

# Efecto de la **superovulación** de cerdas **Duroc múltiparas** con eCG sobre la respuesta ovárica y desarrollo embrionario el día 6 de gestación

La transferencia de embriones (TE) es una tecnología con importantes aplicaciones en producción porcina ya que permite el intercambio de material genético con un mínimo riesgo de transmisión de enfermedades y un coste reducido, evitando los problemas de bienestar animal asociados al transporte de animales.

**Cuello C, Gil MA, Parrilla I, Martínez CA, Roca J y Martínez EA**

Dpto. Medicina y Cirugía Animal, Facultad de Veterinaria. Universidad de Murcia.

30100 Campus de Espinardo, Murcia.

Imagen cedida por los autores

## Introducción

A pesar del enorme interés de la industria porcina en el desarrollo de la TE, actualmente su uso comercial es muy limitado, principalmente debido a la necesidad de emplear procedimientos quirúrgicos. La transferencia de embriones vía no quirúrgica se consideró imposible durante muchos años debido a la compleja anatomía del tracto genital de la cerda. Sin embargo, en la última década se han abierto nuevas perspectivas con el desarrollo de un sistema de transferencia intrauterino profundo vía no quirúrgica (revisado por Martínez *et al.*, 2019). Este procedimiento de transferencia es simple, seguro y bien tolerado por las receptoras, y permite depositar los embriones en la profundidad de un cuerno uterino. En las primeras experiencias realizadas con este sistema de TE con embriones frescos se obtuvieron parámetros reproductivos aceptables con un 71,4 % de tasa de partos y una media de 6,9 lechones nacidos (Martínez *et al.*, 2004), lo que supuso un impulso al desarrollo de la TE en esta especie.

Con el fin de poder alcanzar parámetros reproductivos óptimos en las cerdas receptoras después de la transferencia, es preciso utilizar un alto número de embriones frescos de buena calidad.



PattyPhoto/shutterstock.com

Según la tasa de ovulación de referencia de la especie (15-25 ovocitos), los embriones colectados de una única donante podrían ser suficientes para realizar una TE lo que supone un ratio donante:receptora de 1:1.

## Número de embriones necesarios

No existen estudios comparativos sobre el número de embriones necesarios para realizar transferencias quirúrgicas y no quirúrgicas, aunque se considera que el número de embriones aceptable para garantizar buenos resultados oscila entre 15 y 23 embriones en los procedimientos quirúrgicos (Berthelot *et al.*, 2007; Cameron *et al.*, 1989; Polge, 1982) y entre 24 y 30 embriones en los sistemas no quirúrgicos (Martinez *et al.*, 2004).

Sin embargo, en la práctica esto no es así. Hay que asumir que un porcentaje de las donantes no quedan gestantes después de la inseminación artificial; algunos ovocitos procedentes de cerdas gestantes no están fecundados; algunos de los embriones que se recuperan de las hembras donantes no son transferibles y la tasa de recuperación de embriones no es del 100 %.

Todos estos factores hacen que la ratio real donante:receptora se sitúe en torno a 2:1, lo que da como resultado un incremento importante del coste de un embrión porcino transferible.

Para reducir esta ratio, se pueden plantear las siguientes opciones:

### 1. Plantear el uso de un menor número de embriones por TE

Esta posibilidad aún no ha sido estudiada y habría que evaluar su impacto sobre los parámetros reproductivos.

### 2. Conseguir la superovulación de las cerdas donantes con gonadotropina coriónica equina (eCG)

Quando se emplean cerdas nulíparas como donantes de embriones y se someten a un tratamiento de superovulación aumenta la tasa de ovulación y el número de embriones obtenidos con respecto a las hembras no tratadas (Ziecik *et al.*, 2005); pero también se obtiene un mayor porcentaje (~25 %-50 %) de ovocitos no fecundados y/o embriones degenerados y una alta variabilidad individual en la respuesta ovulatoria (Holtz y Schlieper, 1991; Niemann *et al.*, 1989; Wallenhorst y Holtz, 2002; Ziecik *et al.*, 2005). Por esta razón, el uso de nulíparas como donantes de embriones debe considerarse con cautela.

### 3. Estimular a las cerdas primíparas y múltiparas con gonadotropinas

Las cerdas primíparas y múltiparas pueden estimularse también hormonalmente con gonadotropinas para incrementar su tasa de ovulación después de un tratamiento de sincronización o después del destete (Brüssow *et al.*, 2009). Existen muy pocos estudios sobre la calidad de los embriones de día 5-6 de gestación colectados de cerdas donantes nulíparas (Rátky *et al.*, 2001) o múltiparas (Hazeleger *et al.*, 2000) superovuladas y/o los parámetros reproductivos obtenidos después de la transferencia de este tipo de embriones a cerdas receptoras. Además de ser escasos, las investigaciones anteriores presentaban una importante limitación ya que no incluyeron un grupo control de cerdas sin superovular en sus experimentos, lo que hace imposible las comparaciones y establecer claramente el impacto del tratamiento de superovulación.



**Aunque las tasas de ovulación en porcino varían muchísimo entre razas, y dependen de si la cerda es nulípara o múltipara, se considera que una tasa de ovulación de entre 15 y 25 ovocitos es la típica en esta especie.**

### **Puesta en marcha**

Nuestro grupo se planteó realizar una serie de estudios con un doble objetivo:

1. Determinar el efecto de dos dosis de eCG para inducir la ovulación en cerdas múltiparas sobre la calidad de embriones de día 5-6 de gestación y posteriormente investigar el efecto del tratamiento de superovulación con gonadotropinas en cerdas de diferentes líneas genéticas.
2. Determinar los parámetros reproductivos después de la transferencia intrauterina profunda de embriones colectados desde donantes superovuladas y no superovuladas.

El primer estudio sobre la superovulación de cerdas donantes con diferentes dosis de eCG (Angel *et al.*, 2014) se realizó en condiciones de campo en una granja comercial (Selección Batallé SA, Girona, España).

### **Material y métodos** **Sincronización y superovulación de las donantes**

Se emplearon como donantes de embriones 90 cerdas de pura raza Duroc de 2-6 partos. La sincronización del estro se realizó mediante el destete y únicamente se emplearon como donantes de embriones cerdas con un intervalo destete-estro de 3 a 4 días. La superovulación de las donantes se indujo mediante administración intramuscular de diferentes dosis de eCG (Folligon®; Intervet International B.V., Boxmeer, Países Bajos) 24 h

después del destete. Las dosis de eCG empleadas fueron 1000 UI y 1500 UI. Únicamente las cerdas con signos de celo de 48 a 72 h después de la administración de eCG fueron tratadas con 750 UI de hCG (Veterin Corion, Divasa Farmavic SA, Barcelona, España). La hCG se administró en el momento del inicio del estro por vía intramuscular.

### **Inseminación artificial, recolección y evaluación de los embriones**

Las donantes se inseminaron intracervicalmente a las 0, 24 y 36 h después del inicio del estro. Posteriormente, se colectaron los embriones mediante laparotomía de las cerdas donantes los días 5 o 6 del ciclo (día 0 = inicio del estro), siguiendo el protocolo descrito previamente por Martínez *et al.* (Martínez *et al.*, 2014).

Los embriones recuperados se evaluaron con ayuda de un estereomicroscopio con el fin de clasificarlos en función de su estadio de desarrollo y calidad según los criterios de la sociedad internacional para la transferencia de embriones (IETS; Wright, 1998):

- Las mórulas y blastocistos clasificados como grado 1 y 2 (excelente y buena calidad, respectivamente) se consideraron viables.
- El resto de las estructuras colectadas, incluyendo ovocitos, embriones de una célula, embriones poco desarrollados o de mala calidad, fueron descartados y considerados ovocitos no fecundados y/o embriones degenerados.



## Evaluación de las tasas de ovulación, recuperación, fecundación y presencia de quistes

La tasa de ovulación se determinó contando el número de cuerpos lúteos (CL) presentes en los ovarios durante la laparotomía. Con el fin de evaluar la efectividad del tratamiento de superovulación, se cuantificó el número total de embriones viables y de ovocitos no fecundados y/o embriones degenerados en cada una de las donantes.

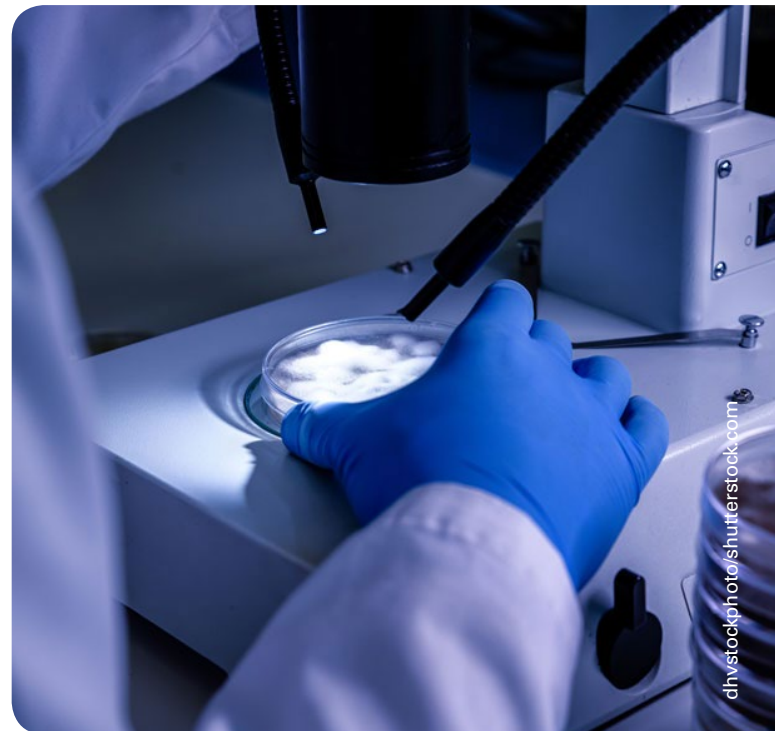
La tasa de recuperación se definió como la ratio entre el número de embriones y ovocitos recuperados con respecto al número total de CL.

La tasa de fecundación se definió como la ratio de embriones viables con respecto al total de embriones y ovocitos recuperados.

Además, se registró la presencia de quistes foliculares (estructuras ováricas llenas de líquido transparente sin signos de ovulación y con un diámetro superior a 2 cm en el momento de la laparotomía) en los ovarios o de ovarios poliquísticos (ovarios con más de 8 quistes foliculares).

## Resultados del tratamiento de superovulación

El efecto del tratamiento de superovulación sobre las tasas de gestación y número de quistes se representa en la *tabla*. La tasa de gestación potencial (porcentaje de donantes con más de cuatro embriones viables) tendió



**En este estudio evaluamos parámetros relacionados con la producción y calidad de los embriones.**

( $P = 0,07$ ) a ser menor en las donantes superovuladas con la dosis más alta de eCG en comparación con las cerdas control. Este resultado se debe a la presencia de ovarios poliquísticos en 3 cerdas (11 %) del grupo de 1500 IU de eCG. Ninguna de estas cerdas presentó CL en sus ovarios, y el tamaño de la mayoría de los quistes

Parámetro:	Tratamiento (UI de eCG)		
	0 (Control)	1000	1500
Cerdas, n	36	27	27
Tasa de gestación, n (%)	36 (100)	27 (100)	24 (88,9) <sup>a</sup>
Cerdas con quistes, n (%)	14 (38,9)	9 (33,3)	12 (44,4)
Número de quistes en las cerdas con quistes (media±SEM)	2,4±0,4	2,9±0,6	3,6±1,0
Cerdas con ovarios poliquísticos, n (%)	0 (0,0)	0 (0,0)	3 (11,1) <sup>a</sup>

<sup>a</sup>Tendencia con respecto al grupo control ( $P = 0,07$ ); SEM: Error estándar de la media.

Efecto del tratamiento de superovulación sobre las tasas de gestación e incidencia de quistes ováricos en cerdas donantes en día 5 y 6 de gestación.

## Tasa de gestación potencial

La tasa de gestación potencial tendió a ser menor en las cerdas superovuladas con la mayor dosis de eCG. Este hecho se debe a la presencia de tres cerdas (11,1 %) con numerosos quistes foliculares y sin CL adicionales en los ovarios, lo que se asocia con infertilidad (Heinonen *et al.*, 1998). El resto de las cerdas, tanto del grupo de superovulación como las cerdas controles estaban gestantes los días 5 y 6 después de la inseminación, sin diferencias significativas en las tasas de gestación entre grupos. Por ello, parece claro que el tratamiento de superovulación utilizado no tuvo efectos adversos sobre la maduración, el transporte de los gametos, la fertilización y el desarrollo embrionario temprano.



fue >3 cm. En el control y en el grupo de 1000 UI de eCG no se observaron ovarios poliquísticos, el número de quistes estuvo en un rango de  $2,4 \pm 0,4$  y  $3,6 \pm 1,0$  por cerda, sin diferencias entre grupos. Tampoco se observaron diferencias en las tasas de recuperación o en las tasas de fecundación.

Los parámetros reproductivos que obtuvimos con respecto a las tasas de ovulación de las cerdas donantes y calidad de los embriones de día 6 se representan en la *figura*.

La media de CL y número total de embriones viables fue superior en los grupos de superovulación y aumentaron con la dosis de gonadotropina ( $P < 0,05$ ). No hubo diferencias entre grupos con respecto al número de ovocitos y/o embriones degenerados. El número de embriones transferibles obtenidos fue mayor ( $P < 0,05$ ) en las cerdas superovuladas que en las cerdas control. Cuando se tienen en cuenta todas las cerdas tratadas (gestantes y no gestantes) la media de embriones transferibles fue de  $20,6 \pm 1,0$  y  $22,4 \pm 2,1$  para el grupo de 1000 UI y 1500 UI, respectivamente.

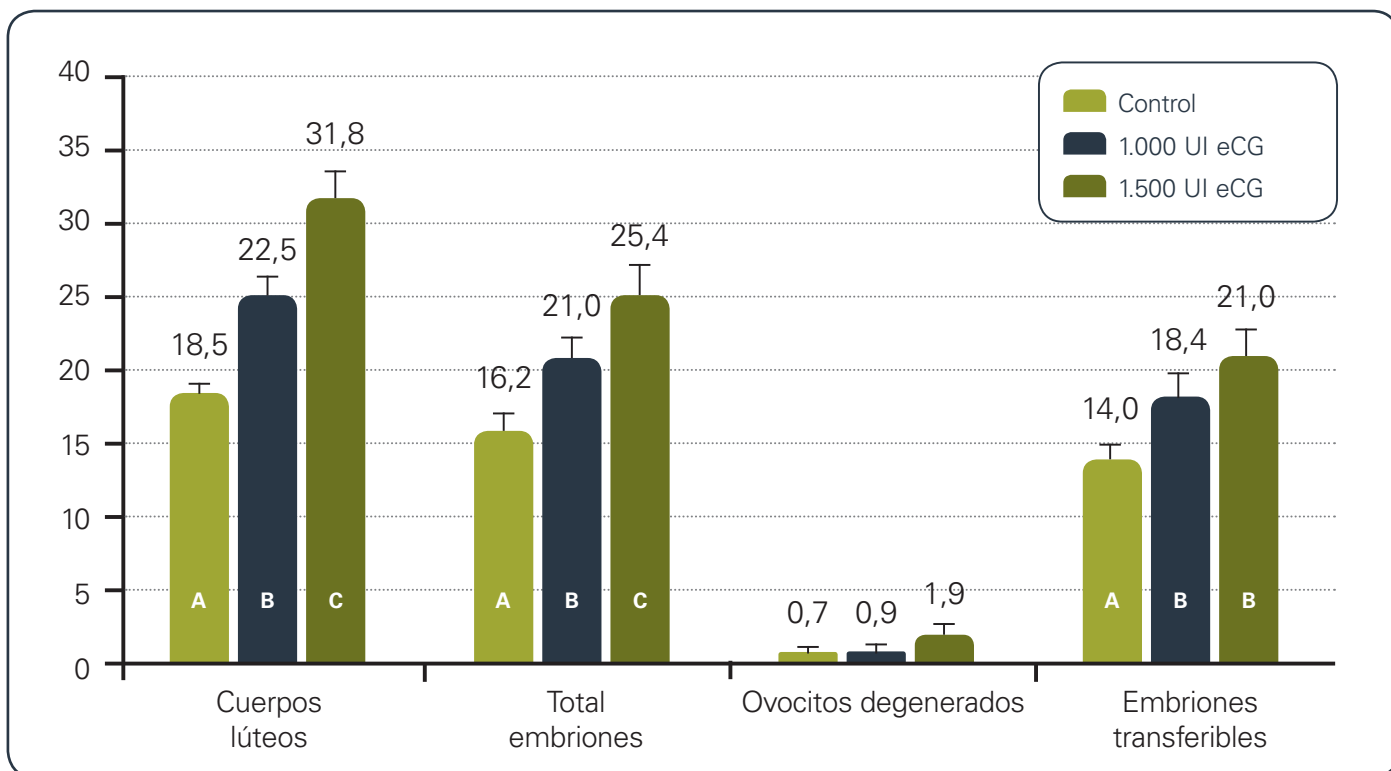
En el día 5 de gestación, el porcentaje de embriones no transferibles fue diferente ( $P < 0,01$ ) entre grupos (3,5 %, 0,0 % y 23,1 % para los grupos 1000 UI, 1500 UI y control, respectivamente) debido exclusivamente a la presencia de mórulas precompactas. En el día 6 de

## Presencia de quistes ováricos

Independientemente del tratamiento de superovulación (1000 o 1500 UI de eCG), encontramos una elevada proporción de donantes (33 %-44 %) con quistes en los ovarios, con entre 3 y 3,5 quistes por cerda. Estos datos son similares a los encontrados en las cerdas control no superovuladas, lo que indica que el tratamiento de superovulación empleado no tuvo un efecto sobre la incidencia de quistes.

Aunque los quistes se han asociado con una mayor tasa de retorno al estro, una menor tasa de partos y un incremento en el número de cerdas en anestro (Castagna *et al.*, 2004), en nuestro estudio los quistes no interfirieron en la ciclicidad, como demuestran la excelente historia reproductiva y la excelente calidad de los embriones colectados. Lo más probable es que estos quistes fuesen no funcionales y, por ello, no interfirieron con el ciclo de las cerdas, tal y como se ha descrito para los quistes únicos (Ryan, 1991).

Aunque no está claro el motivo del elevado porcentaje de cerdas con quistes observado en este estudio, no podemos descartar la hipótesis de que esta elevada incidencia en el número de quistes sea una característica innata de las cerdas de pura raza Duroc.



Influencia del tratamiento de superovulación sobre los parámetros reproductivos en las cerdas gestantes de día 6. Diferente letra indica diferencia significativa para  $P < 0,05$ .

gestación, se obtuvo un mayor ( $P < 0,02$ ) porcentaje de embriones no transferibles (8,1 %) en el grupo de 1500 UI de eCG comparado con los grupos control (2,4 %) y 1000 UI de eCG (2,9 %) como resultado de la presencia de blastocistos eclosionados.

### Discusión

Los resultados de este estudio demuestran claramente que los embriones de día 5 y 6 de gestación obtenidos de donantes superovuladas con eCG presentan una morfología y capacidad de desarrollo similares a aquellos obtenidos de donantes no superovuladas. Independientemente del tratamiento de superovulación (1000 o 1500 UI de eCG), encontramos una elevada proporción de donantes (33 %-44 %) con quistes en los ovarios, oscilando el número de quistes entre 3 y 3,5 por cerda. Estos datos son similares a los encontrados en las cerdas control no superovuladas, lo que indica que el tratamiento de superovulación empleado no tuvo un efecto sobre la incidencia de quistes. Aunque los quistes se han asociado con una mayor tasa de retorno al estro, una menor tasa de partos y un incremento en el número de cerdas en anoestro (Castagna *et al.*, 2004), en nuestro estudio, los quistes no interfirieron en la ciclicidad, como demuestran la excelente historia reproductiva y la excelente calidad de los embriones



colectados. Lo más probable es que estos quistes fuesen no funcionales, y por ello no interfirieron con el ciclo de las cerdas, tal y como se ha descrito para los quistes únicos (Ryan, 1991). Aunque no está claro el motivo del elevado porcentaje de cerdas con quistes observado en este estudio, no podemos descartar la hipótesis de que esta elevada incidencia en el número de quistes sea una característica innata de las cerdas de pura raza Duroc.


La tasa de gestación potencial tendió a ser menor en las cerdas superovuladas con la mayor dosis de eCG. Este hecho se debe a la presencia de tres cerdas (11,1 %) con numerosos quistes foliculares y sin cuerpos lúteos adicionales en los ovarios, lo que se asocia con infertilidad (Heinonen *et al.*, 1998). El resto de las cerdas, tanto del grupo de superovulación como las cerdas controles estaban gestantes los días 5 y 6 después de la inseminación, sin diferencias significativas en las tasas de gestación entre grupos. Por ello, parece claro que el tratamiento de superovulación utilizado no tuvo efectos adversos sobre la maduración, el transporte de los gametos, la fertilización y el desarrollo embrionario temprano.

Los tratamientos de superovulación se han asociado a un elevado porcentaje de ovocitos no fecundados y/o embriones degenerados. En nuestro estudio, nosotros no solo obtuvimos un mayor número de embriones viables y transferibles en las donantes superovuladas, sino que el número de ovocitos no fecundados y/o embriones degenerados fue similar en todos los grupos, no se vio afectado por la superovulación y se situó alrededor del 7 % del total de las estructuras recogidas. Además, sólo un pequeño porcentaje (<6 %) de los embriones viables obtenidos de donantes superovuladas fue clasificado como no transferible. Este porcentaje no se debió a una menor calidad de los embriones, sino a que su estadio de desarrollo no era apropiado para la TE (mórula precompacta o blastocistos eclosionado). Nuestros resultados contradicen estudios previos en los que describen que entre un 16 % y un 53 % de las los embriones recuperados de donantes superovuladas fueron clasificados como ovocitos o embriones de pobre calidad (Brussow *et al.*, 2000; Holtz & Schlieper, 1991;

Niemann *et al.*, 1989; Ziecik *et al.*, 2005). Sin embargo, en todas estas investigaciones la superovulación se efectuó sobre cerdas prepuberales, cerdas que tienen una menor capacidad de producir embriones y que producen embriones de peor calidad. Es importante señalar que en este estudio no se encontró una correlación entre el número de cuerpos lúteos y el número de ovocitos no fecundados y/o embriones degenerados, lo que contradice la creencia generalizada de que una alta tasa de ovulación está asociada a una menor viabilidad y calidad embrionaria. Teniendo en cuenta todas las cerdas superovuladas, la administración de 1000 UI de eCG resultó en un número de embriones transferibles similar al del tratamiento con 1500 UI ( $20,6 \pm 1,0$  y  $22,4 \pm 2,1$ , respectivamente). Por lo que una dosis de 1000 UI es adecuada para inducir la superovulación en cerdas donantes múltiples.

### Conclusión

Como resultado de esta primera investigación, llegamos a la conclusión de que el tratamiento de superovulación empleado incrementó la eficiencia de la colección de embriones en cerdas destetadas sin afectar la formación de quistes ni el número de ovocitos no fecundados y/o embriones degenerados. Una dosis de 1000 UI de eCG fue suficiente para obtener un número aceptable de embriones transferibles y permitió reducir la ratio donante:receptora hasta 1,4:1 en cerdas de raza Duroc, lo que facilita la aplicación de la TE en la especie porcina.



**El tratamiento de superovulación empleado incrementó la eficiencia de la colección de embriones en cerdas destetadas. Una dosis de 1000 UI de eCG fue suficiente para obtener un número aceptable de embriones transferibles y permitió reducir la ratio donante:receptora hasta 1,4:1 en cerdas de raza Duroc, lo que facilita la aplicación de la TE en la especie porcina.**



## Bibliografía

- Angel, M. A., Gil, M. A., Cuello, C., Sanchez-Osorio, J., Gomis, J., Parrilla, I., Vila, J., Colina, I., Diaz, M., Reixach, J., Vazquez, J. L., Vazquez, J. M., Roca, J., & Martinez, E. A. (2014). The effects of superovulation of donor sows on ovarian response and embryo development after nonsurgical deep-uterine embryo transfer. *Theriogenology*, 81(6), 832–839. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2013.12.017>
- Berthelot, F., Venturi, E., Cognié, J., Furstoss, V., & Martinat-Botté, F. (2007). Development of OPS vitrified pig blastocysts: Effects of size of the collected blastocysts, cryoprotectant concentration used for vitrification and number of blastocysts transferred. *Theriogenology*, 68(2), 178–185. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2007.04.050>
- Brüssow, K. P., Schneider, F., Kanitz, W., Rátky, J., Kauffold, J., & Wähner, M. (2009). Studies on fixed-time ovulation induction in the pig. *Society of Reproduction and Fertility Supplement*, 66, 187–195. <https://doi.org/10.1530/biosciprocs.18.0019>
- Brussow, K. P., Torner, H., Kanitz, W., & Ratky, J. (2000). In vitro technologies related to pig embryo transfer. *Reproduction Nutrition Development*, 40(5), 469–480. <https://doi.org/10.1051/rnd:2000111>
- Cameron, R. D., Durack, M., Fogarty, R., Putra, D. K., & McVeigh, J. (1989). Practical experience with commercial embryo transfer in pigs. *Australian Veterinary Journal*, 66(10), 314–318. <https://doi.org/10.1111/j.1751-0813.1989.tb09714.x>
- Castagna, C. D., Peixoto, C. H., Bortolozzo, F. P., Wentz, I., Neto, G. B., & Ruschel, F. (2004). Ovarian cysts and their consequences on the reproductive performance of swine herds. *Animal Reproduction Science*, 80(1–2), 115–123. <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2003.08.004>
- Day, B. N., Longenecker, D. E., Jaffe, S. C., Gibson, E. W., & Lasley, J. F. (1967). Fertility of swine following superovulation. *Journal of Animal Science*, 26(4), 777–780. <https://doi.org/10.2527/jas1967.264777x>
- Hazeleger, W., Bouwman, E. G., Noordhuizen, J. P. T. M., & Kemp, B. (2000). Effect of superovulation induction on embryonic development on day 5 and subsequent development and survival after nonsurgical embryo transfer in pigs. *Theriogenology*, 53(5), 1063–1070. [https://doi.org/10.1016/S0093-691X\(00\)00252-1](https://doi.org/10.1016/S0093-691X(00)00252-1)
- Heinonen, M., Leppävuori, A., & Pyörälä, S. (1998). Evaluation of reproductive failure of female pigs based on slaughterhouse material and herd record survey. *Animal Reproduction Science*, 52(3), 235–244. [https://doi.org/10.1016/S0378-4320\(98\)00105-5](https://doi.org/10.1016/S0378-4320(98)00105-5)
- Holtz, W., & Schlieper, B. (1991). Unsatisfactory results with the transfer of embryos from gilts superovulated with PMSG and hCG. *Theriogenology*, 35(6), 1237–1249. [https://doi.org/10.1016/0093-691X\(91\)90369-O](https://doi.org/10.1016/0093-691X(91)90369-O)
- Longenecker, D. E., & Day, B. N. (1968). Fertility level of sows superovulated at post-weaning estrus. *Journal of Animal Science*, 27(3), 709–711. <https://doi.org/10.2527/jas1968.273709x>
- Martinat-Botté, F., Venturi, E., Guillouet, P., Driancourt, M. A., & Terqui, M. (2010). Induction and synchronization of ovulations of nulliparous and multiparous sows with an injection of gonadotropin-releasing hormone agonist (Receptal). *Theriogenology*, 73(3), 332–342. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2009.09.017>
- Martinez, E.A., Martinez, C. A., Cambra, J. M., Maside, C., Lucas, X., Vazquez, J. L., Vazquez, J. M., Roca, J., Rodriguez-Martinez, H., Gil, M. A., Parrilla, I., & Cuello, C. (2019). Achievements and future perspectives of embryo transfer technology in pigs. *Reproduction in Domestic Animals*, 54, 4–13. <https://doi.org/10.1111/rda.13465>
- Martinez, Emilio A., Angel, M. A., Cuello, C., Sanchez-Osorio, J., Gomis, J., Parrilla, I., Vila, J., Colina, I., Diaz, M., Reixach, J., Vazquez, J. L., Vazquez, J. M., Roca, J., & Gil, M. A. (2014). Successful Non-Surgical Deep Uterine Transfer of Porcine Morulae after 24 Hour Culture in a Chemically Defined Medium. *PLoS ONE*, 9(8), e104696. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0104696>
- Martinez, Emilio A., Caamaño, J. N., Gil, M. A., Rieke, A., McCauley, T. C., Cantley, T. C., Vazquez, J. M., Roca, J., Vazquez, J. L., Didion, B. A., Murphy, C. N., Prather, R. S., & Day, B. N. (2004). Successful nonsurgical deep uterine embryo transfer in pigs. *Theriogenology*, 61(1), 137–146. [https://doi.org/10.1016/S0093-691X\(03\)00190-0](https://doi.org/10.1016/S0093-691X(03)00190-0)
- Martinez, Emilio A, Caamaño, J. N., Gil, M. A., Rieke, A., McCauley, T. C., Cantley, T. C., Vazquez, J. M., Roca, J., Vazquez, J. L., Didion, B. A., Murphy, C. N., Prather, R. S., & Day, B. N. (2004). Successful nonsurgical deep uterine embryo transfer in pigs. *Theriogenology*, 61(1), 137–146. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14643868>



- Niemann, H., Wüst, A., & Gardon, J. C. (1989). Successful intercontinental transport of porcine embryos from Europe to South America. *Theriogenology*, 31(3), 525–530. [https://doi.org/10.1016/0093-691X\(89\)90237-9](https://doi.org/10.1016/0093-691X(89)90237-9)
- PL Ryan, J. R. (1991). Cystic ovarian degeneration in pigs: a review. *Ir Vet J*, 44, 22–36.
- Polge, C. (1982). Embryo transplantation and preservation. *Control of pig reproduction* (D. Cole & G. Foxcroft (eds.)).
- Rátky, J., Brüssow, K. P., Solti, L., Torner, H., & Sarlós, P. (2001). Ovarian response, embryo recovery and results of embryo transfer in a Hungarian native pig breed. *Theriogenology*, 56(5), 969–978. [https://doi.org/10.1016/S0093-691X\(01\)00623-9](https://doi.org/10.1016/S0093-691X(01)00623-9)
- Wallenhorst, S., & Holtz, W. (2002). Embryo collection in prepubertal gilts and attempts to develop an improved embryo transfer technique. *Veterinary Record*, 150(24), 749–751. <https://doi.org/10.1136/vr.150.24.749>
- Wright, J. (1998). Photographic illustrations of embryo developmental stage and quality codes. In D. Strinfellow & S. Siedel (Eds.), *Manual of the International Embryo Transfer Society* (pp. 167–170).
- Ziecik, A. J., Biallowicz, M., Kaczmarek, M., Demianowicz, W., Rioperez, J., Wasielak, M., & Bogacki, M. (2005). Influence of estrus synchronization of prepubertal gilts on embryo quality. *Journal of Reproduction and Development*, 51(3), 379–384. <https://doi.org/10.1262/jrd.17008>