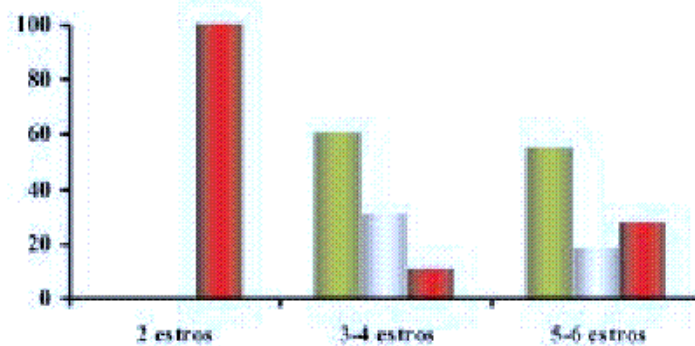


Tabla 17. Posición predictiva del catéter en el interior de un cuerno uterino con relación a la posición real de catéter.

Posición predictiva *	Posición real del catéter **		
	Correcta	Incorrecta	N
Adecuada	14 ^a	0 ^c	14
Inadecuada	1 ^b	2 ^d	3
N	15	2	17

* Después de la inserción del catéter.

** Determinada tras el sacrificio. Sensibilidad (capacidad para identificar las inserciones correctas: a/(a+b): 93'3%. Especificidad (capacidad para identificar las inserciones incorrectas: d/(c+d): 100%. Exactitud total ((a+d)/(a+b+c+d)): 94'1%

En las cerdas en las que el catéter flexible tenía una posición correcta en el cuerno uterino (n=15), el número de estros (3-4 y 5-6 estros) no influyó sobre la longitud del catéter insertada en el interior del cuerno uterino, sobre la longitud del cuerno uterino ni en la progresión del catéter flexible en el interior del útero. La longitud media del catéter flexible insertada en el interior del cuerno uterino y la longitud media del cuerno uterino en el cual fue insertado el catéter fue $63'6 \pm 5'4$ cm (variando entre 27 y 120 cm) y $169'6 \pm 8'2$ cm (variando entre 115 y 250 cm), respectivamente. En 13 de las 15 cerdas (86'7%), el extremo distal del catéter flexible se localizó entre el segundo y el tercer cuarto del cuerno uterino (Tabla 18).

Tabla 18. Resultados (media \pm SEM) de la progresión del catéter flexible en el útero de cerdas Large White hiperprolíficas nulíparas en las que el catéter tuvo una posición correcta (n=5).

	Cuarto del cuerno uterino en el que se localizó el catéter flexible			
	Primero	Segundo	Tercero	Cuarto
Longitud de catéter insertada (cm)	$38'5 \pm 13'4$	$65'2 \pm 3'8$	$68 \pm 17'2$	-
Longitud del cuerno uterino (cm)	$198 \pm 29'7$	$174'1 \pm 11'8$	$144 \pm 16'5$	-
Progresión (%) *	$18'0 \pm 4'1$	$38'9 \pm 3'5$	$58'8 \pm 5'8$	-
Número de cerdas (%)	2 (13'3)	10 (66'7)	3 (20'0)	-

* La progresión del catéter en el cuerno uterino fue definida como el ratio entre la longitud del catéter insertada en el interior del cuerno y la longitud total del cuerno uterino, expresada como un porcentaje.

Las observaciones realizadas tras el sacrificio mostraron que cuando el catéter tenía una posición correcta se encontraba adaptado a la forma del cuerno uterino formando una espiral (Figura 35). El 80% (12 de 15) de las cerdas en las que el catéter tenía una posición correcta presentaban una marca visible (no sangrante) en el endometrio de la primera curvatura del cuerno uterino. La aparición de esta marca no estuvo relacionada con el número de estros de la cerda ($p > 0'05$). Cuando el catéter presentaba una localización incorrecta, se encontraba doblado en el interior del útero formando un bucle. En estos casos se pudo observar una marca visible y dobleces tras su extracción (Figura 36).

Figura 35. Disposición del catéter flexible en el interior de un cuerno uterino.

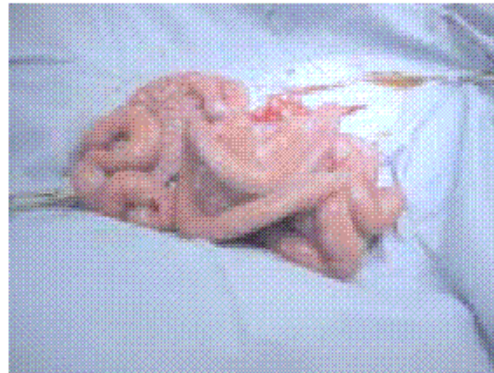
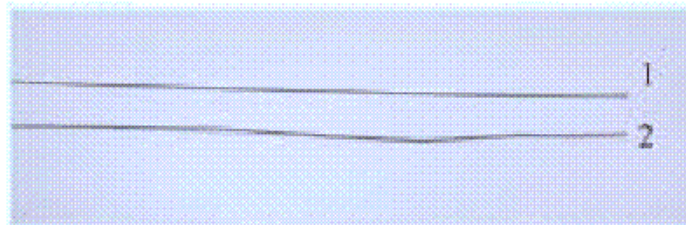


Figura 36. Catéteres de transferencia no quirúrgica de embriones tras su extracción de la cerda.
1) Catéter que presentaba una posición correcta. 2) Catéter que se encontraba formando un bucle en el interior del cuerno uterino, obsérvese su forma irregular.



5b. Transferencia no quirúrgica de embriones vitrificados

Las donantes de embriones ($n=49$) tuvieron un número medio (\pm SEM) de cuerpos lúteos de 27.0 ± 1.3 . El porcentaje de embriones recogidos con respecto al número total de cuerpos lúteos fue 83.3% de los cuales 11.1%, 6.6%, 75.2% y 7.1% fueron ovocitos no fecundados y embriones degenerados, mórulas, blastocistos no eclosionados y blastocistos eclosionados respectivamente. En esta experiencia se utilizaron 420 blastocistos intactos para la vitrificación y posterior transferencia. Los demás embriones se emplearon en otros experimentos.

Los parámetros evaluados durante las transferencias no quirúrgicas de embriones se representan en la tabla 19. En 3 receptoras fue imposible insertar el catéter de transferencia de embriones a través del cervix. El resto de las receptoras recibieron 20 blastocistos vitrificados/calentados cada una. Se observaron retornos al estro regulares (19-23 días) y retrasados (>23 días) en 9 (42.9%) y 2 (9.5%) de las receptoras respectivamente. Diez cerdas (47.6%) fueron diagnosticadas gestantes mediante ecografía el día 25 del ciclo. Una receptora, previamente diagnosticada como gestante retornó al estro el día 34 post-transferencia. La tasa final de parto fue por tanto de 42.9% (9 de 21 receptoras) y el tamaño de camada de 5.4 ± 0.8 lechones (rango de 3 a 9), de los cuales 0.6 ± 0.3 (rango de 0 a 2) fueron nacidos muertos. El peso de los lechones al nacimiento fue 1.1 ± 0.5 Kg. y

no se observaron malformaciones en ninguno de ellos (Figura 37). La supervivencia al parto fue de 24'5%. Se observaron descargas vaginales el día 12 y 28 del ciclo en 2 de las 21 receptoras (9'5%), ninguna de estas cerdas quedó gestante.

Tabla 19. Parámetros evaluados durante las transferencias no quirúrgicas de blastocistos vitrificados/calentados a receptoras Meishan nulíparas.

Parámetro	
Número de cerdas	24
Reacción buena o moderada N (%)	19 (79)
Inserciones posibles N (%)	21 (88)
Longitud de catéter flexible anterior al catéter de IA (cm)	81'8 ± 1.3
Inserciones adecuadas N (%) [~]	21 (100)
Inserciones correctas N (%) [™]	21 (100)

[~] El operador clasificó las inserciones en adecuadas (presumible buena posición en del catéter en el cuerno uterino) o inadecuada (presumible mala posición del catéter o bucle en el interior del cuerno del útero). [™] La inserción se consideró correcta cuando el catéter flexible no presentó dobleces ni marcas tras la transferencia.

Figura 37. Camada obtenida tras la transferencia no quirúrgica en el interior del cuerno uterino de blastocistos vitrificados/calentados de genotipo Large White a receptoras nulíparas Meishan.



Discusión

1. Experiencia 1: Estudio de la morfología y los niveles de muerte celular de blastocistos porcinos vitrificados

Los procesos de vitrificación y calentamiento de embriones suponen generalmente una pérdida de calidad embrionaria que tradicionalmente se ha atribuido a daños físicos y químicos que sufren los embriones durante ambos procedimientos. En esta experiencia intentamos evaluar la calidad embrionaria, en términos de ultraestructura y de fragmentación del ADN, de blastocistos vitrificados/calentados con el objetivo de compararlos con blastocistos frescos y determinar la eficiencia de la evaluación morfológica clásica realizada con un estereomicroscopio.

Inmediatamente después del calentamiento, los blastocistos vitrificados presentan un blastocele colapsado, lo que hace muy difícil su evaluación en este momento. Esta apariencia refleja importantes alteraciones estructurales del embrión, muchas de las cuales son progresivamente reparadas en los blastocistos supervivientes, y están prácticamente ausentes tras 24 h de cultivo *in vitro* (Vajta y cols., 1997b). Por esta razón, en nuestro estudio los blastocistos se evaluaron a las 24 h de cultivo con el fin de distinguir mediante un estereomicroscopio los blastocistos viables, que se re-expandieron y reformaron su cavidad blastocélica, de aquellos que permanecieron colapsados y fueron consecuentemente clasificados como degenerados.

En esta primera experiencia, los porcentajes de supervivencia y eclosión fueron menores en los blastocistos vitrificados que en los frescos tras 24 h de cultivo *in vitro*. Además, el porcentaje de eclosión de los blastocistos vitrificados (12'8%) obtenido en este estudio fue mucho menor que el obtenido en las experiencias posteriores. Este hecho puede estar relacionado con el corto periodo de cultivo (24 h) empleado después del calentamiento, ya que es sabido que los embriones vitrificados/calentados necesitan un periodo para re-expandirse y por ello su desarrollo *in vitro* está retrasado con relación a los embriones frescos (Vajta, 1997d).

Con respecto a la evaluación ultraestructural, los blastocistos frescos después de 24 h de cultivo mostraron características similares a aquellas descritas previamente por otros autores (Maddox-Hyttel y Boerjan, 2002) para blastocistos frescos después de su obtención. Como ocurre en blastocistos bovinos vitrificados (Vajta y cols., 1997), los blastocistos vitrificados considerados morfológicamente viables con ayuda de un estereomicroscopio fueron estructuralmente diferentes a los embriones frescos. La mayoría de estos blastocistos (78'3%) presentaron una ultraestructura normal, mostrando sólo algunos signos de daño previo como la presencia de escasos restos celulares que podían aparecer en el espacio perivitelino o en el blastocele, y un incremento de las microvellosidades apicales. Estas ligeras alteraciones (grado 1) parecen no afectar de forma importante a la supervivencia embrionaria, ya que se han obtenido altas tasas de parto tras la transferencia de blastocistos vitrificados/calentados, que han dado como resultado el nacimiento de lechones totalmente normales (Berthelot y cols., 2001; 2002). Sin embargo, en algunos embriones considerados viables mediante el estereomicroscopio (21'7%), se detectó un daño estructural extenso (blastocistos semi-degenerados; alteraciones grado 2) que podrían comprometer su viabilidad. Basados en el presente estudio, podemos indicar que la eclosión puede ser un pará-

metro más efectivo que la supervivencia para estimar la calidad de los embriones después del calentamiento, ya que todos los blastocistos vitrificados que eclosionaron durante el cultivo *in vitro*, fueron ultraestructuralmente similares a los blastocistos frescos, presentando únicamente ligeras modificaciones (grado 1). Además, las observaciones con el estereomicroscopio proporcionan una información veraz sobre los embriones degenerados que presentaron, como se esperaba, desintegración y desorganización a nivel ultraestructural.

La calidad embrionaria también se evaluó mediante la tinción con Hoechst y la técnica TUNEL para determinar el número total de células y el número de células viables. Como se ha indicado previamente, la vitrificación retrasa el desarrollo de los embriones. Por este motivo, el número total de células tras 24 h de cultivo tendió a ser inferior después de la vitrificación y el calentamiento en comparación con los blastocistos frescos. Los blastocistos clasificados como degenerados con ayuda del estereomicroscopio no progresaron durante el cultivo como muestra el bajo número de células totales (45.7 ± 4.0). Este bajo número de células de los blastocistos degenerados después del cultivo sugiere que, debido a la vitrificación y posterior calentamiento, se produce una desintegración de numerosas células del embrión.

El porcentaje de células positivas al TUNEL en blastocistos frescos ($1.1 \pm 0.3\%$) indica que la muerte programada (apoptosis) de unos pocos blastómeros es un proceso natural que da como resultado la eliminación de células innecesarias o dañadas. Estudios previos muestran que la apoptosis es un proceso que ocurre en condiciones fisiológicas en embriones de diferentes especies de mamíferos antes de su implantación (Hardy y Spanos, 2002). Por otro lado se ha demostrado que el almacenamiento de los blastocistos porcinos a 38°C en TCM durante un periodo de 24 h no incrementa los niveles de apoptosis determinadas mediante TUNEL (Pomar y cols., 2003). Por ello en el presente estudio, el porcentaje de células positivas al TUNEL en embriones frescos tras 24 h de cultivo debería ser comparable al existente antes del cultivo *in vitro*. Aunque el porcentaje de células positivas al TUNEL en blastocistos vitrificados clasificados como viables por medio del estereomicroscopio es baja ($4.3 \pm 3.4\%$), fue mayor ($p < 0.001$) que el obtenido en el caso de los blastocistos frescos, demostrando que la vitrificación y el calentamiento aumentan la muerte celular. Sin embargo, las consecuencias funcionales de este ligero aumento de células TUNEL positivas son desconocidas. El aumento de muerte celular debido a los procesos de vitrificación y calentamiento es evidente si tenemos en cuenta el porcentaje de embriones degenerados después del calentamiento, en comparación con el grupo de blastocistos frescos. Estos blastocistos degenerados mostraron amplias áreas TUNEL positivas (66.7% de los blastocistos degenerados) o un importante porcentaje de células positivas al TUNEL (33.3% de los blastocistos degenerados).

A partir de los resultados de esta experiencia podemos concluir que la vitrificación y el calentamiento afectan la calidad de los blastocistos porcinos en términos de morfología y muerte celular. En este estudio el 76% de los blastocistos vitrificados/calentados fueron considerados viables tras 24 h de cultivo *in vitro* mediante observación con un estereomicroscopio. Estos embriones presentaron un bajo número de células con fragmentación del ADN (TUNEL positivas) y el 80% de ellos mostró unas características ultraestructurales similares a los blastocistos frescos.

2. Experiencia 2: Vitrificación de embriones porcinos en varios estadios de desarrollo empleando diferentes procedimientos de vitrificación ultra-rápida

El objetivo de este estudio fue investigar la eficiencia de tres sistemas de vitrificación (OPS, SOPS y Vit Master-SOPS) para la criopreservación de blastocistos porcinos con una zona pelúcida intacta y sin pre-tratamientos. Con el fin de evaluar la aplicación práctica de esta técnica para su futuro uso para la transferencia de embriones, se emplearon embriones en tres estadios de desarrollo: mórula, blastocisto temprano y blastocisto expandido.

Se ha demostrado que los blastocistos en estadio de "peri-hatching" (blastocistos expandidos próximos a la eclosión o embriones recién eclosionados), presentan el mejor desarrollo *in vitro* después de la vitrificación y el calentamiento (revisado por Berthelot y cols., 2003). Sin embargo, por razones de higiene, la Sociedad Internacional de Transferencia de Embriones (IETS) restringe la obtención, criopreservación y transporte a embriones con una zona pelúcida intacta (Stringfellow, 1998). Además, las mórulas y los blastocistos tempranos parecen ser los más adecuados para la transferencia de embriones a escala comercial, por tratarse de embriones más resistentes a las manipulaciones al presentar una zona pelúcida más gruesa que los blastocistos expandidos.

Las mórulas y blastocistos tempranos tienen un mayor contenido de lípidos en comparación con los blastocistos en estadio de "peri-hatching" (Niimura and Ishida, 1980), lo que parece ser la causa de su mayor sensibilidad al frío (Toner y cols., 1986). Aunque se ha descrito que determinados pre-tratamientos, como la delipidación (Nagashima y cols., 1994) y estabilización del citoesqueleto y centrifugación (Dobrinsky y Johnson, 1994; Dobrinsky y cols., 2000), pueden mejorar el éxito de la criopreservación de mórulas y blastocistos tempranos, los métodos de vitrificación utilizados en este estudio no implicaron pre-tratamientos de los embriones, ya que los protocolos que requieren manipulaciones específicas y aquellos que implican la rotura de la zona pelúcida son menos apropiados para su aplicación práctica.

Aunque se ha especulado que un incremento en la velocidad de enfriamiento puede disminuir el daño por frío que sufren los embriones, el efecto de la velocidad de enfriamiento sobre la viabilidad de los embriones porcinos en diferentes estadios de desarrollo tras la vitrificación y el calentamiento no ha sido totalmente establecido. Se ha demostrado que la supervivencia *in vitro* de blastocistos vitrificados con el sistema OPS es superior a la obtenida con el sistema tradicional (pajuelas de 0'25 ml) de vitrificación (Beebe y cols., 2000; Berthelot y cols., 2000; Holm y cols., 1999; Vajta y cols., 1997c). Más aún, las mórulas, que no podían ser criopreservadas con los sistemas tradicionales de vitrificación, se han vitrificado con éxito con el sistema OPS (Berthelot y cols., 2000; Vajta y cols., 1997c). Estos resultados sugieren que el incremento en la tasa de enfriamiento desde 2.500°C/min (pajuelas de 0'25ml; Rall, 1987) a 20.000 °C/min (sistema OPS; Vajta, 1998a) tiene un efecto positivo sobre la viabilidad embrionaria *in vitro*. En esta experiencia, la supervivencia y la eclosión no se vieron afectadas ($p > 0'05$) por el método de vitrificación utilizado (OPS, SOPS y Vit-Master-SOPS). Estos resultados indican que, bajo nuestras condiciones expe-

rimentales, un incremento en la velocidad de enfriamiento por encima de, aproximadamente, 20.000°C/min, como ocurre cuando se emplean las pajuelas SOPS (Isachenko, 2001) o el sistema Vit-Master-SOPS (Arav, 2002), no mejora la eficiencia del desarrollo *in vitro* de mórulas y blastocistos después del calentamiento. Sin embargo, se observaron diferencias en el desarrollo *in vitro* de los embriones que fueron independientes del sistema de vitrificación empleado. El mayor porcentaje de supervivencia *in vitro* de los embriones vitrificados obtenido en esta experiencia fue en el grupo de blastocistos expandidos, siendo similar a aquél obtenido con los blastocistos expandidos frescos. Igual que en estudios previos (revisado por Berthelot y cols., 2003), las mórulas mostraron los resultados más pobres de supervivencia y eclosión *in vitro* después del calentamiento (60'5% y 27'1%, respectivamente), los cuales fueron significativamente inferiores a aquéllos obtenidos con embriones frescos en el mismo estadio de desarrollo. (86'3% y 68'2%, respectivamente).

Los procedimientos que aumentan la velocidad de enfriamiento por encima de los 20.000°C/min tienen la posible ventaja de que la vitrificación ocurre con concentraciones más bajas de crioprotectores (Palasz and Mapletoft, 1996). Debido a que las soluciones de crioprotectores son tóxicas para los embriones, una reducción de la concentración de estos compuestos podría tener un efecto beneficioso sobre su supervivencia. Sin embargo, es necesario continuar investigando para optimizar las concentraciones de crioprotectores, necesarias para cada sistema de vitrificación, ya que la concentración óptima de crioprotectores podría estar relacionada con la velocidad de enfriamiento y el estadio de desarrollo embrionario.

En conclusión, el incremento de la velocidad de enfriamiento por encima de los 20.000°C/min durante la vitrificación, bajo nuestras condiciones experimentales, no mejora el desarrollo *in vitro* de mórulas, blastocistos tempranos y blastocistos expandidos tras el calentamiento. Aunque los sistemas de vitrificación ultra-rápidos son efectivos para preservar embriones porcinos en estadio de blastocisto temprano y expandido, es necesario realizar más investigaciones antes de que estos métodos puedan tener una aplicación práctica. Esta tecnología puede ser mejorada optimizando los protocolos a las características específicas de los embriones, como por ejemplo su estadio de desarrollo.

3. Experiencia 3: Transferencia de blastocistos vitrificados procedentes de una o dos donantes. Parámetros reproductivos al día 30 de gestación

El propósito de este estudio fue investigar si la mezcla de embriones de dos donantes puede afectar a la tasa de gestación obtenida mediante la transferencia quirúrgica de blastocistos vitrificados/calentados. Las cerdas donantes se sometieron a un tratamiento de superovulación con el fin de obtener suficientes embriones de una donante (20 blastocistos) para hacer una transferencia. Las concentraciones de eCG y hCG administradas fueron relativamente bajas (1.000 UI y 500 UI, respectivamente) porque se ha evidenciado que la viabilidad de los embriones producidos mediante superovulación puede estar comprometida si la respuesta ovárica es demasiado elevada (Holz y Schlieper, 1991). Más aún, se ha demostrado que el desarrollo embrionario se ve afectado con dosis elevadas de

eCG (Hazeleger y cols., 2000a). En nuestro experimento, la supervivencia *in vitro* (73'0% de re-expansión y un 56'8% de eclosión), la tasa de gestación (80%) y el desarrollo embrionario *in vivo* (37'2%) son similares a aquéllos obtenidos con embriones procedentes de cerdas no superovuladas (Berthelot y cols., 2002), lo que sugiere que el tratamiento de superovulación empleado fue efectivo.

No se encontraron diferencias significativas ($p > 0'05$) en la tasa de gestación entre los grupos 1 (blastocistos procedentes de una sola donante) y 2 (embriones procedentes de dos donantes) de transferencias (70% vs 90%). Estos resultados confirman las observaciones de Hazeleger y cols. (2000b), quienes no encontraron ningún efecto al usar una mezcla de embriones frescos procedentes de dos donantes sobre la tasa de gestación el día 21 del ciclo, en comparación con los resultados obtenidos transfiriendo embriones procedentes de una única donante. Más aún, el presente estudio demuestra que la mezcla de embriones de dos donantes no tiene efecto sobre el desarrollo embrionario *in vivo* o la supervivencia *in vivo*. Sin embargo, la eficiencia *in vivo* sí se vio afectada. Cuando las transferencias se realizaron con embriones procedentes de dos donantes, la eficiencia *in vivo* (30'5%) fue mayor ($p < 0'05$) que para aquellas transferencias realizadas con embriones procedentes de una sola donante (19'5%). Este hecho podría deberse a un efecto individual de la donante. Se ha descrito que el genotipo, el estado de desarrollo y el diámetro del embrión (Dobrinsky y cols., 2000; Nagashima y cols., 1992) son factores importantes que afectan a la vitrificación de los embriones y a la viabilidad embrionaria postcalentamiento. En este sentido, la donante como factor individual podría jugar un papel importante en la tolerancia de los embriones a los procedimientos de criopreservación (Youngs, 2000) y capacidad de vitrificación, del mismo modo que el verraco es un factor esencial en la criopreservación espermática (Johnson y cols., 2000). Así, cuando se emplea una mezcla de embriones de diferentes donantes para la transferencia, el efecto individual de la donante se minimiza, este fenómeno podría explicar las diferencias entre grupos encontradas en este estudio.

Nuestros resultados indican que la mezcla de embriones de dos donantes aumenta la eficiencia *in vivo* después de la transferencia de blastocistos porcinos vitrificados/calentados. Sin embargo, es necesario estudiar cómo afecta el factor donante a los procedimientos de vitrificación y transferencia de embriones.

4. Experiencia 4: Desarrollo *in vitro* de blastocistos vitrificados mediante el sistema SOPS y calentados mediante un sistema directo

En esta experiencia se evaluó la efectividad de un protocolo de calentamiento y eliminación de los crioprotectores en un paso para embriones porcinos vitrificados con el sistema SOPS. Este procedimiento sería ideal para la transferencia directa vía quirúrgica o no quirúrgica en condiciones de campo, ya que elimina los pasos necesarios para el lavado de embriones, reduciendo significativamente el tiempo necesario para el calentamiento y manipulaciones específicas.

Es sabido que el medio de vitrificación necesita una mezcla de crioprotectores a con-

centraciones muy elevadas para evitar la formación de cristales de hielo (Rall y Fahy, 1985). Tras el calentamiento, estos crioprotectores deben ser eliminados debido a su elevada toxicidad para el embrión (Weber y cols., 1992; Yoshino y cols., 1993; Dobrinsky, 1996). Los protocolos de calentamiento para embriones vitrificados mediante el sistema OPS incluyen concentraciones decrecientes de un soluto no permeable, generalmente la sacarosa (Vajta y cols., 1997c; Berthelot y cols., 2000, 2001, 2002; Cameron y cols., 2004). El empleo de concentraciones decrecientes de sacarosa durante el calentamiento intenta evitar cambios bruscos de osmolaridad en el medio que podrían afectar al embrión. En el momento del calentamiento, la presión osmótica en el interior del embrión es muy elevada debido a su elevado contenido en crioprotectores permeables, por lo que podría tener lugar una rápida entrada de agua en el embrión que originaría un choque osmótico. La sacarosa es un soluto impermeable que actúa como un tampón osmótico, previene la entrada de agua en el embrión y por tanto el choque osmótico. En presencia de sacarosa, el agua no penetra en las células y los crioprotectores permeables difunden pasivamente al exterior del embrión. Finalmente, después de la eliminación de los crioprotectores, los embriones se rehidratan en un medio isotónico libre de sacarosa y se re-expanden hasta recuperar su volumen normal (Rall, 1992).

En nuestro estudio, el sistema de calentamiento y eliminación de los crioprotectores no afectó ($p > 0.05$) el desarrollo *in vitro* de los blastocistos porcinos vitrificados. Estos resultados sugieren que el calentamiento en una etapa es suficientemente eficiente para evitar el choque osmótico de los embriones. Resultados previos demuestran la efectividad del calentamiento directo de embriones ovinos vitrificados (Baril y cols., 2001) en comparación con el sistema tradicional de calentamiento y eliminación de crioprotectores en varias etapas.

Por otro lado, cuando se realiza el calentamiento directo de los embriones y su transferencia a las receptoras, la sacarosa no se elimina del medio que contiene los embriones, lo que podría tener un efecto negativo sobre la viabilidad embrionaria. Sin embargo, no parece que concentraciones de sacarosa similares a las empleadas en este protocolo de calentamiento sean perjudiciales, ya que se ha demostrado que concentraciones superiores no son dañinas para los embriones porcinos a 39°C durante un periodo de 20 min (Weber y Youngs, 1994). Además, recientemente se ha publicado el nacimiento de las primeras camadas obtenidas tras la transferencia no quirúrgica de embriones porcinos vitrificados y calentados mediante un sistema de calentamiento directo (Cuello y cols., 2002). Se puede especular que dentro del útero de la cerda receptora el medio de calentamiento en el que los embriones son transferidos se reabsorbe rápidamente, y que, posteriormente, los embriones se rehidratan en las secreciones uterinas de igual modo que lo hacen en el medio de cultivo *in vitro*.

Una desventaja de los sistemas de calentamiento directo es que los embriones no son evaluados ni seleccionados antes de la transferencia. Sin embargo, experiencias preliminares realizadas *in vitro* pueden ofrecer una información importante y fiable sobre la criotolerancia de los embriones y la pérdida de viabilidad debida a los procesos de vitrificación y calentamiento. El protocolo de calentamiento de una etapa evaluado en este estudio parece ser adecuado, aunque es necesario continuar la investigación con el fin de establecer la concentración de sacarosa más efectiva y las condiciones ideales de calentamiento

que aseguren la total eliminación de los crioprotectores, así como determinar la eficiencia de este protocolo de calentamiento mediante la transferencia de embriones vitrificados.

En nuestro estudio, tuvimos en cuenta el diámetro de los blastocistos expandidos y la donante de embriones como factores que podrían afectar a la supervivencia de embriones tras la vitrificación. Se ha descrito que el diámetro de los blastocistos eclosionados afecta a su viabilidad cuando son vitrificados empleando pajuelas de 0'25 ml. Los blastocistos eclosionados de más de 400 μm de diámetro tienen un desarrollo *in vitro* más pobre después de la vitrificación que los blastocistos eclosionados de menor tamaño (Dobrinsky y cols., 2000). Sin embargo, no se ha estudiado la influencia del diámetro dentro de los embriones en estadio de blastocistos expandido sobre su supervivencia después de la vitrificación. En el presente estudio se emplearon blastocistos expandidos con un diámetro medio de $179'6 \pm 1'8 \mu\text{m}$ (oscilando entre 166'6 y 200'5 μm). Aunque se encontraron diferencias entre el diámetro medio de los embriones procedentes de cada una de las donantes ($p < 0'001$), que podrían corresponder a ligeras diferencias en la edad real de los embriones, los porcentajes de supervivencia y eclosión no se vieron afectadas ($p > 0'05$) por este parámetro.

Resultados previos sugieren que la donante de embriones puede jugar un papel importante en la capacidad de vitrificación de los embriones porcinos, de la misma manera que el verraco es un factor fundamental en la criopreservación espermática (Johnson y cols., 2000). Experimentos recientes demostraron que el "lote", definido como los embriones obtenidos de una donante en una recogida, afecta la supervivencia de los embriones vitrificados tras el calentamiento (Fujino y cols., 2003). Los resultados del presente estudio confirman este hecho. Aunque se ha descrito que existen diferencias entre donantes con respecto a la respuesta de los embriones a la sacarosa (Weber y Youngs, 1994), lo cual podría afectar a la tolerancia de los embriones a la vitrificación y calentamiento, los factores que están envueltos en el efecto de la donante sobre la supervivencia de los embriones vitrificados son desconocidos. Debido a que la donante influye en el desarrollo *in vitro* de los embriones porcinos vitrificados, en las investigaciones sobre vitrificación se debe garantizar la distribución homogénea de los embriones de una donante entre los diferentes grupos experimentales del estudio.

La vitrificación y el calentamiento directo de los embriones porcinos vitrificados, son procedimientos prometedores para ser empleados en la práctica. Sin embargo, es necesario continuar la investigación con el fin de aumentar la eficiencia de los procedimientos de calentamiento y para determinar la efectividad del sistema de calentamiento directo en combinación con la transferencia no quirúrgica de embriones porcinos en condiciones de campo.

5. Experiencia 5: Transferencia no quirúrgica de blastocistos porcinos vitrificados mediante el sistema OPS

Hasta el momento se ha conseguido transferir con éxito embriones porcinos vía no quirúrgica (Galvin y cols., 1994; Li y cols., 1996; Hazeleger y Kemp, 1994, 2001; Ducro-Steverink y cols., 2004; Martínez y cols., 2001, 2004), y se han obtenido camadas

mediante transferencia quirúrgica de embriones vitrificados (Kobayashi y cols., 1998; Beebe y cols., 2000, 2003; Berthelot y cols., 2000, 2001, 2002; Dobrinsky y cols., 2000, 2001). Sin embargo, el estudio realizado en esta experiencia es el primero en describir el nacimiento de lechones como resultado de la transferencia no quirúrgica de embriones vitrificados.

La inserción de catéteres especialmente diseñados para la transferencia no quirúrgica de embriones se ha realizado únicamente en cerdas multíparas (Hazeleger y Kemp, 1994), ya que el cuello uterino de las cerdas nulíparas es más difícil de pasar. Sin embargo, recientemente se ha desarrollado una nueva técnica para la transferencia intrauterina profunda de embriones vía no quirúrgica (Martínez y cols., 2002, 2004) en cerdas nulíparas y multíparas, técnica que se utiliza en el presente experimento. En la primera parte de la experiencia, se estudió el efecto del número de estros de las cerdas nulíparas sobre la efectividad de la inserción del catéter flexible. Los resultados obtenidos indican que el catéter no pudo ser insertado en aquellas cerdas nulíparas con dos estros, ya que presentaban un cuello del útero estrecho y con pliegues fuertemente cerrados. Por el contrario, fue posible insertar el catéter y que éste progresara a lo largo del cuerno uterino en el 80% de las cerdas con 3 o más estros. Aunque el número de cerdas utilizado fue bajo, los resultados sugieren que un repentino cambio en la distensibilidad del cuello uterino puede tener lugar entre el segundo y tercer estro.

Como se ha descrito previamente (Martínez y cols., 2004), el procedimiento de inserción intrauterina profunda del catéter flexible de TE fue aparentemente indoloro y bien tolerado por las cerdas ya que no se encontró reacción, o ésta fue moderada en aproximadamente en el 90% de las cerdas. Esta respuesta fue además independiente del número de ciclos. Incluso cuando el grado de dificultad fue elevado, o cuando fue imposible pasar el cervix con el catéter, el comportamiento de las cerdas no se vio afectado por el procedimiento de inserción.

El porcentaje de predicciones correctas de la localización interior del catéter en el útero (94'1%) y el porcentaje de inserciones incorrectas no identificadas por el operario con respecto al número total de inserciones (1 de 17 inserciones, 5'6%) fue similar al publicado anteriormente (96'1% y 4'4%, respectivamente; Martínez y cols., 2004). Del mismo modo, el porcentaje de inserciones apropiadas fue similar en ambos estudios (71'4 y 79'3%). Ya que estos datos han sido recogidos por diferentes operarios, se puede sugerir que personal de diferentes laboratorios pueden utilizar este procedimiento con éxito tras un periodo corto de entrenamiento.

En el presente estudio, la correcta posición de catéter en el interior del útero no se vio afectada por las dificultades encontradas durante la inserción del catéter. Estos resultados contradicen las observaciones realizadas por Martínez y cols. (2004), quienes encontraron una relación entre ambos parámetros en las inserciones realizadas en cerdas nulíparas. La diferencias entre resultados podrían deberse al bajo número de cerdas que presentaron dificultades moderadas o severas durante la inserción en ambos trabajos.

En el endometrio del 80% de las cerdas en las que la sonda presentó una posición correcta se observó una marca en la primera curvatura del cuerno uterino. Una marca similar fue descrita tras la inserción de un fibroendoscopio flexible en cerdas híbridas durante

el estro (Martínez y cols., 2001b). En este estudio, se sugirió que la marca del endometrio no tenía un efecto perjudicial sobre la fertilidad de las cerdas sometidas a inseminación intrauterina profunda mediante este procedimiento. Sin embargo, es sabido que los embriones permanecen en la porción distal del cuerno uterino hasta el día 6 del ciclo, y es durante los días 7 y 8 cuando migran a lo largo del cuerno uterino (Dziuk, 1985). Así, cuando los embriones alcanzan la primera curvatura del cuerno uterino, el daño endometrial causado durante la inseminación intrauterina posiblemente ha sido reparado. La situación puede ser muy diferente tras la TE no quirúrgica ya que los embriones son transferidos el día 4'5-5 del ciclo más cerca de la primera curvatura del cuerno uterino. El efecto de esta marca sobre la implantación y posterior desarrollo embrionario tras la transferencia no quirúrgica de embriones necesita ser dilucidado.

Con procedimientos desarrollados recientemente (revisados por Hazeleger y Kemp, 2001), se han realizado transferencias de embriones vía no quirúrgica sin sedación de las receptoras. Sin embargo, la deposición de los embriones sólo puede realizarse en el cuerpo uterino o inicio de un cuerno de cerdas multíparas. Se ha sugerido que uno de los problemas asociados a los sistemas de transferencia no quirúrgica es el lugar de deposición de los embriones en el interior del útero. Resultados obtenidos mediante transferencia de embriones vía quirúrgica muestran que es indiferente si los embriones se transfieren en el extremo distal o en la mitad del cuerno uterino (Stein-Stefani y Holtz, 1987). Sin embargo, la tasa de gestación fue menor cuando los embriones se depositaron en el cuerpo del útero (12%), en comparación a las transferencias realizadas en la mitad (88%) o el cuarto distal del cuerno uterino (81%) (Wallenhorst y Holtz, 1999). Estos resultados indican que el cuerpo del útero no es un lugar óptimo para los embriones de 5 a 6 días de desarrollo. De acuerdo con estos resultados, una tasa de gestación relativamente alta (70'8%) se ha obtenido mediante transferencia no quirúrgica en la profundidad de un cuerno uterino utilizando embriones frescos (Martínez y cols., 2004), aunque, desafortunadamente, en este estudio la posición exacta del extremo distal del catéter no pudo ser determinada. Los resultados obtenidos en nuestro experimento muestran que el extremo distal del catéter flexible alcanzó el segundo o tercer cuarto del cuerno uterino en el 86'7% de las cerdas LWh nulíparas. Aunque esta localización parece ser apropiada para los embriones, al menos cuando se transfieren embriones frescos, se necesita desarrollar más investigaciones para determinar con exactitud el efecto del lugar de deposición de los embriones sobre los resultados de fertilidad tras la TE vía no quirúrgica.

En la segunda parte de esta experiencia, describimos los primeros intentos de transferencia no quirúrgica de blastocistos vitrificados/calentados. En el presente trabajo, el sistema de calentamiento empleado fue directo con el fin de realizar transferencias directas, que son más fáciles de llevar a cabo en condiciones de campo, tal y como se ha realizado ya en otras especies (Baril y cols., 2001; Saha y cols., 1996). Este protocolo fue el puesto a punto en la experiencia 4 con ligeras modificaciones para adaptarlo a las condiciones de campo.

A pesar de las medidas asépticas, el 9'5% de las receptoras mostraron síntomas de infección uterina en forma de descargas vaginales tras la TE no quirúrgica. Estos resultados difieren de aquéllos presentados previamente empleando este mismo proce-

dimiento de TE no quirúrgico, donde ninguna de las 24 receptoras utilizadas presentó síntomas de infección uterina en los días posteriores a la inserción del catéter flexible (Martínez y cols., 2004). Probablemente, las diferentes condiciones higiénicas de las granjas influyen en la incidencia de descargas vaginales posteriores a la transferencia no quirúrgica de embriones.

Desde hace varias décadas existen métodos para la transferencia vía quirúrgica de embriones porcinos. La aplicación de estos sistemas para la transferencia de embriones frescos ha resultado en altas tasas de gestación (90%) y de supervivencia embrionaria en las cerdas gestantes el día 30 de gestación (61'9%) (Polge, 1982). Cuando se aplican los sistemas de transferencia quirúrgica a la transferencia de embriones vitrificados también se obtienen altas tasas de gestación (del 80% al 100%), aunque la supervivencia embrionaria en el parto es más pobre (32-37%) que la obtenida con embriones frescos (Berthelot y cols., 2002; Cameron y cols., 2004). Probablemente, esto es debido a la pérdida de viabilidad embrionaria después de la vitrificación y el calentamiento.

Con respecto a la transferencia no quirúrgica de embriones frescos, varios autores han obtenido tasas de partos que se sitúan entre el 33% y el 70'8% y una supervivencia embrionaria en el parto, que oscilan entre el 20% y el 38% (revisado por Hazeleger y Kemp, 1999; Martínez y cols., 2004). Sin embargo, cuando estas dos tecnologías, transferencia no quirúrgica y vitrificación de embriones porcinos, se combinan, como sucede en el presente experimento, la eficiencia de la transferencia disminuye en términos de tasa de partos (42'9%), aunque la supervivencia embrionaria es similar a aquella obtenida mediante el uso de procedimientos no quirúrgicos con embriones frescos (24'5%). Estos resultados podrían mejorarse incrementando el número de embriones vitrificados/calentados transferidos. El número de blastocistos empleado por transferencia en este estudio (20) podría ser demasiado bajo, considerando la pérdida de viabilidad debida a la vitrificación, y teniendo en cuenta que los estudios previos de transferencia de embriones vía no quirúrgica emplean una media de embriones frescos que oscila entre 25 y 30 (Hazeleger y Kemp, 2001; Martínez y cols., 2002, 2004).

En conclusión, nuestros resultados indican que es posible obtener el nacimiento de lechones mediante transferencia no quirúrgica de embriones porcinos vitrificados/calentados. La transferencia intrauterina profunda no quirúrgica y el sistema de vitrificación OPS son procedimientos prometedores para el transporte e intercambio del material genético. Sin embargo, estas tecnologías deben ser optimizadas, y diferentes parámetros que puedan afectar a la vitrificación y a la transferencia tienen que ser estudiados con el fin de aumentar su eficiencia.

Conclusiones

1. La vitrificación y el calentamiento afectan la calidad de los blastocistos porcinos en términos de morfología y muerte celular. Un alto porcentaje (78%) de blastocistos vitrificados/calentados fueron considerados viables mediante estereomicroscopía tras 24 horas de cultivo *in vitro*, estos embriones presentaron un bajos niveles de muerte celular y el 80% de ellos mostró unas características morfológicas y ultraestructurales similares a los embriones frescos.

2. Un incremento de la velocidad de enfriamiento por encima de los 20.000°C/min durante la vitrificación no mejora el desarrollo *in vitro* de mórulas, blastocistos tempranos y blastocistos expandidos porcinos tras el calentamiento.

3. La donante de embriones tiene un efecto significativo sobre el desarrollo embrionario *in vitro* tras la vitrificación y el calentamiento.

4. El empleo de una mezcla de embriones procedentes de dos donantes incrementa la eficiencia *in vivo* después de la transferencia quirúrgica de blastocistos porcinos vitrificados/calentados.

5. El método clásico de calentamiento en tres etapas de los embriones porcinos vitrificados puede sustituirse por un método directo (una etapa) sin disminuir la viabilidad *in vitro* de los embriones.

6. Se puede obtener una tasa de parto y un tamaño de camada aceptables mediante la transferencia no quirúrgica de embriones porcinos vitrificados/calentados a receptoras nulíparas con tres o más estros.

Resumen

Recientemente la transferencia de embriones porcinos ha experimentado un desarrollo importante. Sin embargo, su aplicación práctica es aún limitada debido al elevado coste de los sistemas quirúrgicos de obtención y transferencia de embriones, así como a las dificultades para la conservación de embriones porcinos durante largos periodos de tiempo. En la actualidad, se están desarrollando procedimientos prometedores para la transferencia no quirúrgica de embriones. Por otro lado, la mejora de los procedimientos de vitrificación, concretamente del sistema Open Pulled Straw (OPS) ofrece muy buenas perspectivas para la preservación de embriones en esta especie. En el presente trabajo se estudiaron diferentes factores que pueden afectar a la eficiencia de la vitrificación, así como diversos aspectos técnicos del procedimiento y su futura aplicación a la transferencia de embriones porcinos.

En primer lugar, se investigó la calidad de embriones vitrificados/calentados en términos de morfología y niveles de muerte celular (determinados mediante TUNEL), y se compararon los resultados obtenidos con estas técnicas con aquéllos que ofreció la evaluación clásica basada en el estudio morfológico mediante estereomicroscopía. Esta experiencia mostró que la vitrificación y el calentamiento afectaron a la calidad de los embriones porcinos. Un elevado porcentaje de los blastocistos vitrificados/calentados (76%) fueron considerados viables con ayuda de un estereomicroscopio tras 24 h de cultivo *in vitro*; la mayoría de ellos (80%) mostraron un bajo nivel de muerte celular y unas características morfológicas similares a los blastocistos frescos.

En un segundo experimento se evaluó el efecto de la velocidad de enfriamiento y del estadio de desarrollo embrionario, sobre el desarrollo *in vitro* tras la vitrificación y el calentamiento, se emplearon tres sistemas de vitrificación (open pulled straws: OPS; open pulled straw superfina: SOPS; y la tecnología Vit-Master® con pajuelas SOPS) para vitrificar mórulas, blastocistos tempranos y blastocistos expandidos. El sistema de vitrificación o la interacción entre el sistema de vitrificación y el estadio de desarrollo no tuvieron un efecto significativo en el desarrollo embrionario *in vitro*. Sin embargo, los blastocistos expandidos vitrificados mostraron los mejores porcentajes de supervivencia y eclosión *in vitro*, siendo éstos similares a los obtenidos con los blastocistos expandidos frescos. Los porcentajes de eclosión de las mórulas y blastocistos tempranos fueron mayores que los de las mórulas y blastocistos tempranos vitrificados.

Con el objetivo de realizar posteriormente transferencias de embriones porcinos vitrificados, investigamos si la mezcla de embriones de dos donantes puede afectar a los resultados de la transferencia. Para ello se realizaron transferencias de embriones vitrificados procedentes de una donante (grupo 1) o de dos donantes (grupo 2). El porcentaje de gestación se determinó mediante ultrasonografía el día 25 después de la detección del estro y las receptoras se sacrificaron el día 30 de gestación para estudiar el desarrollo embrionario *in vivo*. Los resultados indicaron que la mezcla de embriones procedentes de dos donantes no afectó el porcentaje de gestación, el desarrollo *in vivo* (número de fetos/embriones transferidos a las receptoras gestantes) ni a la supervivencia *in vivo* (número de fetos viables/embriones transferidos a las receptoras gestantes) de los embriones, sin embargo incrementó la eficiencia *in vivo* (número de fetos viables/embriones totales transferidos) obtenida tras la transferencia de blastocistos porcinos vitrificados/calentados.

Por otro lado, la necesidad de personal entrenado y equipamiento especializado para el calentamiento y manejo de los embriones vitrificados, así como la transferencia de embriones, son aspectos técnicos que deben ser mejorados antes de que la transferencia de embriones porcinos vitrificados pueda tener aplicación práctica. En este sentido se desarrolló un sistema directo de calentamiento (una etapa) antes de realizar transferencias no quirúrgicas de embriones en condiciones de granja. Utilizando este sistema los resultados de desarrollo *in vitro* fueron similares a los obtenidos mediante el calentamiento clásico en varias etapas. Finalmente, en el presente estudio, se realizaron por primera vez transferencias no quirúrgicas de blastocistos vitrificados (sistema OPS) empleando el sistema de calentamiento en una etapa y un catéter flexible para la transferencia no quirúrgica de embriones en el interior de un cuerno uterino. Como resultado se obtuvo una tasa de partos del 40% y un tamaño de camada de 5/6 lechones.

Summary

Although, tremendous progress has been made in scientific aspects of porcine embryo transfer, its commercial application is still limited. This is mainly due to the high cost of surgical embryo collection and transfer procedures. In addition difficulties of the long-term storage of porcine embryos have hindered its commercial applications too. Recently promising non-surgical porcine embryo transfer techniques have been developed these techniques may be appropriate for routine use in the field. In addition development of embryo vitrification, specifically "Open Pulled Straw" (OPS) technology has opened new perspectives for pig embryo preservation.

The aim of this work was to investigate several factors which may affect the efficiency of embryo vitrification and transfer in pigs. Thus, five experiments were carried out with the following specific objectives: 1) to evaluate the quality of fresh and vitrified/warmed porcine blastocysts in terms of morphology and cell death levels, 2) to study the influence of cooling rate and the embryo developmental stage on the *in vitro* development of vitrified/warmed porcine embryos, 3) to verify whether pooling embryos from two donors could affect the results of the transfer of vitrified/warmed porcine blastocysts, 4) to compare the *in vitro* survival and hatching rates of OPS-vitrified porcine blastocysts obtained after conventional (three-steps) and direct (one-step) warming procedures and 5) to determine the farrowing rate and the litter size obtained after non-surgical deep intrauterine embryo transfer of porcine blastocysts vitrified by the OPS method.

To fulfill the first objective, we investigated the quality of fresh and vitrified/warmed pig blastocysts in terms of morphology as evaluated by electron microscopy and the level of cell death as determined by TUNEL. In addition we evaluated embryos using conventional techniques such as stereomicroscopy. Our initial results showed that vitrification and warming affect the quality of porcine embryo. However, a high percentage (>75%) of the vitrified/warmed blastocysts were considered viable by stereomicroscopy after 24 h of *in vitro* culture. The majority of these embryos (80%) had a low number of dead cells and displayed similar morphological characteristics compared to that of fresh blastocysts.

In the second experiment, the effect of the cooling rate and the embryo developmental stage on *in vitro* embryo development after vitrification and warming was evaluated. Three different vitrification systems (open pulled straw: OPS; superfine open pulled straw: SOPS; and Vit-Master" technology using SOPS: Vit-Master-SOPS) were used to vitrify porcine morulae, early blastocysts or expanded blastocysts. The vitrification system or the interaction of vitrification system and developmental stage had no effect ($p>0.05$) on the embryo survival or hatching rate *in vitro*. However, vitrified expanded blastocysts showed the best development *in vitro* ($p<0.001$). These embryos had survival and hatching rates similar to those of fresh expanded blastocysts. The hatching rate of fresh morula or early blastocyst stage embryos was higher ($p<0.05$) than that obtained with their vitrified counterparts.

In the third experiment, embryos from one donor (group 1) or two donors (group 2) were transferred to asynchronous recipients. Pregnancy was assessed at day 25 after estrus and all recipients were slaughtered at day 30 of gestation. The results indicated that pooling embryos from two donors did not significantly affect the gestation rate, the *in vivo* development (number fetuses/transferred embryos in pregnant recipients) or the *in vivo*

embryo survival (number viable fetuses/transferred embryos in pregnant recipients). However a significant increase ($p < 0.05$) in the *in vivo* efficiency (number viable fetuses/total transferred embryos) was obtained after transfer of vitrified/warmed porcine blastocysts when a pool of embryos from two donors was used for transfer.

In the fourth experiment we tested a direct (one-step) warming procedure in order to perform non-surgical embryo transfers under field conditions. This one-step procedure showed to be adequate for warming vitrified porcine embryos and the results of *in vitro* development of vitrified embryos were not different from those obtained after classical warming (several steps).

Finally, we performed, for the first time, non-surgical transfers of vitrified (OPS method) porcine blastocysts using the one-step warming protocol and a flexible catheter for non-surgical deep intrauterine embryo transfer in pigs obtaining a farrowing rate and litter size of 40% and 5.6 piglets, respectively. These preliminary results indicated the possibility of obtaining live piglets following non-surgical deep intrauterine transfer of vitrified/warmed porcine embryos.

Extended Summary

1. Introduction

During the last several years, important advances in porcine reproductive technologies have been made for medical purposes and for optimizing animal breeding. One of the major advancements has been the development of porcine embryo transfer procedures. The use of this technique contributes to the movement of genetic resources with enhanced animal welfare, minimal risk of disease transmission and reduced transportation costs in comparison with transport of live animals. Embryo transfer is also essential for the application of others reproductive biotechnologies such us *in vitro* embryo production or cloning. Despite the advantages of embryo transfer, its commercial application is still limited due to the high cost of surgical embryo collection and transfer procedures, and to the difficulties for the long-term storage of fresh porcine embryos.

While it is possible to routinely cryopreserve embryos from several mammalian species (Dobrinisky, 2002; Leibo and Songsasen, 2002), the cryopreservation of pig embryos has largely been limited by their high sensitivity to chilling injury (Polge et al., 1974, Wilmut, 1972). At present, vitrification is regarded as an alternative to traditional slow freezing procedures, which do not offer satisfactory results for the cryopreservation of porcine embryos (Berthelot et al., 2003). The improvement of vitrification systems, specifically the Open Pulled Straw (OPS) method (Vajta, 1998a), has provided high pregnancy and farrowing rates after surgical transfer of vitrified/warmed embryos (Berthelot et al., 2000; Berthelot et al., 2001; Berthelot et al., 2002). However, further studies of the factors affecting embryo survival after vitrification and technical aspects of the procedure are required before this technology can be widely applied.

Classically it has been accepted that vitrification and warming adversely affect embryo quality, in terms of *in vitro* embryo survival and hatching rate (Berthelot et al., 2003). This loss of viability could be due to the damage suffered by biological structures, resulting from direct toxic and osmotic effects during vitrification and warming. The majority of investigations on vitrified embryo quality are based on morphological evaluations by using a stereomicroscope. Therefore, these evaluations may be inconclusive since some abnormalities and alterations can not be detected at this level as revealed previous ultrastructural studies carried out with bovine vitrified embryos (Vajta et al., 1997d). Although some studies dealing with the ultrastructure (Maddox-Hyttel and Boerjan, 2002) and cell death levels (Pomar et al., 2003) in porcine fresh embryos are available, no investigations of these parameters have been performed in vitrified/warmed embryos. The study of the qualitative differences between fresh and vitrified/warmed embryos is essential to provide a better knowledge of the efficiency of the vitrification and warming, and to optimize these procedures in order to yield vitrified embryos at morphological quality that is comparable to their fresh counterparts. Moreover, it would be essential to clarify if the morphological evaluation by stereomicroscopy, which is usually used to study the embryo survival after vitrification and warming, gives reliable information about embryo viability.

On the other way, it has been demonstrated that many factors such as the stage of embryonic development (Dobrinisky, 2001b) and cooling rates (Arav et al., 2002) can influence survival of pig embryos after vitrification. Hatched blastocysts and blastocysts at the

peri-hatching stage tolerate slow freezing without special pre-treatment of the embryos (2-50% survival *in vitro*; Berthelot et al. 2003), while morulae and early blastocysts do not survive this cryopreservation procedure (Dobrinsky, 1997a). Vitrification results in higher survival rates after warming (33 to 90%) when untreated early to hatched blastocysts stage embryos are used (Berthelot et al., 2000, Kobayashi et al., 1998a; Holm et al., 1999; Kuwayama et al., 1997). However, although untreated morulae survive vitrification, the *in vitro* hatching rates continue to be lower than those obtained from blastocysts (Berthelot et al., 2000). Cooling rate seems to be a key factor in embryo vitrification. An increase in cooling rate decreases chilling injury (Dobrinsky and Johnson, 1994; Rall, 1987) and may permit a reduction of cryoprotectant concentration (Vajta, 2000). Until recently, embryos from several species have been vitrified in straws of 0.25 ml volume; these straws limit the cooling rate to less than 2,500°C/min (Rall, 1987). The success of vitrification procedures has been enhanced by using new containers such as open pulled straws (OPS; Vajta et al., 1998a), which increase the cooling rate approximately eight-fold in comparison with the 0.25 ml straws. More recently, the OPS cooling rate has been increased by using straws with a smaller inner diameter and wall thickness (superfine open pulled straws: SOPS; Isachenko, 2003a) or with the development of a new device (Vit-Master; Minitüb, Tiefenbach, Germany), whereby the liquid nitrogen temperature is reduced to -210°C by applying negative pressure (Arav, 1998). These procedures increase the cooling rate to approximately four-times that achieved in OPS straws with regular liquid nitrogen (Arav et al., 2002). Thus, their application could enhance the efficiency of the vitrification of embryos in different developmental stages.

Although it is well documented that many factors influence the *in vivo* efficiency of fresh embryo transfer (Youngs, 2000), little is known about the factors that affect the transfer of vitrified porcine embryos. Recently, several research groups have transferred surgically a pool of vitrified/warmed embryos from several donors, obtaining a farrowing rate of 80% and a litter size of 5.9 piglets (Berthelot et al., 2002). In these cases, more embryos are needed for transfer, in order to compensate for the loss of embryo viability associated with vitrification. Transfers of vitrified/warmed embryos are usually carried out with a pool of 16 to 38 embryos from several donors (Berthelot et al., 2000; Berthelot et al., 2001; Cameron et al., 2000; Dobrinsky, 2000; Kobayashi et al., 1998a, 1998b). Because of that, it would be interesting to study whether pooling embryos from several donors may affect the efficiency of the transfer of vitrified embryos compared with the transfers performed with embryos from one donor.

It is evident that the improvement and simplification of the porcine embryo vitrification procedure will involve a great boost to the embryo transfer in this species. In this way, the requirement of trained personnel and optical equipment for warming and handling of vitrified embryos as well as the embryo transfer methods are technical aspects which have to be improved before the transfer of vitrified porcine embryos could have a practical application.

With regard to the embryo warming, the conventional warming methods for OPS-vitrified embryos require several steps with graded solutions of a non-permeable solute such as sucrose to remove the high concentration of cryoprotectants used during vitrification

(Vajta et al., 1997c; Berthelot et al., 2000, 2001, 2002). Since Leibo (1984) introduced a method for direct thawing of bovine embryos frozen by conventional methods, direct warming methods have been successfully performed with vitrified bovine (Vajta et al., 1995; Saha et al., 1996) and sheep (Baril et al., 2001, Isachenko et al., 2003b) embryos. These microscope-free methods are ideal for use in practice, and their application to vitrified porcine embryos may substantially simplify the transfer procedure by warming embryos directly in a syringe, which would be immediately connected to the embryo surgical or non-surgical transfer catheter without any special manipulations.

On the other hand, promising non-surgical embryo transfer (ET) methods in pigs are being developed (Hazeleger and Kemp, 1994, 2001; Martínez et al., 2003, 2004) which may be appropriate for routine field use. New perspectives for ET have occurred with the development of non-surgical ET methods by several authors who have reported farrowing rates from 33 to 64% and litter size from 3.1 to 6.7 after ET in non-sedated recipients (Hazeleger and Kemp, 2001). In these methods, embryos are transferred into the uterine body or beginning of a uterine horn. However, it has been shown after surgical ET that those places are less appropriate to deposit embryos than the middle or last third of the uterine horn (Wallenhorst and Holtz, 1999). Recently, a new device for non-surgical ET into the depth of one uterine horn in non-sedated females has been designed (Martínez et al., 2004). Using this procedure, a farrowing rate of 70.8% and a litter size of 6.9 have been achieved after transfer of fresh embryos.

The development of porcine embryo vitrification in conjunction to a practical non-surgical ET system, will allow numerous applications in research, medicine, animal production and genetic improvement. The aim of this work was to investigate several aspects which may affect the efficiency of embryo vitrification and transfer in pigs. Thus, five experiments were carried out with the following specific objectives:

1. To evaluate the quality of fresh and vitrified/warmed porcine blastocysts in terms of (1) morphology and (2) total number of cells and cell death levels and to compare these parameters with morphological study carried out by stereomicroscopy.
2. To compare three different vitrification systems (OPS, SOPS and Vit-Master-SOPS) in order to clarify the influence of cooling rate on the *in vitro* development of vitrified/warmed porcine embryos at different developmental stages (morulae, early blastocysts or expanded blastocysts).
3. To verify whether pooling embryos from two donors could affect the results of the transfer of vitrified/warmed porcine blastocysts and to know the reproductive parameters at one month of pregnancy after surgical transfer of vitrified/warmed blastocysts from either one or two superovulated donors.
4. To compare the *in vitro* survival and hatching rates of OPS-vitrified porcine blastocysts obtained after conventional (three-steps) and direct (one-step) warming procedures.
5. To determine the farrowing rate and the litter size obtained after non-surgical deep intrauterine embryo transfer of porcine blastocysts vitrified by the OPS method.

2. Material and Methods

2.1. Animals

Embryo donors were Large White Hyperprolific gilts (LWh) from INRA-Nouzilly (France) aged 8 to 10 months and weaned crossbred sows (2 to 6 parities) from a commercial farm (Dalland Hybrid-España, Murcia, Spain). Animals were allocated individually to crates in a mechanically ventilated confinement facility and were fed with a commercial ration twice a day. Water was provided ad libitum.

Embryo recipients were Meishan or LWh gilts aged 8 to 10 months maintained under the same conditions than embryo donors.

2.2. Embryo production

In this work embryos were obtained from donors with natural or induced estrus were used.

2.2.1. Estrus detection and artificial insemination in donors with natural estrus

Estrus detection was carried out once (University of Murcia) or twice (INRA-Nouzilly) a day by exposing females to a mature boar and by applying back pressure. Females that showed a standing estrus reflex were considered to be in estrus and were artificially inseminated 12 and 24 h after initial detection of estrus using fresh semen collected from adult Pietrain boars (3×10^9 spermatozoa diluted to 100 ml with BTS extender).

2.2.2. Estrus detection and artificial insemination in donors with induced estrus

Gilts were treated twice (10:00 h and 16:00 h) with 175 mg of Cloprostenol im (Planate", Schering-Plough Vétérinaire, France) on day 14 of the estrous cycle. (Day 0= first day of estrus). Superovulation was carried out by administration of 1000 IU eCG im (Chrono-Gest", Intervet, France) 24 h after the second dose of Cloprostenol. Ovulation was induced by administration of 500 IU hCG im (Chorulon", Intervet, France), 48 h after eCG treatment. Then, estrus detection was carried out twice a day by exposing females to a mature boar. Only gilts that exhibited estrus within 40 h after hCG treatment were used as donors. Donors were artificially inseminated 12 and 24 h after detection of estrus as described previously.

2.3. Embryo collection

Embryos were recovered by flushing the uterine horns after slaughter or surgically by laparotomy.

2.3.1. Embryo collection after slaughter

Donors were slaughtered in an experimental slaughterhouse at day 5.5 to 6 of the estrous cycle. Immediately after slaughter and before scalding of the gilts, the genital tract was collected. Corpora lutea were counted on the ovaries, and the embryos were recovered by flushing the uterine horns with 100 mL of saline solution (0.9% NaCl) containing 2% newborn calf serum (NBCS, Bio Whittaker, France). The flushing medium was recovered in Petri dishes and embryos were found and evaluated using a stereomicroscope.

2.3.2. Embryo collection by laparotomy

Embryos were obtained surgically by laparotomy on day 6 of the estrus cycle. Donors were sedated by the administration of azaperone (2 mg/kg body weight, im). General anesthesia was induced with sodium thiopental (7 mg/kg body weight, iv) and maintained with halothane (3.5 to 5%). The reproductive tract was exposed via mid-line incision and corpora lutea were counted on the ovaries. Embryos were collected by flushing each uterine horn with 30 ml of NCSU-23 medium (Petters and Wells, 1993) supplemented with 0.4% of bovine serum albumin and 10 mM of HEPES (Basic medium: BM). Medium was recovered in 50 ml tubes (Falcon, USA). Then, medium was placed in Petri dishes in order to locate the embryos under a stereomicroscope. Collected embryos were placed in eppendorf tubes containing 2 ml of flushing medium and were transported at 39°C to the laboratory in a thermostatically controlled incubator (BB-16, Heraeus Instruments, Germany). In the laboratory embryos were washed twice in BM and were maintained in this medium until vitrification.

2.4. Embryo evaluation

Recovered embryos were evaluated under a stereomicroscope to grade their developmental stage and quality. One-cell eggs and embryos poorly developed were classified as unfertilized oocytes and degenerated embryos, respectively. Only embryos in morula and unhatched blastocyst stages, graded as excellent or good for morphological appearance, were used in the experiments.

2.5. Vitrification and Warming

Embryo vitrification was performed using the protocol described by Vajta (1997) and adapted to porcine embryos by Berthelot et al. (2000), except for using 17% ethylene glycol (EG; Sigma, Alcobendas, Spain) and 17% dimethyl-sulfoxide (DMSO; Sigma, Alcobendas, Spain) in the second vitrification medium instead of 18% for each cryoprotectant.

The basic medium for cryoprotectant dilution was TCM199 HEPES (Sigma, Alcobendas, Spain) supplemented with 20% newborn calf serum (NBCS; Sigma, Alcobendas, Spain) (TCMm). Embryo handling was performed in a laboratory at ambient temperature (22-24°C) and all vitrification media were held at 39°C. Groups of 4 to 6 embryos were equilibrated using a four-well multidish as summarized in Table 1. During the last step, embryos were drawn up in a 1.5-2 ml drop and loaded into the narrow end of a straw (OPS or SOPS) by capillary action. Subsequently, straws containing the embryos were plunged into liquid nitrogen.

Table 1. Experimental outline of vitrification.

Medium	Time (min)
TCMm	
TCMm	
TCMm+7.5%DMSO+7.5%EG	3
TCMm+17%DMSO+17%EG + 0.4M Sucrose	1

TCM: TCM199 Hepas; NBCS: newborn calf serum; DMSO: dimethyl-sulfoxide; EG: ethylene glycol.
TCMm: TCM199 Hepas supplemented with 20% newborn calf serum.

For warming, straws containing embryos were held at ambient temperature for 2 sec after removal from the liquid nitrogen. The narrow end was immersed vertically in a well containing 800 ml TCMm with 0.13 M sucrose (Sigma, Alcobendas, Spain). After 1 min, embryos were transferred into another well with the same medium for 5 min. The embryos were equilibrated in TCMm containing 0.075 M sucrose for 5 min. Finally, the embryos were placed into a culture dish with 100 ml TCMm into an incubator at 39°C with 5% CO₂ in air until their use.

2.6. Embryo culture

To evaluate *in vitro* development, embryos were cultured in multidish plates with 96 wells in 100 ml droplets of TCM 199 supplemented with 10% fetal calf serum (Sigma, Alcobendas, Spain) at 39°C, in 5% CO₂ in humidified air. During the *in vitro* culture, embryos were morphologically appraised for their developmental progression. The viability of morulae was assessed by their ability to develop into. Vitrified blastocysts that reformed their blastocoelic cavities after warming, and blastocysts with a normal or thinning zona pellucida and an excellent or good appearance during the culture were also considered viable.

The *in vitro* survival rate is defined as the ratio of viable embryos to the total number embryos cultured. The hatching rate is determined as the ratio of the number of embryos hatched *in vitro* to the total number embryos cultured.

2.7 Experimental design

2.7.1. Experiment 1: Morphology and cell death levels of vitrified porcine blastocysts

This experiment was conducted at the experimental farm of INRA Nouzilly (France) and at the University of Murcia (Spain). Embryos were collected after slaughter at day 5.5-6 of the estrous cycle from synchronized and superovulated LWL gilts ($n=9$). Only embryos in unhatched blastocyst stage, graded as excellent or good for morphological appearance, were selected for this experiment. Some blastocysts from each donor were cultured *in vitro* for 24 h to evaluate the *in vitro* development of fresh embryos ($n=29$). A group of the remaining blastocysts of each donor were vitrified and warmed 4 h after vitrification ($n=125$) and cultured *in vitro* for 24 h. After the culture period, fresh and vitrified/warmed embryos were assessed by a stereomicroscope for their morphological progression and morphologically classified as viable or degenerated. A group of fresh ($n=13$), vitrified viable ($n=23$) and vitrified degenerated ($n=9$) blastocysts were processed for transmission electron microscopy evaluation to assess their ultrastructure.

Another group of fresh ($n=16$) and vitrified viable ($n=25$) and vitrified degenerated ($n=21$) blastocysts were stained with Hoechst and TUNEL. Nuclei with DNA-degradation were detected using a cell death detection technique based on terminal deoxynucleotidyl transferase (TdT) mediated dUTP nick end labeling (TUNEL) principle as described Brison and Schultz (1997) and Byrne (1999) with minor modifications. Hoechst was used to label all nuclei in order to evaluate the total cell number per embryo. Samples were examined under a fluorescence microscope (Eclipse E800, Nikon, Japan) using excitation filters of 465-495 nm and 330-380 nm for green and blue fluorescence respectively. The number of total nuclei, which were stained with Hoechst and displayed blue fluorescence, was counted. The number of nuclei labeled by TUNEL (dead cells), which showed yellowish green fluorescence, was also recorded. When the blastocysts did not display TUNEL positive nuclei or areas, they were considered intact blastocysts. The ratio of TUNEL positive cells was calculated as the percentage of TUNEL labeled nuclei relative to the total number of nuclei stained with Hoescht. Blastocysts with wide apoptotic areas labeled with Hoechst and TUNEL were classified in two groups: A1, embryos where the TUNEL and Hoescht positive area took up less than a half of the embryo, and A2, embryos where the TUNEL and Hoescht positive area took up from a half to almost the totally of the embryo.

Statistical analysis

Data were analyzed using SPSS software package (1997) and differences were considered significant at $p<0.05$. Comparisons of *in vitro* survival and hatching rates between

fresh and vitrified/warmed blastocysts were subjected to Chi-square test. ANOVA was used to analyze the type of the embryos (fresh, vitrified viable and vitrified degenerated blastocysts) on, the total number of cells and the number of cells TUNEL labeled. When ANOVA revealed a significant effect, values were compared by Tukey test.

2.7.2. Experiment 2: Vitrification of porcine embryos at various developmental stages using different ultra-rapid cooling procedures

This experiment was carried out in the University of Murcia (Spain). Weaned cross-bred sows (n=34) were selected as embryo donors and were artificially inseminated 12 and 24 h after initial detection of natural estrus. Embryos were obtained surgically by laparotomy on day 6 of the estrous cycle. Only embryos in morula, early blastocysts and expanded blastocyst, graded as excellent or good for morphological appearance, were selected for this study. Embryos collected from each sow were classified and pooled according their developmental stage. Some embryos of each developmental stage (morula: n=22; early blastocysts: n=26 and expanded blastocysts: n=29) were cultured *in vitro*, without vitrification, to evaluate the *in vitro* development of fresh embryos. The remaining embryos from each developmental stage were randomly allocated into each vitrification system (OPS, SOPS or Vit-Master-SOPS) using a 3x3 factorial experimental design. Embryo vitrification and warming were performed as described above. After storage for 15 days in liquid nitrogen, vitrified embryos were warmed and cultured for 96 h to evaluate *in vitro* development.

Statistical analysis

Data were analyzed using SAS/STAT software package (1997), with differences considered significant at $P < 0.05$. The CATMOD procedure was used (1) to analyze the effect of the vitrification system, developmental stage of the embryos and the interactions of both parameters on *in vitro* survival and hatching rates, and (2) to compare the *in vitro* development of fresh and vitrified/warmed embryos. The embryo diameters from each developmental stage were analyzed using GLM procedure. When ANOVA revealed a significant effect, values were compared using the Tukey-Kramer adjustment for multiple comparisons.

2.7.3. Experiment 3: Transfer of vitrified blastocysts from one or two donors: Reproductive parameters at day 30 of pregnancy

This experiment was conducted at the experimental farm of INRA Nouzilly (France). Embryo donors were LWb (n=24) synchronized and superovulated. Embryos were collected after slaughter of the donors at day 5.5-6 of the cycle. Only embryos in unhatched blastocyst stage, graded as excellent or good for morphological appearance, were selected. Embryo vitrification and warming were performed as described before. Embryos were

stored for 8 to 40 days in liquid nitrogen before warming. To evaluate *in vitro* development, 37 vitrified and warmed blastocysts were cultured for 96 h. Non-vitrified embryos (n=45) were used as controls of *in vitro* development. The remaining blastocysts were transferred surgically to asynchronous (the onset of natural estrus appeared 24h after that of the donors) Meishan gilts.

The transfers were performed surgically by midventral laparotomy. General anesthesia was induced and maintained with halothane (3.5 to 5%). The reproductive tract was exposed via a mid-line incision and 20 vitrified/warmed blastocysts were transferred to each of 20 recipients. Embryos were loaded in a maximum volume of 50 μ L TCMm into a teflon catheter (VYGON 167.15, France) connected to a 1 mL syringe. Embryos were transferred into the tip of one uterine horn, near the utero-tubal junction, after perforating the uterine wall with an electro-scalpel. Ten recipients received embryos from one donor (group 1) and the other ten transfers were performed with mixed embryos from two donors in the following proportions 10 + 10; 11 + 9 or 12 + 8 (group 2).

Pregnancy was assessed by ultrasonography at day 25 after estrus. All recipients were slaughtered 30 days of pregnancy. The fetuses were removed from placental membranes and evaluated. Fetuses with the differentiation of organs typical of one month of pregnancy (Drew and De Lahunta, 1986) and that showed good appearance and coloration (without necrotic or bloody areas) were considered viable. The number of total fetuses and viable fetuses were counted. The *in vivo* development rate was the number of total fetuses compared to the number of transferred embryos to pregnant recipients. The ratio of the number of viable fetuses to the number of transferred embryos in pregnant recipients was the *in vivo* survival rate. The *in vivo* efficiency was the ratio of the number of viable fetuses to the number of embryos transferred to all recipients.

Statistical analysis

The *in vitro* survival and hatching rates of fresh and vitrified/warmed embryos were subjected to Chi-square test. The pregnancy rate from the different groups was compared using Fisher exact test. The GLM (general lineal model) procedure of SAS was used to determine the effects of the origin of embryos (one or two donors) on the number of developed fetuses and viable fetuses at day 30 of pregnancy.

2.74. Experiment 4: *In vitro* development following direct warming of SOPS-vitrified porcine blastocysts

In this experiment two different warming protocols (conventional or direct warming) were tested in order to simplify the warming procedure of vitrified porcine embryos. This experiment was carried out at the University of Murcia (Spain). Embryos were collected from weaned crossbred sows (n=7) artificially inseminated after natural estrus. Embryos were obtained surgically by laparotomy on day 6 of the estrous cycle and only expanded blastocyst graded as excellent or good for morphological appearance, were selected for vit-

rification. Prior to vitrification, the diameter of each embryo (including the zona pellucida) was measured using an ocular micrometer under an inverted phase-contrast microscopy ($\times 200$ magnification). Some embryos from each donor ($n=20$) were cultured *in vitro* to evaluate the *in vitro* development of fresh embryos. The remaining blastocysts of each batch (embryos collected from one donor) were randomly and in equal shares allocated into the two experimental groups (conventional and direct warming) and vitrified. Vitrification was performed within the 5 hours after collection by the method described before. After storage for 15 days in liquid nitrogen, straws were warmed at the same day using two different warming protocols. Conventional warming (three-steps) was performed as described in material and methods section. For direct warming (one-step) straws containing embryos were immersed in a well containing 400 mL TCMm with 0.13 M sucrose for 5 min. To evaluate *in vitro* development, embryos were cultured for 96 h and assessed as the same manner as in previous experiments.

Statistical analysis

Data were analyzed using SPSS software package (1997) and differences were considered significant at $p<0.05$. ANOVA was used to analyze the effect of the warming procedure (two classes: conventional or direct) on *in vitro* survival and hatching rates of the vitrified blastocysts. The model employed had terms for embryo donor (seven classes) and embryo diameter (three classes: 160-180 mm, 181-200 mm and >200 mm) and the interactions among all parameters. Data for *in vitro* and hatching rates were modeled according to the binomial model of parameters, as described previously Fisz (1980). When ANOVA revealed significant effect, values were compared by Tukey test.

2.7.5. Experiment 5: Non-surgical deep intrauterine transfer of vitrified blastocysts

The present experiment was conducted at the experimental farm of INRA Nouzilly (France). LWh and Meishan cyclic gilts aged 5 to 10 months with a normal weight respected their breed and age were used in the experiments.

2.7.5.1. Experiment 5a: Insertions of the flexible catheter

Twenty-seven LWh gilts (at their second to sixth estrus) were used to evaluate the effect of the number of estrus of the gilt on intrauterine insertion effectiveness of the flexible catheter described by Martinez et al. (2001) for non-surgical deep intrauterine catheterization during diestrus in pigs. Gilts were checked for estrus twice a day by exposing them to a mature boar. Females that showed a standing estrous reflex were considered to be in estrus. Intrauterine insertions were carried out by the same operator in a crate at day 5.5-6 of the estrous cycle without sedation the females. After cleaning the perineal area of the gilt, a commercial artificial insemination spirette containing the flexible catheter was insert-

ed through the vagina into the cervix. The spirette was used to assist in the insertion and manipulation of the flexible catheter (length of 1.5 m, outer diameter of the catheter of 4 mm, working canal of 0.7 mm and outer diameter of the tip of 8 mm). The flexible catheter previously inserted through the spirette was pushed through the cervix and moved along one uterine horn as far as possible. Gilts were assigned to three categories depending on their reaction (degree of adverse behaviour of the non-sedated animal to the insertion of the catheter) during the procedure (good = no reaction; moderate = medium reaction, restlessness; and poor = maximal reaction, struggling). The difficulties during insertion were evaluated according to the resistance felt by the operator while manipulation of the catheter (1 = no or light resistance, 2 = moderate or severe resistance, 3 = impossible to insert through the cervix).

After insertion, the operator predicted whether the tip of the catheter had reached the desired location within the uterine horn depending of the feeling during insertion. The insertions were subjectively classified as adequate (presumptive good position of the catheter) or inadequate (presumptive bad position or curled into the uterus). When the insertion procedure was finished, the spirette and the end of the flexible catheter were fixed to the tail of the gilt with tape. Gilts were slaughtered immediately to evaluate the actual position of the flexible catheter in the uterine horn. The position of the catheter was considered as correct when it was inside one uterine horn and well adapted to its anatomy without bends. Incorrect position of the catheter was considered when the catheter bent in the uterus.

In addition, the length of the flexible catheter inside the uterine horn and the length of the uterine horn where the flexible catheter was inserted were measured. The progression of the flexible catheter into the uterine horn was defined as the ratio of the length of the flexible catheter inside the uterine horn to the total length of the inserted uterine horn expressed as a percentage. The depth of the insertions was classified in four categories depending on the catheter progression from the uterine body: insertions performed in the first (progression from 0 to 25%), second (progression from 26 to 50%), third (progression from 51 to 75%), and fourth quarter (progression from 76 to 100%) of the uterine horn. After removal of the flexible catheter, the appearance of the endometrium was macroscopically examined to evaluate the damage caused by the flexible catheter during insertions.

2.75.2. Experiment 5b: Non-surgical embryo transfer of vitrified embryos

Embryos used in this experiment were obtained from LWh donor gilts with spontaneous (n=17) or induced ovulation (n=32). Estrous detection and artificial insemination were performed mentioned before. Donors were slaughtered at day 5.5 to 6 of the estrous cycle. Recovered embryos were evaluated and unhatched blastocyst stage embryos, graded as excellent or good for morphological appearance, were selected for vitrification. Groups of 4 to 6 blastocysts were vitrified as described previously and were stored for 1 to 18 months in liquid nitrogen before warming. Warming of embryos was carried out directly (1-step). Straws containing embryos were maintained at ambient temperature for 2 sec after removal from the liquid nitrogen. The narrow end was immersed in a 1 ml syringe

(warming syringe) containing 400 mL TCMm with 0.13 M sucrose (Sigma, Lezennes, France). Several straws (3 to 5) were warmed in the same syringe in order to have enough embryos to perform a transfer. After the warming of the last straw, embryos were directly transferred connecting the syringe to the flexible catheter.

Twenty-four Meishan gilts with 4 to 6 previous estrus were used as recipients. Non-surgical ETs were conducted on day 4.5 to 5 of the estrous cycle and were performed in gestation crates by the same operator. No medical treatment, anaesthesia or sedation were used for ET. The artificial insemination spirette and the flexible catheter were sterilised by ethylene oxide at least one week before use. Insertions of the flexible catheter were carried out as described in experiment 5a. The length and the tip diameter of the flexible catheter were decreased to 1.2 m and 4.5 mm (instead of 1.5 m and 8 mm as used in experiment 5a), respectively since the length of the uterine horns is shorter in Meishan than in LWL gilts (data not shown). Before insertions, the working canal of the flexible catheter was flushed with 500 mL TCMm at 39°C using a 1 ml disposable syringe. During the insertion of the flexible catheter a light positive pressure was established and the catheter was flushed with 400 ml TCMm when the tip of the catheter reached the uterine body in order to avoid filling of working canal with cervical mucus. When the flexible catheter was totally inserted into a uterine horn, a 1 ml syringe (warming syringe) containing 20 vitrified/warming blastocysts in 400 ml TCMm with 0.13 M sucrose was connected to the catheter and the embryos were transferred. Finally, an additional volume of 400 ml TCMm was used to force the embryos out of the catheter into the uterus.

From 12 days after embryo transfer, recipients were checked for estrus. Pregnancy was assessed by ultrasonography around 25 days post-estrus. All pregnant recipients were allowed to carry litters to term and farrowing rate and litter size were recorded. The survival rate at farrowing was the ratio of the number of live-born piglets to the number of blastocysts transferred to farrowed recipients.

Statistical analysis

Data were analysed using SAS/STAT software package (1997) and differences were considered significant at $P < 0.05$. The CATMOD procedure was used to analyse the following: (1) the effect of the number of estrus of the gilts (three classes: 2, 3-4 or 5-6 estrus) on the reaction of the gilts during the procedure and on the difficulty in inserting the catheter and (2) the influence of the difficulty in inserting the flexible catheter on the reaction of the gilts during the procedure and on the correct position of the catheter into a uterine horn. The influence of the number of estrus of the gilts on the length of the flexible catheter inserted, on the length of the uterine horn and on the progression of the catheter into the uterine horn were analysed using GLM procedure.

3. Results and Discussion

3.1. Experiment 1: Morphology and cell death levels of vitrified porcine blastocysts

3.1.1. Results

The mean number of corpora lutea (\pm SEM) in the donor gilts was 30.9 ± 4.6 . The ratio of collected embryos to the number of corpora lutea was 82.7 %. The total number of embryos collected was 230, of which 13.0%, 8.3%, 75.7% and 3.0% were unfertilized oocytes and degenerated embryos, morulae, blastocysts and hatched blastocysts, respectively. The *in vitro* survival rate of vitrified/warmed embryos after 24 h of culture was lower ($p < 0.01$) than that of fresh embryos (76.0% vs 100% respectively). Significant difference ($p < 0.01$) was also found for the hatching rate between vitrified/warmed (12.8%) and fresh blastocysts (72.4%).

3.1.1.1. Morphology of blastocysts

Morphological and ultrastructural alterations of fresh and vitrified/warmed blastocysts in relation to the morphological assessment by stereomicroscopy after 24 h of *in vitro* culture are summarised in table 2. Morphological observations of embryos by light microscopy, revealed that the 78.3 % (18 out of 23 blastocysts) of the vitrified blastocysts morphologically classified as viable by using a stereomicroscope, were morphologically similar than fresh blastocysts, although some of them showed some cellular debris in the perivitelline space. These embryos were considered as "normal embryos". The remaining embryos morphologically classified as viable after culture (5 out of 23 blastocysts; 21.7%) had an intermediate morphology showing several degrees of cell alterations and more cell debris in the perivitelline space and in the blastocoel than the previous group. These last embryos were scored as "semi-degenerated". The vitrified blastocysts considered by stereomicroscopy as degenerated ($n=9$) were almost disintegrated. They did not display cell differentiation between trophoctoderm and inner cell mass, the blastocoel was collapsed and contained abundant cellular debris. In these embryos, the perivitelline space was dilated and filled with numerous cellular rests.

On semi-thin sections, vitrified blastocysts considered "normal" by light microscopy (table 2) appeared similar than fresh embryos. All vitrified embryos assigned to the ultrastructural study that hatched during *in vitro* culture belonged to this group. Embryos showed only slight differences respected fresh blastocysts such as some vesicles and secondary lysosomes in the cytoplasm, fragmentation of the lipid droplets and dilatation of few cisternae of the RER. Some embryos showed little cellular debris in the perivitelline space. In these regions, protruding microvilli were more numerous. Embryos from this group were scored as blastocysts showing alterations grade 1.

Table 2. Classification of fresh and vitrified/warmed blastocysts in relation to the morphological assessment performed by stereomicroscopy, light microscopy and electron transmission microscopy after 24 h of *in vitro* culture.

Embryo classification by:		Type of blastocyst evaluated by stereomicroscopy		
Light microscopy	ME microscopy	Fresh viable (N)	Vitrified viable (N)	Vitrified degenerated (N)
Intact	Grade 0	13*	0	0
Normal	Grade 1	0	18	0
Semi-degenerated	Grade 2	0	5	0
Degenerated	Grade 3	0	0	9

* No degenerated embryos were observed after 24 h of *in vitro* culture.

Grade 0: Blastocysts without ultrastructural alterations.

Grade 1: Blastocysts showing only lightly changes compare to the control blastocysts.

Grade 2: Blastocysts showing with different degrees of alterations and abundant cellular debris.

Grade 3: Blastocysts disrupted with abundant sings of cells degeneration.

Semi-degenerated blastocysts showed various degrees of cell alterations, and their morphology was intermediate between the embryos describe above and the degenerated blastocysts and were classified as alterations grade 2. These embryos showed an increase of cellular debris and excluded cells in the periviteline space with regard to the vitrified viable, debris appeared also in the blastocoel cavity. The RER was usually dilated and the mitochondria display an increased density. In embryos showing higher degrees of degeneration, small and dense nuclei and residual bodies were observed.

The vitrified degenerated blastocysts showed disintegration, disorganisation and numerous cellular alterations. Only few cells maintained their normal morphology and the loss of the intracellular junctions were detected. No differentiation between trophoctoderm and ICM was observed; the wide periviteline space contained abundant debris and excluded cells, which also occupied the collapsed blastocoel. In the cytoplasm the RE was highly dilated, there were numerous vacuoles and residual bodies and the cellular organelles were degenerated. Small nuclei showing high density were detected as well as numerous sings of phagocytosis. These alterations were scored as grade 3 (table 2).

3.1.1.2. Total number of cells and cell death levels

The Hoescht staining showed that after 24 h of *in vitro* culture, fresh and vitrified viable blastocysts by stereomicroscopy had similar number of total cells (167.5 ± 17.9 and 145.5 ± 8.8 cells, respectively; $p=0.314$). In the other hand, the number of total cells was much lower ($p<0.001$) in the vitrified embryos stereomicroscopically considered degenerated (45.7 ± 4.0). The percentage of intact blastocysts (embryos which did not display TUNEL positive nuclei or areas) was higher ($p<0.05$) in fresh blastocysts (37.5 %) than in vitrified viable (4%) or degenerated embryos (0%). The 66.7% of these last embryos exhib-

ited wide TUNEL labeled areas, and the 33.3% of the remaining blastocysts morphologically considered degenerated showed TUNEL label over 19.4 ± 6.3 % of the total nuclei stained with Hoescht. The ratio of TUNEL positive cells was lower ($p < 0.001$) in fresh blastocysts ($1.1 \pm 0.3\%$) than in vitrified viable blastocysts ($4.3 \pm 3.4\%$).

3.12. Discussion

A decrease in embryo survival after vitrification and warming has been largely attributed to physical and chemical damages induced during both procedures. We have attempted to assess the ultrastructural alterations and the ADN fragmentation occurred in vitrified/warmed blastocysts in order to compare their quality to that from fresh blastocysts and to determine the efficiency of stereomicroscopical evaluation. Just after warming vitrified embryos are collapsed, which makes very difficult their evaluation at this time. This appearance reflect wide cellular alterations most of which are progressively restored in surviving blastocysts, and are almost totally absent following 24 h of culture (Vajta et al., 1997b). For this reason, in this study we assessed blastocysts after 24 h of *in vitro* culture in order to distinguish by using a stereomicroscope vitrified viable blastocysts, which re-expanded and reformed their blastocoel cavity and those blastocysts that remained collapsed and were subsequently morphologically considered as degenerated.

In the present study, the embryo survival and hatching rate were lower in vitrified than in fresh blastocysts. However, the hatching rate of vitrified blastocysts (12.8%) obtained in this study was much lower than those reported in the following experiments. This fact could be related to the short period of culture (24 h) used after warming. It is known that vitrified embryos need a period to re-expand and because of that their development *in vitro* is delayed respected to the fresh embryos.

With respect to the morphological evaluation, fresh blastocysts after 24 h of culture displayed similar characteristics than those described before by several authors for fresh embryos after collection (Maddox-Hyttel and Boerjan, 2002). As found in vitrified bovine blastocysts (Vajta et al., 1997b), the vitrified blastocysts considered morphologically viable by stereomicroscopy were ultrastructural different respected to the fresh embryos. The majority of vitrified viable blastocysts (78.3%) displayed normal ultrastructure, showing only some sings of previous injury such as debris in the periviteline space and blastocoel, and an increase of the apical microvilli. These lightly alterations (grade 1) seem not to dramatically affect embryo survival, since high gestation rate resulting in the farrowing normal piglets have been obtained after surgical transfer of vitrified/warmed blastocysts (Berthelot et al., 2001; 2002; Cameron et al., 2004). However, in some embryos scored as viable by stereomicroscopy, extensive structural damage was detected ("semi-degenerated blastocysts"). These observations suggest that stereomicroscopical evaluation was not efficient enough, since the 21.7% of the vitrified blastocysts scored morphologically as viable after the culture revealed important alterations (grade 2) that would compromise their viability. Based on the present study, the hatching rate could be more effective than the *in vitro* survival parameter for an estimation of the quality of the embryos after warming, since all the

vitrified hatched blastocysts were ultrastructurally similar than fresh embryos, showing only slight modifications (graded 1). In the other hand, the stereomicroscopical observations provide also reliable information about degenerated embryos, which showed expectedly ultrastructural disintegration and disorganization.

Embryo quality was also evaluated by Hoechst and TUNEL assays as a way to evaluate the total cell number and to detect viable cells. As indicated previously, vitrification delayed embryo development and resulted in a total cell number after 24 h of *in vitro* culture that tended to be lower after vitrification and warming in comparison to fresh embryos. Degenerated embryos did not progress during the culture as show the low number of total cells (45.7 ± 4.0). This low number of cells in degenerated blastocysts after culture suggests that a loss of cells due to the injury caused by vitrification and warming occurs.

The ratio of TUNEL positive cells in fresh blastocysts ($1.1 \pm 0.3\%$ of total cells) indicates that programmed cell death (apoptosis) of a few blastomers may be a natural process resulting in the elimination of the unnecessary or damaged individual cells. Previous studies show that apoptosis is a natural process during mammalian preimplantation development in embryos from several species (Hardy and Spanos, 2002). It has been reported that storage at 38°C in TCM for 24 h do not increase the rate of apoptosis in porcine blastocysts determined by TUNEL (Pomar et al., 2003). Therefore, the TUNEL label obtained in fresh embryos cultured for 24 h in our experiment might be comparable to the rates existing before culture. Although the rate of TUNEL labeled cells in vitrified viable embryos was low ($4.3 \pm 3.4\%$), it was higher ($p < 0.001$) than that reported in fresh blastocysts, demonstrating that vitrification and warming increase the cell death. However, the consequences of this low increase of cell death over the embryo functionality are unknown.

Based on these results we conclude that vitrification and warming affect the quality of porcine blastocysts in terms of morphology and cell death. In this study, the 76% of the vitrified/warmed blastocysts were considered viable after 24 h of *in vitro* culture. They showed a low number of dead cells and the 80% of them displayed similar morphological characteristics than fresh blastocysts.

3.2. Experiment 2: Vitrification of porcine embryos at various developmental stages using different ultra-rapid cooling procedures

3.2.1. Results

The overall mean (\pm SEM) corpora lutea number in these sows was 19.5 ± 0.6 . The ratio of collected embryos to the number of corpora lutea was 86.0%. The total number of embryos collected was 570, of which 2.9%, 41.2%, 14.0%, 38.8% and 3.3% were unfertilized oocytes and degenerated embryos, morulae, early blastocysts, expanded blastocysts and hatched blastocysts, respectively.

Embryo diameter was significantly different ($P < 0.01$) between the three embryonic developmental stages considered. The mean (\pm SEM) diameter was 149.6 ± 0.1 , 158.7 ± 0.8 and 186.0 ± 1.3 mm for morulae, early blastocysts and expanded blastocysts, respec-

tively. Within the same embryonic stage, the diameter of embryos assigned to each vitrification system was not different ($P=0.69$). Analysis of variance showed that the developmental stage of the embryos affected their survival and hatching rates after vitrification and warming ($P<0.001$). In contrast, the vitrification system and the interaction of vitrification system and embryonic stage of development had no significant effect on these parameters ($P>0.05$). Expanded blastocysts showed the highest *in vitro* survival and hatching rates after vitrification ($P<0.001$), while the percentage of early blastocysts developing and hatching after warming was higher than that obtained for morulae ($P<0.001$) (Table 3)

A high percentage of vitrified/warmed expanded blastocysts survived the vitrification procedure. Although there were not significant differences ($P>0.05$), the survival (93.2%) and hatching (75.0%) rates of vitrified expanded blastocysts tended to be lower than those obtained using fresh expanded blastocysts (96.6% and 86%, respectively). However, fresh morulae or early blastocysts demonstrated higher ($P<0.01$) hatching rates (68% and 83%, respectively) than their vitrified counterparts (29% and 57%, respectively). These differences were more pronounced for embryos at the morula stage than for early blastocysts.

Table 3. *In vitro* survival and hatching of morulae (M), early blastocysts (EB) and expanded blastocysts (B) vitrified with OPS, SOPS and SOPS with Vit-Master using SOPS straws, after warming and culture for 96 h.

Vitrification system	Embryo stage	Number of embryos	Survival rate % (n)	Hatching rate % (n)
OPS	M	71	58.3 (40)	25.4 (18)
	EB	22	81.8 (18)	45.5 (10)
	B	88	95.5 (83)	72.7 (48)
SOPS	M	88	57.4 (39)	29.4 (20)
	EB	13	76.9 (10)	46.2 (6)
	B	80	93.3 (58)	83.3 (50)
Vit Master	M	71	67.6 (48)	28.8 (19)
	EB	19	94.7 (18)	79.0 (15)
	B	85	89.2 (58)	89.2 (45)
Probability				
Vitrification system			NS	NS
Embryo stage			0.001	0.001
Vitrification system X embryo stage			NS	NS

3.2.2. Discussion

The objective of this study was to investigate the efficiency of three vitrification systems (OPS, SOPS and Vit Master-SOPS) for the cryopreservation of untreated, zona pellicula intact pig embryos. In order to assess the practical application of this technique for future use in pig embryo transfer, embryos were assessed at three stages of development: morula, early blastocyst and expanded blastocyst.

Peri-hatching blastocyst stage embryos are known to show the highest *in vitro* development after vitrification and warming. However, for hygiene reasons, the International Embryo Transfer Society restricts the collection, cryopreservation and transport of embryos to those with an intact zona pellucida (Stringfellow, 1998a, 1998b). Therefore, morula and early blastocyst stage embryos seem to be most suitable for commercial embryo transfer. Morulae and early blastocyst embryos have a higher lipid content when compared with peri-hatching blastocysts (Niimura and Ishida, 1980), which is thought to cause their higher chilling sensitivity (Toner et al., 1986). It has been reported that pre-treatments such as delipidation (Nagashima et al., 1994) and cytoskeletal stabilization and centrifugation (Dobrinsky et al., 2000; Dobrinsky and Johnson, 1994) can improve the success of cryopreserving morulae and early blastocysts. However, the vitrification methods used in this study did not involve pre-treatment of the embryos, as protocols that require special manipulation and those that implicate the breaking of the zona pellucida are less suitable for routine purposes.

Although it has been speculated that increasing the cooling rate might decrease chilling injuries, the effect of cooling rate on the viability of porcine embryos in different stages of development after vitrification and warming has not been established. It is reported that the *in vitro* survival rate of OPS-vitrified blastocysts are higher than that obtained with the classical (0.25ml straw) vitrification method (Beebe et al., 2000; Berthelot et al., 2000; Holm et al., 1999; Vajta et al., 1998a) and that high pregnancy and farrowing rates have been obtained after transfer of OPS-vitrified blastocysts (Berthelot et al., 2000; Berthelot 2002). Moreover morulae, which cannot be cryopreserved by traditional vitrification methods, can be successfully cryopreserved by the OPS method (Berthelot et al., 2000; Vajta et al., 1997c). These results suggest that increasing the cooling rate from 2500°C/min (0.25ml straw; Rall, 1987) to 20000 °C/min (OPS method; Vajta et al., 1997) has a positive effect on the *in vitro* survival of porcine embryos. In the present study the embryo survival and hatching rates were not affected ($P>0.05$) by the vitrification method used (OPS, SOPS and Vit-Master-SOPS). These results indicate that, under our experimental conditions, increasing the cooling rate above approximately 20000°C/min, as occurs when the SOPS (Isachenko et al., 2001) or Vit-Master-SOPS (Arav et al., 2002) procedures are used, does not enhance the efficiency of *in vitro* development of morulae and blastocysts after warming. However, differences *in vitro* development rates were observed in this study, which were independent of the vitrification system used. The highest *in vitro* development rates were obtained following vitrification of expanded blastocysts, and were similar to those obtained with fresh expanded blastocysts. As in previous reports, morulae showed the poorest survival and hatching rates after warming (60.5% and 27.1%, respectively), which were significantly lower than those achieved using fresh embryos at the same stage of development (86.3% and 68.2%, respectively).

Procedures which increase cooling rates to above 20000°C/min have the possible advantage that vitrification probably occurs at lower cryoprotectant concentrations (Palasz and Mapletoft, 1996). As cryoprotective solutions are toxic to embryos, reducing their concentration might be beneficial for their survival. However, more research is needed to optimise the cryoprotectant concentration required in each of the vitrification systems used.

In conclusion, raising the cooling rate to above 20000°C/min during vitrification does not enhance the *in vitro* development of porcine morulae, early or expanded blastocysts after warming under our experimental conditions. Although ultra-rapid vitrification systems are effective for preserving early or expanded porcine blastocysts, more research is required before these methods can be widely used for the practical application of vitrification of pig embryos. This technology may be improved by optimizing the protocols to the specific characteristics of embryos, such as their developmental stage.

3.3. Experiment 3: Transfer of vitrified blastocysts from one or two donors: Reproductive parameters at day 30 of pregnancy

3.3.1. Results

Embryos were collected from 24 donors. The ovulation rate was 32.5 ± 0.7 (mean \pm SEM). The ratio of collected embryos to the number of corpora lutea was 81.3%. The total number of embryos collected was 634, of which 9.0%, 5.7%, 80.9% and 4.4%, were unfertilised oocytes and degenerated embryos, morulae, unhatched blastocysts and hatched blastocysts, respectively.

The *in vitro* survival rate of vitrified/warmed embryos after 96 h of culture was lower ($p < 0.01$) than that of control embryos (73.0% vs 93.7% respectively). Significant difference ($p < 0.05$) was also found for the hatching rate between vitrified/warmed (56.8%) and control blastocysts (79.2%).

The pregnancy rate for the group 1 (70%) was not different ($p > 0.05$) than that of group 2 (90%). The non-pregnant recipients returned to estrus at day 21 to 22 post-estrus, with the exception of one gilt from the group 1, who returned to estrus at Day 28 of the cycle. No significant differences between group 1 and group 2 in embryo development, (33.6% vs 40%, respectively), or *in vivo* embryo survival (27.9% vs 33.9%, respectively) were detected. However, the *in vivo* efficiency was significantly ($p < 0.05$) higher when transfers were performed with embryos from two donors.

3.3.2. Discussion

The purpose of this study was to verify whether pooling embryos from different donors could affect the pregnancy rate following transfer of vitrified/warmed porcine blastocysts. Superovulation was utilized in order to obtain enough embryos from one donor to transfer to a single recipient. The ovulation rate achieved with our treatment was 32.54 ± 11.8 . The concentrations of eCG and hCG administered were relatively low (1000 IU and 500 IU respectively), because there is evidence that viability of embryos produced via superovulation may be compromised if the ovarian response is too high (Holz and Schlieper, 1991). Furthermore, it has been shown that embryo development is affected with increasing dosage of eCG (Hazeleger et al., 2000). In our experiment, *in vitro* embryo survival (73.0%

re-expansion and 56.8% hatching), pregnancy rate and *in vivo* embryo development achieved were similar to those reported with non-superovulated embryos (Berthelot et al., 2002), which suggests that the superovulation treatment was effective.

No significant difference ($p > 0.05$) in pregnancy rate between groups 1 and 2 was found (70% vs 90%). These results are in agreement with observations by Hazeleger et al. (2000), whom found no influence ($p > 0.01$) on the pregnancy rate at day 21 when a mixture of fresh embryos was used for transfer, compared to the transfers carried out with embryos from one donor. Moreover, the present study demonstrates that the mixture of embryos from two donors had no effect on *in vivo* embryo development (40%) or *in vivo* embryo survival (33.9%). However, *in vivo* efficiency was affected in this experiment by pooling of the embryos. Transfers performed with blastocysts from two donors provided higher ($p < 0.05$) *in vivo* efficiency (30.5%), than transfers of embryos from one donor (19.5%). This could be due to an individual effect of the donor. It has been described that the genotype, the developmental stage and diameter of the embryo (Dobrinsky et al., 2000) are important factors in embryo vitrification. The donor, as an individual factor, may also play an important role in vitrification ability, in the same way, as the boar is an essential factor in sperm cryopreservation (Johnson et al., 2000). Thus, when a mixture of embryos is transferred, the individual effect of the donor could be minimised, which could explain the difference between groups found in our study.

In conclusion, our results indicate that pooling embryos from two donors increases the *in vivo* efficiency after transfer of vitrified/warmed porcine blastocysts. However, more research is necessary to confirm how the individual effect of the donor affects the vitrification and transfer procedures.

3.4. Experiment 4: *In vitro* development following direct warming of SOPS-vitrified porcine blastocysts

3.4.1. Results

The mean ovulation rate (\pm SEM) in the donor sows was 22.7 ± 1.5 . The ratio of collected embryos to the number of corpora lutea was 96.9%. The total number of embryos collected was 154, of which 5.2%, 1.3%, 90.9% and 2.6% were unfertilized oocytes and degenerated embryos, morulae or early blastocysts, expanded blastocysts and hatched blastocysts, respectively.

The average diameter of the expanded blastocysts collected from each donor ranged from 166.6 to 200.5 μ m and was significantly different ($p < 0.001$) among embryo donors. Within the same donor, the average diameter of the blastocysts assigned to the conventional and direct warming protocols was not different ($P > 0.26$).

The analysis of variance showed that the warming system, the embryo diameter or the interactions among the factors evaluated did not affect ($P > 0.05$) the survival and hatching rates of the vitrified/warmed blastocysts. However the donor had a significant effect ($P < 0.001$) on the *in vitro* embryo development.

A high percentage of vitrified expanded blastocysts warmed by conventional and direct procedures survived (84.7% and 86.2%, respectively) and hatched (71.2% and 74.1%, respectively) after vitrification and warming. Although there were not significant differences, the survival and hatching rates of vitrified expanded blastocysts tended to be lower than those obtained using fresh blastocysts (100% and 95%, respectively).

3.4.2. Discussion

The objective of this study was to evaluate the effectiveness of a one-step warming protocol for vitrified porcine embryos. This procedure would be ideal for direct surgical or non-surgical ET under field conditions, since it eliminates the steps required for embryo washing, reducing significantly the time needed for warming and special manipulations.

It is known that the vitrification medium needs a high concentration mixture of cryoprotectants to avoid ice crystal formation (Rall and Fahy, 1985), which have to be removed after warming because of their potential toxicity for the embryos (Weber et al., 1992; Yoshino et al., 1993; Dobrinsky et al. 1996). The warming protocols for OPS-vitrified pig embryos includes decreasing concentrations of a non-permeate solute, generally sucrose (Vajta et al., 1997c; Berthelot et al., 2000, 2001, 2002). The use of decreasing concentrations of sucrose tempts to avoid sudden osmolarity changes, which may be damaging for the embryo. Just after warming the osmotic tension inside the embryo is very high due its permeable cryoprotectants content and therefore a rapid influx of water can occur. This is the main cause of a possible osmotic shock. Sucrose is a non-permeate solute that acts as an osmotic buffer, which prevents the entry of water inside the embryo and therefore the osmotic injury. In the presence of sucrose the embryos progressively shrink as the permeable cryoprotectants diffuse passively out the embryo. Finally, after cryoprotectant elimination the embryos are rehydrated in a free-sucrose isotonic medium and swell to a normal volume (Rall, 1992). In our study, the warming system (one-step vs multiple-steps) did not affect ($p>0.05$) the *in vitro* development of the vitrified/warmed porcine blastocysts. These results suggest that one-step warming is efficient enough to avoid osmotic shock of embryos during warming. Previous results also reported the effectiveness of the direct warming of vitrified ovine embryos using a sucrose solution compare to several-steps protocol (Baril et al., 2001).

On the other hand, when a direct warming and ET are performed the sucrose is not removed from the medium containing the embryos, what may be detrimental for the embryo viability. However, it does not seem to be damaging for the embryo since it has been reported that concentrations of sucrose higher than that used in this experiment have not detrimental effect on embryo quality and development when embryos are exposed to them at 39°C for 20 min (Weber and Youngs, 1994). Moreover, recently it have been reported the farrow of piglets after non-surgical transfer of vitrified blastocysts warmed by this direct procedure (Cuello et al., 2002). It could be speculated that inside the uterus warming solution in which the embryos are transferred may be reabsorbed quickly and embryos may be rehydrated in the uterine secretions as the same way as occurs *in vitro* in the culture medium. A disadvan-

tage of the direct warming and transfer procedures is that embryos are not evaluated or selected before transfer. However, previous experiments performed *in vitro* may offer important and repetitive information about embryo cryotolerance and the loss of embryo viability due to vitrification and warming. The one-step warming procedure tested in this experiment is shown to be adequate; however more research is needed to establish the most effective concentration of sucrose, the ideal warming conditions to ensure the total cryoprotectants removal and to determine the efficiency of the one-step warming after embryo transfer.

Independently of the warming system used, our results demonstrate that a high percentage of embryos survive the vitrification and warming procedures. Although no differences were found, the *in vitro* development of vitrified/warmed embryos tended to be lower than that obtained with fresh embryos. These results confirm several studies which report that the OPS vitrification method is an effective procedure for the cryopreservation of porcine blastocyst (Beebe et al., 2000; Berthelot et al., 2000; Holm et al., 1999; Vajta et al., 1997c).

In our study we took into account the diameter of the expanded blastocysts and the donor of embryos as factors that could have an effect on the embryo survival after vitrification. It is known that the diameter of the hatched blastocysts affects their viability when they are vitrified using 0.25ml straws. Hatched blastocysts with a diameter > 400 μm had a poorer development *in vitro* after vitrification in comparison with smaller hatched blastocysts (Dobrinsky, 2000). However, it has not been studied the influence of the embryo diameter within expanded blastocyst stage on the embryo survival after vitrification. In the present study expanded blastocysts with an average diameter of 179.6 ± 1.8 μm (ranging from 166.6 to 200.5 μm) were used. Although differences ($p < 0.001$) in the embryo diameter among embryo donors were observed, which may correspond to slight differences in the actual age of the embryos, the embryo survival and hatching rates were not affected ($p > 0.05$) by this parameter.

Previous results (data not shown) suggested that the donor of embryos may play an important role in the embryo vitrification ability, in the same way as the boar is an essential factor in sperm cryopreservation (Johnson et al., 2000). Recent experiments demonstrated that the batch, defined as embryos obtained for one donor at one time, affects the embryo survival after warming (Fujino et al., 2003). The results of the present study confirm this fact. Although it has been reported differences among donors in the responses to sucrose (Weber and Youngs, 1994), what it could affect the tolerance to vitrification and warming procedures, the factors involved in the effect of the embryo donor on the survival of vitrified embryos are unknown. Since the donor influences the *in vitro* development of vitrified embryos, the allocation of embryos within donors across treatments in the vitrification researches must be warranted.

In conclusion, porcine embryo vitrification and direct warming are promising procedures to be used in practice. However, more research is needed to increase the efficiency of embryo warming procedures and to determine the effectiveness of direct warming in combination with non-surgical ET under field conditions.

3.5. Experiment 5: Non-surgical deep intrauterine transfer of vitrified blastocysts

3.5.1. Results

3.5.1.1. Experiment 5a: Insertions of the flexible catheter

During insertions of the flexible catheter no reaction or a moderate reaction was observed in 88.9% of gilts, and was not related ($P>0.05$) to the number of estrus of the gilts. The number of the estrus had a significant effect ($P<0.05$) on the difficulties found during the insertions of the flexible catheter. In the 100% of gilts with 2 estrus ($n=6$) it was not possible to insert the flexible catheter through the cervix. In gilts with 3 or more estrus it was feasible to pass the cervix and to progress along a uterine horn in the 80.9% of the cases.

The difficulties during insertions had no influence ($P>0.05$) on the reaction of the gilts or the actual position of the catheter into a uterine horn. The flexible catheter was appropriately inserted into a uterine horn in the 71.4% of the gilts with 3 or more estrus. The predictive values of the location of the flexible catheter into the uterine horn were correct in the 94.1% of cases. The sensitivity (ability to identify correct insertions) was 93.3% and the specificity (ability to identify incorrect insertion) 100%.

In gilts where the catheter was appropriately inserted ($n=15$), no influences of the number of estrus (3-4 and 5-6 estrus) on the length of the catheter inserted into the uterine horn, the length of the uterine horn and the progression of the catheter into the uterine horn were observed. The mean (\pm SEM) length of the flexible catheter inserted into the uterine horn and the mean (\pm SEM) length of the uterine horn were 63.6 ± 5.4 cm (range 27 to 120 cm) and 169.6 ± 8.2 cm (range 115 to 250 cm), respectively. In 13 out of 15 gilts (86.7%), the tip of the flexible catheter was located between the second and third quarter of the uterine horn.

Observations after slaughter showed that when the catheter had a correct position it was adapted to the uterine horn forming a spiral. A visible non-blood mark on the endometrial wall of the first uterine curvature was observed in 80% (12 out of 15) of females in which the flexible catheter was correctly inserted inside the uterine horn. This observation was not related to the number of estrus of the gilts ($P>0.05$). When the flexible catheter had an incorrect position it was curled into the uterus and after removal showed an abnormal shape with bends or kinks.

3.5.1.2. Experiment 5b: Non-surgical embryo transfer of vitrified embryos

The total number of recovered embryos was 1103 (recovery rate: 83.3%), of which 11.1%, 6.6%, 75.2% and 7.1%, were unfertilised oocytes and degenerated embryos, morula, unhatched blastocysts and hatched blastocysts, respectively. A total of 420 intact unhatched blastocysts were used for vitrification and transfer. The surplus embryos were used in other experiments.

In three recipients, it was not possible to insert the catheter through the cervix. Twenty vitrified/warmed embryos were transferred to each of the remaining 21 recipient. Regular (19-23 days) and delayed (>23 days) returns to estrus were observed in 9 (42.9%) and 2 (9.5%) recipients, respectively. Ten animals (47.6%) were diagnosed pregnant 25 days after estrus. One recipient, who was diagnosed pregnant, returned to estrus 34 days after transfer. The remaining 9 recipient came to term (42.9%) and farrowed an average of 5.4 ± 0.8 piglets (range from 3 to 9), of which 0.6 ± 0.3 (range from 0 to 2) were born dead. The weight of the piglets at birth was 1.1 ± 0.5 Kg and no morphological abnormalities were observed. Survival rate at farrowing was 24.5%. Vaginal discharges after transfers were observed at 12 and 28 days in 2 out of 21 (9.5%) recipient gilts.

3.5.2. Discussion

Successful non-surgical transfer of fresh pig embryos (Galvin et al., 1994; Hazeleger and Kemp, 1994; Li et al., 1996; Hazeleger and Kemp, 2001; Ducro-Steeverink et al., 2004; Martínez et al., 2004) and following surgical transfer of vitrified porcine embryos (Kobayashi et al., 1998; Dobrinsky et al., 2000, 2001; Berthelot et al., 2000, 2001, 2002; Beebe et al., 2000, 2003; Cameron et al., 2000, 2004) have been reported. However, under our knowledge, the present study is the first to report the first piglets born after non-surgical deep intrauterine transfer of vitrified porcine embryos.

The introduction of special catheters for non-surgical ET into the uterine body has been used only in weaned sows (Hazeleger and Kemp, 1994) since the cervix in gilts would seem more difficult to penetrate than in sows. However, a technique for deep intrauterine embryo transfer in gilts and sows has been recently reported (Martínez et al., 2001a). In our experiments, the flexible catheter described in that paper for non-surgical deep intrauterine embryo transfer in gilts and sows was used. In experiment 1, the effect of the number of estrus of the gilt on the effectiveness of the intrauterine insertion of the catheter was evaluated. Results from this experiment indicate that the flexible catheter could not be inserted through the cervical canal in gilts at their second estrus, which appeared tightly closed in all cases. On the contrary, in about 80% of the gilts with three or more estrus periods it was possible to insert the catheter through the cervix and to progress along a uterine horn. Although the number of gilts used was low, the data suggest that a sudden change in the cervical distensibility between the second and the third estrus may occur.

The deep intrauterine procedure was apparently painless and well tolerated by the majority of the gilts since no or moderate reaction was observed in approximately the 90% of the gilts independent of the number of estrus. Even when the difficulty grade to insert the catheter was elevated or when was impossible to pass the cervix the welfare of the gilts did seem not be perturbed by the procedure.

The overall correct prediction of the location of the catheter in the uterus (94.1%) and the percentage of non-identified incorrect insertions in relation to the total number of insertions done (1 out of 17 insertions, 5.6%) were similar to those previously reported (Martínez et al., 2001a, 2004). Likewise, the percentage of appropriate insertions was similar in both

studies (71.4 & 79.3%). Because these data have been collected from different operators, it can be suggested that other operators of different laboratories can successfully use the procedure with a short period of training.

In experiment 5a, a visible mark on the endometrium wall of the first curvature of the uterine horn was observed in 80% of the animals. A similar mark has been described after insertion of a flexible fibre optic endoscope into the uterine horn of crossbred sows during estrus (Martinez et al., 2001b). In that study, it is suggested that the mark on the endometrium did not have a detrimental effect on the fertility of sows after deep intrauterine insemination. However, it is known that the embryos remain in the tip of the uterine horns until Day 6 of the cycle, and then progress through the horn during Days 7 and 8 (Dziuk and Henshaw, 1985). Therefore, when the embryos reach the first curvature of the uterine horn the damage to the endometrium caused during deep intrauterine insemination may have been repaired. The situation might be very different after non-surgical ET because the embryos are deposited on Day 4.5-5 closer to the first curvature of the uterus. The effect of this mark on the implantation of the embryos or on later embryo development after non-surgical ET requires investigation.

With current procedures (Hazeleger and Kemp, 2001), non-surgical ET without sedation of the female can only be performed by transfer into the uterine body or beginning of a uterine horn in weaned sows. It has been speculated that one of the problems associated with these procedures is the location where embryos are deposited within the uterus. Results from surgical ET showed that is irrelevant whether embryos were transferred in the tip or in the middle of the uterine horn (Stein-Stefani and Holtz, 1987). However, the pregnancy rate of the recipients was low when fresh blastocysts were deposited surgically in the uterine body (12%), compared with blastocysts deposited in the middle (88%) or the caudal quarter of the uterine horn (81%) (Wallenhorst and Holtz, 1999), indicating that the uterine body is a sub-optimum site for 5 to 6 day embryos. In accordance with that, a relatively high farrowing rate (70.8%) has been reported in the first attempts of non-surgical deep intrauterine transfer using fresh embryos (Martinez et al., 2002), although, unfortunately, the exact location of the tip of the flexible catheter into the uterine horn was not determined. Our results from the first experiment show that the tip of the flexible catheter reached the second or third quarter of a uterine horn in the 86.7% of the LWL gilts. Although this location might be appropriate for embryo deposition, at least when fresh embryos are used, more research is needed to determine whether the uterine placement to which embryos are transferred has an influence on the fertility results after non-surgical ET.

In experiment 5b, we show the first attempts in non-surgical deep intrauterine transfer using vitrified/warmed porcine blastocysts. Embryos were vitrified using OPS procedure (Vajta, 1998a), because, at the present, it is the most effective method to achieve high farrowing rates after surgical transfer of cryopreserved pig embryos (Beebe et al., 2000; Berthelot et al., 2000, 2001). In our experiment, we used the embryo warming procedure tested in experiment 4 with lightly modifications in order to perform direct warming and transfer under field conditions and it has been previously carried out successfully in other species (Saha et al., 1996; Baril et al., 2001).

Despite the aseptic measures, the 9.5% of the recipients showed symptoms of uterine infection in the form of vaginal discharges after non-surgical ET. These results are different to those reported previously using the same procedure for ET, where none of the recipients used showed any symptoms of uterine infection in the days after insertion of the flexible catheter (Martínez et al., 2004). Probably the different hygienic conditions of the farms might influence the incidence of vaginal discharges after non-surgical ET.

Surgical transfer procedures for porcine embryos have been available for several decades and have resulted in high pregnancy (90%) and survival rate in pregnant gilts at day 30 of pregnancy (61.9%) (Polge, 1982) following transfer of fresh embryos. When surgical transfer procedures are used for transferring vitrified/warmed blastocysts high pregnancy rates have been also achieved (80 to 100%), however the survival rate at farrowing is poorer (32-37%) (Berthelot et al., 2002), probably due to the loss of viability of the embryos after vitrification and warming. Several authors have reported farrowing rates between 33 to 70.8 % and survival rates at farrowing from 20 to 38% after non-surgical transfer of fresh embryos (Hazeleger, 1999; Martínez et al., 2004). However, when these two emergent technologies, non-surgical ET and embryo vitrification, are combined as occurs in the present experiment the efficiency of the transfer decreases in terms of farrowing rate (42.9%), although the survival rate at farrowing is similar than those reported with non-surgical procedures (24.5%). An improvement in these results might be achieved increasing the number of vitrified embryos to be transferred. The number of vitrified embryos per transfer (20) used in our experiment might be too low considering the loss of viability due to vitrification and the number of fresh embryos (25-30) used in the previous studies on non-surgical ET (Hazeleger and Kemp, 2001; Martínez et al., 2004).

In conclusion, our preliminary results from this experiment indicate that is possible to obtain birth of piglets following non-surgical deep intrauterine transfer of vitrified/warmed porcine embryos. Non-surgical deep intrauterine ET and OPS vitrification method are promising procedures to be used for safe transport of genetic material. 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.

4. Conclusions

1. Vitrification and warming affect the quality of porcine blastocysts in terms of morphology and cell death. A high percentage (>75%) of the vitrified/warmed blastocysts are considered viable by stereomicroscopy after 24 h of *in vitro* culture, showing a low number of dead cells and the 80% of them display similar morphological characteristics than fresh blastocysts.

2. Raising the cooling rate to above 20000°C/min during vitrification does not enhance the *in vitro* development of porcine morulae, early or expanded blastocysts after warming.

Bibliografía

- Albertini DF, Overstrom EW, Ebert KM. 1987. Changes in the organization of the actin cytoskeleton during preimplantation development of the pig embryo. *Biol. Reprod.* 37(2):441-51.
- Aller JF, Alberio RH, Iovannitti B. 1995. Criopreservación de embriones mamíferos: Características generales de la congelación. *Rev. Med. Vet.* 76:132-136.
- Arav A. 1998. Method for cryopreservation of biological samples. US Patent. 5:686-715.
- Arav A, Yavin S, Zeron Y, Natan D, Dekel I, Gacitua H. 2002. New trends in gamete's cryopreservation. *Molecular and Cellular Endocrinology.* 187:77-81.
- Ashwood-Smith MJ, Friedmann GB. 1979. Lethal and chromosomal effects of freezing, thawing, storage, time and X-irradiation on mammalian cells preserved at -196°C in dimethyl sulfoxide. *Cryobiology.* 16:132-140.
- Bank H, Maurer RR. 1974. Survival of frozen rabbit embryos. *Exp. Cell Res.* 89:188-196.
- Baril G, Traldi AL, Cognié Y, Leboeuf B, Beckers JF, Mermillod P. 2001. Successful direct transfer of vitrified sheep embryos. *Theriogenology.* 56:299-305.
- Bautista, JAN; Kanagawa H. 1998. Current status of vitrification of embryos and oocytes in domestic animals: ethylene glycol as an emerging cryoprotectant of choice. *Japanese Journal of Veterinary Research.* 45:183-191.
- Beebe LFS, Cameron RDA, BlackshawAW, Higgins A, Nottle MB. 2000. Piglets born from vitrified zona-intact blastocysts. *Theriogenology.* 53:249.
- Beebe L.F.S., Cameron R.D.A., Blackshaw A.W., Verrall R.G. 2003. Vitrification of zona pellucida intact embryos and birth of piglets using the Vit-Master. *Proceedings of the 17th International Pig Veterinary Society Congress.* Ames, Iowa, USA. p 64.
- 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.
- Berthelot F, Martinat-Botté F, Perreau C, Terqui M. 2001. Birth of piglets after OPS vitrification and transfer of compacted morula stage with intact zona pellucida. *Reprod. Nutr. Dev.* 41:267-272.
- Berthelot F, Martinat-Botté F, Perreau C, Locatelli A, Manceau P, Terqui M. 2002. The use of an appropriate vitrification medium allows development of 30% of cryopreserved blastocysts and their birth as live piglets. *Pig News and Information.* 23:103-108.
- Berthelot F, Martinat-Botte F, Vajta G, Terqui M. 2003. Cryopreservation of porcine embryos: state of the art. *Livestock Production Science.* 83:73-83.
- Bilton, R. J., and N. W. Moore. 1976. *In vitro* culture, storage and transfer of goat embryos. *Aust. J. Biol. Sci.* 29:125.
- Bracke C, Niemann H. 1995. New aspects in the freezing of embryos for livestock. *Proceedings of the 11th Scientific Meeting of European Embryo Transfer Association.* Lyon, Francia. pp 101-111.
- Brison DR, Schultz RM. 1997. Apoptosis during mouse blastocysts formation: evidence for a role for survival factors including transforming growth factor alpha. *Biol. Reprod.* 56:1088-1096.
- Bui-Xuan-Nguyen N, Heyman Y, Renard JP. 1984. Direct freezing of cattle embryos alter partial dehydration at room temperature. *Theriogenology.* 22:389-399.

- Byrne AT, Suthgate J, Brison DR, Leese HJ. Analysis of apoptosis in the preimplantation bovine embryo using TUNEL. *J Reprod. Fertil.* 117:97-105.
- Cameron RDA, Lising R, Nagashima H, Blackshaw AW. 1992. Cryopreservation of cultured and uncultured porcine embryos with glycerol and trehalose. *Proceedings of the 12th International Pig Veterinary Society Congress, The Hague, Holanda.* p 476.
- Cameron RDA, Beebe LFS, Blackshaw AW, Higgins A, Nottle MB. 2000. Piglets born from vitrified early blastocysts using a simple technique. *Aust. Vet. J.* 78:195-196.
- Cameron RDA, Beebe LFS, Blackshaw AW, Keates HL. 2004. Farrowing rates and litter size following transfer of vitrified porcine embryos into a commercial swine herd. *Theriogenology.* 61: 1533-1543.
- Capdevielle EF. 1996. Criopreservación de embriones bovinos: Vitrificación. Otra alternativa. *CABIA* 28:22-32.
- Chang MC, Walton A. 1940. The effects of low temperatura and acclimatization on the respiratory activity and survival of ram spermatozoa. *Proc. R. Soc. Lond.* 857:517-527.
- Chupin D. 1987. Quick freezing of day 7 bovine blastocysts: Optimum parameters of dehydration step. *Theriogenology.* 27:219.
- Cuello C, Berthelot F, Martinat-Botté, Venturi E, Vázquez JM, Roca J, Martínez EA. 2002. Farrowing rate after non-surgical transfer of vitrified pig embryos. *Reproduction.* 29: 52.
- Cuthbertson KSR. 1983. Parthenogenetic variation of mouse oocytes *in vitro* with ethanol and benzyl alcohol. *J. Exp. Zool.* 226:311-314.
- Dobrinsky JR. 1993. Cryopreservation of porcine embryos: current status and perspectives. *Embryo Transfer Newsletter.* 11:13-18.
- Dobrinsky JR, Johnson LA. 1994. Cryopreservation of porcine embryos by vitrification: a study of *in vitro* development. *Theriogenology.* 42:25-35.
- Dobrinsky JR. 1996. Cellular approach to cryopreservation of embryos. *Theriogenology.* 45:17-26.
- Dobrinsky JR. 1997a. Cryopreservation of pig embryos. *Journal of Reproduction and Fertility.* 52:301-312.
- Dobrinsky JR, Long CR, Johnson LA. 1997b. Stability of microfilaments during swine embryo cryopreservation. *Theriogenology.* 47:343.
- Dobrinsky JR, Pursel VG, Long CR, Johnson LA. 1998. Birth of normal after cytoskeletal stabilisation of embryos and cryoconservation by vitrification. *Theriogenology.* 49:166.
- Dobrinsky JR, Pursel VG, Long CR, Johnson LA. 2000. Birth of piglets after transfer of embryos cryopreserved by cytoskeletal stabilization and vitrification. *Biol. Reprod.* 62:564-570.
- Dobrinsky JR, Nagashima H, Pursel VG, Schreier LL, Johnson LA 2001a. Cryoconservation of morula and early blastocysts stage swine embryos: Birth of litters after transfers. *Theriogenology.* 55:303
- Dobrinsky JR. 2001b. Cryopreservation of pig embryos: adaptation of vitrification technology for embryo transfer. *Reproduction.* 58:325-333.

- Dobrinsky JR. 2002. Advancements in cryopreservation of domestic animal embryos. *Theriogenology*. 57:285-302.
- Drew MN, De Lahunta A. 1986. The Embryology of domestic animals, developmental mechanisms and malformations. Eds. Williams and Wilkins, Baltimore, USA.
- Ducro-Steeverink DWB, Smits JM, Hazeleger W, Merks JWM. 2001. Reproduction results after nonsurgical embryo transfer in pigs. *Theriogenology*. 55:361.
- Ducro-Steeverink DWB, Peters CGW, Maters CC, Hazeleger W, Merks JWM. 2004. Reproduction results and offspring performance after non-surgical embryo transfer in pigs. *Theriogenology*. In press.
- Dziuk PJ. 1968. Effect of number of embryos and uterine space on embryo survival in the pig. *J. Anim. Sci.* 27:673-676.
- Dziuk PJ. 1985. Effect of migration, distribution and spacing of pig embryos on pregnancy and fetal survival. *J. Reprod. Fertil.* 33:57-63.
- Dziuk PJ, Henshaw G. 1985. Fertility of boar semen artificially inseminated following *in vitro* storage. *J. Anim. Sci.* 17:554-558.
- Eddidin M, Petit VA. 1977. The effect of temperature on the lateral diffusion of plasma membrane proteins. *Proceedings of the Ciba Found Symp.* 52:155-74.
- Fahning ML, García MA. 1992. Status of cryopreservation of embryos from domestic animals. *Cryobiology*. 29:1-18.
- Fisz M. 1980. Some probability distributions. Probability Theory and Mathematical Statistics Malabar. Eds. Krieger. pp 129-174.
- Fujino Y, Ujisato Y, Endo K, Tomizuka T, Kojima T, Oguri N. 1993. Cryoprotective effect of egg yolk in cryopreservation of porcine embryos. *Cryobiology*. 30:299-305.
- Fujino Y, Yonemura I, Suzuki M, Misumi K. 2003. Cryotolerance of porcine embryos-the need for batch-wise assessment. *Theriogenology*. 59:302.
- Galvin JM, Killiam DB, Stewart ANV. 1994. A procedure for successful nonsurgical embryo transfer in swine. *Theriogenology*. 41:1279-1289.
- Green ST, Boland MP, Gordon . 1984. Studies on the recovery and storage of porcine embryos. *Research Report 1982-1983*. p 100. Faculty of General Agriculture, University College, Dublin.
- Hancock JL, Hovell GJR. 1962. Egg transfer in the sow. *J. Reprod. Fert.* 4:195-201.
- Hardy K, Spanos S. 2002. Apoptosis in mammalian embryos. Assessment of mammalian embryo quality. Ed. Ann Van Soom and Marleen Boerjan. Kluwer Academic Publishers. Países Bajos.
- Hayashi S, Kobayashi K, Mizuno J, Saitoh K, Hirano S. 1989. Birth of piglets from frozen embryos. *Vet. Rec.* 125: 43-44.
- Hazeleger W, Kemp B. 1994. Farrowing rate and litter size after transcervical embryo transfer in sows. *Reprod. Dom. Anim.* 29:481-487.
- Hazeleger W and Kemp B. 1999. State of the art in pig embryo transfer. *Theriogenology*. 51:81-90.
- Hazeleger W, Bouwman EG, Noordhuizen JPTM, Kemp B. 2000a. Effect of superovulation induction on embryonic development on day 5 on subsequent development and survival after non-surgical embryo transfer in pigs. *Theriogenology*. 53:1063-1070.

- Hazeleger W, Noordhuizen JPTM, Kemp B. 2000b. Effect of asynchronous non-surgical transfer of porcine embryos on pregnancy rate and embryonic survival. *Livestock Production Science*. 64:281-284.
- Hazeleger W, Kemp B. 2001. Recent developments in pig embryo transfer. *Theriogenology*. 56:1321-1331.
- Holz W, Schlieper B. 1991. Unsatisfactory results with the transfer of embryos from gilts superovulated with PMSG and hCG. *Theriogenology*. 35:1237-1249.
- Holm P, Vajta G, Machaty Z, Schmidt M, Prather RS, Grve 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*. 20:307-310.
- Isachenko V, Alabart JL, Nawroth F, Isachenko E, Vajta G, Folch J. 2001. The open pulled straw vitrification of ovine GV-oocytes: positive effect of rapid cooling or rapid thawing or both. *Cryo Letters*. 22:157-162.
- Isachenko V, Folch J, Isachenko E, Nawroth F, Krivokharchenko A, Vajta G, Dattena M, Alabart JL. 2003a. Double vitrification of rat embryos at different developmental stages using an identical protocol. *Theriogenology*. 60:445-452.
- Isachenko V, Alabart JL, Dattena M, Nawroth F, Cappai P, Isachenko E, Cocero MJ, Olivera J, Roche A, Accardo C, Krivokharchenko A, Folch J. 2003b. New technology for vitrification and field (microscope-free) warming and transfer of small ruminant embryos. *Theriogenology*. 59:1209-1218.
- Johnson LA, Weitze KF, Fiser P, Maxwell WMC. 2000. Storage of boar semen. *Animal Reproduction Science*. 62:143-172.
- Kasai M. 1996. Simple and efficient methods for vitrification of mammalian embryos. *Anim. Reprod. Sci*. 42:67-75.
- Kashiwasaki N, Ohtani S, Nagashima H, Yamakawa H, Cheng WTK, Lin AC, Ma RCS, Ogawa S. 1991. Production of normal piglets from hatched blastocysts frozen at -196°C. *Theriogenology*. 35:221.
- Kobayashi S, Tomita M, Pollard JW, Leibo SP. 1995. Survival of cryopreserved porcine embryos vitrified in ethylene glycol plus polyvinylpyrrolidone. *Theriogenology*. 41:228.
- Kobayashi S, Doto M, Kano M, Takei M, Minato K, Leibo SP. 1998a. Farrows or pregnancies by transfer of porcine embryos vitrified at two different institutions. *Cryobiology*. 37:436.
- Kobayashi S, Takei M, Kano M, Tomita M, Leibo SP. 1998b. Piglets produced by transfer of vitrified porcine embryos after stepwise dilution of cryoprotectants. *Cryobiology*. 36:20-31.
- Kosarcic D, Veselinovic S, Ivkov V, Medic D, Micic R, Ivkov O, Kosarcic S. 1995. Transplantation of thawed deeply frozen embryos in swine. *Macedonian J. Reprod.* 1:23-27.
- Kvasnickii AV. 1951. Interbreed transplantation of ova. *Anim. Breed. Abstr.* 19: 224.
- Kuwayama M, Holm P, Jacobsen H, Greve T, Callesen H. 1997. Successful cryopreservation of porcine embryos by vitrification. *The Veterinary Record*. 4:365.
- Lane M, Bavister BD, Lyons EA, Forest KT. 1999. Containerless vitrification of mammalian oocytes and embryos. *Nat. Biotech.* 17:1234-1236.

- Leibo SP. 1984. One-step method for direct non-surgical transfer of frozen-thawed bovine embryos. *Theriogenology*. 21:767-790.
- Leibo SP. 1986. Cryobiology: preservation of mammalian embryos. *Basic Life Sci*. 37: 251-72.
- Leibo SP, Martino A, Kobayashi S, Pollard JW. 1996. Stage dependent sensitivity of oocytes and embryos to low temperatures. *Anim. Reprod. Sci*. 42:45-53.
- Leibo SP, Songsasen N. 2002. Cryopreservation of gametes and embryos of non-domestic species. *Theriogenology*. 57:303-326.
- Li J, Riecke A, Day BN, Prather RS. 1996. Porcine nonsurgical embryo transfer. *J. Anim. Sci*. 74:2263-2268.
- Luyet BJ, GeHENIO PM. 1940. Life and death at low temperatures. Eds. Normandy, *Biodynamica*.
- Maddox-Hyttel P, Boerjan M. 2002. The ultrastructure of cattle, swine and horse embryos. Assessment of mammalian embryo quality. Eds. Ann Van Soom and Marleen Boerjan. Kluwer Academic Publisher. Dordrecht. Holanda. pp 296-339.
- Martinat-Botté F, Renaud G, Madec F, Costiou P, Terqui M. 2000. En: Ultrasonography and reproduction in swine. Principles and practical applications. Eds. INRA and Hoetchst Roussel Vet. París, Francia.
- Martínez EA, Vázquez JM, Roca J, Lucas X, Gil MA, Vázquez JL. 2001a. Deep intrauterine insemination and embryo transfer in pigs. *Control of pig reproduction VI*. Eds Cambridge University Press. London, Reino Unido. *Reproduction Supplement* 58:301-311.
- Martínez EA, Vázquez JM, Roca J, Lucas X, Gil MA, Parrilla I, Vázquez JL, Day BN. 2001b. Successful non-surgical deep intrauterine insemination with small numbers of spermatozoa in sows. *Reproduction*. 122: 289-296.
- Martínez EA, Gil MA, Riecke A, Roca J, Vázquez JM, Didion BA, Day BN. 2002. Non-surgical deep intrauterine embryo transfer in sows. *Theriogenology*. 57:549.
- Martínez EA, Caamaño José N; Gil MA, Riecke A, McCauley Todd C, Cantley Tom C, Vázquez JM, Roca J, Vázquez JL, Didion BA, Murphy CN, Prather RS, Day BN. 2004. Successful nonsurgical deep uterine embryo transfer in pigs. *Theriogenology*. 61:137-146.
- Martino A, Songsasen N, Leibo SP. 1996. Development into Blastocysts of bovine oocytes cryopreserved by ultra rapid cooling. *Biology of Reproduction*. 45:1059-1069.
- Massip A. 2001. Cryopreservation of embryos of farm animals. *Reprod. Dom. Anim*. 36:49-55.
- Maurer R. 1978. Freezing of mammalian embryos: A review of the techniques. *Theriogenology*. 9:45-68.
- Mazur P. 1977. Slow freezing injury in mammalian cells. The freezing of mammalian embryos. Eds. Elsevier, Excerpta Medica. Amsterdam. Holanda. pp 19-48.
- Mazur P. 1984. Freezing of living cells: mechanisms and implications. *Am J Physiol* 247:125-142.
- Mazur P, Schneider U. 1986. Osmotic responses of preimplantation mouse and bovine embryos and their cryobiological implications. *Cell Biophys*. 8: 259-284.

- Mazur P. 1990. Equilibrium, Quasi-Equilibrium, and Nonequilibrium Freezing of Mammalian embryos. *Cell Biophysics*. 17: 53-92.
- Mazur P, Cole K W. 1992. Cryobiological Preservation of Drosophila Embryos. *Science*. 258:1932-1935.
- Misumi K, Suzuki, Sato S, Saito N. 2003. Successful production of piglets derived from vitrified morulae and early blastocysts using a microdroplet method. *Theriogenology*. 60:253-260.
- Miyake T, Kasai M, Zhu SE, Sakurai T, Machida T. 1993. Vitrification of mouse oocytes and embryos at various stages of development in an ethylen based solution by a simple method. *Theriogenology*. 40:121-134.
- Mödl J, Reichenbach HD, Wolf E, Brem G. 1996. Development of frozen-thawed porcine blastocysts *in vitro* and *in vivo*. *Vet. Rec.* 139:208-210.
- Modlinski JA. 1980. Preimplantation development of microsurgically obtained haploid and homozygous diploid mouse embryos and effects of pretreatment with cytochalasin-b on enucleated eggs. *J. Embryol. Exp. Morphol.* 60:153-161.
- Nagashima H, Kato Y, Yamakawa H, Ogawa S. 1988. Survival of pig hatched blastocysts exposed below 15°C. *Theriogenology*. 29:280.
- Nagashima H, Kato Y, Yamakawa H, Matsumoto T, Ogawa S. 1989. Changes in freezing tolerance of pig blastocysts in peri-hatching stages. *Japanese J. Anim. Reprod.* 35:130-134.
- Nagashima H, Yamakawa H, Niemann H. 1992. Freezability of porcine of porcine blastocysts at different peri-hatching stages. *Theriogenology*. 37:839-850.
- Nagashima H, Kashiwazaki N, Ashman RJ, Grupen CG, Seamark RF, Nottle MB. 1994. Removal of cytoplasmic lipid enhances the tolerance of porcine embryos to chilling. *Biol. Reprod.* 51:618-622.
- Nagashima H, Kashiwazaki N, Ashman RJ, Grupen CG, Nottle MB. 1995. Cryopreservation of porcine embryos. *Nature*. 374:416.
- Nagashima H, Cameron RDA, Kuwayama M, Young M, Beebe LFS, Blackshaw AW, Nottle MB. 1999. Survival of porcine delipated oocytes and embryos after cryopreservation by freezing or vitrification. *J. Reprod. Dev.* 45:167-176.
- Niemann H. 1995. Advances in cryopreservation of bovine oocytes and embryos derived *in vitro* and *in vivo*. *Reproduction and Animal Breeding, Advances and Strategy* Eds. Enne G, Greppi GF, Lauria. Serono Symposia, Elsevier. pp 117-129.
- Niimura S, Ishida K. 1980. Histochemical observation of lipid droplets in mammalian eggs during the early development. *Japanese Journal of Animal Reproduction*. 26:46-49.
- Norberg HS. 1973. Ultrastructural aspects of the preattached pig embryo: cleavage and early blastocysts stages. *Z. Anat. Entwicklungsgesch* 143:95-114.
- Palasz AT, Mapletoft RJ. 1996. Cryopreservation of mammalian embryos and oocytes: Recent advances. *Biotech. Adv.* 14:127-149.
- Palma GA. 2001. Biotecnología de la reproducción. Eds. Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria. pp 149-167.
- Papis, K, Shimizu, M, Izaike, Y. 2000. Factors affecting the survivability of bovine oocytes vitrified in droplets. *Theriogenology*. 54:651-658.

- Petters RM, Wells KD. 1993. Culture of pig embryos. *J. Reprod. Fertil.* 48:61-73.
- Polge C, Smith AU, Parkes AS. 1949. Revival of spermatozoa after vitrification and dehydration at low temperatures. *Nature.* 164:16.
- Polge C, Day BN. 1968. Pregnancy following nonsurgical egg transfer in pigs. *Vet Rec.* 82:712.
- Polge C, Wilmut I, Rowson LEA. 1974. The low temperature preservation of cows, sheep and pig embryos. *Cryobiology.* 11:560.
- Polge C. 1977. The freezing of mammalian embryos: perspectives and possibilities. *Ciba Found Symp.* 52:3-18.
- Polge C. 1982. Embryo transplantation and preservation. Control of Pig Reproduction. Control of Pig Reproduction. Eds. Cole DJA, Foxcroft G.R., Butterworth Scientific. London, Reino Unido. pp 279-291.
- Pollard JW, Leibo, SP. 1994. Chilling sensitivity of mammalian embryos. *Theriogenology.* 41:101-106.
- Pomar FJR, Ducro-Steuerink DWB, Hazeleger W, Teerds KJ, Colenbrander B, Bevers MM. 2003. Development, DNA fragmentation and cell death in porcine embryos after 24 h storage under different conditions. *Theriogenology.* 61:147-158.
- Prather RS, First NL. 1986. Effect of cytochalasin B and demecolcine on freeze-thaw survival of murine embryos *in vitro*. *J Exp Zool.* 239:37-40.
- Pursel VG, Johnson LA, Schulman LL. 1973. Effect of dilution seminal plasma and incubation period on cold shock susceptibility of boar spermatozoa. *J. Anim. Sci.* 37:528-531.
- Pursel VG, Johnson LA. 1975. Freezing of boar spermatozoa: Fertilizing capacity with concentrated semen and new training procedure. *J. Anim. Sci.* 40:99-102.
- Rall WF, Fahy G. 1985. Ice-free cryopreservation of mouse embryos at -196°C by vitrification. *Nature.* 313:573-575.
- Rall WF. 1987. Factors affecting the survival of mouse embryos cryopreserved by vitrification. *Cryobiology.* 24:387-402.
- Rall WF. 1992. Cryopreservation of oocytes and embryos: methods and applications. *Animal Reproduction Science.* 28:237-245.
- Rayos A, Takahashi Y, Hishinuma M, Kanagawa H. 1992. Quick freezing of one cell mouse embryos using ethylene glycol with sucrose. *Theriogenology.* 37:595-603.
- Rubinsky B, Arav A, Devries A. 1992. The cryoprotective effect of antifreeze glycopeptides from antarctic fishes. *Cryobiology.* 29(1):69-79.
- Saha S, Otoi T, Takagi M, Boediono A, Sumantri C, Suzuki T. 1996a. Normal calves obtained after direct transfer of vitrified bovine embryos using ethylene glycol, trehalose, and polyvinylpyrrolidone *Cryobiology.* 33:291-299.
- Saha S, Rajamahendran R, Boediono A, Sumantri C, Suzuki T. 1996b. Viability of bovine blastocysts obtained after 7, 8 or 9 days of culture *in vitro* following vitrification and one step dehydration. *Theriogenology.* 46:331-343.
- S.A.S. 1997. Institute Inc., S.S. Guide for personal computers, version 6.12 CARY NC. SAS.
- Schneider U, Mazur P. 1984. Osmotic consequences of cryoprotectant permeability and its relations to the survival of frozen-thawed embryos, *Theriogenology.* 21: 69-79.

- Schneider U. 1986. Cryobiological principles of embryo freezing. *J. In Vitro Fertil. And Emb.* 3:3-9.
- Shaw, JM, Kola I, MacFarlane DR and Trounson AO. 1991. An association between chromosomal abnormalities in rapidly frozen 2-cell mouse embryos and the ice-forming properties of the cryoprotective solution. *J. Reprod. Fertil.* 91:9-18.
- Smorag Z, Gajda B. 1994. Cryopreservation of mammalian ova and embryos by vitrification. *Biotech. Adv.* 12:449-465.
- Sommerfeld V, Niemann H. 1999. Cryopreservation of bovine *in vitro* produced embryos using ethylene glycol in controlled freezing or vitrification. *Cryobiology.* 38:95-105.
- SPSS. 1998. SPSS Base 8.0 for Windows User's Guide. SPSS Inc. Chicago IL.
- Stein-Stefani J, Holtz W. 1987. Surgical and endoscopic transfer of porcine embryos to different uterine sites. *Theriogenology.* 27:278.
- Stringfellow DA, Seidel S. 1998. Recommendations for the sanitary holding of *in vivo* derived embryos. Manual of the International Embryo Transfer Society. Eds. Stringfellow DA, Seidel SM. Illinois, USA.
- Suzuki T, Yamamoto M, Ooe M, Sakata A, Matsuoka M, Nishikita Y, Okamoto K. 1990. Effect of sucrose concentration used for one-step dilution upon *in vitro* and *in vivo* survival of bovine embryos refrigerated in glycerol and 1,2 propanediol. *Theriogenology.* 34:1051-1057.
- Takashi Y, Kanagawa H. 1990. Effect of equilibration period on the viability of frozen-thawed mouse morulae after rapid freezing. *Mol. Reprod. Develop.* 26:105-110.
- Takeda T, Elsdon RP, Seidel GE Jr. 1984. Cryopreservation of mouse embryos by direct plunging into liquid nitrogen. *Theriogenology.* 21:266.
- Theodoropoulos PA, Gravanis A, Tsapara A, Margioris N, Papadogiorgaki E, Galanopoulos V, Stournaras C. 1994. Cytochalasin-b may shorten actin filaments by a mechanism independent of barbed end capping. *Biochem Pharmacol.* 47:1875-1881.
- Toner M, Cravalho EG, Ebert KM, Overström EW. 1986. Cryobiophysical properties of porcine embryos. *Biol. Reprod.* 34:98.
- Trounson A. 1986. Preservation of human eggs and embryos. *Fertil Steril.* 46:1-12.
- Vajta G, Holm P, Greve T, Callesen H. 1995. Direct in-straw rehydration after thawing of vitrified *in vitro* produced bovine blastocysts. *Veterinary Record.* 137:672.
- Vajta G, Holm P, Greve T, Callesen H. 1996. Factors affecting survival rate of *in vitro* produced bovine embryos after vitrification and direct in-straw rehydration. *Anim. Reprod. Sci.* 45:191-200.
- Vajta G, Booth PJ, Holm P, Greve T, Callesen H. 1997a. Successful vitrification of early stage bovine *in vitro* produced embryos with Open Pulled Straw (OPS) method. *Cryo Letters.* 18:191-195.
- Vajta G, Holm P, Greve T, Callesen H. 1997b. Survival and development of bovine blastocysts produced *in vitro* after assisted hatching, vitrification and in-straw direct rehydration. *Journal of Reproduction and Fertility.* 111:65-70.
- Vajta G, Holm P, Greve T, Callesen H. 1997c. Vitrification of porcine embryos using the Open Pulled Straw (OPS) method. *Acta Vet. Scand.* 38:349-352.
- Vajta G, Hyttel P, Callesen H. 1997d. Morphological changes of in-vitro-produced bovine

- blastocysts after vitrification, in-straw direct rehydration, and culture. *Mol. Reprod. Dev.* 48:9-17.
- Vajta G, Holm P, Kuwayama M, Booth PJ, Jacobsen H, Greve T, Callesen H. 1998. Open Pulled Straw (OPS) vitrification: a new way to reduce cryoinjury of bovine ova and embryos. *Mol. Reprod. Dev.* 51:53-58.
- Vajta G, Peura T, Holm P, Booth PJ, Greve T, Callesen H. 1999. The effect of medium, serum and temperature on the *in vitro* survival of bovine blastocysts after open pulled straw (OPS) vitrification. *Theriogenology.* 51:176.
- Vajta G. 2000. Vitrification of the oocytes and embryos of domestic animals. *Anim. Reprod. Sci.* 60:357-364.
- Valdez CA, Hishinuma M, Takahashi Y, Kanagawa H. 1991. Effect of trehalose dilution on the survival of vitrified-thawed mouse morulae. *Jpn. J. Vet. Res.* 39:23-6.
- Voelkel SA, Hu YX. 1992. Use of ethylene glycol as a cryoprotectant for bovine embryos allowing direct transfer of frozen-thawed embryos to recipient females. *Theriogenology.* 37:687-697.
- Wallenhorst S, Holtz W. 1999. Transfer of pig embryos to different uterine sites. *J. Anim. Sci.* 77:2327-2329.
- Weber PK, McGinnis LK, Youngs CR. 1992. An evaluation of potential vitrification solutions for cryopreservation of porcine embryos. *Theriogenology.* 37:321.
- Weber PK, Youngs CR. 1994. Investigation of cryoprotectant toxicity to porcine embryos. *Theriogenology.* 41:1291-1298.
- Weber PK, McGinnis LK, Youngs CR. 1992. An evaluation of potential vitrification solutions for cryopreservation of porcine embryos. *Theriogenology.* 37:321.
- Whittingham DG, Leibo SP, Mazur P. 1972. Survival of mouse embryos frozen to -196 degrees and -269 degrees C. *Science.* 178:411-414.
- Whittingham DG. 1980. Principles of embryo cryopreservation. Eds. Ashwood-Smith, MJ and Farrant J. *Low temperature preservation in Medicine and Biology.* Kent, China. p4.
- Willadsen SM, Polge C, Rowson LE, Moor RM. 1976. Deep freezing of sheep embryos. *J. Reprod. Fertil.* 46:151-154.
- Wilmot I. 1972. The low temperature preservation of mammalian embryos. *J. Reprod. Fert.* 31:513-514.
- Wilmot I, Rowson L. 1973. Experiments on the low temperature preservation of cow embryos. *Vet. Rec.* 92:686-690.
- Wilmot I. 1986. Cryopreservation of mammalian eggs and embryos. *Dev Biol.* 4: 217-47.
- Yamamoto Y, Oguri N, Tsutsumi Y, Hachinohe Y. 1982. Experiments in the freezing and storage of equine embryos. *J. Reprod. Fert.* 32:399-403.
- Yonemura I, Fujino Y, Irie S, Miura Y. 1996. Transcervical transfer of porcine embryos under practical conditions. *J. Reprod. Dev.* 42:89-94.
- Yoshino J, Kojima T, Shimizu M, Tomizuka T. 1993. Cryopreservation of porcine blastocysts by vitrification. *Cryobiology.* 30:413-422.
- Youngs CR. 2000. Factors influencing the success of embryo transfer in pig. *Theriogenology.* 56:1311-1320.

- Zeilmaker GH, Alberda AT, Van Gent I. 1984. Two pregnancies following transfer of intact frozen-thawed embryos. *Fertil. Steril.* 42:293-296.
- Zuh B, Wang G, Ma B, Wang J. 1990. One step freezing of rabbit embryos. *Theriogenology.* 33:196.

Abreviaturas

ADN	Ácido desoxirribonucleico
BSA	Albúmina sérica bovina
Br-dUTP	Bromodioxiuridina trifosfato
CATMOD	Categorical Data Modeling
eCG	Gonadotropina coriónica equina
GLM	General lineal model
hCG	Gonadotropina coriónica humana
h	horas
i.m.	Intramuscular
i.v.	Intravenoso
LWh	Large White hiperprolífica
MB	Medio básico de manejo de embriones
min	Minutos
NaCl	Cloruro sódico
NBCS	<i>New born calf serum</i> . Suero de ternero recién nacido
OPS	Open Pulled Straw
PBS-BSA	PBS con un 0.1% de BSA
SOPS	Superfine Open Pulled Straw
TCMm	TCM199 Hepes modificado
TdT	Enzima terminal transferasa
TE	Transferencia de embriones
TUNEL	Terminal deoxynucleotidyl transferase Biotin-dUTP Nick end labeling

