

Primeros cerdos nacidos en México a partir de embriones producidos *in vitro*

First pigs born in Mexico from *in vitro* produced embryos

Yvonne Claudine Ducolomb Ramírez^a, Salvador Romo García^b, Juan Alberto Balcázar Sánchez^c, Luis Felipe Rodarte Covarrubias^c, Eduardo Casas Hernández^a, Gladis del Carmen Fragoso González^d, Edda Lidia Scitutto Conde^e, Miguel Betancourt Rule^a

RESUMEN

El presente trabajo tuvo dos objetivos: validar las técnicas de maduración *in vitro*, fertilización *in vitro* de ovocitos y desarrollo *in vitro* de embriones porcinos, como una contribución para el desarrollo de las técnicas de reproducción asistida en México; el segundo fue transferir embriones a una hembra receptora, para producir lechones. Los ovocitos se recolectaron a partir de hembras prepúberes y se maduraron en medio definido TCM-199, suplementado con alcohol polivinílico. Los ovocitos madurados se inseminaron en medio amortiguado con Tris y se transfirieron a medio de desarrollo embrionario NCSU-23. Para la primera fase del trabajo, se realizaron siete ensayos con 311 ovocitos, de los cuales 82 % completaron la maduración, y de éstos, 70 % resultaron fertilizados. Se obtuvieron 106 embriones en diferentes etapas del desarrollo y 14 % de estos alcanzaron el estado de blástula. En la segunda fase del trabajo, se transfirieron por vía quirúrgica 49 embriones en diferente estado de desarrollo, al cuerno uterino de una hembra receptora previamente sincronizada. Se detectó la gestación por medio de ultrasonografía 55 días después de la transferencia. A los 114 días y medio después de la fertilización, nacieron por cesárea dos hembras vivas con apariencia y peso normales.

PALABRAS CLAVE: Cerdo, Blástula, Transferencia de embriones, Maduración *in vitro*, Fertilización *in vitro*.

ABSTRACT

Techniques for *in vitro* maturation, *in vitro* fertilization and *in vitro* development of porcine embryos from oocytes were validated for development of assisted reproductive methodologies in Mexico, and embryos were transferred to a recipient female to produce piglets. Oocytes were collected from prepuberal females and matured in a defined medium, TCM-199, supplemented with polyvinyl alcohol. Mature oocytes were inseminated in Tris-buffered medium and transferred to NCSU-23 embryo culture medium. Technique validation was done using seven assays with a total of 311 oocytes, of which 82 % completed maturation, and 70 % of these were fertilized. A total of 106 embryos in different developmental stages were obtained and 14 % of these reached blastocyst stage. Piglets were produced through surgical transfer of 49 embryos in different developmental stages to the uterine horn of an artificially synchronized recipient female. Pregnancy was diagnosed by ultrasound at day 55 post-transfer. At 114 and a half days after IVF, two live female piglets of normal appearance and weight were born by cesarean section.

KEY WORDS: Pig, Blastocyst, Embryo transfer, *In vitro* maturation, *In vitro* fertilization.

Las investigaciones sobre fertilización *in vitro* (FIV) se iniciaron al final de la década de 1950, cuando se produjo el nacimiento de conejos por esta técnica⁽¹⁾. Aunque la FIV progresó rápidamente en especies de mamíferos de laboratorio, su desarrollo fue más lento

In vitro fertilization (IVF) research began in the late 1950's and soon produced the birth of rabbits⁽¹⁾. Though IVF progressed quickly in laboratory mammal species, it has developed slowly in domestic animals, with the birth of the first IVF

Recibido el 16 de marzo de 2004 y aceptado para su publicación el 13 de mayo de 2005.

^a Departamento de Ciencias de la Salud, Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa. Av. San Rafael Atlixco 186, 09340, Iztapalapa, D.F. México. duco@xanum.uam.mx. Correspondencia al primer autor.

^b Departamento de Posgrado, Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán, UNAM.

^c Departamento de Reproducción y Departamento de Etología, Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, UNAM.

^d Departamento de Inmunología, Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM.

en las especies domésticas, ya que el nacimiento de la primera ternera mediante FIV se logró en 1982⁽²⁾. Estos veinte años de retraso fueron consecuencia de problemas metodológicos, ya que las condiciones requeridas para la capacitación espermática, la maduración *in vitro* (MIV) de ovocitos y el desarrollo embrionario preimplantación, difieren entre las diversas especies de mamíferos.

La demanda de la FIV en varias especies domésticas se ha incrementado debido al desarrollo de técnicas de transgénesis mediante las cuales, es posible introducir genes específicos en el genoma de animales como bovinos, ovinos y porcinos^(3,4,5). Estas técnicas requieren la producción de un alto número de embriones en los que se puedan llevar a cabo estas manipulaciones.

Los cerdos representan un modelo apropiado para la creación de animales transgénicos, con el fin de elaborar productos biológicos y obtener órganos para xenotrasplantes, debido a que presentan aspectos fisiológicos, anatómicos y bioquímicos similares a los de los seres humanos, y los órganos obtenidos de cerdos transgénicos tendrían una aplicación para trasplantes en humanos⁽⁶⁾. Algunos cerdos transgénicos son capaces de sintetizar proteína C⁽⁷⁾, hemoglobina y sustituto de sangre humanas⁽⁶⁾. Existen trabajos que describen la producción de ratones transgénicos, en los que se ha transferido la resistencia a enfermedades parasitarias como la cisticercosis, con base en la identificación de genes candidatos de resistencia en un modelo murino⁽⁸⁾, que podría ser aplicado al porcino.

Para incrementar la eficiencia y reproducibilidad en la MIV y FIV, así como en el desarrollo embrionario, se han creado medios definidos. El fluido folicular porcino y el suero fetal bovino han sido eliminados de estos medios como fuente de nutrientes, debido a la complejidad de su composición y a la variabilidad que existe entre ellos, por lo que se han remplazado por componentes como el alcohol polivinílico (PVA) y suplementos como cisteína, glucosa, piruvato de sodio, factor de crecimiento epidérmico (EGF), LH y FSH⁽⁹⁻¹³⁾.

Aunque se ha progresado en este campo, hay pocos informes de nacimientos de cerdos producidos por

calf not occurring until 1982⁽²⁾. This twenty-year delay was the result of different methodological problems originating in the sperm collection, oocyte *in vitro* maturation (IVM) and preimplantation embryo development conditions of each mammal species.

Demand for IVF in a number of domestic species has increased as transgenesis techniques have developed making possible to introduce specific genes into the genome of animals such as bovines, ovines and porcines^(3,4,5). These techniques require production of large numbers of embryos with which to implement these manipulations.

Pigs are an appropriate model for creating transgenic animals intended for production of biological products and organs for xenotransplants because their physiological, anatomical and biochemical aspects are similar to those of humans and thus organs from transgenic pigs could be used for transplants in humans⁽⁶⁾. Some transgenic pigs can synthesize C protein⁽⁷⁾, hemoglobin and substitute human blood⁽⁶⁾. Studies have also been done describing the production of transgenic mice to which resistance to parasitic diseases like cisticercosis has been transferred based on identification of candidate resistance genes in a murine model⁽⁸⁾ which could be applied to pigs.

Defined media have been created to increase the efficiency and reproducibility of IVF and IVM, as well as embryo development. Porcine follicular fluid and bovine fetal serum have been eliminated from these media as nutrient sources due to their compositional complexity and internal variability. They have been replaced by components such as polyvinyl alcohol (PVA) and supplements such as cysteine, glucose, sodium pyruvate, epidermal growth factor (EGF), LH and FSH⁽⁹⁻¹³⁾.

Progress is being made in this field, but there are still few reports of pig births produced by IVM and IVF⁽¹³⁻¹⁷⁾ that describe embryo transfer (ET) in different embryonic development stages. In Mexico, no studies have previously reported the birth of pigs with these techniques. This study had two objectives, first to validate IVM, IVF and *in vitro* porcine embryo development techniques, and second to generate embryos *in vitro* for transfer to a recipient sow and produce piglets.

MIV y FIV⁽¹³⁻¹⁷⁾, en los que se describan la transferencia de embriones (TE) en diferentes estados de desarrollo embrionario. En México no existen trabajos en los que se haya logrado el nacimiento de lechones por medio de estas técnicas.

En este trabajo los objetivos fueron dos: el primero fue validar las técnicas de MIV, FIV y el desarrollo de embriones porcinos *in vitro*. El segundo, obtener embriones *in vitro* para transferirlos a una hembra receptora y producir lechones.

Para cumplir el primer objetivo los ovarios se colectaron en el rastro, a partir de cerdas prepúberes y se transportaron al laboratorio en menos de dos horas, en solución de NaCl al 0.9 % a 25 °C (A menos que se especifique lo contrario, los reactivos empleados fueron de la marca Sigma). Folículos ováricos de 3 a 6 mm se puncionaron para la obtención del fluido folicular, que se dejó sedimentar para obtener el paquete celular, que fue lavado dos veces con medio modificado de Tyrode suplementado con lactato de sodio 10 mM, HEPES 10 mM y PVA 1mg/ml (TL-HEPES-PVA). Se seleccionaron los ovocitos con citoplasma uniforme y granular, y rodeados de una masa compacta de células del cúmulo; se lavaron tres veces en medio de maduración (TCM-199 con sales de Earle y bicarbonato de sodio 26.2 mM) libre de proteínas, suplementado con D-glucosa 3.05 mM, piruvato de sodio 0.91 mM, PVA 0.1 %, cisteína 0.57 mM, EGF 10ng/ml, LH 0.5 µg/ml y FSH 0.5 µg/ml⁽¹¹⁾. De 40 a 50 ovocitos se transfirieron a cajas de cuatro pozos (Nunc), que contenían 500 µl de medio de maduración libre de proteínas, cubierto con aceite mineral (Fisher) y se incubaron a 39 °C con 5 % de CO₂ en aire y humedad a saturación por 44 h.

Después de la MIV, las células del cúmulo fueron removidas con hialuronidasa al 0.1 % en TCM-199. Los ovocitos desnudos se lavaron dos veces con medio de maduración y tres veces con medio de FIV en gotas de 500 µl y cubiertas con aceite mineral⁽¹⁸⁾. Este medio, designado como medio amortiguado con Tris (TBM), está compuesto por NaCl 113.1 mM, KCl 3 mM, CaCl₂ 2 H₂O 7.5 mM, Tris 20 mM, glucosa 11 mM, piruvato de sodio 5 mM, albúmina sérica bovina (BSA) 0.4 % y cafeína 2.5 mM. Para la FIV, se colocaron de 30 a 35 ovocitos en gotas de

To fulfill the first objective, ovaries were collected at an abattoir from prepuberal female pigs, and transported to the laboratory in less than 2 h in 0.9 % NaCl at 25 °C (unless otherwise indicated, all reagents are Sigma brand). Ovarian follicles measuring between 3 and 6 mm were punctured to collect the follicular fluid. This was left to sediment to obtain the cell pellet, which was washed twice with Tyrode modified medium supplemented with 10 mM sodium lactate, 10 mM HEPES and 1mg/ml PVA (TL-HEPES-PVA). Oocytes with uniform, granular cytoplasm surrounded by a compact mass of cumulus cells were selected. These were washed three times in a protein-free maturation medium (TCM-199 with Earle's salts and 26.2 mM sodium bicarbonate) supplemented with 3.05 mM D-glucose, 0.91 mM sodium pyruvate, 0.1% PVA, 0.57 mM cysteine, 10 ng/ml EGF, 0.5 µg/ml LH and 0.5 µg/ml FSH⁽¹¹⁾. Forty to fifty oocytes were transferred to four-well plates (Nunc) containing 500 µl of protein-free maturation medium, covered with mineral oil (Fisher) and incubated at 39 °C with 5% CO₂ in air and humidified atmosphere for 44 h.

After IVM, the cumulus cells were removed with 0.1% hyaluronidase in TCM-199. The denuded oocytes were washed twice in maturation medium and three times in IVF medium in 500 µl drops covered with mineral oil⁽¹⁸⁾. This IVF medium, designed as Tris buffer medium (TBM), is composed of 113.1 mM NaCl, 3 mM KCl, 7.5 mM CaCl₂ 2H₂O, 20 mM Tris, 11 mM glucose, 5 mM sodium pyruvate, 0.4 % bovine serum albumin (BSA) and 2.5 mM caffeine. For IVF, thirty to thirty-five oocytes were placed in 50 µl drops of TBM covered with mineral oil and incubated at 39 °C with 5% CO₂ in air and humidified atmosphere for 45 min until insemination^(9,10).

Each semen sample was obtained using the gloved hand method and transported at 39 °C to the laboratory. It was diluted 1:1 with a phosphate saline solution (PBS-Dulbecco, Gibco), supplemented with 0.1% BSA fraction V, 75 µg/ml G potassic penicillin and 50 µg/ml streptomycin sulfate. This suspension was centrifuged at 61 g for 5 min, the supernatant diluted 1:1 with PBS-Dulbecco and then centrifuged at 1,900 xg for 5 min. The supernatant was discarded and the sperm pellet was resuspended

50 μ l de medio TBM cubiertas con aceite mineral y se incubaron a 39 °C con 5 % de CO₂ en aire y humedad a saturación, por 45 min hasta la inseminación^(9,10).

La muestra de semen se obtuvo mediante el método de la mano enguantada y se transportó a 39 °C al laboratorio, donde fue diluida 1:1 con solución salina de fosfatos (PBS-Dulbecco, Gibco), suplementada con BSA fracción V al 0.1 %, 75 μ g/ml de penicilina potásica G y 50 μ g/ml de sulfato de estreptomina. Esta suspensión se centrifugó a 61 xg durante 5 min. El sobrenadante se diluyó 1:1 con PBS-Dulbecco y se centrifugó a 1,900 xg por 5 min. El sobrenadante se desechó y el paquete celular, conteniendo los espermatozoides, se resuspendió en 10 ml de PBS-Dulbecco y se centrifugó a 1,900 xg por 5 min. El paquete celular se diluyó con 100 μ l de TBM y se hizo una dilución para que, al agregar 50 μ l de la suspensión de espermatozoides a la gota del medio de FIV con los ovocitos, se obtuviera una concentración final de 5 x 10⁵ espermatozoides por ml⁽⁹⁾. Las células se colocaron en incubación en las condiciones antes descritas durante 7 h.

Después del periodo de coincubación, los ovocitos se lavaron tres veces en gotas de 50 μ l de medio North Carolina State University-23 (NCSU-23)⁽¹⁹⁾ suplementado con BSA libre de ácidos grasos al 0.4 %; se transfirieron a gotas de 500 μ l del mismo medio cubiertas con aceite mineral en placas de cuatro pozos, y se incubaron en las mismas condiciones durante 12 h. Posteriormente, se lavaron en medio TL-HEPES-PVA y se prensaron entre un portaobjetos y un cubreobjetos para fijarlos con ácido acético-etanol (J.T. Baker) (1:3) por 72 h. Los ovocitos se tiñeron con una solución de orceína al 1 % en ácido acético (J.T. Baker) al 45 %. Las preparaciones se evaluaron en el microscopio de contraste de fases a un aumento de 400x⁽⁹⁾. Los ovocitos con vesícula germinal o cromosomas en la primera metafase se consideraron inmaduros, los que mostraron cromosomas en la segunda metafase y presentaron el primer cuerpo polar, se consideraron como maduros, y aquéllos que presentaron dos o más pronúcleos, como fertilizados.

Después de 7 h de coincubación, los ovocitos fertilizados que se utilizaron para evaluar el desarrollo

in 10 ml PBS-Dulbecco and centrifuged at 1,900 xg for 5 min. The cell pellet was diluted with 100 μ l TBM. A dilution was made such that when the 50 μ l of sperm suspension was added to the drop of IVF medium with the oocytes the final concentration would be 5 x 10⁵ sperm per ml⁽⁹⁾. The cells were co-incubated for 7 h under the previously described conditions.

After the incubation period the oocytes were washed three times in 50 μ l drops of North Carolina State University-23 (NCSU-23) medium⁽¹⁹⁾ supplemented with 0.4% fatty acid-free BSA. They were transferred to 500 μ l drops of the same medium covered with mineral oil in four-well plates and incubated under the same conditions for 12 h. Then they were washed in TL-HEPES-PVA medium and placed between a slide and a cover glass to be fixed with 1:3 acetic acid:ethanol (J.T. Baker) for 72 h. The oocytes were stained with a 1% orceine solution in 45% acetic acid (J.T. Baker). These slides were examined in a phase contrast microscope at 400x⁽⁹⁾. Oocytes with germinal vesicle or chromosomes in the first metaphase were considered immature, those exhibiting chromosomes in the second metaphase and with the first polar body were considered mature and those with two or more pronuclei were considered fertilized.

After 7 h co-incubation, fertilized oocytes used to evaluate embryonic development were washed as mentioned above, transferred to 500 μ l of NCSU-23 medium and incubated at 39°C in a humidified atmosphere and 5% CO₂ in air. Embryos were examined at 48 and 120 h after incubation to determine development stages.

Seven IVM, IVF and embryonic development assays were done. Of the 311 oocytes utilized, 256 (82 %) completed maturation, and 178 (70 %) of these were fertilized. A total of 106 embryos in different development stages were produced and 15 (14 %) of these reached the blastocyst stage. Polyspermy was 35 %.

Once IVM, IVF and embryonic development conditions were established, the objective of producing viable piglets was pursued. The recipient was a nulliparous commercial genetic line sow with three recorded regular estrus cycles. From d 12 to

embrionario se lavaron de la forma mencionada, se transfirieron a gotas de 500 μ l de medio NCSU-23 y se incubaron a 39 °C en atmósfera húmeda y 5 % de CO₂ en aire. A las 48 y 120 h de incubación, se observaron los embriones para determinar su estado de desarrollo.

Se realizaron siete ensayos de MIV, FIV y desarrollo embrionario. De un total de 311 ovocitos empleados, 256 (82 %) completaron la maduración y de estos, 178 (70 %) resultaron fertilizados. Se obtuvieron 106 embriones en diferentes etapas del desarrollo y 15 (14 %) de ellos alcanzaron el estado de blástula. El porcentaje de polispermia fue del 35 %.

Una vez establecidas las condiciones de MIV, FIV y desarrollo embrionario, se procedió a realizar el segundo objetivo, y se usó como receptora una hembra nulípara de línea genética comercial, en la que se registraron tres ciclos estrales regulares. De los días 12 al 17 del cuarto ciclo estral, se le administraron diariamente por vía oral 20 mg de Altrenogest (Hoescht Marion-Rousell). Los días 18 y 20 se le administraron, por vía intramuscular, 1500 UI de eCG y 7500 UI de hCG (Intervet). Se registró el día y la hora en que la hembra presentó calor. Cinco y medio días después del último estro, se realizó la TE, procurando sincronizar de esta forma el estado de desarrollo de los embriones en etapa de mórulas y blástulas tempranos (6 a 7 días), con el medio ambiente uterino de la receptora.

Veinticuatro horas antes de la cirugía, se le suspendió la ingesta de alimento y agua a la hembra receptora para vaciar el contenido del aparato digestivo; posteriormente, se procedió a tranquilizarla con 2 mg/kg de peso de Sural (Asaperona, Intervet), para posteriormente aplicarle 7 mg/kg de peso de metomidil (clorato de metomidato, Chinoin). Después de anestesiada, se realizó la laparoscopia de acuerdo a la técnica de Legendre y Bousseau⁽²⁰⁾; una vez en la cavidad abdominal, se procedió a localizar el útero y a ubicar los ovarios, para contar los cuerpos lúteos de cada uno.

Los embriones se transportaron al quirófano en menos de una hora, en gotas de 50 μ l de medio NCSU-23 cubiertas con aceite mineral, en placas de cuatro pozos a 39 °C protegidos de la luz. Una vez en el quirófano

17 of the fourth estrus cycle a daily dosage of 20 mg Altrenogest (Hoescht Marion-Rousell) was administered orally. From d 18 to 20, 1500 UI eCG and 7,500 UI hCG (Intervet) were administered intramuscularly. The day and time the female was in heat were recorded. ET was done five and a half days after the last estrus, thus ensuring that the development stage of embryos in the morula and early blastocyst stages (6 to 7 d) was synchronized with the environment in the uterus of the recipient.

All food and water were suspended for the recipient female 24 h before surgery to empty the digestive tract. Anesthesia begun with 2 mg/kg weight Sural (Asaperona, Intervet), followed by 7 mg/kg weight Metomidil (methomidate chloride, Chinoin). Once anesthesia was complete, laparoscopy was done following the method of Legendre and Bousseau⁽²⁰⁾. After entering the abdominal cavity, the uterus and ovaries were located and the corpora lutea on each ovary counted.

The embryos were transported to the operating room in less than an hour in 50 μ l drops of NSCU-23 medium covered with mineral oil in four-well plates at 39 °C, protected from light. In the operating room they were examined and loaded into a catheter using a stereoscopic microscope.

The embryos were then transferred to the tip of the uterine horn ipsilateral to the ovary with the largest number of corpora lutea. The uterine horn was punctured with an angiocatheter and the embryos were deposited on the surface of the uterus. The horn was returned to the abdominal cavity and the muscular fascia and skin were sutured⁽²⁰⁾. Pregnancy diagnosis was done with real-time linear arrangement ultrasound using a 5 MHz probe (E.I. Medical).

A single lot of IVF embryos that had reached the following development stages was used: 10 expanded blastocysts; 27 morulas and early blastocysts; and 12 in early development stage (8 to 16 cells). All were transferred to the uterine horn of the recipient female. After ET the female did not show estrus. Gestation progress was evaluated with ultrasound examinations at 55, 69, 90 and 107 d. The female exhibited no signs of parturition at 114 and half days after IVF (109 d after ET) thus the

se observaron y se cargaron en un catéter bajo el microscopio estereoscópico.

Posteriormente, los embriones se transfirieron a la punta del cuerno uterino ipsolateral al ovario con mayor número de cuerpos lúteos. Se puncionó el cuerno uterino con un angiocatéter para depositar los embriones en la luz uterina. El cuerno se regresó a la cavidad abdominal y se suturaron la fascia muscular y la piel⁽²⁰⁾. El diagnóstico de gestación se realizó por medio de ultrasonido (tiempo real-arreglo lineal) con un transductor de 5 MHz (E.I. Medical).

Se utilizó un solo lote de embriones obtenidos por FIV que alcanzaron las siguientes etapas de desarrollo: 10 blástulas expandidas, 27 mórulas y blástulas tempranas, y 12 en estados tempranos de desarrollo (8 a 16 células). Todos fueron transferidos al cuerno uterino de la hembra receptora. Después de la TE, la hembra no presentó estró, se utilizó el ultrasonido a los 55, 69, 90 y 107 días, para evaluar el avance de la gestación. Transcurridos 114 días y medio después de la FIV, o 109 días después de la TE, la hembra no presentó síntomas de parto, por lo que se procedió a realizar una intervención quirúrgica de la que se obtuvieron dos hembras vivas, con pesos de 1.5 y 1.0 kg respectivamente, con apariencia y tamaño normales.

Los medios de maduración de ovocitos son suplementados convencionalmente con fluidos biológicos, como fluido folicular y suero fetal, que estimulan la maduración; sin embargo, contienen moléculas no caracterizadas, que pueden ejercer un efecto inhibitorio en la maduración, dando como resultado una gran variabilidad en la producción de embriones⁽¹³⁾. En el medio de maduración empleado en este estudio se sustituyeron el suero fetal bovino y el fluido folicular por PVA⁽⁹⁾, suplementado con EGF⁽¹⁰⁾. Se ha demostrado que la MIV de ovocitos de cerdo en medios definidos, produce embriones viables⁽⁹⁾. En estudios previos, se han transferido embriones recién fertilizados⁽¹⁶⁾ o de dos a cuatro células en el oviducto^(14,15), o embriones de ocho células o mórulas en el cuerno uterino⁽¹⁰⁾.

En el presente estudio se transfirieron 49 embriones en diferentes etapas de desarrollo, a un solo cuerno

decision was made to intervene surgically. Two live female piglets of normal appearance and size (1.5 and 1.0 kg weight) were delivered by cesarean section.

Oocyte maturation media are conventionally supplemented with biological fluids such as follicular fluid and fetal serum which stimulate maturation. However, these fluids contain uncharacterized molecules that can have an inhibitory effect on maturation, resulting in a great variability in embryo production⁽¹³⁾. In the present study, bovine fetal serum and follicular fluid were substituted with PVA⁽⁹⁾, supplemented with EGF⁽¹⁰⁾ in the maturation medium used. Previous studies have shown that IVM of pig oocytes in defined media produces viable embryos⁽⁹⁾. Other studies report the transfer of recently fertilized embryos⁽¹⁶⁾ or two- to four-cell embryos^(14,15) into the oviduct, or of eight-cell embryos or morulas into the uterine horn⁽¹⁰⁾.

In the present study, 49 embryos in different developmental stages were transferred into a single uterine horn. This was done because pig embryos have the ability to migrate to either horn. Embryos in different developmental stages were transferred to a single recipient female because only one female was available for this experiment and because the final goal of this experiment was the production of piglets regardless of the number of embryos used. Transfer of multiple embryos also maximizes the possibility of some embryos reaching full gestation as many do not implant or are reabsorbed. Yoshida *et al.*⁽¹⁵⁾ transferred 75 two- to four-cell embryos developed in vitro to the oviducts of a recipient female and 114 d later three female piglets were born. In another study, 380 two- to four-cell embryos were transferred to the oviducts of eight female recipients (48 per recipient), four of which were pregnant but only one produced live piglets⁽¹⁴⁾. Kikuchi *et al.*⁽¹⁶⁾ transferred 50 recently fertilized embryos and with 24 h of development to four sows and only three live piglets resulted. In contrast, in another study 20 to 25 blastocyst stage embryos were transferred to four recipient sows, producing 21 piglets⁽¹³⁾.

Only two piglets resulted in the present study, but the other embryos probably contributed to the rescue of the corpora lutea and the continued gestation of the two piglets.

uterino. La transferencia de todos los embriones a un solo cuerno uterino se debió al hecho de que en la cerda los embriones tienen la capacidad de migrar a ambos cuernos. Por otra parte, las razones de transferir embriones en diferentes estadios de desarrollo a una sola hembra receptora, fueron la disponibilidad de una sola hembra para realizar este experimento, y que el objetivo final era el de lograr la producción de lechones, sin importar la cantidad de los embriones utilizados.

Se ha informado que muchos embriones no se implantan o son reabsorbidos, por lo que un alto número de embriones debe ser transferido para que algunos de ellos puedan llegar al final de la gestación. Yoshida *et al.*⁽¹⁵⁾ transfirieron 75 embriones en estado de dos a cuatro células, desarrollados *in vitro*, a los oviductos de una hembra receptora; 114 días después nacieron tres hembras. En otro estudio, se transfirieron 380 embriones en estado de dos a cuatro células a los oviductos de ocho hembras receptoras (48 embriones en cada receptora), cuatro de ellas resultaron preñadas, pero sólo una produjo nueve lechones vivos⁽¹⁴⁾. Kikuchi *et al.*⁽¹⁶⁾ transfirieron 50 embriones recién fertilizados y de 24 h de desarrollo a cuatro hembras, y obtuvieron solamente tres lechones vivos. En cambio, en otro trabajo se transfirieron de 20 a 25 embriones en estado de blástula a cuatro hembras receptoras, las cuales produjeron un total de 21 lechones⁽¹³⁾.

Aunque en el presente estudio se logró el nacimiento de sólo dos lechones, es probable que los otros embriones hayan contribuido para lograr el rescate de los cuerpos lúteos y mantener la gestación de los dos productos.

Todos los embriones transferidos fueron del mismo lote; a los 6 días posteriores a la fertilización no todos llegaron a la etapa de blástula, como era lo esperado, pero podemos afirmar que a la hora de la transferencia todos estaban vivos, ya que en lotes utilizados como testigo, al hacer pruebas de viabilidad con MTT (Metiltiazolotetrazolio), se observó que los embriones en estado temprano de desarrollo (8 a 16 células) permanecieron vivos, aún cuando sus contemporáneos hayan alcanzado la etapa de blástula. Por otra parte, es probable que los embriones que continuaron el desarrollo hasta término, hayan sido aquéllos con una sincronización más cercana con la receptora, es decir, las mórulas y las blástulas.

All the transferred embryos were from the same lot. Six days after fertilization not all the embryos had reached the blastocyst stage, as it was expected, but all were alive when transferred. This was confirmed in a control group through viability tests using MTT (methylthiazol tetrazolium) in which the early development stage embryos remained alive even when the other embryos had reached the blastocyst stage. From all the transferred embryos, it is likely that those that continued developing until parturition were the ones with the closest synchronization with the recipient sow, that is, the morulas and blastocysts.

The present results coincide with those of Yoshida *et al.*⁽¹⁵⁾, who state that transfer of a large number of embryos should provide protection against product loss during gestation. This is confirmed by the birth of the two apparently normal female piglets in the present study with weights similar to those obtained by natural means. A similar study achieved the birth of nine piglets with weights of 1.0 to 1.5 kg from two recipient sows using IVF and ET to a single uterine horn in each recipient⁽¹⁶⁾.

Previous studies in Mexico have utilized IVF methodology in pigs^(21,22), but no embryo transfers or pregnancies have been reported using this technique. The present is the first study in Mexico in which live piglets are reported born using IVM, IVF and ET. This is an important step towards developing assisted reproduction methodologies for swine production in Mexico.

ACKNOWLEDGEMENTS

The authors thank MC. Marco Bonilla, MC Héctor Zayas and MVZ Rubén Ramírez for their technical support. Dr. María Elena Trujillo consulted for the hormonal synchronization of the sow. MVZ Ricardo García García provided anesthesia support and MVZ. Jesús Paredes Pérez performed the cesarean section. Thanks to Rastro Los Arcos, Los Reyes, Estado de México, México, for donating the ovaries. This project was partially financed by the CONACyT, grant 1470 a MB.

End of english version

Los resultados obtenidos coinciden con los descritos por Yoshida *et al.*⁽¹⁵⁾, quienes mencionan que la transferencia de un alto número de embriones debe proporcionar protección durante la gestación, para evitar la pérdida de productos. Las dos hembras que nacieron fueron aparentemente normales, y su peso fue semejante al que se obtiene por medios naturales. En un estudio similar al presente, se logró obtener en dos hembras receptoras, el nacimiento de nueve lechones con pesos de 1.0 a 1.5 kg, empleando FIV y TE a un cuerno uterino de una hembra receptora⁽¹⁶⁾.

En México se han llevado a cabo estudios utilizando la metodología de FIV en cerdos^(21,22), sin embargo, no se han reportado transferencias de embriones ni gestaciones producidas por esta técnica. Este es el primer trabajo en el que se logra el nacimiento de lechones vivos por MIV, FIV y TE. Los resultados obtenidos en este estudio podrán contribuir al desarrollo nacional de metodologías de reproducción asistida para la producción de cerdos.

AGRADECIMIENTOS

Se agradece al M. en C. Marco Bonilla, al M. en C. Héctor Zayas y al MVZ Rubén Ramírez su apoyo técnico, a la Dra. María Elena Trujillo su asesoría en la sincronización hormonal de la hembra, al MVZ Ricardo García García por el apoyo en la anestesia, al MVZ Jesús Paredes Pérez por la realización de la cesárea a la cerda, y al Rastro Los Arcos, Los Reyes, Estado de México, México, por la donación de los ovarios. Proyecto parcialmente apoyado por el CONACyT convenio 1470 a MB.

LITERATURA CITADA

- Chang MC. Fertilization of rabbit ova *in vitro*. *Nature* 1959;(184):466-467.
- Brackett BG, Bousquet D, Boice ML, Donawick WJ, Evans JF, Dressel MA. Normal development following *in vitro* fertilization in the cow. *Biol Reprod* 1982;(27):147-158.
- Toyoda Y, Naito K. *In vitro* fertilization in domestic animals. In: Bavister BD, Cummings J, Roldan ERS editors. *Fertilization in mammals*. Massachusetts, USA: Serono Symposia, Norwell 1990:335-347.
- Weidle UH, Lenz H, Brem G. Genes encoding a mouse monoclonal antibody are expressed in transgenic mice, rabbits and pigs. *Gene* 1997;(98):185-191.
- Prather RS, Tao T, Machaty Z. Development of the techniques for nuclear transfer in pigs. *Theriogenology* 1999;(51):487-498.
- Niemann H, Reichelt B. Manipulating early pig embryos. *J Reprod Fertil* 1993;48(Suppl):75-94.
- Shamay A, Solinas S, Pursel VG, McKnight RA, Alexander L, Beattie C, *et al.* Production of the mouse whey acidic protein in transgenic pigs during lactation. *J Anim Sci* 1991;(69):4552-4562.
- Fragoso G, Lamoyi E, Mellor A, Lomeli C, Hernández M, Sciuotto E. Increased resistance to *Taenia crassiceps* murine cysticercosis in Qa2 transgenic mice. *Infect Immun* 1998;(2):760-764.
- Abeydeera RL, Wang W, Prather RS, Day BN. Maturation *in vitro* of pig oocytes in protein-free culture media: fertilization and subsequent embryo development *in vitro*. *Biol Reprod* 1998;(58):1316-1320.
- Abeydeera RL, Wang WH, Cantley TC, Reike A, Prather RS, Day BN. Presence of epidermal growth factor during *in vitro* maturation of pig oocytes and embryo culture can modulate blastocyst development after *in vitro* fertilization. *Mol Reprod Dev* 1998;(51):395-401.
- Wang W, Niwa K. Synergetic effects of epidermal growth factor and gonadotropins on the cytoplasmic maturation of pig oocytes in a serum-free medium. *Zygote* 1995;(3):345-350.
- Wang WH, Abeydeera LR, Cantley TC, Day BN. Effects of oocyte maturation media on development of pig embryos produced by *in vitro* fertilization. *J Reprod Fertil* 1997;(111):101-108.
- Yoshioka K, Suzuki C, Itoh S, Kikuchi K, Iwamura S, Rodriguez-Martinez H. Production of piglets derived from *in vitro*-produced blastocysts fertilized and culture in chemically defined media: effects of theophylline, adenosine and cysteine during *in vitro* fertilization. *Biol Reprod* 2003;(6):2092-2099.
- Mattioli M, Bacci ML, Galeati G, Seren E. Developmental competence of oocytes matured and fertilized *in vitro*. *Theriogenology* 1989;(31):1201-1207.
- Yoshida M, Mizoguchi Y, Ishigaki K, Kogima T, Nagai T. Birth of piglets derived from *in vitro* fertilization of pig oocytes matured *in vitro*. *Theriogenology* 1993;39:1303-1311.
- Kikuchi Z, Kashiwasaki N, Noguchi J, Shimada A, Takahashi R, Hirabayashi M, *et al.* Developmental competence after transfer to recipients of porcine oocytes matured, fertilized and cultured *in vitro*. *Biol Reprod* 1999;(60):336-340.
- Funahashi H, Kim N, Stumpf TT, Cantley TC, Day BN. Presence of organic osmolytes in maturation medium enhances cytoplasmic maturation of porcine oocytes. *Biol Reprod* 1996;(54):1412-1419.
- Abeydeera RL, Day BN. Fertilization and subsequent development *in vitro* of pig oocytes inseminated in a modified Tris-buffered medium with frozen-thawed ejaculated spermatozoa. *Biol Reprod* 1997;(57):729-734.
- Peters RM, Wells KD. Culture of pig embryos. *J Reprod Fertil* 1993;48(Suppl):61-73.
- Legendre X, Bousseau S. Récolte et transfert d'embryons sous contrôle endoscopique chez les petits ruminants. *Rec Méd Vét* 1992;168(3):289-293.
- Betancourt M, Fierro R, Ambriz D. *In vitro* fertilization of pig oocytes matured *in vitro*. *Theriogenology* 1993;(40):1155-1160.
- Duolomb Y, Fierro R, González-Márquez H, Valdez A, Betancourt M. Effect of porcine follicular fluid on *in vitro* maturation oocytes, *in vitro* fertilization and polyspermy. *Advances in Reproduction* 2003;(7):1-5.