UNIVERSIDAD DE LEÓN

Facultad de Veterinaria

Departamento de Medicina, Cirugía y Anatomía Veterinaria

TESIS DOCTORAL

Utilización del control ovulatorio posdestete y la adición de plasma seminal en la optimación de la inseminación artificial porcina, con semen fresco y criopreservado

JOSÉ CARLOS GARCÍA GARCÍA

León, Marzo de 2014

AUTORIZACIÓN DE LOS DIRECTORES DE TESIS PARA SU PRESENTACIÓN

Dr. D. Juan Carlos Domínguez Fernández de Tejerina, catedrático de Reproducción y Obstetricia de la Facultad de Veterinaria de la Universidad de León,

Dra. Dña. Beatriz Alegre Gutiérrez, Colaboradora Honorífica del Dpto. de Medicina, Cirugía y Anatomía Veterinaria de la Universidad de León, y Diplomada Europea de Reproducción Animal (ECAR), y,

Dr. D. Rodrigo Manjarín Arredondo, MS y PhD de Michigan State University (USA), e investigador en el USDA/ARS Children's Nutrition Research Center en Baylor College of Medicine (USA).

Como directores de la Tesis Doctoral realizada por José Carlos García García, licenciado en Veterinaria,

AUTORIZAN:

La defensa de la Tesis Doctoral titulada: ¨**Utilización del control ovulatorio posdestete y la adición de plasma seminal en la optimización de la inseminación artificial porcina, con semen fresco y criopreservado**¨, dentro del programa de doctorado Sanidad Animal y Reproducción.

Y para dar cumplimiento al Art. 8º. 1 del R.D. 778/98, se firma en León a 4 de Marzo de 2014,

Fdo.: Dr. D. J. Carlos Domínguez Fdez. Tejerina Fdo.: Dra. Dña. Beatriz Alegre Gutiérrez

Fdo.: Dr. D. Rodrigo Manjarín Arredondo

CONFORMIDAD DEL DEPARTAMENTO

El Departamento de Medicina, Cirugía y Anatomía Veterinaria, ha acordado dar su conformidad a la admisión a trámite de la lectura de la Tesis Doctoral titulada: **"Utilización del control ovulatorio posdestete y la adición de plasma seminal en la optimización de la inseminación artificial porcina, con semen fresco y criopreservado"**, dirigida por los Dres. **D. JUAN CARLOS DOMÍNGUEZ FERNÁNDEZ DE TEJERINA**, **Dña**. **BEATRIZ ALEGRE GUTIÉRREZ** y **D. RODRIGO MANJARÍN ARREDONDO** y elaborada por el tesando **D. JOSÉ CARLOS GARCÍA GARCÍA**.

Lo que se firma, para dar cumplimiento del Art. 8º. 2 del R.D. 778/98, en León a 04 de Marzo de 2014,

V^{O} B^{O}	V^{O} B^{O}
La directora del Departamento	El secretario del Departamento
Fdo.: Dra. Dña. Inmaculada Díez Prieto	Fdo.: Dr. D. Juan H. Rejas López

Esta memoria ha sido realizada en las instalaciones de la **Facultad de Veterinaria de la Universidad de León** la **Universidad Estatal de Michigan, USA**, **CENTROTEC, S.A** (Centro Tecnológico de Inseminación Artificial Porcina) y **UVESA** en León.

***A mi familia*.**

Agradecimientos

Este trabajo ha sido desarrollado gracias a la colaboración de multitud de personas e instituciones. Desde aquí mi más profundo agradecimiento y reconocimiento a todos aquellos que de manera desinteresada habéis colaborado en la realización de este proyecto:

- A mis directores de Tesis, por proporcionarme la posibilidad de realizar el doctorado bajo su dirección, poniendo a mi disposición cuantos recursos materiales necesitase e integrándome en un grupo de investigación con unos valores humanos incomparables.
- Dr. Roy Kirkwood, for their continued support, advice and education during my studies in the USA.
- A la Consejería de Educación de la Junta de Castilla y León por la concesión de la Beca de Formación de Personal Investigador, que me ha permitido realizar esta Tesis Doctoral.
- A Rodrigo Manjarín y David Martín, porque sin su inmensa ayuda no habría sido posible la finalización de este trabajo.
- A todos mis compañeros de Centrotec S.A., cuya infraestructura me posibilitó la realización de esta Tesis, Dra. Beatriz Alegre, Dr. Raúl González, Erica, Adrián, Álvaro y Raúl por estar dispuestos a echarme una mano en todo momento, colaborando activamente en la parte experimental.
- A los compañeros de la Unidad de Reproducción y Obstetricia, Dr. Sergio Bernal, Sonia Cárdenas, Dr. Fernando Tejerina, Francisco Abad, Miguel Abad, Cristian Córdova, Rocío y a todos ellos por su disposición y colaboración permanente.
- José M. Calavia, M.J. Castro y Evaristo Aguado, por su gran ayuda y disponibilidad para la realización de las pruebas *in vivo.*

Índice

Índice de figuras y tablas…… XVII

Glosario de abreviaturas..……..……..…….XIX

Resumen…….……..…….……..... 1

Introducción…….……...……. 5

Objetivos…….……...…… 15

Material y métodos……..…..……..……..19

Resultados y Discusión

Primera Publicación: **Effect of gonadotropin treatment on estrus, ovulation, and litter size in weaned and anoestrous sows**……....…….…….. 31

Publicado en Journal of Animal Science (2010) 88:2356-2360

Segunda Publicación: **Effect of sperm numbers and time of insemination relative to ovulation on sow fertility** …...……..……. 45

Publicado en Animal Reproduction Science (2007) 100:397-401

Tercera Publicación: **Thawing boar semen in the presence of seminal plasma: Effects on sperm quality and fertility**…….……..…..……...……. 59

Publicado en Animal Reproduction Science (2010) 119:160-165

Cuarta Publicación: **Effect of thawing frozen boar sperm in 50% seminal plasma on sow fertility**……...……. 75

Publicado en The pig Journal (2011) 65:59-61

Conclusiones…….……...……..……..… 85

Bibliografía…….……...……..…..…… 91

Índice de Figuras y Tablas

Primera publicación

Table 1. Effect of injection of 600 IU of eCG and 87.5 IU of FSH on d 2, followed by 600 IU of eCG or PG 600 on the estrus and ovulation responses of anestrous sows at 7 d after weaning.....37

Table 2. Influence of parity on the effect of PG 600 and PG 600 followed by supplemental hCG on estrus and farrowing rates, and subsequent litter size in weaned sows.....38

Segunda publicación

Table 1. Farrowing rates and total born litter sizes for sows receiving a single transcervical insemination of 2.5×10^9 or 1.25×10^9 sperm at 6 or 24 h before ovulation.....51

Tercera publicación

Fig. 1. Effects of incubation of thawed boar sperm for 4 h in media with 0%, 10% or 50% seminal plasma (SP) on mean±SE for (A) percent live sperm and (B) percent motility.....68

Table 1. Effect of thawing cryopreserved (FT) boar sperm in 50% seminal plasma (SP) on sow fertility (means±SE).....68

Cuarta publicación

Table 1. Effect of thawing cryo-preserved (FT) boar sperm in 50% seminal plasma (SP) on sow fertility.....80

Glosario de Abreviaturas (Excepto publicaciones)

BTS:	Solución “betsville” de descongelación
CASA:	Análisis computerizado de semen
eCG:	Gonadotropina coriónica equina
FSH:	Hormona folículo-estimulante
GnRH:	Hormona liberadora de gonadotropinas
hCG:	Gonadotropina coriónica humana
IA:	Inseminación artificial
IA-C:	Inseminación artificial cervical
IA-PC:	Inseminación artificial poscervical
IDC:	Intervalo destete-celo
UI:	Unidades internacionales
LH:	Hormona luteinizante
MPO:	Momento previsto de la ovulación
PS:	Plasma seminal
PVP:	Polivinilpirrolidona

Resumen

El presente trabajo de Tesis Doctoral se compone de 4 publicaciones cuyo objetivo general consiste en el desarrollo de nuevas técnicas de manejo reproductivo para la mejora de la fertilidad y prolificidad en cerdas destetadas.

En la primera publicación se estudia la eficacia de nuevos protocolos hormonales para aumentar la fertilidad de cerdas destetadas y en anestro. En el primer experimento se valora el efecto del pretratamiento con hormona folículo-estimulante (**FSH**) sobre la respuesta ovulatoria y fertilidad de cerdas en anestro tratadas con gonadotropina coriónica equina (**eCG**). No se encontraron diferencias significativas del tratamiento sobre el intervalo destete-celo (**IDC**), el celo, la ovulación, el porcentaje de partos y el tamaño de la camada. En el segundo experimento se estudia el efecto del momento de aplicación y de la dosis de gonadotropina coriónica humana (**hCG**) suplementaria sobre el porcentaje de celos y la fertilidad en cerdas destetadas con diferente número de parto tratadas con PG600® (Intervet, Shering-Plough Animal Health). Comparado con el grupo control, la administración de gonadotropinas mejora la respuesta estral en las cerdas de primer y segundo parto, mientras que el porcentaje de partos en cerdas de ≥ 3 partos, inyectadas con PG600® seguido de 200 UI de hCG a las 24 horas, disminuye en comparación con el grupo control y la inyección de PG600® en solitario.

La segunda publicación recoge el efecto de la interacción entre el número de espermatozoides depositados mediante inseminación poscervical (**IA-PC**) y el momento de la inseminación respecto a la ovulación, sobre la fertilidad de la cerda utilizando

semen refrigerado. Se observa una reducción del porcentaje de partos en las inseminaciones realizadas con $1,25\times10^9$ espermatozoides, 24 horas antes del momento previsto de la ovulación (**MPO**) respecto a las realizadas con $2,5\times10^9$ espermatozoides, 6 horas antes del MPO. No hubo efecto del número de espermatozoides inseminados ni del momento de la inseminación sobre el tamaño de la camada.

La tercera publicación examina el efecto de la suplementación del semen congelado-descongelado de verraco con distintas concentraciones de plasma seminal (**PS**), sobre la calidad espermática y la fertilidad en la cerda mediante inseminación artificial cervical (**IA-C**). En el primer experimento de esta publicación se observa que el aumento de la concentración de PS provoca un aumento significativo de la viabilidad y movilidad espermática. En el segundo experimento se constata que la inseminación de cerdas con semen criopreservado reduce el porcentaje de gestación y el tamaño de la camada, efecto no observado cuando el semen congelado-descongelado fue suplementado con un 50% de PS.

En la última publicación se estudia el efecto de la suplementación del semen criopreservado con PS sobre la fertilidad de la cerda mediante IA-PC. Se demuestra que la inseminación poscervical de cerdas con semen criopreservado, suplementado con un 50% de PS causa una reducción en el porcentaje de partos, en comparación con las cerdas inseminadas con semen refrigerado, pero no hubo diferencias significativas sobre el tamaño de la camada.

Introducción

En los últimos años, el sector porcino se ha convertido en un importante motor de la economía española. Es uno de los cinco primeros sectores industriales de nuestro país, con una cifra de negocio de más de 19.000 millones de euros, constituyendo el 22% del sector alimentario español. Representa más del 14% del PIB industrial y genera más de dos millones y medio de empleos, de los cuales cerca de 200.000 son puestos de trabajo directos (MAGRAMA, 2013). Gracias a él, se ha creado un amplio tejido industrial, formado por gran cantidad de pequeñas y medianas empresas repartidas por toda la geografía nacional. Siendo un sector estratégico y, dada su gran importancia, cualquier medida que suponga un incremento de la producción porcina tendría una gran repercusión económica.

El objetivo general de este trabajo consiste en el desarrollo de nuevas técnicas de manejo reproductivo para la mejora de la fertilidad y prolificidad de la cerda destetada. En la primera publicación de esta tesis se valora la eficacia de nuevos protocolos hormonales para favorecer la aparición del celo y aumentar el porcentaje de ovulación de cerdas destetadas y en anestro (aquellas que tras 7 días a partir del destete no han manifestado sintomatología de celo). En la segunda publicación se aborda el efecto del número de espermatozoides y el momento de inseminación respecto a la ovulación en la fertilidad de la cerda, utilizando semen refrigerado (conservado a 15ºC) e inseminación poscervical (**IA-PC**). En la tercera publicación se valora el efecto de la suplementación de distintas concentraciones (0%, 10% y 50%) de plasma seminal (**PS**) sobre la viabilidad y movilidad espermática del semen criopreservado de verraco, así como la

suplementación de semen criopreservado con un 50% de PS sobre la fertilidad de la cerda mediante inseminación cervical (**IA-C**), y finalmente, la cuarta publicación estudia el efecto de la IA-PC con semen criopreservado suplementado con un 50% de PS sobre la fertilidad de la cerda.

El objetivo del primer experimento de la primera publicación es, en primer lugar, determinar el efecto del pretratamiento con hormona folículo-estimulante (**FSH**) sobre la respuesta reproductiva de cerdas en anestro tratadas con gonadotropinas, y en segundo lugar, determinar el efecto de la dosis y momento de la administración de gonadotropina coriónica humana (**hCG**) suplementaria sobre la respuesta de cerdas destetadas tratadas con gonadotropinas.

La producción de una explotación porcina se mide por el número de hembras inseminadas semanalmente (Dial *et al*., 1996). La habilidad de alcanzar y/o mantener un adecuado número de inseminaciones semanal requiere un suministro continuo de cerdas en celo. Los métodos más utilizados para la inducción del celo en cerdas destetadas son la exposición al verraco y la administración de hormonas gonadotrópicas. Una adecuada exposición al verraco requiere el contacto directo con las hembras; cuando esto no es físicamente posible, o cuando la exposición diaria no revierte en la inducción del celo, se vuelve necesaria la utilización de un protocolo hormonal. La mayoría de preparaciones comerciales contienen una combinación de gonadotropina coriónica equina (**eCG**) y hCG, que presentan una acción folículo-estimulante y luteinizante, respectivamente, similar a la ejercida por la FSH y la hormona luteinizante (**LH**) endógenas de la hipófisis (Bates *et al*., 1991; Knox *et al*., 2001). Las preparaciones más comunes de estas dos

hormonas están compuestas por 400 UI de eCG y 200 UI de hCG, entre las que destacan PG600® (Intervet, Schering-Plough Animal Health), Ovucel® (Laboratorios Ovejero, S.A.), etc…, demostrando una alta eficacia en la inducción del celo en cerdas destetadas (Kirkwood *et al*., 1998). Sin embargo, cuando se realiza el tratamiento de cerdas en anestro, a menudo se obtiene una baja fertilidad, posiblemente debido a un inadecuado desarrollo folicular (Lucy *et al.*, 2001; Braceen *et al*., 2003). Numerosos experimentos en cerdas nulíparas han mostrado la imprescindible función de la FSH en el reclutamiento de los folículos primarios y secundarios, así como el papel de la hormona eCG y de la PG600® en el desarrollo de folículos terciarios y preovulatorios (Guthrie *et al*., 1990; Knox y Zimmerman, 1993, Bolamba *et al*., 1996; Guthrie, 2005), sugiriendo que la falta de respuesta en estas cerdas podría ser debida a la incapacidad de la PG600® para iniciar el crecimiento de los folículos de menor tamaño. Dado que las cerdas destetadas en anestro estacional representan un estado fisiológico similar a las cerdas nulíparas prepúberes, en cuanto a la escasa actividad del eje hipotálamo-hipófisis-ovario, que induce un inadecuado desarrollo folicular debido la falta de gonadotropinas endógenas (Lucy *et al.*, 2001; Braceen *et al*., 2003). Por lo tanto, el primer objetivo de este experimento consiste en valorar el efecto del pretratamiento con FSH seguido de eCG en la respuesta estral y ovulatoria en cerdas destetadas con anestro estacional.

La inducción hormonal del celo en cerdas destetadas puede disminuir el porcentaje de partos y el tamaño de la camada (Estienne y Hartsock, 1998; Kirkwood, 1999). Recientemente, Manjarín *et al*. (2010) demuestran que, comparado con la administración de PG600® sola, la suplementación con hCG a las 24 horas aumenta la

concentración de progesterona en sangre en cerdas nulíparas. Se supone que este aumento puede ser consecuencia de un mayor número de cuerpos lúteos, o un aumento individual de la producción de progesterona por cuerpo lúteo. Un mayor número de ovocitos liberados, o de la supervivencia de los embriones inducida por niveles más elevados de progesterona, conducirá a mayores tamaños de camada. Por lo tanto, el segundo objetivo que nos planteamos, pretende valorar el efecto de la suplementación de la inyección de PG600® con hCG en la fertilidad de las cerdas destetadas.

El objetivo de la segunda publicación de esta tesis, consiste en valorar el efecto de la interacción entre el número de espermatozoides depositados mediante IA-PC y el momento de la inseminación respecto a la ovulación, sobre la fertilidad de la cerda.

La eficiencia de la inseminación artificial (**IA**) porcina depende tanto de la predicción del momento de ovulación como del protocolo de inseminación. Los protocolos actuales de IA están basados en la deposición de los espermatozoides en las 24 horas anteriores a la ovulación. Debido a la gran variabilidad que existe entre animales en el intervalo destete-celo (**IDC**) y a su vez con el momento de la ovulación (Kemp y Soede, 1996), es recomendable inducir la ovulación mediante el uso de gonadotropinas exógenas, así como realizar varias inseminaciones en días consecutivos, para conseguir una adecuada concentración de espermatozoides en el oviducto en el momento de la ovulación. La mejora en los protocolos actuales de inducción de la ovulación (Gama *et al*., 2005; Cassar *et al*., 2005; Abad, 2006), asociado a la introducción de nuevas técnicas de inseminación intrauterina (Martínez *et al*., 2005),

han contribuido a mejorar el rendimiento reproductivo de la cerda. Comparado con la IA-C, la IA-PC permite una deposición más profunda de los espermatozoides en el tracto reproductivo de la cerda, mediante la utilización de catéteres especiales (Martínez *et al*., 2005). Estudios realizados por Rozeeboom *et al*. (2004), y Watson y Behan (2002) sugieren que esta técnica de inseminación permite la reducción del número de espermatozoides, aunque la fertilidad de los animales estuvo influida por el momento de inseminación en relación a la ovulación. En este sentido, cuando la IA-PC se realizó muy cerca del momento de la ovulación inducida, De Rensis *et al*. (2003) y Cassar *et al*. (2004) mostraron un aumento en la fertilidad de los animales, independiente del número de inseminaciones. Sin embargo, en estos dos estudios no se disminuyó la concentración espermática comparada con la IA-C. Por tanto, el efecto de la interacción entre el número de espermatozoides y el momento de la deposición espermática en la IA-PC en cerdas destetadas no ha sido estudiado, representando su optimización una oportunidad para la mejora de la eficiencia de la reproducción porcina.

En la tercera publicación, el objetivo consiste en determinar el efecto de la suplementación de semen criopreservado con PS sobre la calidad espermática y la fertilidad de la cerda. La IA porcina implica casi exclusivamente el uso de semen refrigerado recogido entre 1 y 7 días previo a su uso, aunque numerosos estudios indican que la fertilidad óptima requiere la inseminación dentro de las 48 horas siguientes a la recolección seminal, tanto si se utilizan diluyentes de corta como de larga conservación (Johnson *et al.*, 1982; Waberski *et al.*, 1994a; Bennemann *et al.*, 2005). La

congelación seminal permitiría eliminar las restricciones del tiempo y espacio para el uso de las dosis seminales. Sin embargo, la inseminación con semen criopreservado tiene un rendimiento reproductivo inferior al obtenido con semen refrigerado, tanto en el porcentaje de partos como en el tamaño de la camada (Johnson *et al.*, 2000; Roca *et al.*, 2003). De hecho, solo se observan porcentajes aceptables de fertilidad cuando la inseminación se realiza en el intervalo de 4 horas antes de la ovulación (Waberski *et al.*, 1994b; Roca *et al.*, 2003). Se cree que el daño sufrido por el proceso de criopreservación podría inducir un efecto en los espermatozoides similar a la capacitación o al envejecimiento prematuro (Bravo *et al*., 2005; Ortega-Ferrusola *et al.*, 2008), asociado a un incremento de la fragmentación del ADN (Fraser y Strzezek, 2007). Los espermatozoides capacitados no forman un reservorio espermático funcional (Fazeli *et al.*, 1999; Tienthai *et al.*, 2004). Por tanto, el control de la capacitación y el envejecimiento prematuro del esperma representa un punto de interés para la mejora de la fertilidad asociada al uso de semen porcino criopreservado. Mediante la tinción con clortetraciclina, se ha demostrado que la incubación en un medio suplementado con un 10% de PS, tanto con semen refrigerado como con congelado-descongelado, puede prevenir, y posiblemente revertir, la crio-capacitación (Suzuki *et al.*, 2002; Vadnais *et al.*, 2005a,b). Sin embargo, cuando el semen de verraco se suplementa con 0% o 10 % de PS, y se insemina entre 2 y 12 horas antes del momento previsto de la ovulación (**MPO**), no se observan diferencias en la fertilidad de la cerda (Abad *et al*., 2007b). Sorprendentemente, el semen de morueco suplementado con 30% de PS mejora la fertilidad de la oveja (Maxwell *et al*., 1999), mientras que la suplementación con 100% de PS porcino aumenta la longevidad de los espermatozoides *in vivo* (Einarsson y Viring,

1973), así como la fertilidad en cerdas primíparas y multíparas (Crabo y Einarsson, 1971; Einarsson *et al*., 1973). Basándonos en estos experimentos, formulamos la hipótesis de que el aumento de la concentración de PS usado en la reconstitución de semen congelado-descongelado mejoraría la fertilidad de la cerda utilizando IA-C. Para evaluar esta hipótesis, se utilizaron 3 concentraciones de PS (0, 10 y 50%), en el caso de las valoraciones *in vitro* de la viabilidad y movilidad espermática, mientras que para la valoración de la fertilidad de la cerda *in vivo* se utilizó únicamente la concentración del 50% de PS, habida cuenta de que la concentración de PS (50%) mejora significativamente la vitalidad y movilidad espermática.

La respuesta a la suplementación de semen de verraco con PS ha demostrado ser impredecible. Por ejemplo, Abad *et al*. (2007b) no observan un aumento de la fertilidad cuando el semen es suplementado con un 10% de PS, mientras que Okazaki *et al*. (2009) demuestran una mejora de la misma. Este efecto beneficioso del PS sobre la fertilidad, es posible que no solo dependa del porcentaje de suplementación o de la viabilidad y movilidad de los espermatozoides, sino también del lugar de deposición de los espermatozoides en la hembra. Recientemente se ha observado que la IA-PC mejora los resultados de fertilidad del semen descongelado comparado con la IA-C (Casas *et al*., 2010; Roca *et al*., 2011).

Basándonos en estos estudios, y en la mejora de la fertilidad cuando el semen congelado-descongelado fue suplementado con un 50% de PS, constatada en la tercera publicación de esta tesis (Garcia *et al*., 2010), se lleva a cabo un último experimento en

el que se formula la hipótesis de que la fertilidad de la cerda mejorará si el semen congelado-descongelado de verraco suplementado con un 50% de PS es depositado mediante IA-PC.

Objetivos

Objetivo general

Desarrollo de nuevas técnicas de manejo reproductivo para la mejora de la fertilidad de la cerda destetada. Por una parte, actuando sobre el control de la inducción del celo y la ovulación en cerdas destetadas, y por otra, sobre la mejora de la viabilidad y fertilidad del semen criopreservado de verraco.

Objetivos específicos

1. **Primera publicación**

   Valorar la eficacia de nuevos protocolos hormonales para la inducción del celo en cerdas en anestro y destetadas:

   a. Primer experimento

      Efecto del pretratamiento con FSH sobre la respuesta ovulatoria y fertilidad de cerdas en anestro tratadas con eCG.

   b. Segundo experimento

      Efecto de la dosis y momento de la administración de hCG suplementaria sobre el porcentaje de celos y la fertilidad de cerdas destetadas tratadas con PG600®.

2. **Segunda publicación**

   Evaluar el efecto de la interacción entre el número de espermatozoides depositados mediante IA-PC, y el momento de la inseminación respecto a la ovulación sobre la fertilidad de la cerda.

3. Tercera publicación

Determinar el efecto de la suplementación del semen congelado-descongelado de verraco con PS sobre la calidad espermática y la fertilidad de la cerda.

a. Primer experimento

   Efecto de la suplementación de semen criopreservado de verraco con distintas concentraciones del PS sobre la viabilidad y movilidad espermática.

b. Segundo experimento

   Efecto de la suplementación de semen criopreservado de verraco con un 50% de PS sobre la fertilidad de la cerda mediante la utilización de la IA-C.

4. Cuarta publicación

Estudiar el efecto de la suplementación de semen criopreservado de verraco con un 50% de PS en la fertilidad de la cerda mediante la utilización de la IA-PC.

Material y Métodos

Primera publicación.

Effect of gonadotropin treatment on estrus, ovulation, and litter size in weaned and anoestrous sows.

El primer experimento se llevó a cabo en una granja de 1.000 cerdas (Large White × Landrace) en León, España. Las cerdas fueron alojadas en jaulas individuales de gestación. A los 7 días después del destete, 87 cerdas que no habían manifestado sintomatología de celo (anestro), fueron distribuidas por número de parto y asignadas aleatoriamente a uno de cuatro posibles tratamientos hormonales: 1) PG600® (Intervet/Schering Plough Animal Health) el día 9 después del destete (n=23), 2) 600 UI de eCG (Folligon®, Intervet/Schering Plough Animal Health) el día 9 después del destete (n=20), 3) 87,5 UI de FSH (Folltropin®, Bioniche Animal Health, Belleville, Ontario, Canadá) mezclados con polivinilpirrolidona (**PVP**) C-30 (5 ml, Plasdone C-30®, ISP Technologies Inc., Wayne, NJ) los días 7 y 8 posteriores al destete seguidos de 600 UI de eCG el día 9 después del destete (n=24) y 4) grupo no inyectado o control (n=20). La dosis de eCG fue elegida en base a la eficacia conocida en cerdas destetadas (Cassar *et al*., 2005). El objetivo de la administración de FSH en una solución PVP fue prolongar el período de actividad biológica de la hormona (Jackson *et al*., 2006).

La respuesta estral fue caracterizada mediante la expresión del reflejo de inmovilidad inducido por la exposición directa a un verraco adulto durante 5 min diarios los 7 días posteriores a la inyección de hormonas. La respuesta ovulatoria fue valorada mediante el análisis de la concentración de progesterona en muestras de sangre obtenidas mediante venopunción yugular los días 9 y 19 posteriores al destete. Una

elevación en la concentración de progesterona desde ≤1 ng/ml en el día 9 hasta un mínimo de 5 ng/ml en el día 19 fue considerado como una respuesta ovulatoria normal (Althouse y Hixon, 1999). Aquellas cerdas que manifestaron sintomatología de celo fueron inseminadas, permitiendo llevar a término la gestación, registrando los datos de porcentaje de partos y tamaño de la camada.

El segundo experimento se realizó en las mismas instalaciones que el experimento anterior. Al destete, un total de 247 cerdas fueron seleccionadas según su número de parto (1-2, y ≥ 3) y distribuidas en 5 tratamientos: 1) PG600® (n=15 y 41, respectivamente), 2) PG600® y 100 UI de hCG (Chorulon®, Intervet/Schering Plough Animal Health) administrados conjuntamente (n=14 y 34), 3) PG600® seguido de 100 UI de hCG a las 24 horas (n=18 y 32), 4) PG600® seguido de 200 UI de hCG a las 24 horas (n=14 y 31) y 5) Grupo no inyectado o control (n=14 y 34). La dosis de hCG fue elegida en base a su eficacia en cerdas nulíparas (Manjarin *et al*., 2010). La respuesta estral fue diagnosticada como en el experimento anterior. Todas las cerdas con sintomatología de celo fueron inseminadas, y los datos de porcentaje de partos y tamaño de la camada anotados.

Segunda publicación.

Effect of sperm numbers and time of insemination relative to ovulation on sow fertility.

El presente experimento se llevó a cabo en una granja de 2.700 cerdas (Yorkshire × Landrace) en Michigan, USA. Un total de 231 cerdas recibieron una

inyección de 600 UI de eCG (Pregnecol®, Bioniche Animal Health, Bellville, Ont., Canadá) 12 horas antes del destete, seguido de 5 mg de LH porcina (Lutropin®, Bioniche Animal Health) 80 horas después. Todos los animales fueron distribuidos aleatoriamente según el número de parto en 5 grupos, 1) única IA-PC 24 horas antes del MPO, y $1,25\times10^9$ espermatozoides (n=43), 2) única IA-PC 6 horas antes del MPO, y $1,25\times10^9$ espermatozoides (n=45), 3) única IA-PC 24 horas antes del MPO, y $2,5\times10^9$ espermatozoides (n=49), 4) única IA-PC 6 horas antes del MPO, y $2,5\times10^9$ espermatozoides (n=45) y 5) Dos IA-C 24 y 6 horas antes del MPO, con $2,5\times10^9$ espermatozoides (n=49; Control). El MPO fue 38 horas después de la inyección de LH porcina (Cassar *et al*., 2005; Abad, 2006).

Las cerdas fueron alojadas en jaulas individuales de gestación. Para la IA-PC se utilizó el cateter Deepgoldenpig™ (IMV International, Maple Grove, MN, USA). Las dosis seminales se obtuvieron de un centro de inseminación artificial comercial (International Boar Semen, Iowa, USA) y estaban compuestas por un pool de espermatozoides de los mismos verracos, con dos concentraciones diferentes ($1,25\times10^9$ y $2,5\times10^9$).

La detección de celos se realizó en presencia de un verraco adulto, y sólo las cerdas que manifestaban comportamiento de celo en el momento de la IA se incluyeron en el estudio. Las cerdas se mantuvieron hasta el final de la gestación, registrando los datos del porcentaje de partos y el tamaño de la camada.

Tercera publicación.

Thawing boar semen in the presence of seminal plasma: Effects on sperm quality and fertility.

El primer experimento se llevó a cabo en las instalaciones de CENTROTEC (Centro Tecnológico de Inseminación Artificial) en León, España. Se seleccionaron un total de 5 verracos en base a su fertilidad y calidad espermática como donantes de semen. Todos los verracos se alojaron en corrales individuales con temperatura ambiental controlada y fotoperiodo constante. Se realizó una extracción seminal a cada verraco semanalmente, donde se recogió la fracción rica de cada eyaculado mediante la técnica de la mano enguantada. Durante el procesamiento de todos los eyaculados se determinó indirectamente el volumen mediante el peso y la concentración espermática por medio de un fotómetro SDM-5 (Minitüb GMBH, Tiefenbach, Alemania). La movilidad, la morfología y la integridad acrosómica se valoraron mediante un microscopio de contraste de fase Eclipse E-400 (Nikon, Tochigi, Japan). Únicamente se utilizaron eyaculados con ≥ 80% de espermatozoides móviles, ≥ 75% de espermatozoides morfológicamente normales y ≥ 95% de acrosomas normales.

El semen se procesó para su criopreservación de acuerdo a la técnica descrita por Eriksson y Rodríguez-Martínez (2000), modificada por Peláez *et al*. (2006). Los espermatozoides con una concentración final de 1×10^9 espermatozoides/ml se envasaron en pajuelas de 0,25 ml (Minitüb, Alemania) a 5ºC, que posteriormente se transfirieron a un biocongelador programable (Ice Cube 1810, Sy-Lab, Purkersdorf, Australia), donde se utilizó una curva de congelación que aplicaba un descenso de

3ºC/min desde los 5ºC hasta -6ºC, mantenimiento a -6ºC durante 1 min y a partir de entonces, descenso de 20ºC/min de -6ºC a -100ºC. Una vez alcanzados los -100ºC, las pajuelas se sumergieron en nitrógeno líquido (-196ºC) para su almacenamiento hasta su utilización. Las pajuelas fueron descongeladas en un baño termostático a 50ºC durante 12 segundos (Eriksson y Rodríguez-Martínez, 2000).

El PS se obtuvo mediante centrifugación (800×g durante 10 min a 25ºC) de eyaculados procedentes de los mismos 5 verracos utilizados para la congelación seminal y se almacenó a -80ºC hasta su utilización. La descongelación del PS se realizó en un baño termostático a 37ºC, momento en el que se realizó una nueva centrifugación para confirmar la ausencia de espermatozoides mediante microscopía de contraste de fase.

Para la incubación y valoración espermática de cada uno de los eyaculados y del pool procedente de los mismos cinco verracos, se descongelaron y se incubaron dos pajuelas de semen de cada eyaculado en 40 ml de diluyente BTS (Beltsville Thawing Solution, Minitüb, Alemania), que contenía 0%, 10% o 50% (v/v) de PS de cada verraco o un pool de PS, respectivamente. Para la valoración de la integridad de la membrana plasmática y la movilidad espermática, se realizaron 3 réplicas en cada uno de los puntos de valoración durante las 4 horas posteriores a la descongelación, a los 10 min después de la descongelación (0 horas) y a los 60, 120, 180 y 240 min posteriores. La integridad de la membrana plasmática de los espermatozoides se evaluó utilizando el método originalmente descrito por Harrison y Vickers (1990) mediante un microscopio óptico de epifluorescencia Nikon eclipse E-600 (Nikon, Tochigi, Japón). La determinación del porcentaje de movilidad de los espermatozoides se realizó con una cámara de

recuento Makler de 10 µm de profundidad (Sefi Medical Instruments, Haifa, Israel) sobre la placa termocalefactada de un microscopio Nikon Eclipse E-400 con contraste de fase. La señal de vídeo fue adquirida por una cámara digital Basler A312F (Basler AG, Alemania) y asociada a un software CASA (ISAS® Proiser R+D, Paterna, España). El número de partículas incorrectamente identificadas como espermatozoides se minimizó revisando las diferentes secuencias del video gracias a la posibilidad de almacenaje de las imágenes.

El segundo experimento se llevó a cabo en una granja de 1.000 cerdas (Yorkshire × Landrace) en León, España. Al destete, 82 cerdas recibieron una inyección de 900 UI de eCG (Folligon®, Intervet/Schering), seguida a las 80 horas por 750 UI de hCG (Chorulon®, Intervet/Schering). Todos los animales fueron asignados según su número de parto para recibir dos IA-C a las 36 y 42 horas después de la inyección de hCG, y distribuidas aleatoriamente en 3 grupos diferentes, dependiendo del tipo de inseminación realizada: 1) IA-C con semen refrigerado, 3×10^9 espermatozoides (n=30), 2) IA-C con semen criopreservado, 5×10^9 espermatozoides (20 pajuelas × 0,25 ml), en 80 ml de diluyente BTS suplementado con un 50% (v/v) de PS (n=26) y 3) IA-C con semen criopreservado, 5×10^9 espermatozoides (20 pajuelas × 0,25 ml), en 80 ml de diluyente BTS (n=26). El momento previsto de la ovulación fue 42 horas después de la inyección de hCG (Soede y Kemp, 1993; Hazeleger *et al.*, 2000). Las cerdas fueron alojadas en jaulas individuales de gestación, y se les proporcionó contacto directo con un verraco adulto durante la IA-C.

El semen y el PS procedían de un pool de los mismos verracos utilizados en el experimento anterior. La viabilidad del esperma en el momento de la descongelación fue de un 60%. Las pajuelas de semen criopreservado (0,25 ml) se descongelaron, mediante su inmersión en baño termostático a 50ºC, durante 12 segundos (Eriksson y Rodriguez-Martinez, 2000). Se valoró el estado de gestación utilizando la ecografía a tiempo real a los 28 días después de la IA, dejando llevar a término la gestación para determinar el porcentaje de partos y el tamaño de la camada.

Cuarta publicación.

Effect of thawing frozen boar sperm in 50% seminal plasma on sow fertility.

El presente experimento se llevó a cabo en una granja de 2.700 cerdas Yorkshire en Michigan, USA. Al destete, un total de 98 cerdas recibieron una inyección de 900 UI de eCG (Pregnecol®, Bioniche Animal Health, Bellville, Ont., Canadá) seguido de 5 mg de LH porcina a las 80 horas (Lutropin®, Bioniche Animal Health). El momento previsto de la ovulación fue de 38 horas después de la inyección de LH (Abad *et al*., 2007b), Todas las cerdas fueron seleccionadas según su número de parto para recibir una única IA-PC mediante un cateter Deepgoldenpig™ (IMV International, Maple Grove, MN, USA) a las 36 horas después de la inyección de LH, y distribuidas en 3 grupos dependiendo de la IA-PC realizada: 1) IA-PC con semen refrigerado, 3×10^9 espermatozoides en 80 ml de diluyente X-cell (IMV International; n=34), 2) IA-PC con semen criopreservado, 5×10^9 espermatozoides en 80 ml de diluyente X-cell (n=32) y 3) IA-PC con semen

criopreservado, 5×10^9 espermatozoides en 80 ml de diluyente X-cell suplementado con un 50% (v/v) de PS (n=32).

El PS se obtuvo mediante centrifugación (800×g durante 10 min a 25ºC) de un pool de semen obtenido de 10 verracos Yorkshire entre 12 y 16 meses de edad, seleccionados por su fertilidad y procedentes del centro de inseminación de la propia granja. El PS se almacenó a -20ºC hasta su utilización. Los eyaculados utilizados como fuente de PS tenían más de un 80% de movilidad espermática. La descongelación de PS se realizó en un baño termostático a 37ºC, y se añadió al diluyente antes de la descongelación del esperma para permitir el contacto inmediato entre los espermatozoides descongelados y el PS.

El semen, tanto refrigerado como criopreservado, se adquirió en un centro de inseminación artificial comercial (International Boar Semen, Iowa, USA), y estaba compuesto por un pool de espermatozoides de dos verracos. La movilidad del esperma en el momento de la congelación fue de un 85-90% y de un 65-70% a la descongelación. Las dosis seminales criopreservadas (5 ml) se descongelaron mediante la exposición a temperatura ambiente durante 7 segundos, seguido de una inmersión en baño termostático a 42ºC durante 43 segundos. Las cerdas se mantuvieron hasta el final de la gestación y tanto el porcentaje de partos como el tamaño de la camada fue registrado.

Resultados y Discusión

Primera publicación.

Effect of gonadotropin treatment on estrus, ovulation, and litter size in weaned and anoestrous sows. ***Journal of Animal Science (2010) 88:2356-2360.***

Resultados

En el primer experimento, 87 cerdas que no habían manifestado sintomatología de celo durante los 7 días posteriores al destete (anestro), fueron distribuidas según su número de parto y asignadas aleatoriamente a uno de los cuatro posibles tratamientos hormonales: 1) PG600® el día 9 después del destete, 2) 600 UI de eCG el día 9 después del destete, 3) 87,5 UI de FSH (mezclados con PVP) en los días 7 y 8 posteriores al destete, seguidos de 600 UI de eCG el día 9 después del destete y 4) grupo no inyectado o control. La respuesta estral fue caracterizada mediante la expresión del reflejo de inmovilidad inducido por la exposición directa a un verraco adulto (5 min) durante 7 días posteriores a la inyección de hormonas. La respuesta ovulatoria fue valorada mediante el análisis de la concentración de progesterona en muestras de sangre obtenidas mediante venopunción yugular los días 9 y 19 respecto al destete. Una elevación en la concentración de progesterona de ≤ 1 ng/ml en el día 9 hasta un mínimo de 5 ng/ml en el día 19 fue considerada como una respuesta ovulatoria normal. Aquellas cerdas que manifestaron sintomatología de celo fueron inseminadas, permitiendo llevar a término la gestación.

Todas las cerdas utilizadas en este estudio tenían concentraciones de progesterona ≤1 ng/ml en el día 9 después del destete, mientras que aquellas cerdas que habíamos considerado que habían ovulado, tenían concentraciones de progesterona >20 ng/ml en el día 19. No se encontraron diferencias significativas asociadas al

tratamiento en el IDC, el porcentaje de celo, ovulación, y partos, ni en el tamaño de la camada.

En el segundo experimento, 247 cerdas destetadas fueron seleccionadas según su número de parto (1-2, y ≥3) y distribuidas aleatoriamente en 5 tratamientos: 1) PG600®, 2) PG600® y 100 UI de hCG conjuntamente, 3) PG600® y 100 UI de hCG a las 24 horas, 4) PG600® y 200 UI de hCG a las 24 horas y 5) Grupo no inyectado o control. La respuesta estral fue caracterizada como en el experimento anterior, e igualmente, todas las cerdas que manifestaron sintomatología de celo fueron inseminadas, permitiendo llevar a término la gestación.

El porcentaje de cerdas de primer y segundo parto que presentaron sintomatología de celo en los 7 días posdestete, estuvo influenciado por el tratamiento. Todos los grupos tratados con gonadotropinas mejoraron ($P \leq 0.05$) la respuesta al celo comparado con el grupo control. No hubo efecto del tratamiento sobre el IDC, el porcentaje de partos, o el tamaño de la camada.

En las cerdas de ≥ 3 partos no tuvo efecto sobre el IDC, el porcentaje de celos, o el tamaño de la camada. Sin embargo, el porcentaje de partos del grupo inyectado con PG600® seguido de 200 UI de hCG a las 24 horas disminuyó ($P \leq 0.05$), en comparación con el grupo control y la inyección de PG600® en solitario.

Effect of gonadotropin treatment on estrus, ovulation, and litter size in weaned and anestrous sows[1]

R. Manjarin,*[2] J. C. Garcia,†[2] J. C. Dominguez,†‡ M. J. Castro,† B. Alegre,‡ J. D. Munoz,§ and R. N. Kirkwood#[3]

*Department of Animal Science, Michigan State University, East Lansing 48824;
†Department of Medicine, Surgery, and Veterinary Anatomy, University of Leon, 24071, Leon, Spain;
‡Centrotec, Campo de Villavidel, 24225, Leon, Spain; and §Department of Crop and Soil Science, and #Department of Large Animal Clinical Sciences, Michigan State University, East Lansing 48824

ABSTRACT: In the first of 2 experiments, we evaluated the effects on anestrous sows of pretreatment with FSH to stimulate the growth of small follicles, followed by eCG to stimulate the growth of medium follicles, estrus, and ovulation. In Exp. 2, we examined the effect of sows receiving 400 IU of eCG plus 200 IU of hCG (PG 600, Intervet/Schering Plough Animal Health, Boxmeer, the Netherlands) at weaning and then different doses and timing of supplemental hCG. In Exp. 1, a total of 87 multiparous Hypor sows deemed anestrus 7 d after weaning were assigned to intramuscular (i.m.) injection of 1) PG 600, 2) eCG (600 IU), 3) pretreatment with 87.5 IU of FSH on d 7 and 8 plus eCG on d 9, or were 4) noninjected controls. Sows had daily boar contact for 15 d after weaning for estrus detection. Blood samples were obtained on d 9 and 19 and assayed for progesterone to determine ovulation status. The weaning-to-estrus interval, number of sows in estrus and ovulating, farrowing rate, and litter size were not different ($P > 0.1$) in treated groups compared with controls. In Exp. 2, a total of 247 Hypor sows were assigned at weaning by parity (1 and 2 or ≥3) to receive 1) an i.m. injection of PG 600, 2) PG 600 supplemented with 100 IU of hCG injected either concurrently or after 24 h, 3) 200 IU of hCG after 24 h, or 4) no injection (controls). Sows were exposed to boars daily for 7 d. After treatment of parity 1 and 2 sows, all gonadotropin-treated groups had an increased ($P < 0.05$) number of sows in estrus compared with the control group; weaning-to-estrus interval, farrowing rates, and litter size were unaffected ($P > 0.1$). After treatment of parity ≥3 sows, there was no treatment effect on the estrous response and weaning-to-estrus interval; compared with control and PG 600-treated sows, farrowing rate was decreased ($P < 0.05$) for sows receiving 200 IU of hCG after 24 h. There was no effect ($P > 0.1$) of treatment on litter size. We conclude that gonadotropins can be used to increase estrus response in weaned sows, but that hCG treatment subsequent to PG 600 may be detrimental to sow fertility in parity ≥3 sows.

Key words: anestrus, farrowing, human chorionic gondaotropin, PG 600, sow

©2010 American Society of Animal Science. All rights reserved.

J. Anim. Sci. 2010. 88:2356–2360
doi:10.2527/jas.2009-2792

INTRODUCTION

In weaned sows, estrus can be induced by injecting 600 to 1,000 IU of eCG (Brussow et al., 2009) or a combination of 400 IU of eCG and 200 IU of hCG (PG 600, Intervet/Schering Plough Animal Health, Boxmeer, the Netherlands) on the day of weaning (Kirkwood et al., 1998). Estrus responses to treatment can be variable, and breeding to a hormone-induced estrus can result in decreased farrowing rates, smaller litters, or both (Estienne and Hartsock, 1998; Kirkwood, 1999). We have demonstrated in prepubertal gilts that hCG treatment subsequent to PG 600 increased early luteal blood progesterone concentrations (Manjarin et al., 2010), which may be a consequence of an increased number of corpora lutea or an increased progesterone output by individual corpora lutea. If numbers of ova released or embryo survival are increased because of enhanced luteal function, larger litter sizes may ensue. Therefore, we

[1]We gratefully acknowledge Intervet/Schering Plough Animal Health (Boxmeer, the Netherlands) for providing the PG 600 and Chorulon. We thank Union Veterinarios Españoles Sociedad Anonima (Malaga, Spain) for allowing access to the gilts, Evaristo Aguado (Villaquejida, Spain) for his expert assistance throughout the study, and Laboratorio de Tecnicas Instrumentals, University of Leon (Leon, Spain) for providing the laboratory facilities.

[2]Both authors contributed equally to this work.

[3]Corresponding author: kirkwood@cvm.msu.edu

Received December 28, 2009.
Accepted March 30, 2010.

hypothesized that the fertility of sows receiving PG 600 at weaning would be improved by injection of supplemental LH-like activity.

A more economical approach to reduce weaning-to-estrus intervals is by treating only those sows failing to exhibit a prompt return to estrus after weaning (Bracken et al., 2006), although treatment of anestrous sows often results in poorer fertility, possibly because of inadequate follicular development in a proportion of the anestrous sow population (Lucy et al., 2001; Bracken et al., 2003). Injection of FSH into gilts promoted growth in the small follicle populations (Guthrie et al., 1990; Bolamba et al., 1996; Knox, 2005). Therefore, we hypothesized that injection of FSH into anestrous sows would enhance the growth of small follicles, potentially generating a larger pool of medium follicles that would respond to an eCG injection. The objectives of these studies were first, to determine the effect of pretreatment with FSH on the reproductive responses of gonadotropin-treated anestrous sows, and second, to determine the effect of dose and timing of administration of supplemental hCG on reproductive responses of gonadotropin-treated weaned sows.

MATERIALS AND METHODS

Animals were cared for humanely in accordance with the University of Leon institutional animal care guidelines.

Exp. 1: Effect of Prior FSH Treatment on Response of Anestrous Sows to eCG

This study was performed on a 1,000-sow farrowing-to-weaning facility near Leon, Spain, during July, August, and September of 2007. At weaning, mixed-parity Hypor (Large White and Landrace breeding) sows were housed in individual gestation stalls and fed 3 kg/d of a gestation diet formulated to provide approximately 3,265 kcal of ME/kg and 0.55% total lysine. All sows received 5 min of daily fence-line boar contact from 2 d after weaning to facilitate estrus detection. At 7 d after weaning, 87 sows that had failed to exhibit estrus were allocated to 4 treatment groups balanced for parity and received 1) an intramuscular (**i.m.**) injection of 400 IU of eCG plus 200 IU of hCG (5 mL of PG 600, Intervet/Schering Plough Animal Health) on d 9 (n = 23); 2) 600 IU of eCG (3.0 mL of Folligon, Intervet/Schering Plough Animal Health) on d 9 (n = 20); 3) injection of 87.5 IU of FSH (Folltropin, Bioniche Animal Health, Belleville, Ontario, Canada) mixed with polyvinyl-pyrrolidinone C-30 (5 mL of **PVP**, Plasdone C-30, ISP Technologies Inc., Wayne, NJ; average molecular weight = 58,000) on d 7 and d 8, followed by 600 IU of eCG on d 9 (n = 24); or 4) noninjected controls (n = 20). Sows were not restrained for injection. The dose of eCG was chosen on the basis of known efficacy in weaned sows (Cassar et al., 2005). The objective of administering FSH in PVP solution was to prolong the period of biological activity of the hormone (Jackson et al., 2006). The PVP solution (30%) was prepared by dissolving 15 mg of PVP in 40 mL of distilled and deionized water; this was stored at 4°C until use.

Boar exposure for estrus detection continued for an additional 7 d, and estrous sows were artificially inseminated with 3×10^9 sperm from Centrotec (Campo de Villavidel, Leon, Spain) at detection of estrus and at 24-h intervals if still exhibiting estrus. All sows received a minimum of 2 matings. Bred sows were allowed to go to term to determine farrowing rates and subsequent litter sizes. To determine the ovulation responses to hormone treatment, blood samples (8 mL) were collected, and the serum was harvested within 4 h by centrifugation at $2{,}000 \times g$ for 4°C for 15 min. Samples were obtained from all sows via jugular venipuncture at 9 and 19 d after weaning and analyzed for progesterone concentrations in a single assay using a commercial ELISA kit (Immulite, Siemens Medical Solutions Diagnostics, Tarrytown, NY). Assay sensitivity and intraassay CV were 0.2 ng/mL and 8.1%, respectively. An increase in progesterone concentrations from <1 ng/mL on d 9 to a minimum of 5 ng/mL on d 19 was considered to indicate an ovulation response to treatment (Althouse and Hixon, 1999).

Exp. 2: Effect of Supplemental hCG on Response of Weaned Sows to PG 600

This study was performed at the same facility as above during July, August, and September of 2008. A total of 247 mixed-parity Hypor sows were weaned into individual gestation stalls and fed 3 kg/d of a gestation diet formulated to provide approximately 3,265 kcal of ME/kg and 0.55% total lysine. Sows were assigned by parity (1 and 2 vs. ≥3) to receive an i.m. injection at weaning of 1) 400 IU of eCG plus 200 IU of hCG (5 mL of PG 600, Intervet/Schering Plough Animal Health; n = 15 for parities 1 to 2, and n = 40 for parity ≥3, respectively), 2) PG 600 with 100 IU of hCG (0.33 mL of Chorulon, Intervet/Schering Plough Animal Health) injected i.m., either concurrently (n = 14 and 34, respectively) or after 24 h (n = 18 and 32, respectively), or 3) 200 IU of hCG (0.66 mL) injected 24 h after PG 600 (n = 14 and 31, respectively). Sows were not restrained for injection. An additional 54 sows served as noninjected controls (n = 14 and 34, respectively). The hCG doses were chosen on the basis of observed efficacy in a gilt model (Manjarin et al., 2010). All sows received 5 min of daily fence-line boar contact for a period of 7 d after weaning to facilitate estrus detection. Estrous sows were artificially inseminated with 3×10^9 sperm (Centrotec) at detection of estrus and at 24-h intervals if still exhibiting estrus. All sows received a minimum of 2 matings. Sows were allowed to go to term to determine farrowing rates and subsequent litter sizes.

Table 1. Effect of injection of 600 IU of eCG[1] and 87.5 IU of FSH[2] on d 2, followed by 600 IU of eCG or PG 600[3] on the estrus and ovulation responses of anestrous sows at 7 d after weaning

Item	Control	eCG	FSH + eCG	PG 600
No. of sows	20	20	24	23
Parity[4]	3.9 ± 0.4	3.7 ± 0.4	3.7 ± 0.4	3.6 ± 0.4
Weaning-to-estrus interval,[4] d	4.6 ± 0.5	4.3 ± 0.6	4.1 ± 0.7	4.2 ± 0.5
Estrus,[5] %	3 (15.0)	9 (45.0)	13 (54.1)	10 (43.4)
Ovulation,[6] %	4 (20.0)	9 (45.0)	12 (50.0)	12 (52.1)
Farrowing,[7] %	3 (100)	7 (77.8)	11 (84.6)	10 (100.0)
Litter size[4]	9.0 ± 2.5	10.0 ± 3.7	9.5 ± 3.4	9.1 ± 2.8

[1]Folligon (Intervet/Schering Plough Animal Health, Boxmeer, the Netherlands).
[2]Folltropin (Bioniche Animal Health, Belleville, Ontario, Canada).
[3]Intervet/Schering Plough Animal Health.
[4]Means ± SE.
[5]Sows in estrus by 7 d after treatment (% values from total number of sows in parentheses).
[6]Ovulation indicated by serum progesterone >5 ng/mL (% values from total number of sows in parentheses).
[7]Data in parentheses are percentages.

Statistical Analyses

In Exp. 1, the effect of gonadotropin treatment on the response variables was analyzed using a generalized mixed model (PROC GLIMMIX, SAS Inst. Inc., Cary, NC). Both treatment and parity factors were included as fixed effects. Response variables, including frequency of estrus and ovulation and sows farrowing, were expressed as the number of cases assuming a binary distribution. The effect of treatment on weaning-to-estrus interval and litter size was analyzed using the mixed model procedure (PROC MIXED) of SAS, assuming a normal distribution and including the effect of parity as a fixed term. A value of $P < 0.05$ was set as the significant level in testing all ANOVA results. Mean differences for all treatments vs. the control were computed and reported.

In Exp. 2, the effect of gonadotropin treatment on the response variables was analyzed using a generalized mixed model, with treatment and parity as fixed effects. Response variables, including frequency of estrus and sows farrowing, were expressed as the number of cases, assuming a binary distribution. The effect of treatment on weaning-to-estrus interval and litter size was analyzed using the mixed model procedure including the effect of parity as a fixed term. A value of $P < 0.05$ was set as the significant level in testing ANOVA results. Mean differences for all treatments vs. the control were computed and reported.

RESULTS

Exp. 1

The effect of parity was not significant. All sows used in this study had nondetectable progesterone concentrations on d 9 after weaning, whereas all sows determined to have ovulated had circulating progesterone concentrations of >20 ng/mL on d 19. There was no effect of treatment on weaning-to-estrus interval, estrus, ovulation, farrowing rate, or litter size (Table 1).

Exp. 2

The percentage of parity 1 and 2 sows returning to estrus within 7 d after weaning was influenced by treatment, with all gonadotropin-treated groups increasing ($P < 0.05$) the estrus response compared with the control group (Table 2). There was no effect of treatment on weaning-to-estrus interval, farrowing rate, or subsequent litter size. Treatment of parity ≥3 sows had no effect on weaning-to-estrus interval, estrus response, or litter size (Table 2). However, compared with control sows and sows receiving PG 600, farrowing rate was decreased ($P < 0.05$) for sows injected with 200 IU of hCG 24 h after PG 600.

DISCUSSION

In Exp. 1, we hypothesized that sows pretreated with FSH would have greater estrus, ovulatory, and farrowing responses to eCG injection, presumably because of enhanced follicular development, but this was not evident. Although we did not measure ovarian follicle growth in this study, based on a previously published similar FSH-treatment protocol (Jackson et al., 2006), it is likely that even those sows that failed to ovulate had early antral follicle growth initiated by FSH treatment. In turn, this likely indicates that sows pretreated with FSH that failed to respond to eCG treatment may lack adequate endogenous LH-like activity to maintain follicle development to preovulatory size. Indeed, nutritionally driven (and presumably seasonally driven) delayed estrus was associated with a reduced basal concentration of LH (Kirkwood et al., 1987), and appropriate LH concentrations are required for follicle development beyond 4 mm (Driancourt et al., 1995, Liu et al., 2000). Interestingly, PG 600 contains 200

Table 2. Influence of parity on the effect of PG 600[1] and PG 600 followed by supplemental hCG[2] on estrus and farrowing rates, and subsequent litter size in weaned sows[3]

Item	Control	PG 600	PG 600 + 100hCG-0[4]	PG 600 + 100hCG-24[5]	PG 600 + 200hCG-24[6]
Parities 1 and 2					
No. of sows	14	15	14	18	14
Weaning-to-estrus interval,[7] d	4.8 ± 0.4	4.1 ± 0.7	4.3 ± 0.6	4.3 ± 0.3	4.3 ± 0.6
Estrus, %	9 (64.3)[a]	15 (100)[b]	14 (100)[b]	17 (94.4)[b]	14 (100)[b]
Farrowing, %	5 (55.5)	12 (80.0)	8 (57.1)	13 (76.5)	11 (78.6)
Litter size[6]	7.8 ± 2.4	8.4 ± 2.4	9.4 ± 2.7	10.1 ± 4.0	9.4 ± 4.3
Parity ≥3					
No. of sows	34	41	34	32	31
Weaning-to-estrus interval,[7] d	4.6 ± 0.6	4.2 ± 0.6	4.2 ± 0.7	4.0 ± 0.5	4.1 ± 0.3
Estrus, %	28 (82.3)	39 (95.1)	30 (88.2)	32 (100)	30 (96.8)
Farrowing, %	23 (82.1)[a]	34 (87.2)[a]	23 (76.7)[ab]	24 (75.0)[ab]	17 (56.7)[b]
Litter size[7]	10.0 ± 1.8	10.4 ± 1.8	10.0 ± 2.1	10.2 ± 1.8	9.8 ± 1.5

[a,b]Means within row followed by different letters are different ($P < 0.05$).
[1]Intervet/Schering Plough Animal Health (Boxmeer, the Netherlands).
[2]Chorulon (Intervet/Schering Plough Animal Health).
[3]Data in parentheses are percentages.
[4]PG 600 injected concurrently with 100 IU of hCG.
[5]PG 600 followed after 24 h with 100 IU of hCG.
[6]PG 600 followed after 24 h with 200 IU of hCG.
[7]Means ± SE.

IU of hCG, and we observed no difference in estrus or ovulation responses between eCG- and PG 600-treated anestrous sows. However, previous work has demonstrated that even when treating sows with PG 600, some endogenous secretion of LH is required to sustain follicle growth, and the preovulatory LH surge is entirely endogenous (Kraeling et al., 1990; Garcia et al., 2004). Therefore, the less than 50% estrus response to gonadotropic stimulation of anestrous sows in the present study, compared with 70% or greater in sows treated with gonadotropins at weaning (Britt et al., 1986; Bates et al., 1991; Kirkwood et al., 1995, 1998), may be due to anestrous sows needing a more prolonged period of LH-like activity than that provided by PG 600 to stimulate and maintain ovarian follicular growth.

Bracken et al. (2006) reported a 93% estrus response of anestrus sows to PG 600 injection 7 d after weaning. The reason for the difference in response rates compared with the present study (43.4%) is not known. However, the response of anestrous sows to hormonal stimulation will depend on the degree of follicular development at the time of treatment. The mean diameter of ovarian follicles in the study by Bracken et al. (2006) was approximately 4 mm, a follicle size associated with a transition to LH control (Driancourt et al., 1995), and thus greater responsiveness to the hCG component of PG 600. In contrast, heat-stressed sows had follicles of only <3 mm in diameter (Lucy et al., 2001; Bracken et al., 2003), and historically, sows on our study farm have exhibited marked seasonal infertility. However, we did not measure follicle size in the present study, so a comparison between the sow populations was not possible.

The results from Exp. 2 indicate that supplementing weaned sows with different amounts of LH-like activity at different stages of a follicular phase induced by PG 600 did not improve estrus response, pregnancy rate, farrowing rate, or litter size compared with treatment with PG 600 alone. This result was not completely unexpected because in our previous work (Manjarin et al., 2010), we found that the effect of supplemental LH-like activity on progesterone concentrations in prepubertal gilts was age dependent, being less evident as the population aged and with the endogenous LH support likely becoming adequate to support follicular development. In the present study, we found that injecting younger sows with PG 600 increased estrus response rates compared with injecting control sows, but there was no effect of supplemental hCG. In contrast, PG 600 did not affect the estrus responses of older sows, but farrowing rate was reduced in the sows receiving 200 IU of supplemental hCG. It is possible that more sows injected with 200 IU of hCG 24 h after PG 600 expressed estrous behavior without ovulation, which would manifest as a reduced farrowing rate. Further, it is possible that an excess of hCG in older sows down-regulated follicular LH receptors, as was shown to occur in rat granulosa cells (LaPolt et al., 1990), which could have the effect of inhibiting ovulation. It is also possible that the supplemental hCG interfered with the maintenance of pregnancy because of cyst formation. Indeed, we recently noted a high incidence of cysts in PG 600-treated prepubertal gilts receiving 200 IU of supplemental hCG 24 h later (J. C. Garcia, unpublished data), and it was shown previously that administration of PG 600 at greater doses than recommended induced cysts (Breen et al., 2006). Follicular cysts in sows act as a primary source of progesterone (Close and Liptrap, 1975), and inappropriately timed increases of progesterone could result in a uterine milieu not conducive to embryo development.

From the above discussion, we suggest that responsiveness of anestrus sows to exogenous gonadotropins

will depend on the combined effects of initial follicle size and ongoing luteotrophic support. Anestrus sows are likely to have reduced endogenous gonadotropin concentrations, which could limit their ability to support ongoing follicular development as well as populations of smaller size follicles. We speculate that under these conditions, the injection of supplemental hCG is more likely to enhance the response to PG 600.

We conclude from the present data that supplemental LH-like activity does not improve the fertility rate when added to the PG 600 treatment 24 h after weaning and is therefore not indicated as a common protocol for the induction of estrus and ovulation in weaned sows. We suggest that given the dynamic changes in follicular control mechanisms around the 4-mm follicle stage, it is possible that currently available gonadotropin preparations or their modes of administration may be inappropriate for many seasonally anestrus sows. An improved understanding of the effect of LH on follicular growth may facilitate the development of improved protocols for hormonal induction of estrus in this population of sows.

LITERATURE CITED

Althouse, G. C., and J. E. Hixon. 1999. Use of commercially available ELISAs to help determine estrous status in female swine. Swine Health Prod. 7:65–68.

Bates, R. O., B. N. Day, J. H. Britt, L. K. Clark, and M. A. Brauer. 1991. Reproductive performance of sows treated with a combination of pregnant mare's serum gonadotropin and human chorionic gonadotropin at weaning in the summer. J. Anim. Sci. 69:894–898.

Bolamba, D., A. Dubuc, J. J. Dufour, and M. A. Sirard. 1996. Effects of gonadotropin treatment on ovarian follicle growth, oocyte quality and in vitro fertilization of oocytes in prepubertal gilts. Theriogenology 46:717–726.

Bracken, C. J., W. R. Lamberson, T. J. Safranski, and M. C. Lucy. 2003. Factors affecting follicular populations on day 3 postweaning and interval to ovulation in a commercial sow herd. Theriogenology 60:11–20.

Bracken, C. J., J. S. Seaman-Bridges, T. J. Safranski, and M. C. Lucy. 2006. Ovarian follicular development, estrus, and ovulation in seasonally anestrous sows treated seven days post weaning with equine and human chorionic gonadotropins. J. Swine Health Prod. 14:207–209.

Breen, S. M., S. L. Rodriguez-Zas, and R. V. Knox. 2006. Effect of altering dose of PG 600 on reproductive performance responses in prepubertal gilts and weaned sows. Anim. Reprod. Sci. 95:316–323.

Britt, J. H., K. L. Esbenshade, and K. Heller. 1986. Responses of seasonally anestrous gilts and weaned primiparous sows to treatment with pregnant mare's serum gonadotropin and altrenogest. Theriogenology 26:697–707.

Brussow, K. P., F. Schneider, W. Kanitz, J. Ratky, J. Kauffold, and M. Wahner. 2009. Studies on fixed-time ovulation induction in the pig. Pages 187–198 in Control of Pig Reproduction VIII. H. Rodriguez-Martinez, J. L. Vallet, and A. J. Ziecik, ed. Nottingham University Press, Nottingham, UK.

Cassar, G., R. N. Kirkwood, Z. Poljak, K. Bennett-Steward, and R. M. Friendship. 2005. Effect of single or double insemination on fertility of sows bred at an induced estrus and ovulation. J. Swine Health Prod. 13:254–258.

Close, R. W., and R. M. Liptrap. 1975. Plasma progesterone levels in sows with induced cystic ovarian follicles. Res. Vet. Sci. 19:28–34.

Driancourt, M. A., A. Locatelli, and A. Prunier. 1995. Effects of gonadotrophin deprivation on follicular growth in gilts. Reprod. Nutr. Dev. 35:663–673.

Estienne, M. J., and T. G. Hartsock. 1998. Effect of exogenous gonadotropins on the wean-to-estrus interval in sows. Theriogenology 49:823–828.

Garcia, A., M. J. Estienne, A. F. Harper, and J. V. Knight. 2004. Failure of gonadotropin therapy to induce estrus in gilts treated with a GnRH analog to suppress ovarian activity. Intern. J. Appl. Res. Vet. Med. 3:195–200.

Guthrie, H. D., D. J. Bolt, and B. S. Cooper. 1990. Effects of gonadotropin treatment on ovarian follicle growth and granulosal cell aromatase activity in prepubertal gilts. J. Anim. Sci. 68:3719–3726.

Jackson, A. L., S. M. Breen, S. L. Rodriguez-Zas, and R. V. Knox. 2006. Evaluation of methodology for administration of porcine FSH for use in estrus induction and for increasing ovulation rate in prepubertal gilts. Theriogenology 66:1042–1047.

Kirkwood, R. N. 1999. Pharmacological intervention in swine reproduction. Swine Health Prod. 7:29–35.

Kirkwood, R. N., F. X. Aherne, and G. R. Foxcroft. 1998. Effect of gonadotropin at weaning on reproductive performance of primiparous sows. Swine Health Prod. 6:51–55.

Kirkwood, R. N., S. K. Baidoo, F. X. Aherne, and A. P. Sather. 1987. The influence of feeding level during lactation on the occurrence and endocrinology of the postweaning estrus in sows. Can. J. Anim. Sci. 67:405–415.

Kirkwood, R. N., N. M. Soede, G. W. Dyck, and P. A. Thacker. 1995. The effect of immunoneutralization of PMSG at a gonadotropin-induced oestrus on the duration of ovulation and reproductive performance of sows. Can. J. Anim. Sci. 61:321–324.

Knox, R. V. 2005. Recruitment and selection of ovarian follicles for determination of ovulation rate in the pig. Domest. Anim. Endocrinol. 29:385–397.

Kraeling, R. R., J. S. Kesner, M. J. Estienne, C. E. Estienne, C. R. Barb, and G. B. Rampacek. 1990. Follicle growth in hypophysial stalk-transected pigs given pulsatile GnRH and pregnant mare serum gonadotropin. Domest. Anim. Endocrinol. 7:395–402.

LaPolt, P. S., M. Oikawa, X.-C. Jia, C. Dargen, and A. J. W. Hsueh. 1990. Gonadotropin-induced up- and down-regulation of rat ovarian LH receptor message levels during follicular growth, ovulation and luteinization. Endocrinology 126:3277–3279.

Liu, J., A. T. Koenigsfeld, T. C. Cantley, C. K. Boyd, Y. Kobayashi, and M. C. Lucy. 2000. Growth and the initiation of steroidogenesis in porcine follicles are associated with unique patterns of gene expression for individual components of the ovarian insulin-like growth factor system. Biol. Reprod. 63:942–952.

Lucy, M. C., J. Liu, C. K. Boyd, and C. J. Bracken. 2001. Ovarian follicular growth in sows. J. Reprod. Fertil. Suppl. 58:31–45.

Manjarin, R., J. C. Dominguez, M. J. Castro, B. Alegre, M. A. Driancourt, and R. N. Kirkwood. 2010. Effect of hCG on early luteal serum progesterone concentrations in PG600-treated gilts. Reprod. Domest. Anim. 45:555–557. doi:10.1111/j.1439-0531.2008.01299.x

Sechin, A., J. C. Deschamps, T. Lucia, J. A. G. Aleixo, and V. Bordignon. 1999. Effect of equine chorionic gonadotropin on weaning-to-first service interval and litter size of female swine. Theriogenology 51:1175–1182.

Steverink, D. W. B., N. M. Soede, G. J. R. Groenland, F. W. van Schie, and B. Kemp. 1999. Duration of oestrus in relation to reproduction results in pigs on commercial farms. J. Anim. Sci. 77:801–809.

Tantasuparuk, W., N. Lundeheim, A. M. Dalin, A. Kunavongkrit, and S. Einarsson. 2001. Weaning-to-service interval in primiparous sows and its relationship with longevity and piglet production. Livest. Prod. Sci. 69:152–162.

Webster, W. R. 1978. Evaluation of a pregnant mare's serum and human chorionic gonadotrophin mixture for alleviating summer infertility in sows. Aust. Vet. J. 54:26–29.

Discusión

Los resultados del primer experimento no concuerdan con la hipótesis de que las cerdas previamente tratadas con FSH tendrían un mayor porcentaje de celos, ovulaciones y partos respecto a las tratadas con eCG, presumiblemente, debido a un mayor desarrollo folicular. Aunque no se midió el crecimiento folicular en este experimento, basándonos en anteriores publicaciones con un protocolo similar de pretratamiento con FSH (Jackson *et al*., 2006), es probable que en las cerdas que no ovularon sí se produjera un crecimiento de la población de folículos de tamaño mediano inducido por la FSH.

Estos resultados indican que la falta de respuesta estral y ovulatoria a la administración de FSH consecutiva a la inyección de eCG puede deberse a la insuficiente actividad LH endógena en los animales para promover el desarrollo folicular hasta la ovulación. De hecho, otros autores indican un retraso en el celo de cerdas asociado a una reducción basal de la concentración endógena de LH (Kirkwood *et al*., 1987), así como la necesidad de LH para promover el desarrollo folicular más allá de los 4 mm de diámetro (Driancourt *et al*., 1995; Liu *et al*., 2000). Curiosamente, la PG600® contiene 200 UI de hCG, y no se observa ninguna diferencia en el celo o respuesta ovulatoria entre los tratamientos de eCG y PG600® de las cerdas en anestro. Sin embargo, Kraeling *et al*. (1990) y Garcia *et al*. (2004), demostraron que incluso cuando se realiza el tratamiento de las cerdas con PG600®, se requiere la secreción endógena de LH para mantener el crecimiento folicular, y que la ola preovulatoria de LH sea

totalmente endógena. Por lo tanto, la respuesta de menos de un 50% de sintomatología de celo a la estimulación gonadotrópica de cerdas en anestro en el presente estudio, en comparación con el 70% o más en cerdas tratadas con gonadotropinas en el momento del destete (Britt *et al.*, 1986; Bates *et al.*, 1991; Kirkwood *et al.*, 1995, 1998), podría ser debida a que las cerdas en anestro necesitan una mayor actividad LH que la suministrada por la PG600®.

Bracken *et al*. (2006) observa una respuesta estral del 93% en cerdas en anestro tratadas con PG600® 7 días después del destete. Desconocemos la razón de la diferencia en los porcentajes de respuesta estral en comparación con el presente estudio (43,4%). Es posible que la falta de respuesta de las cerdas en anestro a la estimulación hormonal dependa del grado de desarrollo folicular en el momento del tratamiento. El diámetro medio de los folículos ováricos en el estudio de Bracken *et al*. (2006) es de aproximadamente 4 mm, un tamaño folicular que esta asociado a la transición de FSH a LH (Driancourt *et al*., 1995; Liu *et al.*, 2000), y por tanto, con una mayor capacidad de respuesta al componente hCG de la PG600®. Por el contrario, cerdas con estrés térmico por calor suelen tener folículos de un tamaño inferior a 3 mm de diámetro (Lucy *et al.*, 2001; Bracken *et al*., 2003), e históricamente, las cerdas en la granja de nuestro estudio muestran una marcada infertilidad estacional. Sin embargo, en el presente trabajo no se realizó la medición del tamaño de los folículos para no interferir en el manejo reproductivo de la granja, por lo que una comparación entre ambas poblaciones de cerdas no es posible.

Los resultados del segundo experimento indican que la suplementación en cerdas destetadas con diferentes cantidades de hCG en diferentes etapas de una fase folicular inducida por PG600®, no mejora el porcentaje de celos, gestaciones, partos, o tamaño de la camada, en comparación con el tratamiento de sólo PG600®. Estos resultados no fueron completamente inesperados, Manjarin *et al*. (2010) observan que el efecto de suplementación con LH sobre la concentración de progesterona en nulíparas depende de la edad de las cerdas, siendo menos evidente a medida que avanza la edad de las mismas. Esto probablemente se debe a que a medida que las cerdas crecen, se produce una maduración fisiológica del eje hipotálamo-hipófisis-ovario, que se traduce en un aumento de los niveles endógenos de LH, permitiendo mantener el desarrollo folicular, independientemente de la inyección de gonadotropinas exógenas.

En el presente estudio, se comprueba que el tratamiento con PG600® en cerdas de primer y segundo parto aumenta el porcentaje de celos en comparación con el grupo control, pero que no hubo ningún efecto de la suplementación con hCG sobre la PG600® sola. Por el contrario, la inyección de PG600® en cerdas de ≥ 3 partos no afecta al porcentaje de celos, pero sí se reduce el porcentaje de partos en las cerdas que recibieron 200 UI de hCG a las 24 horas después de la PG600®. Es posible que las cerdas inyectadas con 200 UI de hCG a las 24 horas después de la PG600® expresasen sintomatología de celo sin ovulación o alteraciones hormonales incompatibles con la gestación, que se manifestaría con un reducido porcentaje de partos. Alternativamente, es posible que un exceso de hCG en cerdas adultas pudiera llegar a reducir la expresión de los receptores foliculares para la LH, como ha sido demostrado *in vitro* en las células de la granulosa en la rata (LaPolt *et al*., 1990), que podría inhibir la ovulación. También

es posible que la hCG suplementaria pudiera interferir con el mantenimiento de la gestación debido a la formación de quistes ováricos. De acuerdo con esto, Breen *et al*. (2006) muestra que la administración de PG600® a dosis mayores de las recomendadas, induce la formación de quistes en la mayoría de las cerdas nulíparas y destetadas. Los quistes foliculares en cerdas actúan como una fuente primaria de progesterona (Close y Liptrap, 1975), y ese aumento inapropiado de progesterona podría provocar un ambiente uterino no apto para el desarrollo embrionario.

Es posible que la respuesta ovulatoria a las gonadotropinas exógenas por parte de cerdas en anestro dependa del efecto combinado del tamaño folicular inicial y de la secreción endógena de gonadotropinas en el momento del tratamiento. La baja concentración de gonadotropinas endógenas en estos animales así como una población folicular de pequeño diámetro, podría limitar la capacidad de las hormonas exógenas para estimular el desarrollo folicular.

En conclusión, la suplementación de PG600® con hCG no mejora la fertilidad de las cerdas destetadas, y por lo tanto, su uso no está indicado para la inducción del estro y la ovulación al destete. Sugerimos que, dados los cambios en la expresión de los receptores foliculares en torno a los 4 mm de diámetro, es posible que las preparaciones de gonadotropinas actualmente disponibles o sus modos de administración no sean apropiadas para la inducción del celo y la ovulación en cerdas en anestro estacional. Es necesaria una mejor comprensión del efecto de la LH sobre el crecimiento folicular para facilitar el desarrollo de protocolos más eficientes para la inducción hormonal del estro y la ovulación en esta población de cerdas.

Segunda publicación.

Effect of sperm numbers and time of insemination relative to ovulation on sow fertility. ***Animal Reproduction Science (2007) 100:397-401.***

Resultados

En el presente experimento, 231 cerdas recibieron una inyección de 600 UI de eCG 12 horas antes del destete, seguido de 5 mg de LH porcina 80 horas después. Todos los animales fueron distribuidos por su número de parto y aleatoriamente asignados en 5 grupos experimentales: 1) única IA-PC 24 horas antes del MPO, y $1,25\times10^9$ espermatozoides, 2) única IA-PC 6 horas antes del MPO, y $1,25\times10^9$ espermatozoides, 3) única IA-PC 24 horas antes del MPO, y $2,5\times10^9$ espermatozoides, 4) única IA-PC 6 horas antes del MPO, y $2,5\times10^9$ espermatozoides, y 5) dos IA-C 24 y 6 horas antes del MPO, y $2,5\times10^9$ espermatozoides (grupo control). Se permitió a todas las cerdas llevar a término la gestación.

Las inseminaciones realizadas con $1,25\times10^9$ espermatozoides 24 horas antes del MPO provocaron una disminución del porcentaje de partos ($P\leq0,02$) respecto a las inseminaciones realizadas con $2,5\times10^9$ espermatozoides 6 horas antes del MPO (84,4 *vs.* 62,8%). No se encontraron diferencias significativas en el resto de los parámetros estudiados.

ELSEVIER

Animal Reproduction Science 100 (2007) 397–401

ANIMAL REPRODUCTION SCIENCE

www.elsevier.com/locate/anireprosci

Effect of sperm numbers and time of insemination relative to ovulation on sow fertility

J.C. Garcia, M. Abad, R.N. Kirkwood *

Department of Large Animal Clinical Sciences, Michigan State University, East Lansing, MI, USA

Received 9 July 2006; accepted 29 September 2006
Available online 5 October 2006

Abstract

We examined the effect of inseminating mixed parity sows ($n = 231$) once with fewer sperm at different times relative to ovulation. Lactation length was 19 days and sows received an IM injection of 600 IU equine chorionic gonadotrophin (eCG) 12 h before weaning. At 80 h after eCG injection, sows received an IM injection of 5 mg porcine luteinizing hormone (pLH). Predicted time of ovulation (PTO) was 38 h after pLH injection. Sows were assigned by parity to receive a single transcervical artificial insemination (AI) at either 6 or 24 h before PTO with semen doses containing either 2.5 or 1.25×10^9 sperm. A positive control group of sows ($n = 49$) was subject to conventional AI 24 and 6 h before PTO. Detection of estrus was performed in the presence of a boar and only sows exhibiting estrous behavior at the assigned time of AI were included in the study. Farrowing rate for sows receiving 2.5×10^9 sperm at 6 h before PTO was greater than that for sows receiving 1.25×10^9 sperm at 24 h before PTO (85% versus 61%, $P < 0.05$). All other groups were intermediate. There was no effect of time of AI or sperm numbers on subsequent litter size. These data indicate that single insemination of fewer sperm may compromise sow fertility, even when performed transcervically, if not appropriately timed relative to ovulation.
© 2006 Elsevier B.V. All rights reserved.

Keywords: Sow; Artificial insemination; Ovulation; Fertility

1. Introduction

It is accepted that sows having shorter wean-to-estrus intervals (WEI) tend to exhibit a longer duration of estrus and sows having a longer WEI tend to have a shorter duration of estrus (Steverink et al., 1999). Because ovulation occurs at about 70% through estrus the effect is that sows having

* Corresponding author. Tel.: +1 517 432 5198; fax: +1 517 432 1042.
E-mail address: kirkwood@cvm.msu.edu (R.N. Kirkwood).

0378-4320/$ – see front matter © 2006 Elsevier B.V. All rights reserved.
doi:10.1016/j.anireprosci.2006.09.026

short WEI (e.g., 4 days) tend to have a longer estrus onset-to-ovulation interval (late ovulators) while sows having long WEI (e.g., >5 days) tend to have a shorter estrus onset-to-ovulation interval (early ovulators) (Kemp and Soede, 1996). Using gonadotropins to induce a short WEI also produces a population of late ovulating sows (Knox et al., 2001). It is known that ovulation typically occurs at 40–44 h after hCG injection (e.g., Dziuk and Baker, 1962; Hunter, 1967) or at 36–38 h after pLH injection (Gama et al., 2005; Cassar et al., 2005; Abad, 2006). Because the objective is to inseminate sows during the 24 h period before ovulation, if time of ovulation can be accurately predicted then breeding management for optimal sow fertility should be relatively simple. Indeed, when time of ovulation was accurately predicted, a single insemination resulted in sow fertility comparable to that following two inseminations (Cassar et al., 2005).

It is known that as the site of sperm deposition gets deeper into the reproductive tract, fewer sperm per insemination dose are required to maintain fertility (Martinez et al., 2005). Insemination catheters allowing semen deposition into the uterine body are commercially available and appear to allow for sperm numbers to be reduced to 1×10^9 per AI dose with maintenance of acceptable fertility (Watson and Behan, 2002; Rozeboom et al., 2004). Results presented by Rozeboom et al. (2004) were influenced by the WEI suggesting that timing of AI relative to ovulation becomes more important as the number of sperm deposited is reduced. To further examine effects of sperm numbers and timing of AI, we undertook a field trial to test the hypothesis that sow fertility would be maintained when single inseminations of fewer sperm were performed at a precise time relative to ovulation.

2. Material and methods

The present study was conducted during August to October 2005 at a commercial 2700-sow farrow-to-wean facility in mid Michigan. Mixed parity Yorkshire × Landrace sows ($n = 231$) were assigned to the breeding study. Lactation length was 19 days. At 12 h before weaning, sows received an IM injection of 600 IU equine chorionic gonadotrophin (eCG; Pregnecol®, Bioniche Animal Health, Bellville, Ont., Canada) to stimulate ovarian follicular development and a prompt return to estrus. At 80 h after eCG injection, sows received an IM injection of 5 mg porcine luteinizing hormone (pLH; Lutropin®, Bioniche Animal Health) to induce ovulation. The predicted time of ovulation (PTO) was 38 h after pLH injection (Cassar et al., 2005; Abad, 2006).

Sows were assigned by parity to receive a single AI using a transcervical insemination catheter (IMV International, Maple Grove, MN, USA) at either 6 or 24 h before PTO with semen doses containing either 2.5 or 1.25×10^9 sperm cells. The semen source was a commercial boar stud and the stud provided pooled doses from the same boars but containing different numbers of sperm. A positive control group of sows ($n = 49$) was subject to conventional (cervical) AI with 2.5×10^9 sperm at 24 and 6 h before PTO. Detection of estrus was performed in the presence of a boar and only sows exhibiting estrous behavior at the assigned time of AI were included in the study. After weaning and during gestation, sows were housed in individual gestation stalls and received 2.5 kg/day of a diet formulated to provide 13.4 MJ DE/kg and 12% crude protein. Sows were allowed to go to term and the farrowing rates and subsequent litter sizes were recorded.

3. Statistical analysis

Data were analyzed using commercial statistical analysis software (INFOSTAT/E v2.0., University of Cordoba, Argentina). Main effects of insemination timing and of sperm numbers were initially examined as a factorial arrangement in the absence of the positive control group. There-

after, data were reanalyzed as five individual treatments. Treatment effects on farrowing rate were examined by χ^2, first controlling for insemination time and then controlling for sperm numbers. Data for litter size were examined by analysis of variation with parity as a covariable. Results are presented as mean ± S.E.M. and $P < 0.05$ was considered statistically significant.

4. Results

There was a main effect of sperm numbers inseminated, in that the insemination of 1.25×10^9 sperm resulted in a lesser ($P < 0.02$) farrowing rate than that following insemination of 2.5×10^9 sperm (Table 1). There was no main effect of time of insemination relative to ovulation although the greatest farrowing rate was obtained by the sow group receiving 2.5×10^9 sperm at 6 h before PTO while the least farrowing rate was observed in the group receiving 1.25×10^9 sperm at 24 h before PTO (84.4% versus 62.8%, $P < 0.05$). There was no evident effect of sperm numbers inseminated or timing of insemination on total litter size born (Table 1).

5. Discussion

Currently, commercially available deeper deposition techniques are largely limited to transcervical deposition into the uterine body, as performed in the present study. In our study, we observed no effect of numbers of sperm inseminated or the timing of insemination relative to ovulation on subsequent litter size. Although this finding does agree with those of some previous workers (Watson and Behan, 2002; Pelland et al., 2006), others have reported smaller litters associated with intrauterine insemination of fewer sperm (Rozeboom et al., 2004; Roberts and Bilkei, 2005). The effect on litter size noted by Rozeboom et al. (2004) was influenced by the WEI suggesting the effects was, in turn, influenced by the timing of insemination relative to ovulation. The numbers of sows we employed would limit our ability to detect differences, however, we suggest that the lack of effect on litter size in the present study likely is a result of our controlling the time of ovulation and so maximizing the potential for insemination within 24 h of ovulation.

Following intra-cervical inseminations of approximately 3×10^9 sperm, previous reports have indicated improved farrowing rates when insemination occurred relatively close to the time of an induced ovulation after multiple inseminations (De Rensis et al., 2003; Cassar et al., 2004, 2005) or a single insemination (Cassar et al., 2005). In the present study, single inseminations were used, and with trans-cervical insemination of 2.5×10^9 sperm observed no adverse effect on

Table 1
Farrowing rates and total born litter sizes for sows receiving a single transcervical insemination of 2.5 or 1.25×10^9 sperm at 6 or 24 h before ovulation

No. of sperm	1.25×10^9		2.5×10^9		
Hours before PTO[a]	24	6	24	6	24 and 6[b]
No. of sows	43	45	49	45	49
Parity[c]	3.9 ± 0.3	3.7 ± 0.3	3.4 ± 0.3	3.7 ± 0.2	3.4 ± 0.3
Farrowing rate[d] (%)	62.8 a	71.1 ab	79.6 ab	84.4 b	75.5 ab
Total born litter size[c]	11.9 ± 1.3	10.5 ± 1.0	12.3 ± 1.0	11.8 ± 0.9	11.9 ± 1.0

Means followed by different letters differ, $P < 0.05$.
[a] Predicted time of ovulation.
[b] Positive control sows inseminated conventionally, into the cervix.
[c] Means ± standard errors.
[d] Main effect of number of sperm, $P < 0.02$.

farrowing rate in comparison with the positive control treatment. This observation lends support to the suggestion that when appropriately timed relative to ovulation, only a single insemination is required. However, the evident reduction in farrowing rate associated with insemination of fewer sperm regardless of timing relative to ovulation in this study, and as influenced by the wean-to-estrus interval in an earlier study (Rozeboom et al., 2004), further suggests that optimum fertility is a function of both sperm numbers and timing of insemination.

In contrast to previous data (Watson and Behan, 2002; Pelland et al., 2006), data from the present study indicate that farrowing rate was reduced when sows were inseminated with semen doses containing fewer sperm. Although no treatment was different from the control value, a reduced farrowing rate was particularly evident in the sow group receiving fewer sperm at 24 h before PTO. The evident contrast to farrowing rates noted in earlier studies may be due to frequency of inseminations. Both Watson and Behan (2002) and Rozeboom et al. (2004) inseminated sows twice, rather than a single insemination as performed in the present study. However, Pelland et al. (2006) did use a single insemination but it was performed approximately coincident with expected ovulation (38-h after pLH injection). Presumably, the effect of multiple inseminations will be to improve the likelihood of one of the inseminations being appropriately timed relative to ovulation, which will increase the number of sperm cells in the oviductal sperm reservoir and so numbers of available sperm at time of ovulation. When insemination of fewer sperm is performed coincident with ovulation (Pelland et al., 2006), presumably an increase in numbers of available sperm at the time of ovulation will occur. In the present study, insemination of fewer sperm 24 h in advance of expected ovulation likely compromised the size of the sperm reservoir at the time of ovulation.

Based on the data presented here and previously by other workers, we conclude that success with artificial insemination is primarily dependant on the availability of sufficient sperm in the oviduct at the time of ovulation. Other aspects of insemination management such frequency of insemination, timing of insemination, number of sperm inseminated, or site of sperm deposition merely serve to ensure adequate sperm availability at the time of ovulation.

Acknowledgement

We gratefully acknowledge Bioniche Animal Health for their financial support of this study.

References

Abad, M., 2006. Sow fertility to insemination of cryopreserved sperm. M.Sc. Thesis, Michigan State University.

Cassar, G., Kirkwood, R.N., Poljak, Z., Bennett-Steward, K., Friendship, R.M., 2005. Effect of single or double insemination on fertility of sows bred at an induced estrus and ovulation. J. Swine Health Prod. 13, 254–258.

Cassar, G., Kirkwood, R.N., Poljak, Z., Friendship, R.M., 2004. Effect of estrogen formulation and site of deposition on fertility of artificially inseminated sows treated with hCG to induce ovulation. J. Swine Health Prod. 12, 285–287.

De Rensis, F., Benedetti, S., Silva, P., Kirkwood, R.N., 2003. Fertility of sows following artificial insemination at a gonadotrophin-induced estrus coincident with weaning. Anim. Reprod. Sci. 76, 245–250.

Dziuk, P.J., Baker, R.D., 1962. Induction and control of ovulation in swine. J. Anim. Sci. 21, 697–699.

Gama, R.D., Vianna, W.L., Pinese, M.E., de Campos Rosseto, A., de Sant'Anna Moretti, A., 2005. Different doses of porcine luteinizing hormone in precocious puberty induction in gilts. Reprod. Dom. Anim. 40, 433–435.

Hunter, R.H.F., 1967. Porcine ovulation after injection of human chorionic gonadotrophin. Vet. Rec. 81, 21–23.

Kemp, B., Soede, N.M., 1996. Relationship of weaning-to-estrus interval to timing of ovulation and fertilization in sows. J. Anim. Sci. 74, 944–949.

Knox, R.V., Rodriguez-Zas, S.L., Miller, G.M., Willenburg, K.L., Robb, J.A., 2001. Administration of P.G. 600 to sows at weaning and time of ovulation as determined by transrectal ultrasound. J. Anim. Sci. 79, 796–802.

Martinez, E.A., Vazquez, J.M., Roca, J., Cuello, C., Gil, M.A., Parrilla, I., Vazquez, J.L., 2005. An update on reproductive technologies with potential short-term application in pig production. Reprod. Dom. Anim. 40, 300–309.

Pelland, C., Cassar, G., Kirkwood, R., Friendship, R., 2006. The influence of using intrauterine insemination with a reduced number of spermatozoa in sows with synchronized ovulation. Proc. Am. Assoc. Swine Vets., 33–35.

Roberts, P.K., Bilkei, G., 2005. Field experiences on post-cervical artificial insemination in the sow. Reprod. Dom. Anim. 40, 489–491.

Rozeboom, K.J., Reicks, D.L., Wilson, M.E., 2004. The reproductive performance and factors affecting on-farm application of low-dose intrauterine deposit of semen in sows. J. Anim. Sci. 82, 2164–2168.

Steverink, D.W.B., Soede, N.M., Groenland, G.J.R., van Schie, F.W., Kemp, B., 1999. Duration of oestrus in relation to reproduction results in pigs on commercial farms. J. Anim. Sci. 77, 801–809.

Watson, P.F., Behan, J.R., 2002. Intrauterine insemination of sows with reduced sperm numbers: results of a commercially based field trial. Theriogenology 57, 1683–1693.

Discusión

En el ganado porcino, la eficacia de la IA depende tanto de la predicción del momento de la ovulación como del protocolo de inseminación. Las técnicas comerciales de IA profunda se limitan en su mayoría a la utilización de la IA-PC, en la que los espermatozoides son depositados en el cuerpo uterino. Los resultados obtenidos en el presente experimento demuestran que en la IA-PC, tanto el número de espermatozoides utilizados, como el momento de la inseminación en relación con la ovulación, no influyen en el tamaño de la camada. Estos resultados coinciden con varios trabajos anteriores (Watson y Behan, 2002; Pelland *et al*., 2006), mientras que otros autores reportan tamaños de camada más pequeños asociados a inseminaciones intrauterinas realizadas con un número reducido de espermatozoides (Rozeboom *et al*., 2004; Roberts y Bilkei, 2005).

El efecto sobre el tamaño de la camada señalado por Rozeboom *et al*. (2004) fue influenciado por el IDC, y a su vez por el momento de la inseminación en relación con la ovulación. Es probable que la ausencia de diferencias del número de espermatozoides inseminados y del momento de la inseminación sobre el tamaño de la camada en el presente experimento, sea el resultado de la realización de un control hormonal del momento de la ovulación. Recientes experimentos con IA-C (aproximadamente 3×10^9 espermatozoides) sugieren mejores porcentajes de partos cuando las inseminaciones se producen relativamente cerca del momento de la ovulación, ya sea utilizando una inseminación (Cassar *et al*., 2005) o varias inseminaciones (De Rensis *et al*., 2003;

Cassar *et al*., 2004). En el presente experimento no se observaron efectos adversos sobre el porcentaje de partos entre los grupos con una única IA-PC y una concentración de $2{,}5\times10^9$ espermatozoides, y el grupo control. Esta observación confirma la hipótesis de que cuando la inseminación se lleva a cabo en el momento adecuado respecto al momento de la ovulación, solo es necesaria una única inseminación.

En contraste con los estudios de Watson y Behan (2002) y Pelland *et al*. (2006), los datos del presente experimento indican una reducción del porcentaje de partos cuando las cerdas fueron inseminadas con un menor número de espermatozoides ($1{,}25\times10^9$). Las inseminaciones realizadas con $1{,}25\times10^9$ espermatozoides 24 horas antes del MPO provocan una disminución del porcentaje de partos respecto a las inseminaciones realizadas con $2{,}5\times10^9$ espermatozoides 6 horas antes del MPO. Es posible que la disminución en el porcentaje de partos observados, comparado con los estudios anteriores, pueda deberse a la frecuencia de las inseminaciones. Tanto Watson y Behan (2002) como Rozeboom *et al*. (2004) realizaron dos inseminaciones, en lugar de una, como en el presente experimento. Sin embargo, Pelland *et al*. (2006) utiliza una sola inseminación, aunque se llevó a cabo en el momento de la ovulación (38 horas después de la inyección de LH porcina). Posiblemente, el efecto de múltiples inseminaciones pudiera mejorar la probabilidad de que una inseminación coincidiera con el momento de la ovulación, lo que aumentaría el número de espermatozoides en el reservorio oviductal disponibles en el momento de la ovulación. En el presente experimento, la inseminación con un número reducido de espermatozoides, 24 horas antes del momento previsto de la ovulación, podría haber comprometido el tamaño de la población del reservorio espermático en el momento de la ovulación.

Basándonos en los datos de este experimento y en los presentados por otros autores, concluimos que el éxito de la IA depende principalmente de la disponibilidad de suficientes espermatozoides en el oviducto en el momento de la ovulación. Otros aspectos del manejo de la inseminación como la frecuencia de las inseminaciones, el momento de la inseminación, el número de espermatozoides inseminados o el lugar de la deposición espermática, contribuyen a garantizar la disponibilidad adecuada de espermatozoides en el momento de la ovulación.

Tercera publicación.

Thawing boar semen in the presence of seminal plasma: Effects on sperm quality and fertility. ***Animal Reproduction Science (2010) 119:160-165.***

Resultados

En el primer experimento, se seleccionaron 5 verracos en base a su fertilidad y calidad espermática como donantes de semen. Semanalmente se realizó una extracción seminal a cada verraco. Posteriormente se procedió a la valoración seminal, utilizando únicamente eyaculados con ≥ 80% de espermatozoides móviles, ≥ 75% de espermatozoides morfológicamente normales y ≥ 95% de acrosomas normales, para la criopreservación seminal, donde se utilizaron dos eyaculados de cada uno de los verracos. Para la incubación y valoración espermática, de cada uno de los eyaculados y del pool procedente de los mismos cinco verracos, se descongelaron y se incubaron dos pajuelas de semen de cada eyaculado en 40 ml de diluyente BTS que contenía 0%, 10% o 50% (v/v) de PS de cada verraco, o un pool de PS respectivamente. El PS se obtuvo mediante centrifugación de eyaculados procedentes de los mismos 5 verracos. Se determinó la integridad de la membrana plasmática y la movilidad a las 0, 1, 2, 3 y 4 horas posteriores a la descongelación.

El aumento de la concentración de PS mejora la viabilidad y movilidad espermática ($P \leq 0{,}001$). Los porcentajes de espermatozoides vivos disminuyeron progresivamente durante el período de incubación de 4 horas. Además, cuando el esperma se incuba en un 50% de PS, el porcentaje de espermatozoides vivos es siempre superior (en todos los tiempos de valoración) en comparación con los espermatozoides que se incuban en un 0 o 10% de PS ($P \leq 0{,}0001$). La adicción de un 10% de PS no tiene efecto sobre el porcentaje de espermatozoides vivos en cualquier

punto de valoración, cuando se comparó con los espermatozoides que se incubaron en 0% de PS.

El porcentaje de movilidad de los espermatozoides disminuye progresivamente durante el período de incubación de 4 horas. La movilidad durante la incubación con un 50% de PS fue significativamente superior en todos los puntos de valoración ($P \leq 0{,}01$), en comparación con las poblaciones de espermatozoides incubados con 0 o 10% de PS. Para la población de espermatozoides incubados en un 10% de PS, el porcentaje de espermatozoides móviles fue mayor a las 2, 3 y 4 horas en comparación con los espermatozoides que se incubaron en un 0% de PS ($P \leq 0{,}01$).

En el segundo experimento 82 cerdas recibieron una inyección de 900 UI de eCG en el momento del destete, seguida de 750 UI de hCG a las 80 horas. Posteriormente se realizaron dos IA-C a las 36 y 42 horas después de la inyección de hCG. Todas las cerdas fueron asignadas aleatoriamente por número de parto en 3 grupos dependiendo del tipo de inseminación realizada: 1) IA-C con semen refrigerado (3×10^9 espermatozoides), 2) IA-C con semen criopreservado (5×10^9 espermatozoides), y 3) IA-C con semen criopreservado (5×10^9 espermatozoides), suplementado con un 50% de PS. El semen y el PS procedían de un pool de los mismos verracos utilizados en el experimento anterior. Se valoró el estado de gestación utilizando la ecografía a tiempo real a los 28 días después de la inseminación dejando llevar a término la gestación.

La IA-C con semen criopreservado provoca una reducción del porcentaje de gestación y del tamaño de camada ($P=0{,}06$ y $P \leq 0{,}05$, respectivamente). Sin embargo,

este efecto no se observa cuando el semen descongelado se suplementa con un 50% de PS. No hubo efecto del tratamiento sobre el porcentaje de partos.

Animal Reproduction Science 119 (2010) 160–165

Contents lists available at ScienceDirect

Animal Reproduction Science

journal homepage: www.elsevier.com/locate/anireprosci

Thawing boar semen in the presence of seminal plasma: Effects on sperm quality and fertility

J.C. Garcia[a], J.C. Dominguez[a,b], F.J. Pena[c], B. Alegre[b], R. Gonzalez[b], M.J. Castro[a], G.G. Habing[d], R.N. Kirkwood[d,*]

[a] Department of Medicine, Surgery and Veterinary Anatomy, University of Leon, Leon, Spain
[b] Centrotec, Campo de Villavidel, Leon, Spain
[c] Department of Medicine and Animal Health, University of Extremadura, Spain
[d] Department of Large Animal Clinical Sciences, College Vet Med, Michigan State University, East Lansing, MI 48824-1314, USA

ARTICLE INFO

Article history:
Received 17 June 2009
Received in revised form 20 October 2009
Accepted 2 November 2009
Available online 5 November 2009

Keywords:
Boar
Cryopreserved
Sperm quality
Fertility

ABSTRACT

Causes of poor fertility after insemination of frozen-thawed (FT) sperm include reduced sperm viability at thawing and a shorter longevity of surviving sperm in the female genital tract due to sub-lethal damage. The present studies examined the effect of incubating thawed boar sperm in seminal plasma (SP) on sperm membrane integrity (viability), and motility *in vitro* (experiment 1), and fertility *in vivo* (experiment 2). For experiment 1, FT sperm from five individual boars and a sperm pool from these boars were thawed and incubated for 4 h in media containing 0%, 10%, or 50% autologous seminal plasma (individual boars) or pooled seminal plasma (sperm pool). At approximately 10 min (0 h) and again at 1 h, 2 h, 3 h, and 4 h, sperm populations were examined for percentage sperm viability and percent sperm motility. Each variable progressively decreased during the incubation period. Incubation in 50% SP increased percentages of live sperm ($P < 0.0001$) and percent sperm motility ($P < 0.01$) at all time points compared to incubation in either 0% or 10% SP. For experiment 2, multiparous Large white × Landrace sows ($n = 82$) each received 900 IU eCG at weaning and 750 IU hCG 80 h later to control time of ovulation. Sows were assigned on the basis of parity to be inseminated with pooled semen with or without SP from the boars used in experiment 1. Sows received 3×10^9 live fresh-extended sperm ($n = 30$) or FT sperm thawed in 80 mL BTS extender ($n = 26$) or 3×10^9 live FT sperm thawed in 80 mL BTS containing 50% SP (FT-SP; $n = 26$). Sows were inseminated at 36 h, and 42 h after hCG injection. Compared to sows receiving fresh semen, the pregnancy rate of FT inseminated sows tended ($P = 0.06$) to be lower with the FT-SP group being intermediate. Farrowing rates were not different (83.3%, 69.2%, and 65.4% for fresh, FT, and FT-SP, respectively). Inseminations with FT sperm were associated with a reduction in litter size ($P < 0.05$), which was not evident in the FT-SP group. Taken together, these data confirm an adverse effect of inseminating FT sperm on sperm quality and sow fertility but suggest that thawing FT sperm in 50% SP may partially alleviate these adverse effects.

© 2009 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

Swine AI involves almost exclusively the use of liquid semen collected within the previous 3–7 days, although there is evidence to indicate that optimal fertility requires AI within 48 h after collection and extension in both

* Corresponding author. Tel.: +1 517 432 5198; fax: +1 517 432 1042.
E-mail address: kirkwood@cvm.msu.edu (R.N. Kirkwood).

0378-4320/$ – see front matter © 2009 Elsevier B.V. All rights reserved.
doi:10.1016/j.anireprosci.2009.11.001

short- and long-term extenders (Johnson et al., 1982; Waberski et al., 1994a; Bennemann et al., 2005). In addition to removing time constraints for sperm usage, cryopreservation would permit sperm to be stored longer, to allow sufficient time for testing, to ensure the absence of pathogens and so improve herd biosecurity.

The insemination of swine with cryopreserved sperm usually results in farrowing rates and litter sizes below those observed following insemination of fresh sperm (Johnson et al., 2000; Roca et al., 2003). This is believed to be a result of sperm cryo-injury including, but not limited to, a capacitation-like or premature aging effect (Bravo et al., 2005; Ortega-Ferrusola et al., 2008), associated with an increase in DNA fragmentation (Fraser and Strzezek, 2007). Capacitated spermatozoa do not form a functional sperm reservoir (Fazeli et al., 1999; Tienthai et al., 2004) and, similarly, cryopreserved sperm do not form a normal sperm reservoir (Abad et al., 2007a). Acceptable fertilization rates were observed only when insemination occurred within 4 h of ovulation (Waberski et al., 1994b; Roca et al., 2003).

One potential means of improving the fertility of cryopreserved boar sperm is to ameliorate the capacitation-like or aging effect. Using chlortetracycline staining, it was demonstrated that incubation of fresh or cryopreserved sperm in media supplemented with 10% seminal plasma appeared to prevent, and possibly reverse, (cryo)capacitation (Suzuki et al., 2002; Vadnais et al., 2005a,b). However, when boar semen was supplemented with 0% or 10% seminal plasma and inseminated within 2 h or 12 h of the predicted time of ovulation, there was no effect of timing of insemination or seminal plasma on sow fertility (Abad et al., 2007b). Interestingly, supplementing cryopreserved ram semen doses with 30% seminal plasma improves ewe fertility (Maxwell et al., 1999). Further, earlier workers observed that extension of cryopreserved boar sperm in 100% seminal plasma was beneficial to *in vivo* sperm longevity (Einarsson and Viring, 1973) and on gilt and sow fertility (Crabo and Einarsson, 1971; Einarsson et al., 1973). Given the evident *in vivo* benefits of extending cryopreserved boar sperm in relatively high concentrations of seminal plasma, the objective of the present study was to determine whether effects of seminal plasma are dose-dependant. We hypothesized that, compared to thawing sperm in 10% seminal plasma, thawing sperm in extender having 50% seminal plasma would enhance *in vitro* sperm quality and so subsequent sow performance.

2. Material and methods

2.1. Experiment 1

From May 2008 to November 2008, a total of five large white boars of 12–35 months of age and housed at CENTROTEC (Technologic Center of Artificial Insemination), Campo de Villavidel, Leon, Spain, were selected based on documented fertility and normal semen quality. There was no pre-selection for semen freezability. All boars were kept in individual pens with the environmental temperature maintained at 18–22 °C and a constant photoperiod of 12 h/d. The boars received 2.5 kg/d of a 13% protein diet and were allowed water *ad libitum*.

2.1.1. Processing of semen and seminal plasma

Each boar was allowed to mount a 'dummy' sow weekly and the sperm-rich fraction of the ejaculates collected with the gloved-hand technique into a plastic bag inside an insulated thermos flask previously warmed to 37 °C. We used two ejaculates from each boar. Immediately after collection, the filtered ejaculates were transported to the laboratory in a thermos and placed in a 32.5 °C water bath.

The volume of each ejaculate was measured indirectly on the basis of weight and sperm concentration estimated using a 60 μL aliquot of semen in 3.0 mL of MR-A® extender in a photometer SDM-5 (Minitüb GmbH, Tiefenbach, Germany). Morphology and acrosome integrity were assessed using a 60 μL aliquot of semen in 1.0 mL of MR-A extender in an Eppendorf centrifuge tube. These 1.0 mL samples were fixed using 10 μL of 2% glutaraldehyde solution (1.0% sodium citrate, 2.9% glucose, 0.2% sodium bicarbonate in 100 mL water; with 8 mL of 25% glutaraldehyde added to 92 mL of this solution) and were then examined using a phase contrast microscope Eclipse E-400 (Nikon, Tochigi, Japan). A total of 200 sperm were examined under 400× magnification for morphology and 100 sperm under 1000× magnification for acrosome integrity. An initial analysis of sperm motility was performed microscopically using a 60 μL aliquot of semen in 1 mL of MR-A extender in a Eppendorf tube using the phase contrast microscope at 200× magnification with a stage heater (HT 200, Minitüb, Germany) at 39 °C. Only ejaculates with ≥80% motile sperm, ≥75% morphologically normal sperm and ≥95% normal acrosomes were used.

Semen was processed for cryopreservation according to the technique described by Eriksson and Rodriguez-Martinez (2000), except our first extender dilution was MR-A at 2:1 rather than BTS at 1:1 and we used a slower cooling and freezing curve (Peláez et al., 2006). Initially, 60×10^9 sperm from each ejaculate were diluted in MR-A that was previously warmed to 32.5 °C and the extended semen incubated at room temperature (20–22° C) for 1 h. After the initial incubation the semen was transferred to a room cooled to 15 °C for 3 h after which it was centrifuged at 800 × *g* for 10 min at 15 °C in a programmable refrigerated centrifuge (Heraeus Megafuge 1.0 R, Heraeus Holding GmbH, Germany) and the supernatant was discarded. The pellets were re-extended with a lactose–egg yolk extender (11.0% (v/v) β-lactose and 20.0% (v/v) hen's egg yolk) to a final concentration of 1.5×10^9 sperm/mL. After thorough mixing the semen was further cooled to 5 °C for 2 h in a refrigerator. At this temperature the semen was slowly mixed with the freezing extender consisting of 89.55% (v/v) lactose–egg yolk extender, 8.95% (v/v) glycerol and 1.5% (v/v) Equex STM (Minitüb, Germany) at a ratio of two parts of semen to one part of extender, yielding a final concentration of 3% glycerol and 1.0×10^9 sperm/mL.

Sperm were packaged at 5 °C in 0.25 ml straws (Minitüb, Germany). After sealing, all racks were transferred to the chamber of a programmable freezer (Ice Cube 1810, Sy-Lab, Purkersdorf, Australia) set at 5 °C. The cooling/freezing rate used was 3 °C/min from +5 to −6 °C, hold for 1 min for crystallization and thereafter 20 °C/min from −6 to −100 °C (Eriksson and Rodrigues-Martinez, 2000 used 50 °C/min). Samples were then plunged into liquid N_2 (−196° C) for

storage. The straws were thawed in circulating water at 50 °C for 12 s (Eriksson and Rodriguez-Martinez, 2000).

From the same five boars used for semen collection, further ejaculates were collected as described previously and centrifuged twice at 800 × *g* for 10 min at 25 °C and the pellet discarded. The seminal plasma was stored in aliquots of 8 mL in 15 mL conical tubes at −80 °C until required. Thawing of seminal plasma was done at 37 °C in a water bath, at which time the seminal plasma was centrifuged a third time prior to use in the study and the absence of sperm confirmed using phase contrast microscopy under 400× magnification.

2.1.2. Sperm incubation and examination

Cryopreserved sperm from each of the five individual boars (two straws per ejaculate per boar; four straws total) and an additional sperm pool (of same five boars) were thawed and incubated in 50 mL centrifuge tubes at 37 °C in a water bath for 4 h in 40 mL BTS extender (Beltsville Thawing Solution, Minitüb, Germany) containing 0%, 10%, or 50% autologous seminal plasma (individual boars) or pooled seminal plasma (sperm pool). The pooled sperm and seminal plasma were examined to confirm that responses observed were not the result of boar-to-boar variation. Sperm concentration was 25×10^6 sperm/mL. Sperm plasma membrane integrity and total motility were determined at approximately 10 min post-thaw (0 h) and at 1 h, 2 h, 3 h, and 4 h. These procedures were performed on three occasions.

Sperm plasma membrane integrity was evaluated using the method originally described by Harrison and Vickers (1990). To a 500 μL aliquot of sperm suspension were added 10 μL of propidium-iodide (PI; 0.5 mg/mL in isotonic saline, kept in the dark and stored at −80 °C; Sigma–Aldrich Chemie GmbH, Steingeim, Germany), 10 μL of 6-carboxyfluorescein diacetate (CFDA; 0.46 mg/mL in dimethyl sulphoxide, kept in the dark and stored at −80 °C; Sigma–Aldrich Chemie, Germany) and 5 μL of formaldehyde (0.3% (v/v) in isotonic saline, stored at 5 °C) and incubated in the dark for 8 min at 37 °C in a water bath. Subsamples (6 μL) of the stained suspension were observed in random fields under 400× magnification with epifluorescence UV-illumination under an Eclipse E-600 microscope (Nikon,Tochigi, Japan), and a minimum of 100 cells examined in each of two 6 μL aliquots. Sperm that fluoresced entirely green (CFDA-positive) were considered to be intact, whereas sperm with heads that fluoresced red (PI-positive) were considered dead.

For determination of percent sperm motility, a 500 μL aliquot of the sperm suspension was placed in a 1.5 mL microtube (Sarstedt, Germany) and incubated at 39 °C for 6 min. Sperm motility was assessed in 4 μL of the sperm suspension placed in a pre-warmed (39 °C) 10 μm deep Makler counting chamber (Sefi Medical Instruments, Haifa, Israel) and immediately transferred to the warm stage (39 °C) of a Nikon Eclipse E-400 microscope with phase contrast optics at 200× magnification. The video signal was acquired by a Basler A312F digital camera (Basler AG, Germany) and associated CASA software (ISAS® Proiser R + D, Paterna, Spain). For each sample, six predetermined optical fields around the central reticulum of the chamber were used to count a minimum of 150 sperm per sample. The number of objects incorrectly identified as spermatozoa was minimized on the monitor by using the playback function.

2.2. Experiment 2

This study was conducted on a commercial 1000-sow farrow-to-wean facility near Leon, Spain, during September 2008 to April 2009. The animals were cared for in accordance with local animal care guidelines.

To stimulate post-weaning ovarian follicle growth and onset of estrus, 82 multiparous (4.8 ± 0.4) Yorkshire × Landrace sows received an intramuscular (IM) injection of 900 IU equine chorionic gonadotrophin (eCG; Folligon, Intervet/Schering, Boxmeer, the Netherlands). At 80 h after the eCG, sows received an injection (IM) of 750 IU human chorionic gonadotrophin (hCG; Chorulon, Intervet/Schering) to induce ovulation. Based on literature evidence ovulation was predicted to occur at 42 h after hCG injection (Soede and Kemp, 1993; Hazeleger et al., 2000). Sows were housed in individual gestation crates and were provided nose-to-nose contact with a boar at the designated times of artificial insemination (AI), which were 36 h, and 42 h after hCG injection. Semen and seminal plasma were pools derived from the same boars as used in Experiment 1. Sows were assigned on the basis of parity to one of three treatments and inseminated into the cervix with live fresh sperm (<48 h since collection; $n = 30$), 5×10^9 FT sperm (20× 0.5 mL straws) from the same boars thawed into 80 mL Beltsville thawing solution and previously shown to average about 60% post-thaw viability (BTS; $n = 26$), or FT semen from the same boars thawed into 80 mL BTS supplemented with 50% seminal plasma (FT-SP; $n = 26$). Pregnancy status was assessed using real-time ultrasound at 28 days after insemination and the sows allowed to farrow to permit determination of farrowing rates and subsequent litter sizes.

2.3. Statistical analysis

All data were analyzed using statistical analysis systems software (Version 9, SAS Institute Inc., Cary, NC). Patterns of responses of sperm from the individual boars were very similar to each other and to the sperm pool. Therefore, for the purposes of analysis, the pool was considered as a sixth boar. Percentages of live sperm (i.e., intact plasma membranes) and percent sperm motility were measured at about 10 min post-thaw (0 h) and again at 1 h, 2 h, 3 h, and 4 h after thawing. Repeated measures ANOVA using PROC GLM was used to analyze the differences between treatment groups. Because of the observed non-normality in model residuals, the dependent variables were log-transformed. Two separate models were constructed for percentages of live sperm and percent sperm motility that included treatment group, boar, and repetition as between-subjects main effects. In addition, the interaction between boar and treatment was included in the model. Time was included as the repeated effect. Least squares means of the log-transformed variables were compared at all time points.

For experiment 2, differences in pregnancy and farrowing rates were compared using Chi square. Litter sizes (total born) were tested using GLM analysis of variance including treatment and parity as main effects in the model. Results are presented as mean ± SE and $P < 0.05$ was considered significant.

3. Results

3.1. Experiment 1

Treatment was a significant predictor in both models ($P < 0.001$). The proportions of live sperm decreased progressively during the 4 h incubation period (Fig. 1a). Additionally, when sperm were incubated in 50% seminal plasma, least squares means of live sperm were greater at all time points examined when compared to sperm incubated in 0% or 10% seminal plasma ($P < 0.0001$). There was no effect of 10% seminal plasma on percentage live sperm at any time point when compared to sperm incubated in 0% seminal plasma (Fig. 1a).

The percent sperm motility decreased progressively during the 4 h incubation period (Fig. 1b). Compared to the sperm populations incubated in 0% or 10% seminal plasma, when incubated in 50% seminal plasma the least square means of the percent sperm motility were greater ($P < 0.01$) at 0 h and this level of significance was maintained at all time points examined (Fig. 1b). The percentage motile sperm was higher at 2 h, 3 h, and 4 h for those incubated in 10% seminal plasma compared to sperm incubated in 0% seminal plasma ($P < 0.01$; Fig. 1b).

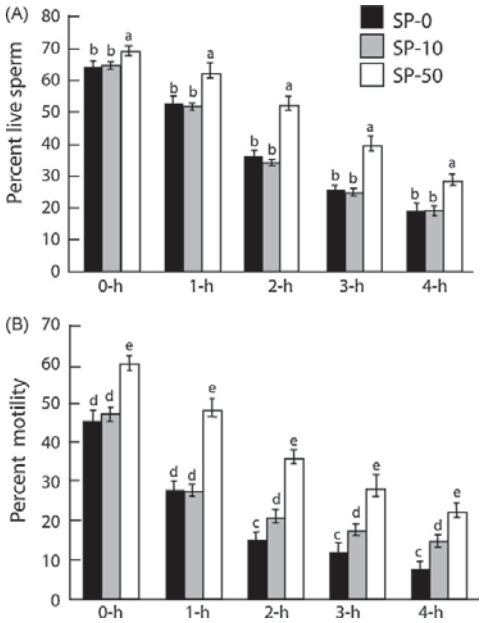

Fig. 1. Effects of incubation of thawed boar sperm for 4 h in media with 0%, 10% or 50% seminal plasma (SP) on mean ± SE for (A) percent live sperm and (B) percent motility. Each time-point represents the mean of 10 ejaculates, with each ejaculate split among the three treatments.
Within time, means having different letters differ: ab, $P < 0.0001$; cde, $P < 0.01$.

Table 1
Effect of thawing cryopreserved (FT) boar sperm in 50% seminal plasma (SP) on sow fertility (means ± SE).

	Fresh semen	FT plus SP	FT
No. sows	30	26	26
Pregnancy rate (%)	86.7a	80.8ab	65.4b
Farrowing rate (%)	83.3	69.2	65.4
Total born litter size	11.2 ± 0.4c	12.5 ± 0.5c	9.8 ± 0.5d

Means followed by different letters differ: ab ($P = 0.06$); cd ($P < 0.05$).

3.2. Experiment 2

Insemination of sows with cryopreserved boar sperm tended ($P = 0.06$) to reduce pregnancy rate, an effect ameliorated by thawing sperm into extender with 50% seminal plasma (Table 1). There was no significant effect of treatment on farrowing rate. Insemination with cryopreserved sperm was associated with a reduction in total born litter size ($P < 0.05$), an effect not observed when sperm were thawed in 50% seminal plasma (Table 1).

4. Discussion

The present findings clearly indicate that seminal plasma can positively impact sperm quality *in vitro*, and that the effect appeared dose dependant. The effect of seminal plasma *in vivo* was not as obvious. It was shown previously that 10% seminal plasma could maintain sperm viability under conditions of relatively great dilution, as would occur with cell sorting (Caballero et al., 2004) and previous studies by our group have shown that, based on chlortetracycline staining patterns (Vadnais et al., 2005b) or merocyanine and peanut agglutinin lectin or propidium iodide and yo pro 1 (Gumbao, unpublished data), the capacitation-like or aging effect due to freezing and thawing can be prevented by incubation of thawed sperm in 10% seminal plasma, and that this effect was evident within 15 min of incubation. Similarly, capacitative changes associated with the cooling of sperm were effectively prevented by 10% or 20% seminal plasma (Vadnais and Roberts, 2007). *In vivo*, it was recently demonstrated that thawing boar semen in 10% seminal plasma improved pregnancy rates to artificial insemination (Okazaki et al., 2009). In contrast, we previously determined that extending thawed semen in 10% seminal plasma had no effect sperm's ability to form a functional sperm reservoir in the oviducts (Abad et al., 2007a) nor on sow fertility if inseminated 2 h or 12 h before predicted time of ovulation (Abad et al., 2007b). Although speculative, given the improved pregnancy rate but not farrowing rate associated with 50% seminal plasma noted in Experiment 2, it is possible that improved fertilization and subsequent pregnancy rates associated with thawing FT sperm in 50% seminal plasma were realized but that early pregnancy losses masked any effect on farrowing rate. Indeed, it has been observed that sow fertilization rates to FT and fresh semen inseminations were statistically

comparable when the FT inseminations occurred at 2 h to 4 h before a hormonally controlled ovulation (Waberski et al., 1994b), as was presumably the case in the present study, which would presumably result in greater pregnancy rates. That a disproportionate loss of pregnancy may occur after insemination of FT sperm is consistent with the concept of cryopreservation inducing a sperm aging effect with associated deleterious effects on sperm DNA integrity. Indeed, cryopreservation greatly increased the percentage of ram sperm having a greater DNA fragmentation (Peris et al., 2007). Fertilization with older sperm may then result in increased embryo mortality.

Interestingly, others have indicated a fertility benefit to ewes when thawed ram semen was extended in 30% seminal plasma (Maxwell et al., 1999). This disparity of *in vivo* results, albeit across species, showing no effect of 10% boar seminal plasma but a benefit from 30% ram seminal plasma supports the current results. Relatively little effect of 10% seminal plasma was found on measures of boar sperm quality but there was a marked effect of 50% seminal plasma. It is evident from the present studies that whatever the active principal(s) is in seminal plasma that impacts sperm function *in vitro*, and presumably *in vivo*, the effect is concentration limited.

Seminal plasma is a complex mixture of hormones, electrolytes and proteins whose effects include initiating sperm motility and myometrial activity to transport sperm to the oviduct, antioxidant activity, modulating uterine inflammatory responses, and impacting the timing of ovulation. In addition to providing a vehicle for sperm transport, seminal plasma provides energy for the sperm and may also modulate their physiology (Maxwell et al., 1996; Centurion et al., 2003). Of particular recent interest has been the protein content of seminal plasma, which will vary both in concentration and protein profile in early as compared to late portions of the ejaculate (Saravia et al., 2008). Further, the ability of sperm to withstand cryopreservation differs depending on which portion of the ejaculate they originate from (Saravia et al., 2008). As discussed by Caballero et al. (2008), >90% of seminal plasma proteins are in the spermadhesin family, which may be heparin-binding or non-heparin-binding, with the non-heparin-binding PSP-I and PSP-II accounting for >50% of seminal plasma proteins. These seminal plasma proteins coat the sperm and act to, among other things, stabilize the acrosomes. Further, the beneficial effects of mixtures of PSP-I and PSP-II on sperm viability, motility and mitochondrial membrane potential was dose dependant (Caballero et al., 2008), which is consistent with the present results.

In contrast to our previous study where we thawed FT sperm in 10% seminal plasma (Abad et al., 2007b), the present study suggests a beneficial effect of thawing FT sperm in 50% seminal plasma on subsequent litter size. An improved efficacy of a greater seminal plasma inclusion rate on the ability to establish a pregnancy and maintain a greater number of fetuses to term may be a consequence of repair of sperm cryo-injury, or possibly antioxidant activity limiting further sperm damage resulting in a larger viable sperm population. Alternatively, the effect may have been mediated by a volume-dependant interaction between seminal plasma constituents and the uterus. Seminal plasma may modulate uterine immune responses to sperm (Rozeboom et al., 1998) and to be involved in the regulation of early embryo development (O'Leary et al., 2004). However, the design of the present and of previous studies examining the fertility effects of seminal plasma, do not permit these potential effects to be separated.

We conclude from the present data that extending cryopreserved boar sperm in 50% seminal plasma will significantly improve sperm viability and motility, with the possible net effect of extending the sperm's lifespan and positively impacting sow fertility.

Acknowledgements

We gratefully acknowledge the financial support of Ontario Pork, University of Leon, and Centrotec AI center. We also wish to thank Dr. John B. Kaneene for technical assistance with the statistical analysis.

References

Abad, M., Garcia, J.C., Sprecher, D.J., Cassar, G., Friendship, R.M., Buhr, M., Kirkwood, R.N., 2007b. Effect of insemination–ovulation interval and addition of seminal plasma on sow fertility to insemination of cryopreserved sperm. Reprod. Dom. Anim. 42, 418–422.

Abad, M., Sprecher, D.J., Ross, P., Friendship, R.M., Kirkwood, R.N., 2007a. Effect of sperm cryopreservation and supplementing semen doses with seminal plasma on the establishment of a sperm reservoir in gilts. Reprod. Dom. Anim. 42, 149–152.

Bennemann, P.E., Diehl, G.N., Milbradt, E., Vidor, R.M., Fries, H.C.C., Wentz, I., Bernardi, M.L., Bortolozzo, F.P., 2005. Artificial insemination of gilts with 1.5 billion sperms stored in different periods associated with different pre-ovulatory intervals. Reprod. Dom. Anim. 40, 507–510.

Bravo, M.M., Aparicio, I.M., Garcia-Herreros, M., Gil, M.C., Peña, F.J., García-Marín, L.J., 2005. Changes in tyrosine phosphorylation associated with true capacitation and capacitation like state in boar spermatozoa. Mol. Reprod. Dev. 71, 88–96.

Caballero, I., Vazquez, J.M., Centurion, F., Rodriguez-Martinez, H., Parrilla, I., Roca, J., Cuello, C., Martinez, E.A., 2004. Comparative effects of autologous and homologous seminal plasma on the viability of largely extended boar spermatozoa. Reprod. Dom. Anim. 39, 370–375.

Caballero, I., Vazquez, J.M., Garcia, E.M., Parrilla, I., Roca, J., Calvette, J.J., Sanz, L., Martinez, E.A., 2008. Major proteins of boar seminal plasma as a tool for biotechnological preservation of spermatozoa. Theriogenology 70, 1352–1355.

Centurion, F., Vazquez, J.M., Calvete, J.J., Roca, J., Sanz, L., Parrilla, I., Garcia, E.M., Martinez, E.A., 2003. Influence of porcine spermadhesins on the susceptibility of boar spermatozoa to high dilution. Biol. Reprod. 69, 640–646.

Crabo, B., Einarsson, S., 1971. Fertility of deep frozen boar spermatozoa. Acta Vet. Scand. 12, 125–127.

Einarsson, S., Swensson, T., Viring, S., 1973. A field trial on the fertility of deep-frozen boar spermatozoa. Nord. Vet. Med. 25, 372–376.

Einarsson, S., Viring, S., 1973. Distribution of frozen-thawed spermatozoa in the reproductive tract of gilts at different time intervals after insemination. J. Reprod. Fertil. 32, 117–120.

Eriksson, B.M., Rodriguez-Martinez, H., 2000. Effect of freezing and thawing rates on the post-thaw viability of boar spermatozoa frozen in FlatPacks and Maxi-straws. Anim. Reprod. Sci. 63, 205–220.

Fazeli, A., Duncan, A.E., Watson, P.F., Holt, W.V., 1999. Sperm–oviduct interaction: induction of capacitation and preferential binding of uncapacitated spermatozoa to oviductal epithelial cells in porcine species. Biol. Reprod. 60, 879–886.

Fraser, L., Strzezek, J., 2007. Effect of different procedures of ejaculate collection, extenders and packages on DNA integrity of boar spermatozoa following freezing–thawing. Anim. Reprod. Sci. 99, 317–329.

Harrison, R.A., Vickers, S.E., 1990. Use of fluorescent probes to assess membrane integrity in mammalian spermatozoa. J. Reprod. Fertil. 88, 343–352.

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, 1063–1070.
Johnson, L.A., Aalbers, J.G., Willems, C.M.T., Rademaker, J.H.M., Rexroad, C.E., 1982. Use of boar spermatozoa for artificial insemination III. Fecundity of boar spermatozoa stored in Beltsville liquid and Kiev extenders for three days at 18 °C. J. Anim. Sci. 54, 132–136.
Johnson, L.A., Weitze, K.F., Fiser, P., Maxwell, W.M.C., 2000. Storage of boar semen. Anim. Reprod. Sci. 62, 143–172.
Maxwell, W.M.C., Evans, G., Mortimer, S.T., Gillian, L., Gellatly, E.S., McPhie, C.A., 1999. Normal fertility in ewes after cervical insemination with frozen-thawed spermatozoa supplemented with seminal plasma. Reprod. Fertil. Dev. 11, 123–126.
Maxwell, W.M., Welch, G.R., Johnson, L.A., 1996. Viability and membrane integrity of spermatozoa after dilution and flow cytometric sorting in the presence or absence of seminal plasma. Reprod. Fertil. Dev. 8, 1165–1178.
Okazaki, T., Abe, S., Yoshida, S., Shimada, M., 2009. Seminal plasma damages sperm during cryopreservation, but its presence during thawing improves semen quality and conception rates in boars with poor post-thaw semen quality. Theriogenology 71, 491–498.
O'Leary, S., Jasper, M.J., Warnes, G.M., Armstrong, D.T., Robertson, S.A., 2004. Seminal plasma regulates endometrial cytokine expression, leukocyte recruitment and embryo development in the pig. Reproduction 128, 237–247.
Ortega-Ferrusola, C., Sotillo-Galán, Y., Varela–Fernández, E., Gallardo-Bolaños, J.M., González-Fernández, L., Tapia, J.A., Peña, F.J., 2008. Detection of apoptosis like changes during the cryopreservation process in equine sperm. J. Androl. 29, 213–221.
Peláez, J., Breininger, E., Alegre, B., Peña, F.J., Domínguez, J.C., 2006. In vitro evaluation of the quality and fertilizing capacity of boar semen frozen in 0.25 ml straws. Reprod. Dom. Anim. 41, 153–161.
Peris, S.I., Bilodeau, J.F., Dufour, M., Baylei, J.L., 2007. Impact of cryopreservation and reactive oxygen species on DNA integrity, lipid peroxidation and functional parameters in ram sperm. Mol. Reprod. Dev. 77, 878–892.
Roca, J., Carvajal, G., Lucas, X., Vazquez, J.M., Martinez, E.A., 2003. Fertility of weaned sows after deep intrauterine insemination with a reduced number of frozen-thawed spermatozoa. Theriogenology 60, 77–87.
Rozeboom, K.J., Troedsson, M.H.T., Molitor, T.W., Crabo, B.G., 1998. The effect of spermatozoa and seminal plasma on leukocyte migration into the uterus of gilts. J. Anim. Sci. 77, 2201–2206.
Saravia, F., Wallgren, M., Johannisson, A., Calvete, J.J., Sanz, L., Pena, F.J., Roca, J., Rodriguez-Martinez, H., 2008. Exposure to the seminal plasma of different portions of the boar ejaculate modulates the survival of spermatozoa cryopreserved in MiniFlatPacks. Theriogenology, doi:10.1016/j.theriogenology.2008.09.037.
Soede, N.M., Kemp, B., 1993. In synchronized pigs, the duration of ovulation is not affected by insemination and is not a determinant for early embryo diversity. Theriogenology 39, 1043–1053.
Suzuki, K., Asano, A., Eriksson, B., Niwa, K., Nagai, T., Rodriguez-Martinez, H., 2002. Capacitation status and in vitro fertility of boar spermatozoa: effects of seminal plasma, cumulus-oocyte-complexes-conditioned medium and hyaluronan. Int. J. Androl. 25, 84–93.
Tienthai, P., Johannisson, A., Rodriguez-Martinez, H., 2004. Sperm capacitation in the porcine oviduct. Anim. Reprod. Sci. 80, 131–146.
Vadnais, M.L., Kirkwood, R.N., Sprecher, D.J., Chou, K., 2005b. Effect of extender, incubation temperature, and added seminal plasma on capacitation of cryopreserved, thawed boar sperm as determined by chlortetracycline staining. Anim. Reprod. Sci. 90, 347–354.
Vadnais, M.L., Kirkwood, R.N., Tempelman, R.J., Sprecher, D.J., Chou, K., 2005a. Effect of cooling and seminal plasma on the capacitation status of fresh boar sperm as determined using chlortetracycline assay. Anim. Reprod. Sci. 87, 121–132.
Vadnais, M.L., Roberts, K.P., 2007. Effects of seminal plasma on cooling-induced capacitative changes in boar sperm. J. Androl. 28, 416–422.
Waberski, D., Weitze, K.F., Lietmann, C., Lubbert zur Lage, W., Bortolozzo, F.P., Willmen, T., Petzoldt, R., 1994a. The initial fertilizing capacity of longterm-stored liquid boar semen following pre- and postovulatory insemination. Theriogenology 41, 1367–1377.
Waberski, D., Weitze, K.F., Gleumes, T., Schwartz, M., Willmen, T., Petzold, R., 1994b. Effect of time of insemination relative to ovulation on fertility with liquid and frozen boar semen. Theriogenology 42, 831–840.

Discusión

Los resultados del presente experimento indican que la suplementación con PS puede mejorar la calidad del esperma *in vitro*, siendo su efecto dosis-dependiente. Sin embargo, el efecto de la suplementación con PS *in vivo* no fue tan evidente. Caballero *et al*. (2004) demuestran que la adicción de un 10% de PS puede mejorar la viabilidad del esperma. Así mismo, en otros estudios se observa, en base a patrones de tinción con clortetraciclina (Vadnais *et al*., 2005b), que la incubación de espermatozoides descongelados en un medio con un 10% de PS puede revertir la capacitación sufrida por los espermatozoides durante el proceso de congelación-descongelación, siendo evidente este efecto dentro de los 15 min de incubación. Del mismo modo, Vadnais y Roberts (2007) consiguieron revertir eficazmente la criocapacitación sufrida por los espermatozoides mediante la incorporación de un 10 o 20% de PS. Recientemente, Okazaki *et al*. (2009) demuestran *in vivo* que la descongelación de semen de verraco en un 10% de PS induce una mejora en el porcentaje de gestación. Por el contrario, Abad *et al*. (2007a) determinan que la descongelación de semen de verraco en un medio suplementado con un 10% de PS, no tiene ningún efecto sobre la formación de un reservorio espermático funcional en el oviducto de la cerda, ni sobre la fertilidad de cerdas inseminadas a las 2 ó 12 horas antes del MPO. Aunque especulativo, dado el aumento en el porcentaje de gestación pero no de partos asociado a la suplementación con un 50% de PS (Experimento 2), es posible que la mejora de la fertilidad asociada a la suplementación con PS fuera enmascarada por pérdidas tempranas de gestación. De

hecho, Waberski *et al*. (1994b) no observan diferencias en la utilización de semen refrigerado y criopreservado cuando las inseminaciones con semen criopreservado se realizan entre las 2 y 4 horas antes de la ovulación inducida hormonalmente. La pérdida de gestaciones asociada a la utilización de semen criopreservado podría ser debida a efectos perjudiciales sobre la integridad del ADN del espermatozoide inducidos durante el proceso de congelación-descongelación. De hecho, Peris *et al*. (2007) muestran un aumento en la fragmentación del ADN de morueco asociado a la criopreservación. Curiosamente, Maxwell *et al*. (1999) indican una mejora en la fertilidad en ovejas cuando el semen de morueco se descongela en un medio enriquecido con un 30% de PS. Esta disparidad de resultados *in vivo*, aunque sea en diferentes especies, que no muestran efecto de la suplementación con un 10% de PS en verraco, pero si un beneficio cuando suplementamos con un 30% de PS el semen de morueco, apoya los resultados actuales que indican que el efecto del PS es dosis-dependiente. Los resultados de este experimento muestran el marcado efecto beneficioso de la suplementación con un 50% de PS sobre los parámetros de calidad seminal valorados, y el escaso efecto observado cuando la suplementación fue del 10%. Es evidente a partir de los presentes estudios, que el efecto del principio activo o principios activos del PS sobre la funcionalidad de los espermatozoides *in vitro*, y posiblemente *in vivo*, es dependiente de su concentración.

El PS está compuesto por una mezcla de hormonas, electrolitos y proteínas, cuyos efectos incluyen la regulación de la movilidad espermática y de la actividad del miometrio para el transporte de los espermatozoides hacia el oviducto, actividad antioxidante, modulación de la respuesta inflamatoria uterina para la protección de los espermatozoides, y regulación del momento de la ovulación. Además de proporcionar un

vehículo para el transporte de los espermatozoides, el PS proporciona energía para el esperma y también puede modular su fisiología (Maxwell *et al.*, 1996; Centurion *et al*., 2003). De particular interés han sido las proteínas contenidas en el PS, ya que existe una variación tanto del perfil de proteínas como de su concentración en las diferentes fracciones del eyaculado (Saravia *et al*., 2009). Además, se han encontrado diferencias en la capacidad de los espermatozoides de sobrevivir al proceso de criopreservación según la fracción del eyaculado a la que perteneciesen (Saravia *et al*., 2009). De esta forma, tal como describe Caballero *et al*. (2008), la familia de espermadhesinas representa más del 90% de las proteínas del PS, clasificándose en función de su afinidad (AQN-1; AQN-3 y AWN) o no (heterodímero PSP-I/PSP-II) por la heparina. Los monómeros PSP-I y PSP-II representan aproximadamente el 50% de proteínas del PS. La función de estas espermadheisas sería la de prevenir las reacciones acrosomales prematuras, regular la capacitación espermática, además de beneficios sobre la viabilidad del esperma (Caballero *et al*., 2008), lo cual podría confirmar nuestros resultados. Mientras que la suplementación de espermatozoides descongelados con 10% de PS no tuvo un efecto beneficioso sobre el tamaño de la camada (Abad *et al*., 2007b), nuestros resultados muestran un aumento en el número de lechones nacidos cuando la descongelación se lleva a cabo en un medio suplementado con un 50% de PS. Estos resultados pueden ser una consecuencia del efecto reparador por parte del PS del daño sufrido como consecuencia del proceso de criopreservación (choque frío, estrés osmótico y formación de cristales de hielo intracelular durante la congelación y posterior descongelación de los espermatozoides), así como del efecto antioxidante que limita aún más el daño sufrido por el espermatozoide, aumentando la población de

espermatozoides viables. Alternativamente, esta acción beneficiosa puede ser debida al efecto del PS sobre la inmunomodulación del útero, ya que se ha observado que el PS puede influir en la modulación de la respuesta inflamatoria producida tras la inseminación, protegiendo a los espermatozoides (Rozeboom *et al*., 2001), así como estar involucrado en la regulación del desarrollo embrionario temprano (O'Leary *et al*., 2004).

En resumen, la adicción de un 50% de PS a los medios de dilución de los espermatozoides para su descongelación mejora significativamente la viabilidad y movilidad espermática, prolongando la vida útil de los espermatozoides, con la consiguiente mejora en la prolificidad de la cerda.

Cuarta publicación.

Effect of thawing frozen boar sperm in 50% seminal plasma on sow fertility.

The pig Journal (2011) 65:59-61.

Resultados

En el presente experimento 98 cerdas recibieron una inyección de 900 UI de eCG en el momento del destete, seguidas de 5 mg de LH porcina a las 80 horas y una única IA-PC a las 36 horas después de la inyección de LH porcina. Todas las cerdas fueron seleccionadas en base a su número de parto y distribuidas en 3 grupos dependiendo del tipo de IA-PC realizada: 1) IA-PC con semen refrigerado (3×10^9 espermatozoides), 2) IA-PC con semen criopreservado (5×10^9 espermatozoides), y 3) IA-PC con semen criopreservado (5×10^9 espermatozoides), suplementado con un 50% de PS. El semen, tanto refrigerado como criopreservado, procede de un centro de inseminación artificial comercial, compuesto por un pool de espermatozoides de 2 verracos, mientras que el PS procedía de un pool de 10 verracos de la propia granja. Se permitió a todas las cerdas llevar a término la gestación.

La IA-PC de cerdas con semen criopreservado suplementado con un 50% de PS provoca una reducción del porcentaje de partos ($P\leq0,01$), en comparación con las cerdas inseminadas con semen refrigerado, pero no hubo diferencias significativas sobre el tamaño de la camada. El porcentaje de partos de las cerdas inseminadas con semen criopreservado fue intermedio y no hubo un efecto significativo sobre el tamaño de camada.

EFFECT OF THAWING FROZEN BOAR SPERM IN 50% SEMINAL PLASMA ON SOW FERTILITY

J.C. GARCIA[1]
J.C. DOMINGUEZ [1,2]
R. MANJARIN[3]
B. ALEGRE[2]
R.N. KIRKWOOD[3]

[1] Department of Medicine, Surgery and Veterinary Anatomy, University of Leon, Leon, Spain.
[2] Centrotec., Campo de Villavidel, Leon, Spain.
[3] Department of Large Animal, Clinical Sciences, Michigan State University, East Lansing, Michigan, USA.

The Pig Journal (2011) 65 59-61

SUMMARY

To examine the effects of seminal plasma, 97 multiparous Yorkshire sows each received 900 IU eCG at weaning and then 5mg pLH 80 hours later to control time of ovulation. At 36 hours after pLH, sows were assigned on the basis of parity to receive a single intra-uterine insemination of 3 x 10^9 fresh sperm (CON) or 5 x 10^9 cryo-preserved sperm thawed (FT) into 80mL extender without FT or with 50% Seminal Plasma (SP) (FT- SP). Compared with CON sows, FT-SP sows had decreased (P<0.01) farrowing rate and FT sows were intermediate. Litter sizes were unaffected by treatment.

INTRODUCTION

Swine artificial insemination (AI) almost exclusively involves fresh liquid semen collected within the previous three to seven days, depending on extender. However, there is data suggesting that full fertility requires fresh semen to be used one to two days after collection regardless of extender type (Bennemann et al., 2005). Although this short timeframe will usually allow inseminations to occur at an appropriate time for sow fertility, it limits the time available to detect potential pathogenic contaminants such as PRRS and PCV2 viruses. This time limitation is a risk factor for disease transmission via semen but could be resolved if cryo-preserved (FT) sperm were used. However, sow fertility to insemination of FT sperm is usually lower because of sperm membrane damage during freezing and thawing, expressed as the induction of a premature aging or capacitation-like status of the sperm cells and increased indicators of apoptosis (Martin *et al.*, 2004; Bravo *et al.*, 2005).

Presumably due to their cryo-capacitated state, FT sperm do not form an adequate functional sperm reservoir in the oviducts (Abad *et al.*, 2007a) resulting in a short fertile lifespan. Improved fertility to FT insemination may be realised if sperm are deposited during the four hour period before ovulation (Waberski *et al.*, 1994) or the cryo-injury is repaired. Using chlortetracycline staining, it has been demonstrated that incubation of FT boar sperm in media supplemented with 10% seminal plasma (SP) appeared to prevent or reverse cryocapacitation (Vadnais *et al.*, 2005). Supplementing FT ram semen with 30% SP has been shown to improve *in vivo* fertility of ewes (Maxwell *et al.*, 1999), but responses to SP-supplementation of boar semen have proven unpredictable, with insemination of 10% SP-supplemented boar sperm resulting in either improved female fertility (Okazaki *et al.*, 2009) or not effect (Abad *et al.*, 2007b). It may be that a consistent effect of SP on sow fertility depends on the level of supplementation and, possibly, the resultant number of viable sperm. We recently noted improved *in vitro* sperm viability and longevity when FT boar sperm were thawed in 50% SP but not when thawed in 10% SP (Garcia *et al.*, 2010). Further, maintenance of sow fertility with insemination of fewer viable sperm is achieved by intra-uterine insemination (Watson and Behan, 2002). The present experiment was undertaken to test the hypothesis that sow fertility would be improved if FT boar sperm were thawed in 50% SP and then deposited into the uterus.

MATERIAL AND METHODS

At weaning, 98 multiparous Yorkshire sows were assigned to the control of their oestrus and ovulation by injection of 900 IU equine chorionic gonadotrophin (eCG; Pregnecol®, Bioniche Animal Health, Belleville, ON) and 5mg porcine luteinising hormone (pLH; Lutropin, Bioniche Animal Health) 80 hours later. The predicted time of ovulation (PTO) was 38 hours after pLH injection (Abad *et al.,* 2007b). The sows were assigned by parity to receive a single intra-uterine insemination at 36 hours after pLH injection if they exhibited oestrous behaviour in the presence of a boar. Oestrus detection was not employed prior to this time. Inseminations were 3 x 10^9 fresh sperm in 80mL X-cell extender (IMV international, Maple Grove. MN; n=34), 5 x 10^9 FT sperm thawed in 80mL X-cell extender (n=32), or 5 x 10^9 FT sperm

thawed in 80mL X-cell extender having 50% (v/v) seminal plasma (n=32).

The SP was obtained after centrifugation (800xg for 10 minutes at 25ºC) of a pool of semen derived from 10 Yorkshire boars standing in the boar stud of a commercial sow farm and was stored at -20ºC until needed. Each boar in the pool was between 12 and 36 months of age and had been test-mated to confirm fertility. The ejaculates used to supply the SP had greater than 80% sperm motility. Thawing of SP was done in a 37ºC wather bath and the SP was added to extender prior to thawing sperm to allow immediate contact between the sperm and SP constituents. Both fresh and FT sperm doses were pools of the same two boars and were obtained commercially (International Boar Semen, IA). Sperm motility at cryo-preservation was 85% and 90% with 5.2% and 21% abnormal cells (proximal or distal droplets. detached heads or coiled tails), respectively. Both boars demonstrated 65% to 70% post-thaw motility on a caffeine slide. The FT semen in 5ml straws was thawed according to the suppliers protocol, which involved exposure to room temperature for seven seconds followed by submersion in 42ºC water bath for 43 seconds. Sows were allowed to go to term and farrowing rates and subsequent litter sizes were recorded.

Data was analysed using the Number Cruncher Statistical System (NJ Hintze, Kayesville, Ut). Differences in farrowing rates were compared using Chi square. Litter sizes (total born) were tested using GLM analysis of variance including treatment and parity as main effects in the model. Results are presented as mean ± SE and P<0.05 was considered significant.

RESULTS

Compared with sows inseminated with fresh semen, the insemination of sows with cryo-preserved boar sperm extended in 50% SP caused a reduction (P<0.01) in farrowing rate, but litter sizes were not significantly different (see Table 1). Farrowing rate of the FT inseminated sows was intermediate and again, there was no significant effect on litter size (see Table 1).

DISCUSSION

In the present study, insemination of SP-supplemented FT sperm was associated with lower farrowing rates. This is in contrast to previous data indicating that SP was associated with improved gilt and sow fertility (Crabo and Einarsson, 1971; Einarsson *et al*., 1973; Okazaki et al., 2009). We had previously demonstrated a lack of effect of 10% SP on sow performance (Abad *et al*., 2007b), but improved *in vitro* sperm quality when FT sperm were extended in 50% SP (Garcia *et al*., 2010). Furthermore, Garcia *et al*., (2010) also noted that FT inseminated sows had reduced litter sizes, but this affect was not evident with SP supplemented FT semen. An effect of 50% SP was not evident for farrowing rate in the previous study and we reasoned that this was due to an inadequate number of viable sperm. If so, an intra-uterine insemination, as employed in the present study, could improve all aspects of fertility to FT insemination. However, the present results do not support this suggestion. Indeed, extension of FT sperm in SP was actually detrimental to fertility. The contrasting results of the present and our previous study may reflect the source of the SP. In the study of Garcia *et al*., (2010) autologous SP was used while in the present study pooled SP was derived from 10 different boars. It is known that the SP of some individual boars can be detrimental to sperm function (Caballero *et al*., 2004), and it is possible that the SP of some of the 10 donor boars was detrimental to fertility. Prior to undertaking this study, we reasoned that while this effect was possible, the use of a pool of SP would mask any potential adverse effect. However in the absence of assessments of the SP from individual boars, the potential for some boars to negatively affect the efficacy of a pool of SP remains unknown.

From the data presented, we conclude that sow fertility to insemination of cryo-preserved sperm may be affected detrimentally by thawing the sperm in 50% SP. The unpredictable fertility response to supplementation of cryo-preserved boar sperm with SP suggests that SP from individual donor boars should be critically examined prior lo its use in semen extension media.

Table 1 - *Effect of thawing cryo-preserved (FT) boar sperm in 50% seminal plasma (SP) on sow fertility*

	Fresh semen	FT	FT plus SP
Number of sows	34	32	32
Farrowing rate %	85,3[a]	68,8[ab]	53,1[b]
Total born litter sive [1]	10,9 ± 0,74	8,5 ± 0,85	9,8 ± 0,97

Means followed by different letters differ; [ab] (P<0,01), [1] Means ± SE

ACKNOWLEDGEMENTS

We gratefully acknowledge the financial support of Ontario Pork.

REFERENCES

Abad, M., Garcia, J.C, Sprecher, D.J., Cassar, G.,Friendship, R.M., Buhr, M.M. and Kirkwood, R.N. (2007b) Effect of insemination-ovulation interval and addition of seminal plasma on sow fertility to insemination of cryopreserved sperm. Reproduction in Domestic Animals, **42**, 418-422.

Abad, M., Sprecher, D.J., Ross, P., Friendship, R.M. and Kirkwood, R.N. (2007a) Effect of sperm cryopreservation and supplementing semen doses with seminal plasma on the establishment of a sperm reservoir in gilts. Reproduction in Domestic Animals, **42**,149-152.

Bennemann, P.E., Diehl, G.N., Milbradt, E., Vidor, R.M., Fries, H.C., Wentz, I., Bernardi, M.L. and Bortolozzo, F.P.(2005) Artificial insemination of gilts with 1.5 billion sperms stored in different periods associated with different pre-ovulatory intervals. Reproduction in Domestic Animals, **40**, 507-510.

Bravo, M.M., Aparicio, I.M. Garcia-Herreros, M., Gil, M.C., Peña, F.J. and García-Martín, L.J. (2005) Changes in tyrosine phosphorylation associated with true capacitation and capacitation like state in boar sperrnatozoa. Molecular Reproduction and Development, **71**, 88-96.

Caballero,I., Vazquez,J.M., Centurion, F., Rodriguez-Martinez.H., Parrilla, I., Roca, J., Cuello, C. and Martinez, E.A. (2004) Comparative effects of autologous and homologous seminal plasma on the viability of largely extended boar spermatozoa. Reproduction in Domestic Animals, **39**, 370- 375.

Crabo, B. and Einarsson. S. (1971) Fertility of deep frozen boar spermatozoa. Acta Veterinaria Scandinavica. **12**, 125-127.

Einarsson, S., Swensson, T. and Viring, S. (1973) A field trial on the fertility of deep-frozen boar spermatozoa. Nordic Veterinary Medicine, **25**, 372-376.

Garcia,J.C., Dominguez, J.C., Pena, F.J., Alegre, B.,Gonzalez,R., Castro, M.J., Habing, G.G. and Kirkwood, R.N. (2009) Thawing boar semen in seminal plasma: Effects on sperm quality in vitro and sow fertility. Animal Reproduction Science, **119**, 160-165.

Martin, G., Sabido, O., Durand, P. and Levy, R. (2004) Cryopreservation induces an apoptosis like mechanism in bull sperm. Biology of Reproduction, **71**. 28-37.

Maxwell, W.M., Evans, G., Mortimer, S.T., Gillan, L., Gellatly, E.S. and McPhie, C.A. (1999) Normal fertility in ewes after cervical insemination with frozen-thawed spermatozoa supplemented with seminal plasma. Reproduction, Fertility and Development, **11**, 123-126.

Okazaki, T., Abe, S., Yoshida, S. and Shimada, M. (2009) Seminal plasma damages sperm during cryo-preservation, but its presence during thawing improves semen quality and conception rates in boars with poor post-thaw semen quality. Theriogenology, **71**. 491-498.

Vadnais, M.L., Kirkwood, R.N., Sprecher, D.J. and Chou, K. (2005b) Effects of extender, incubation temperature, and added seminal plasmas on capacitation of cryopreserved, thawed boar sperm as determined by chlortetracycline staining. Animal Reproduction Science, **90**. 347-354.

Waberski, D., Weitze, K.F., Gleumes, T., Schwartz, M., Willmen, T., and Petzold, R. (1994) Effect of time of insemination relative to ovulation on fertility with liquid and frozen boar semen. Theriogenology, **42**, 831-840.

Watson, P.F., and Behan, J.R. (2002) Intrauterine insemination of sows with reduced sperm numbers: results of a commercially based field trial. Theriogenology. **57**, 1683-1693.

Discusión

Los resultados del presente experimento, confirman que la suplementación de espermatozoides criopreservados con PS provoca a una disminución del porcentaje de partos. Estos resultados no concuerdan con estudios publicados anteriormente, que indican un aumento de la fertilidad inducida por la suplementación con PS (Crabo y Einarsson, 1971; Einarsson *et al.*, 1973; Okazaki *et al.*, 2009), mientras que Abad *et al*. (2007b) muestran una falta de mejora de la suplementación con un 10% de PS sobre la fertilidad de la cerda. Por otra parte, hemos observado un incremento de la calidad espermática y un aumento del tamaño de la camada cuando el semen criopreservado de verraco se descongela en un medio suplementado con un 50% de PS, mientras que el efecto de la suplementación no fue evidente sobre el porcentaje de partos (Garcia *et al*., 2010), con lo que concluimos que los resultados se debían a la inseminación con un número insuficiente de espermatozoides viables. Si es así, una IA intrauterina, tal como se empleó en el presente experimento, podría mejorar la fertilidad de las inseminaciones realizadas con semen criopreservado. Sin embargo, los presentes resultados no apoyan esta hipótesis. De hecho, la suplementación del semen criopereservado con PS fue perjudicial para la fertilidad. La disparidad de resultados entre ambos experimentos puede ser debida a la fuente del PS. En nuestro primer experimento (Garcia *et al*., 2010) se utilizó PS de los mismos verracos utilizados para la criopreservación, mientras que en el presente experimento el PS se obtuvo de un pool de 10 verracos diferentes. Caballero *et al*. (2004) constatan que el PS de algunos verracos puede ser perjudicial para la

función espermática, algo que podría haber sucedido con alguno de los 10 verracos donantes usados en nuestro estudio. De hecho, se valoró la posibilidad de que este efecto fuera posible, y se decidió utilizar un pool de PS para enmascarar el potencial efecto individual. Sin embargo, en ausencia de evaluaciones individuales del PS, la posibilidad de que alguno de los verracos pueda afectar negativamente a la eficacia del pool de PS sigue siendo desconocida.

A partir de los resultados obtenidos, se concluye que la fertilidad de la cerda puede verse afectada perjudicialmente por la IA con semen criopreservado en un medio suplementado con un 50% de PS. La respuesta impredecible de la fertilidad a la suplementación de los espermatozoides criopreservados de verraco con PS, sugiere que el PS de los verracos donantes debe ser examinado exhaustivamente antes de su uso en medios de dilución seminal, tal como lo realizamos en el experimento anterior.

Conclusiones

PRIMERA:

En cerdas en anestro, los dos tratamientos alternativos ensayados, aplicación de eCG exclusivamente o una combinación de FSH + eCG, no tuvieron ningún efecto estadísticamente significativo, comparándolos con el tratamiento tradicional con PG600®, en cuanto a la inducción del celo, ovulación, fertilidad y tamaño de la camada.

SEGUNDA:

En cerdas destetadas, los resultados obtenidos con la PG600® y los tratamientos alternativos propuestos, mediante suplementación de hCG a las cero y veinticuatro horas posteriores, dependen de la paridad de las cerdas; de forma y manera que solo en las de primero y segundo parto constatamos un incremento, en todos los casos de forma estadísticamente significativa, con respecto al control, del porcentaje de inducción del celo. Sin embargo, en las cerdas de tres o más partos no se comprueba este efecto, e incluso se aprecia que en el grupo suplementado con el doble de hCG a las 24 horas, hay un descenso del porcentaje de partos con respecto al resto de grupos experimentales.

TERCERA:

Con la inseminación poscervical única, tanto veinticuatro como seis horas antes del momento previsto de la ovulación, se obtienen resultados de fertilidad y tamaño de la camada, sin diferencias estadísticamente significativas, en comparación con la inseminación cervical tradicional doble. Resultado que se mantiene incluso cuando, en la inseminación poscervical, se reduce a la mitad el número de espermatozoides por dosis.

Se constata, no obstante, que los mejores resultados absolutos se obtienen con la inseminación poscervical, y un número de espermatozoides de dos mil quinientos millones por dosis, aplicada seis horas antes del momento previsto de la ovulación.

CUARTA:

La suplementación con plasma seminal del semen criopreservado porcino, en el momento de su descongelación, incrementa tanto la viabilidad como la movilidad espermática, siendo en todo caso su efecto dosis-dependiente. Así, con respecto a la viabilidad, ese incremento solamente es estadísticamente significativo cuando representa el cincuenta por ciento del volumen final. En cuanto a la movilidad, también la adicción de un diez por ciento de plasma seminal incrementa significativamente la motilidad a partir de las dos horas de incubación. No obstante, el efecto de la adición de un cincuenta por ciento de plasma seminal se constata durante toda la incubación y estadísticamente superior tanto con respecto al control, como al grupo con un diez por ciento de plasma seminal.

QUINTA:

De las pruebas "in vivo" realizadas sobre los resultados de fertilidad y prolificidad, podemos concluir que la adición de un cincuenta por ciento de plasma seminal al semen congelado porcino en el momento de su descongelación, no afecta a la fertilidad pero sí a la prolificidad, toda vez que la mantiene en niveles comparables con los obtenidos con semen refrigerado, soslayando por tanto la disminución de lechones nacidos cuando se utiliza semen criopreservado sin plasma seminal. No obstante,

cabe resaltar la importancia de que el plasma seminal proceda de los mismos sementales de los que se ha realizado la criopreservación, ya que en caso contrario, hemos detectado una pérdida de fertilidad significativa con respecto al semen refrigerado.

Bibliografía

Althouse, G.C., Hixon, J.E. (1999). Use of commercially available ELISAs to help determine estrous status in female swine. *Swine Health Prod. 7,* 65–68.

Abad, M. (2006). Sow fertility to insemination of cryopreserved sperm. *M.Sc. Thesis*, *Michigan State University.*

Abad, M., Garcia, J.C., Sprecher, D.J., Cassar, G., Friendship, R.M., Buhr, M., Kirkwood, R.N. (2007b). Effect of insemination–ovulation interval and addition of seminal plasma on sow fertility to insemination of cryopreserved sperm. *Reprod. Dom. Anim*. *42*, 418–422.

Abad, M., Sprecher, D.J., Ross, P., Friendship, R.M., Kirkwood, R.N. (2007a). Effect of sperm cryopreservation and supplementing semen doses with seminal plasma on the establishment of a sperm reservoir in gilts. *Reprod. Dom. Anim. 42*, 149–152.

Bates, R.O., Day, B.N., Britt, J.H., Clark, L.K., Brauer, M.A., (1991). Reproductive performance of sows treated with a combination of pregnant mare's serum gonadotropin and human chorionic gonadotropin at weaning in the summer. *J.Anim. Sci. 69*, 894–898.

Bennemann, P.E., Diehl, G.N., Milbradt, E., Vidor, R.M., Fries, H.C.C., Wentz, I., Bernardi, M.L., Bortolozzo, F.P., (2005). Artificial insemination of gilts with 1.5 billion sperms stored in different periods associated with different pre-ovulatory intervals. *Reprod. Dom. Anim. 40*, 507–510.

Bolamba, D., Dubuc, A., Dufour, J.J., Sirard, M.A. (1996). Effects of gonadotropin treatment on ovarian follicle growth, oocyte quality and in vitro fertilization of oocytes in prepubertal gilts. *Theriogenology 46*, 717–726.

Bracken, C.J., Lamberson, W.R., Safranski, T.J., Lucy, M.C. (2003). Factors affecting follicular populations on day 3 postweaning and interval to ovulation in a commercial sow herd. *Theriogenology 60*, 11–20.

Bracken, C.J., Seaman-Bridges, J.S., Safranski, T.J., Lucy, M.C. (2006). Ovarian follicular development, estrus, and ovulation in seasonally anestrous sows treated seven days post weaning with equine and human chorionic gonadotropins. *J. Swine Health Prod. 14*, 207–209.

Bravo, M.M., Aparicio, I.M., Garcia-Herreros, M., Gil, M.C., Peña, F.J., García-Marín, L.J. (2005). Changes in tyrosine phosphorylation associated with true capacitation and capacitation like state in boar spermatozoa. *Mol. Reprod. Dev. 71*, 88–96.

Breen, S.M., Rodriguez-Zas, S.L., Knox, R.V. (2006). Effect of altering dose of PG600 on reproductive performance responses in prepubertal gilts and weaned sows. *Anim. Reprod. Sci. 95,* 316–323.

Britt, J.H., Esbenshade, K.L., Heller, K. (1986). Responses of seasonally anestrous gilts and weaned primiparous sows to treatment with pregnant mare's serum gonadotropin and altrenogest. *Theriogenology 26*, 697–707.

Brussow, K. P., Schneider, F., Kanitz, W., Ratky, J., Kauffold, J., Wahner, M. (2009). Studies on fixed-time ovulation induction in the pig. In *Control of Pig Reproduction VIII*. Rodriguez-Martinez, H., Vallet, J.L. Ziecik, A.J., ed. Nottingham University Press, Nottingham, UK, pp: 187–198.

Caballero, I., Vazquez, J.M., Centurion, F., Rodriguez-Martinez, H., Parrilla, I., Roca, J., Cuello, C., Martinez, E.A. (2004). Comparative effects of autologous and homologous seminal plasma on the viability of largely extended boar spermatozoa. *Reprod. Dom. Anim. 39,* 370–375.

Caballero, I., Vazquez, J.M., Garcia, E.M., Parrilla, I., Roca, J., Calvette, J.J., Sanz, L., Martinez, E.A. (2008). Major proteins of boar seminal plasma as a tool for biotechnological preservation of spermatozoa. *Theriogenology 70*, 1352–1355.

Casas, I., Sancho, S., Briz, M., Pinart, E., Bussalleu, E., Yeste, M., Bonet, S. (2010). Fertility after post-cervical artificial insemination with cryopreserved sperm from boar ejaculates of good and poor freezability. *Anim. Reprod. Sci. 118(1),* 79-83.

Cassar, G., Kirkwood, R.N., Poljak, Z., Bennett-Steward, K., Friendship, R.M. (2005). Effect of single or double insemination on fertility of sows bred at an induced estrus and ovulation. *J. Swine Health Prod. 13*, 254–258.

Cassar, G., Kirkwood, R.N., Poljak, Z., Friendship, R.M. (2004). Effect of estrogen formulation and site of deposition on fertility of artificially inseminated sows treated with hCG to induce ovulation. *J. Swine Health Prod. 12*, 285–287.

Centurion, F., Vazquez, J.M., Calvete, J.J., Roca, J., Sanz, L., Parrilla, I., Garcia, E.M., Martinez, E.A. (2003). Influence of porcine spermadhesins on the susceptibility of boar spermatozoa to high dilution. *Biol. Reprod. 69*, 640–646.

Close, R.W., Liptrap, R.M. (1975). Plasma progesterone levels in sows with induced cystic ovarian follicles. *Res. Vet. Sci. 19*, 28–34.

Crabo, B., Einarsson, S. (1971). Fertility of deep frozen boar spermatozoa. *Acta Vet. Scand. 12,* 125–127.

De Rensis, F., Benedetti, S., Silva, P., Kirkwood, R.N. (2003). Fertility of sows following artificial insemination at a gonadotrophin-induced estrus coincident with weaning. *Anim. Reprod. Sci. 76*, 245–250.

Driancourt, M.A., Locatelli, A., Prunier, A. (1995). Effects of gonadotrophin deprivation on follicular growth in gilts. *Reprod. Nutr. Dev. 35*, 663–673.

Dziuk, P.J., Baker, R.D. (1962). Induction and control of ovulation in swine. *J. Anim. Sci. 21*, 697–699.

Einarsson, S., Swensson, T., Viring, S. (1973). A field trial on the fertility of deep-frozen boar spermatozoa. *Nord. Vet. Med. 25,* 372–376.

Einarsson, S., Viring, S. (1973). Distribution of frozen-thawed spermatozoa in the reproductive tract of gilts at different time intervals after insemination. *J. Reprod. Fertil. 32*, 117–120.

Eriksson, B.M., Rodriguez-Martinez, H. (2000). Effect of freezing and thawing rates on the post-thaw viability of boar spermatozoa frozen in FlatPacks and Maxi-straws. *Anim. Reprod. Sci. 63,* 205–220.

Estienne, M.J., Hartsock, T.G. (1998). Effect of exogenous gonadotropins on the wean-to-estrus interval in sows. *Theriogenology 49,* 823–828.

Fazeli, A., Duncan, A.E., Watson, P.F., Holt, W.V. (1999). Sperm–oviduct interaction: induction of capacitation and preferential binding of uncapacitated spermatozoa to oviductal epithelial cells in porcine species. *Biol. Reprod. 60,* 879–886.

Fraser, L., Strzezek, J. (2007). Effect of different procedures of ejaculate collection, extenders and packages on DNA integrity of boar spermatozoa following freezing–thawing. *Anim. Reprod. Sci. 99,* 317–329.

Gama, R.D., Vianna, W.L., Pinese, M.E., de Campos Rosseto, A., de Sant'Anna Moretti, A. (2005). Different doses of porcine luteinizing hormone in precocious puberty induction in gilts. *Reprod. Dom. Anim. 40*, 433–435.

Garcia, J.C., Dominguez, J.C., Pena, F.J., Alegre, B., Gonzalez, R., Castro, M.J., Habing, G.G., Kirkwood, R.N. (2009). Thawing boar semen in seminal plasma: Effects on sperm quality in vitro and sow fertility. *Anim.Reprod. Sc. 119,* 160-165.

Garcia, A., Estienne, M.J., Harper, A.F., Knight, J.V. (2004). Failure of gonadotropin therapy to induce estrus in gilts treated with a GnRH analog to suppress ovarian activity. Intern. *J. Appl. Res. Vet. Med. 3*, 195–200.

Guthrie, H.D., Bolt, D.J., Cooper, B.S. (1990). Effects of gonadotropin treatment on ovarian follicle growth and granulosal cell aromatase activity in prepubertal gilts. *J. Anim. Sci. 68,* 3719–3726.

Harrison, R.A., Vickers, S.E. (1990). Use of fluorescent probes to assess membrane integrity in mammalian spermatozoa. *J. Reprod. Fertil. 88*, 343–352.

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, 1063–1070.

Hunter, R.H.F. (1967). Porcine ovulation after injection of human chorionic gonadotrophin. *Vet. Rec. 81*, 21–23.

Jackson, A.L., Breen, S.M., Rodriguez-Zas, S.L., Knox, R.V. (2006). Evaluation of methodology for administration of porcine FSH for use in estrus induction and for increasing ovulation rate in prepubertal gilts. *Theriogenology 66,*1042–1047.

Johnson, L.A., Aalbers, J.G., Willems, C.M.T., Rademaker, J.H.M., Rexroad, C.E. (1982). Use of boar spermatozoa for artificial insemination III. Fecundity of boar spermatozoa stored in Beltsville liquid and Kiev extenders for three days at 18ºC. *J. Anim. Sci. 54*, 132–136.

Johnson, L.A., Weitze, K.F., Fiser, P., Maxwell, W.M.C. (2000). Storage of boar semen. *Anim. Reprod. Sci. 62,* 143–172.

Kemp, B., Soede, N.M. (1996). Relationship of weaning-to-estrus interval to timing of ovulation and fertilization in sows. *J. Anim. Sci. 74,* 944–949.

Kirkwood, R.N. (1999). Pharmacological intervention in swine reproduction. *Swine Health Prod. 7,* 29–35.

Kirkwood, R.N., Aherne, F.X., Foxcroft, G.R. (1998). Effect of gonadotropin at weaning on reproductive performance of primiparous sows. *Swine Health Prod. 6*, 51–55.

Kirkwood, R.N., Baidoo, S.K., Aherne, F.X, Sather, A.P. (1987). The influence of feeding level during lactation on the occurrence and endocrinology of the postweaning estrus in sows. *Can. J. Anim. Sci. 67*, 405–415.

Kirkwood, R.N., Soede, N.M., Dyck, G.W., Thacker, P.A. (1995). The effect of immunoneutralization of PMSG at a gonadotropin-induced oestrus on the duration of ovulation and reproductive performance of sows. *Can. J. Anim. Sci. 61,* 321–324.

Knox, R.V. (2005). Recruitment and selection of ovarian follicles for determination of ovulation rate in the pig. *Domest. Anim. Endocrinol. 29*, 385–397.

Knox, R.V., Rodriguez-Zas, S.L., Miller, G.M., Willenburg, K.L., Robb, J.A. (2001). Administration of PG600 to sows at weaning and time of ovulation as determined by transrectal ultrasound. *J. Anim. Sci. 79,* 796–802.

Kraeling, R.R., Kesner, J.S., Estienne, M.J., Estienne, C.E., Barb, C.R., Rampacek, G.B. (1990). Follicle growth in hypophysial stalk-transected pigs given pulsatile GnRH and pregnant mare serum gonadotropin. *Domest. Anim. Endocrinol. 7,* 395–402.

LaPolt, P.S., Oikawa, M., Jia, X.-C., Dargen, C., Hsueh, A.J.W. (1990). Gonadotropin-induced up- and down-regulation of rat ovarian LH receptor message levels during follicular growth, ovulation and luteinization. *Endocrinology 126,* 3277–3279.

Liu, J., Koenigsfeld, A.T., Cantley, T.C., Boyd, C.K., Kobayashi, Y., Lucy., M.C. (2000). Growth and the initiation of steroidogenesis in porcine follicles are associated with unique patterns of gene expression for individual components of the ovarian insulin-like growth factor system. *Biol. Reprod. 63*, 942–952.

Lucy, M.C., Liu, J., Boyd, C.K., Bracken, C.J. (2001). Ovarian follicular growth in sows. *J. Reprod. Fertil. Suppl. 58*, 31–45.

Manjarin, R., Dominguez, J.C., Castro, M.J., Alegre, B., Driancourt, M.A., Kirkwood R.N. (2010). Effect of hCG on early luteal serum progesterone concentrations in PG600-treated gilts. *Reprod. Dom. Anim. 45*, 555–557.

MARGRAMA (Ministerio de Agricultura, Alimentación y Medio Ambiente). (2013). *[consulta: Diciembre 2013] [En línea]: www.magrama.gob.es/es/prensa/ultimas-noticias/.*

Martin, G., Sabido, O., Durand, P., Levy, R. (2004). Cryopreservation induces an apoptosis like mechanism in bull sperm. *Biology of Reproduction, 71*, 28-37.

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

Maxwell, W.M.C., Evans, G., Mortimer, S.T., Gillian, L., Gellatly, E.S., McPhie, C.A. (1999). Normal fertility in ewes after cervical insemination with frozen-thawed spermatozoa supplemented with seminal plasma. *Reprod. Fertil. Dev. 11*, 123–126.

Maxwell, W.M., Welch, G.R., Johnson, L.A. (1996). Viability and membrane integrity of spermatozoa after dilution and flow cytometric sorting in the presence or absence of seminal plasma. *Reprod. Fertil. Dev. 8*, 1165–1178.

Okazaki, T., Abe, S., Yoshida, S., Shimada, M. (2009). Seminal plasma damages sperm during cryopreservation, but its presence during thawing improves semen quality and conception rates in boars with poor postthaw semen quality. *Theriogenology 71*, 491–498.

O'Leary, S., Jasper, M.J., Warnes, G.M., Armstrong, D.T., Robertson, S.A. (2004). Seminal plasma regulates endometrial cytokine expression, leukocyte recruitment and embryo development in the pig. *Reproduction 128*, 237–247.

Ortega-Ferrusola, C., Sotillo-Galán, Y., Varela–Fernández, E., Gallardo- Bolaños, J.M., González-Fernández, L., Tapia, J.A., Peña, F.J. (2008). Detection of apoptosis like changes during the cryopreservation process in equine sperm. *J. Androl. 29,* 213–221.

Peláez, J., Breininger, E., Alegre, B., Peña, F.J., Domínguez, J.C. (2006). In vitro evaluation of the quality and fertilizing capacity of boar semen frozen in 0.25 ml straws. *Reprod. Dom. Anim. 41*, 153–161.

Pelland, C., Cassar, G., Kirkwood, R., Friendship, R. (2006). The influence of using intrauterine insemination with a reduced number of spermatozoa in sows with synchronized ovulation. *Proc. Am. Assoc. Swine Vets.,* 33–35.

Peris, S.I., Bilodeau, J.F., Dufour, M., Baylei, J.L. (2007). Impact of cryopreservation and reactive oxygen species on DNA integrity, lipid peroxidation and functional parameters in ram sperm. *Mol. Reprod. Dev. 77*, 878–892.

Roberts, P.K., Bilkei, G. (2005). Field experiences on post-cervical artificial insemination in the sow. *Reprod. Dom. Anim. 40*, 489–491.

Roca, J., Carvajal, G., Lucas, X., Vazquez, J.M., Martinez, E.A. (2003). Fertility of weaned sows after deep intrauterine insemination with a reduced number of frozen-thawed spermatozoa. *Theriogenology 60*, 77–87.

Roca, J., Parrilla, I., Rodriguez-Marinez, H., Gil, M.A., Cuello, C., Vazquez, J.M., Martinez, E.A. (2011). Approaches towards efficiente use of boar semen in the pig industry. *Reprod. Dom. Anim. 46(2),* 79-83.

Rozeboom, K.J., Reicks, D.L.,Wilson, M.E. (2004). The reproductive performance and factors affecting on-farm application of low-dose intrauterine deposit of semen in sows. *J. Anim. Sci. 82*, 2164–2168.

Rozeboom, K.J., Rocha-Chavez, G., Troedsson, M.H. (2001). Inhibition of neutrophil chemotaxis by pig seminal plasma in vitro: a potential method for modulating stbreeding inflammation in sows. *Reproduction. 121*, 567-572.

Rozeboom, K.J., Troedsson, M.H.T., Molitor, T.W., Crabo, B.G. (1998). The effect of spermatozoa and seminal plasma on leukocyte migration into the uterus of gilts. *J. Anim. Sci. 77,* 2201–2206.

Saravia, F., Wallgren, M., Johannisson, A., Calvete, J.J., Sanz, L., Pena, F.J., Roca, J., Rodriguez-Martinez, H. (2009). Exposure to the seminal plasma of different portions of the boar ejaculate modulates the survival of spermatozoa cryopreserved in MiniFlatPacks. *Theriogenology, 71 (4),* 662-675.

Sechin, A., Deschamps, J.C., Lucia, T., Aleixo, J.A.G., Bordignon, V. (1999). Effect of equine chorionic gonadotropin on weaning-to-first service interval and litter size of female swine. *Theriogenology 51,* 1175–1182.

Soede, N.M., Kemp, B. (1993). In synchronized pigs, the duration of ovulation is not affected by insemination and is not a determinant for early embryo diversity. *Theriogenology 39*, 1043–1053.

Steverink, D.W.B., Soede, N.M., Groenland, G.J.R., van Schie, F.W., Kemp, B. (1999). Duration of oestrus in relation to reproduction results in pigs on commercial farms. *J. Anim. Sci. 77,* 801–809.

Suzuki, K., Asano, A., Eriksson, B., Niwa, K., Nagai, T., Rodriguez-Martinez, H. (2002). Capacitation status and in vitro fertility of boar spermatozoa: effects of seminal plasma, cumulus-oocyte-complexes-conditioned medium and hyaluronan. *Int. J. Androl. 25*, 84–93.

Tantasuparuk, W., Lundeheim, N., Dalin, A.M., Kunavongkrit, A., Einarsson, S. (2001). Weaning-to-service interval in primiparous sows and its relationship with longevity and piglet production. *Livest. Prod. Sci. 69*, 152–162.

Tienthai, P., Johannisson, A., Rodriguez-Martinez, H. (2004). Sperm capacitation in the porcine oviduct. *Anim. Reprod. Sci. 80*, 131–146.

Vadnais, M.L., Kirkwood, R.N., Sprecher, D.J., Chou, K. (2005b). Effect of extender, incubation temperature, and added seminal plasma on capacitation of cryopreserved, thawed boar sperm as determined by chlortetracycline staining. *Anim. Reprod. Sci. 90,* 347–354.

Vadnais, M.L., Kirkwood, R.N., Tempelman, R.J., Sprecher, D.J., Chou, K. (2005a). Effect of cooling and seminal plasma on the capacitation status of fresh boar sperm as determined using chlortetracycline assay. *Anim. Reprod. Sci. 87*, 121–132.

Vadnais, M.L., Roberts, K.P. (2007). Effects of seminal plasma on cooling induced capacitative changes in boar sperm. *J. Androl. 28*, 416–422.

Waberski, D., Weitze, K.F., Lietmann, C., Lubbert zur Lage, W., Bortolozzo, F.P., Willmen, T., Petzoldt, R. (1994a). The initial fertilizing capacity of longterm-stored liquid boar semen following pre- and postovulatory insemination. *Theriogenology 41*, 1367–1377.

Waberski, D., Weitze, K.F., Gleumes, T., Schwartz, M., Willmen, T., Petzold, R. (1994b). Effect of time of insemination relative to ovulation on fertility with liquid and frozen boar semen. *Theriogenology 42,* 831–840.

Watson, P.F., Behan, J.R. (2002). Intrauterine insemination of sows with reduced sperm numbers: results of a commercially based field trial. *Theriogenology 57*, 1683–1693.

Webster, W.R. (1978). Evaluation of a pregnant mare's serum and human chorionic gonadotrophin mixture for alleviating summer infertility in sows. *Aust. Vet. J. 54*, 26–29.