



**UNIVERSIDAD DE LEÓN**

**Facultad de Veterinaria  
Departamento de Sanidad Animal**

**TESIS DOCTORAL**

**Nuevas estrategias en el manejo hormonal de la reproducción en  
las cerdas nulíparas**

**RODRIGO MANJARIN ARREDONDO**

**2013**

## **AUTORIZACION DE LOS DIRECTORES DE TESIS PARA SU PRESENTACION**

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

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),

Como directores de la Tesis Doctoral realizada por Rodrigo Manjarín Arredondo, licenciado en veterinaria,

**AUTORIZAN:**

La defensa de la Tesis Doctoral titulada: "**Nuevas estrategias en el manejo hormonal de la reproducción en las cerdas nulíparas**", 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 20 de Noviembre de 2013,

Fdo.: Dr. D. J. Carlos Domínguez Fernández

Fdo.: Dra. Dña. Beatriz Alegre Gutiérrez



## CONFORMIDAD DEL DEPARTAMENTO

El Departamento de Sanidad Animal, ha acordado dar su conformidad a la admisión a trámite de la lectura de la Tesis Doctoral titulada: **“NUEVAS ESTRATEGIAS EN EL MANEJO HORMONAL DE LA REPRODUCCION EN LAS CERDAS NULIPARAS”**, dirigida por los Dres. **D. JUAN CARLOS DOMINGUEZ FERNANDEZ DE TEJERINA** y Dña. **BEATRIZ ALEGRE GUTIERREZ**, y elaborada por el tesando **D. RODRIGO MANJARIN ARREDONDO**.

Lo que se firma, para dar cumplimiento del Art. 8º. 2 del R.D. 778/98, en León a 20 de Noviembre de 2013,

Vº Bº

El director del Departamento

Vº Bº

El secretario del Departamento

Fdo.: Dr. D. Cesar B. Gutiérrez Martín

Fdo.: Dr. D. Juan M. Fresneda Francés

Esta memoria ha sido realizada en las instalaciones de las Facultades de Veterinaria de la Universidad Estatal de Michigan, USA, la Universidad de Guelph, Canadá, y la Universidad de León, así como el Servicio de Técnicas Instrumentales de la Universidad de León, e instalaciones ganaderas de GPA en Ávila y UVESA en León.

Los resultados de esta memoria han sido presentados en los siguientes congresos:

American Society Animal Science 2010 Midwest Meeting

American Society Animal Science 2009 Midwest Meeting

Animal Science Graduate Research Forum, Michigan State University, September 2009

Animal Science Graduate Research Forum, Michigan State University, September 2008

A mi familia, mis directores de tesis y mis amigos por confiar en mí y darme su apoyo incondicional durante este periodo, gracias.

## Agradecimientos

- En estas breves líneas, me gustaría agradecer a todas las personas e instituciones que han colaborado en la realización de este proyecto.
- A mis directores de Tesis, por darme la oportunidad de realizar estos experimentos y por su continuado esfuerzo y apoyo durante todo este periodo
- Dr. Roy Kirkwood, Dr. Robert Friendship and Dr. Glen Cassar, for their continued support, advice and education during my studies in the USA and Canada
- M.J. Castro y Evaristo Aguado, porque sin su inmensa ayuda nunca habría sido posible realizar esta investigación.
- Blas, Julio, Javier, Fernando, Víctor, Chechu, Noemí, Blanca y Saúl, que contribuyeron a esta tesis con su tiempo y comprensión.
- A Intervet International, por financiar parte de esta investigación.

## ÍNDICE

<b>Índice de Tablas .....</b>	<b>ix</b>
<b>Índice de Abreviaciones.....</b>	<b>x</b>
<b>CAPÍTULO 1: Introducción y objetivos .....</b>	<b>1</b>
1.1 Introducción .....	2
1.2 Objetivos .....	8
<b>CAPÍTULO 2: Revisión Bibliográfica .....</b>	<b>9</b>
2.1 Ovogénesis y desarrollo folicular en el cerdo .....	10
2.2 Perfiles hormonales y desarrollo ovárico antes de la pubertad .....	14
2.3 Perfiles hormonales y desarrollo ovárico después de la pubertad.....	18
2.4 Estrategias para la estimulación de la pubertad en cerdas prepúberes .....	27
<b>CAPÍTULO 3: Effect of eCG or eCG plus hCG on Estrus Expression and Ovulation in Prepubertal Gilts.....</b>	<b>30</b>
Published in <i>Reproduction in Domestic Animals</i> , 2009; 44(3):411-413	
<b>CAPÍTULO 4: Effect of Prior FSH Treatment on the Estrus and Ovulation Responses to eCG in Prepubertal Gilts.....</b>	<b>34</b>
Published in <i>Animal Reproduction Science</i> , 2009; 110(1-2): 123-127	
<b>CAPÍTULO 5: Effect of hCG Treatment on the Estrous and Ovulation Responses to FSH in Prepubertal Gilts .....</b>	<b>40</b>
Published in <i>Reproduction Domestic Animals</i> , 2009; 44(3):432-434	
<b>CAPÍTULO 6: Effect of hCG on Early Luteal Serum Progesterone Concentrations in PG600-treated Gilts .....</b>	<b>44</b>
Published in <i>Reproduction Domestic Animals</i> , 2010; 45:555-557	
<b>CAPÍTULO 7: Effect of additional hCG on follicular growth and ovulation in PG600-treated gilts .....</b>	<b>47</b>
Submitted to <i>Journal of Animal Science</i> , November 2013	
<b>CAPÍTULO 8: Resumen de resultados, discusión y conclusiones.....</b>	<b>60</b>
8.1 Resumen global de resultados .....	61
8.2 Discusión.....	65
8.3 Conclusiones .....	71



<b>CAPÍTULO 10: Bibliografía.....</b>	<b>72</b>
<b>ANEXOS.....</b>	<b>84</b>

## Índice de Tablas

Tabla 2.1: Porcentaje de celos en cerdas prepúberes en respuesta a la inyección con PG600 .....	29
Tabla 3.1. Efecto del tratamiento con eCG o eCG + hCG en la incidencia de celo y ovulación en cerdas prepúberes, indicada por la elevación de la progesterona en sangre en el d 7 postratamiento.....	32
Tabla 3.2. Influencia del peso de las cerdas prepúberes en la respues estraly ovulatoria a la eCG o eCG + hCG .....	32
Table 4.1: Celos y ovulación en respuesta a la administración de PG600 (eCG + hCG), eCG sola, y FSH seguida de eCG .....	37
Tabla 5.1: Efecto de la administración de hCG, FSH seguida de eCG, o FSH seguida de hCG a cerdas prepúberes de 150 d de edad, en la incidencia de celo y ovulación indicada por un aumento en la progesterona sanguínea. ....	42
Tabla 6.1: Efecto de la inyección de PG60 sola o seguida por hCG a las 0, 24 y 48h en la respuesta ovulatoria en cerdas prepúberes .....	46
Tabla 6.2: Influencia de la edad en el efecto de la PG&00 sola o seguida de hCG en la respuesta ovulatoria y los niveles de progesterona en sangre en cerdas prepúberes .....	46
Tabla 7.1: Efecto d ela suplementación con hCG en el celo y la ovulación en cerdas nulíparas tratadas con PG600 .....	59

## Índice de Abreviaciones

AI = inseminación artificial

Dpc = días post coito

eCG = gonadotropina coriónica equina

FSH = hormona folículo estimulante

GnRH = hormona liberadora de gonadotropinas

hCG = gonadotropina coriónica humana

IM = intramuscular

IU = unidades internacionales

LH = hormona luteinizante

NPD = días no productivos

PVP = polyvinylpyrrolidinone

SC = subcutáneo

SEM = error estándar de la media

IGF-1= factor de crecimiento similar a la insulina tipo I

IGF BP = proteína de unión al factor de crecimiento similar a la insulina tipo I

PAPP-A = Proteína plasmática A asociada a la preñez

## **CAPÍTULO 1: Introducción y objetivos**

## 1.1 Introducción

La producción de una explotación porcina se mide por el número de lechones destetados por semana, parámetro que depende fundamentalmente del porcentaje 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 nulíparas en celo. Esto es posible mediante la estimulación temprana de la pubertad en las hembras de reemplazo, seguida del mantenimiento de una actividad cíclica regular en las semanas previas a la fecha de inseminación (Kirkwood, 1999). Los métodos más utilizados para la estimulación temprana de la pubertad en porcino son la exposición de las hembras nulíparas a un macho adulto y la administración de hormonas gonadotrópicas. La adecuada exposición al verraco para estimular la pubertad y mantener ciclos estrales regulares hasta la primera inseminación, requiere el contacto directo diario del cerdo con las hembras nulíparas durante varios meses (Kirkwood and Thacker, 1992; Hughes, 1997). Cuando esto no es físicamente posible, o cuando la exposición diaria no revierte en la maduración sexual o la ciclicidad regular de las hembras, se vuelve necesaria la inducción del celo mediante un protocolo hormonal. La mayoría de preparaciones comerciales para la estimulación del celo en ganado porcino contienen una combinación de las hormonas gonadotropina coriónica equina (eCG) y gonadotropina coriónica humana (hCG), que presentan una acción folículo estimulante y luteinizante similar a las hormonas FSH y LH sintetizadas endógenamente en la hipófisis del cerdo. La preparación más común de estas dos hormonas está compuesta por 400 IU de eCG y 200 IU de hCG (PG600, Intervet, Schering-Plough Animal Health), y es altamente efectiva en la inducción del celo en cerdas destetadas; sin embargo, cuando es aplicada a cerdas prepúberes, hasta el 30% pueden llegar a no mostrar celos, y cerca del 30% de aquellos que si ovulan no desarrollan ciclos regulares en las semanas o meses posteriores

al tratamiento (Kirkwood, 1999). La etiología de la impredecibilidad de la respuesta estral y ovulatoria en cerdas nulíparas a la inyección de PG600 es desconocida.

La principal hipótesis de este trabajo es que la falta de respuesta estral en el 30% de cerdas prepúberes tratadas con hormonas exógenas es debida a una inadecuada combinación de las gonadotropinas eCG y hCG para promover el correcto crecimiento folicular y la instauración de la pubertad. Para demostrar esta hipótesis, 6 diferentes experimentos fueron llevados a cabo con el objetivo de comparar las respuestas estral y ovulatoria inducida por la administración de PG600 con los siguientes protocolos hormonales:

- i. administración de eCG sola,
- ii. pretratamiento con FSH seguido con eCG,
- iii. administración de hCG sola,
- iv. pretratamiento con FSH seguido con hCG,
- v. tratamiento con eCG seguido de hCG,
- vi. tratamiento con eCG + hCG seguido de hCG.

Los tratamientos *i* y *ii* están presentados en los capítulos 3 y 4 de la tesis, respectivamente, los tratamientos *iii* y *iv* en el capítulo 5, y los protocolos *v* y *vi* se recogen en los capítulos 6, 7 y 8. Finalmente, desarrollamos un último experimento presentado en forma de anexo, donde la fertilidad en respuesta a los diferentes protocolos hormonales fue evaluada en cerdas en anestro estacional, que representan un modelo fisiológico similar a las cerdas prepúberes.

Previos experimentos han demostrado que la mayoría de las cerdas prepúberes tratadas con PG600 que no desarrollan celo, presentan niveles posovulatorios de progesterona (P4) en sangre 10 días (d) después del tratamiento (Tilton et al., 1995). Estos resultados nos llevaron a especular de que la gonadotropina hCG, siendo un análogo de la hormona luteinizante (LH), hubiera podido causar la ovulación prematura o incluso la luteinización de los folículos más grandes, de forma que el aumento adelantado de P4 bloquearía el comportamiento estral en las cerdas prepúberes. Si esta hipótesis es cierta, entonces la inyección sola de eCG resultaría en una mejoría de la respuesta estral, puesto que esta hormona tiene muy poca actividad LH en comparación con la hCG. En apoyo de esta hipótesis, la inyección de dosis elevadas de eCG sin el componente hCG indujo la ovulación del 70-100% de las cerdas prepúberes tratadas (Dial et al., 1984; Britt et al., 1986; Esbenshade, 1987; Flowers et al., 1989; Bolamba, 1992). Sin embargo, la comparación de la respuesta estral y ovulatoria entre la administración de eCG y la combinación de eCG y hCG nunca ha sido evaluada en cerdas prepúberes. Además, es desconocida si la diferencia en respuesta estral y ovulatoria entre ambos protocolos hormonales está relacionada con el desarrollo folicular y el peso de las hembras al momento del tratamiento. Por lo tanto, el primer objetivo de la tesis consistió en determinar el efecto de la administración de eCG sola o en combinación con hCG sobre el celo y la ovulación de cerdas prepúberes. Además, la relación entre estas respuestas, el peso y el desarrollo folicular inicial de las hembras, es también discutida. El celo en las hembras prepúberes fue valorado mediante la expresión del reflejo de inmovilidad inducido por la exposición directa a un macho durante 15 min entre los 2 y 7 d posteriores a la inyección de las gonadotropinas. Por el contrario, la ovulación fue cuantificada mediante el análisis de la concentración de P4 en muestras de sangre obtenidas de la vena yugular en los d 0, 3 y 10 respecto a la inyección de las gonadotropinas. Una elevación en la concentración de  $P4 \geq 1$  ng/mL entre los d 0 y 3 postratamiento fue definida

como ovulación prematura, mientras que niveles sanguíneos de P4 < 1 ng/mL en los d 0 y 3, seguidos de un aumento en la concentración de P4  $\geq$  5 ng/mL en el d 10 fue definido como una respuesta ovulatoria normal. El crecimiento folicular previo a la inyección de gonadotropinas fue determinado por ultrasonografía ovárica mediante la utilización de una sonda transrectal, que permitió la valoración del diámetro de los 3 folículos mas grandes presentes en ambos ovarios.

El segundo objetivo de este trabajo consistió en determinar el efecto de la inyección consecutiva de las hormonas FSH y eCG en la respuesta estral y ovulatoria en cerdas nulíparas. Numerosos experimentos en cerdas prepúberes han mostrado la imprescindible función de la hormona folículo estimulante (FSH) en el reclutamiento de los folículos primarios y secundarios, así como el papel de la hormona eCG en el desarrollo de folículos terciarios y preovulatorios (Guthrie et al., 1990; Knox and Zimmerman, 1993, Bolamba et al., 1996; Guthrie, 2005). Sin embargo, estas dos hormonas nunca han sido administradas de forma consecutiva en porcino para promover el desarrollo de la pubertad. Basándonos en estos experimentos, así como en los resultados del primer experimento, formulamos la hipótesis de que, comparado con la administración eCG sola o en combinación con hCG, la administración previa de FSH seguida de eCG aumentaría las respuestas estral y ovulatoria en cerdas prepúberes. Debido a la corta vida media de la hormona FSH en sangre, esta fue administrada en 6 consecutivas inyecciones en intervalos de 12 h, seguido de una sola inyección de eCG 12 horas (h) después de la última administración de FSH.

El tercer y cuarto objetivos de este trabajo consistieron en determinar el efecto de la hormona hCG, administrada sola o de forma consecutiva a la inyección de FSH, en las



respuestas estral y ovulatoria en cerdas nulíparas. Previos experimentos han demostrado que la hormona hCG, además de su acciones ovulatoria y esteroidegenica, puede estimular también el crecimiento folicular (Guthrie et al., 1990; Bolamba et al., 1991; Driancourt et al., 1992). Sin embargo, en estos experimentos el diámetro y número de la población folicular al momento del tratamiento condicionó la capacidad de ovulación, sugiriendo la incapacidad de hCG para iniciar el desarrollo de los folículos más pequeños (Bolamba et al., 1991; Driancourt et al., 1995). Este efecto contrasta con la acción de la hormona FSH en el desarrollo de los folículos primarios y secundarios descrita previamente. Sin embargo, las hormonas FSH y hCG nunca han sido administradas de forma consecutiva en porcino para promover la ovulación. De esta forma, formulamos la hipótesis de que, comparado con la administración individual de hCG o en combinación con eCG, la administración de FSH seguido de hCG aumentaría la respuesta estral y ovulatoria en cerdas prepúberes. Con el objetivo de alargar la actividad biológica de la hormona FSH en sangre, esta hormona fue disuelta en una solución con polyvinylpyrrolidinone (PVP; Jackson et al., 2006) y administrada en dos inyecciones consecutivas separadas por 24 h, seguido de la administración de hCG 24 h después de la última administración de FSH.

El conjunto de los resultados obtenidos durante los experimentos anteriores nos llevó a formular la hipótesis de que la falta de respuesta estral y ovulatoria en 30% de las cerdas prepúberes tratadas con la PG600 podría ser debida a una insuficiente duración o intensidad de la actividad LH para completar el desarrollo folicular. Por lo tanto, la administración adicional de hCG, de forma concurrente o consecutiva a la administración de PG600, induciría un aumento en la tasa de celo y ovulación en cerdas prepúberes. Para probar esta hipótesis se llevaron a cabo dos diferentes experimentos (cuarto, quinto en la tesis). En el cuarto experimento recogido en la tesis, cerdas nulíparas de diferentes edades y pesos fueron

inyectadas con PG600, PG600 seguido de hCG, eCG seguido de hCG, o sirvieron como control. La suplementación con 200IU de hCG se realizó a las 0, 24 y 48h. La valoración de la respuesta ovulatoria se basó, al igual que en los casos anteriores, en un aumento en la concentración de P4 en sangre  $\geq 5$  ng/mL en el d 10. Además, se contabilizó el porcentaje de cerdas nulíparas con niveles de P4  $\geq 30$  ng/mL, indicativo de una mejor respuesta ovulatoria debido a un mayor número de cuerpos lúteos, o a una mayor producción de P4 por cuerpo lúteo.

En base a los resultados obtenidos, se llevó a cabo el quinto experimento para investigar la etiología de los altos niveles de P4 asociados a la suplementación con hCG en las cerdas prepúberes. En este experimento se utilizaron 49 cerdas nulíparas que fueron tratadas con PG600 y dos dosis diferentes de hCG a las 24h. Veintiocho animales fueron sacrificados a los 10 d posteriores al tratamiento, y los ovarios fueron examinados para contabilizar el número de cuerpos lúteos y quistes foliculares, así como la naturaleza de los mismos. El crecimiento folicular en el resto de los animales fue monitorizado usando el método ultrasonografía transrectal descrito anteriormente.

## 1.2 Objetivos

### *Objetivo general*

Determinar la etiología de la impredecibilidad de las respuestas estral y ovulatoria en cerdas prepúberes a la inyección de gonadotropinas exógenas, y mejorar los protocolos hormonales actuales empleados en la inducción temprana de la pubertad en porcino.

### *Objetivos específicos*

1. Valorar la eficacia de nuevos protocolos hormonales en la inducción del celo en cerdas prepúberes:
  - a. eCG sola o consecutiva a la administración de FSH
  - b. hCG sola o consecutiva a la administración de FSH
  - c. eCG consecutiva a la administración de hCG
  - d. hCG consecutiva a la administración de PG600 (eCG+hCG)
  
2. Determinar el efecto de la inyección de gonadotropinas exógenas en la respuesta ovulatoria en cerdas prepúberes:
  - a. Niveles de progesterona en sangre
  - b. Cuantificación de cuerpos lúteos
  - c. Formación de quistes ováricos
  
3. Determinar la relación entre la madurez fisiológica de las cerdas prepúberes y las respuestas estral y ovulatoria a la administración de gonadotropinas exógenas:
  - a. efecto del desarrollo folicular previo al tratamiento hormonal
  - b. efecto del peso
  - c. efecto de la edad

## **CAPÍTULO 2: Revisión Bibliográfica**

## 2.1 Ovogénesis y desarrollo folicular en el cerdo

Durante el periodo embrionario temprano, comprendido entre los días 24 a 26 después del nacimiento, las células germinales primordiales migran desde el saco vitelino hasta la gónada indiferenciada, también llamada cresta genital, y se organizan en los cordones sexuales. Las células germinales llevan a cabo la primera división mitótica, aumentando su número desde  $5 \times 10^3$  en el día 24 posfecundación (pfc) hasta más de  $1 \times 10^6$  en el día 50. En ausencia del factor determinante testicular, los cordones sexuales se fragmentan en grupos celulares, cada uno de ellos rodeando a una de las células germinales. Estos grupos se diferencian en las células foliculares primitivas, y la mayor parte de la cresta genital se transforma en el ovario. Las células germinales se transforman en oogonias mediante sucesivas divisiones mitóticas y luego a oocitos primarios a través de la primera división meiótica. La división de los oocitos se detiene en la fase  $G_2$  del ciclo celular, y no continúan la meiosis hasta inmediatamente después de la ovulación. El tiempo necesario para la transformación de oogonias a oocitos es más largo en cerdos que en otras especies de mamíferos (Black and Erickson, 1968). La primera oogonia entra en la profase meiótica antes del día 40 pfc y su transformación no es completa hasta aproximadamente 30 día después del parto (**Figura 2.1**).

Los oocitos primarios están rodeados por una o dos capas de células foliculares aplanadas que forman los folículos primordiales ováricos. Los primeros folículos primordiales son observados hacia el día 56 pfc, y su número aumenta a lo largo de la vida prenatal (Bielańska-Osuchowska, 2006). Aproximadamente 500.000 folículos primordiales están presentes en ambos ovarios en el día 10 después del nacimiento en la cerda, y

constituyen el número máximo disponible durante toda su vida reproductiva (Black and Erickson, 1968).

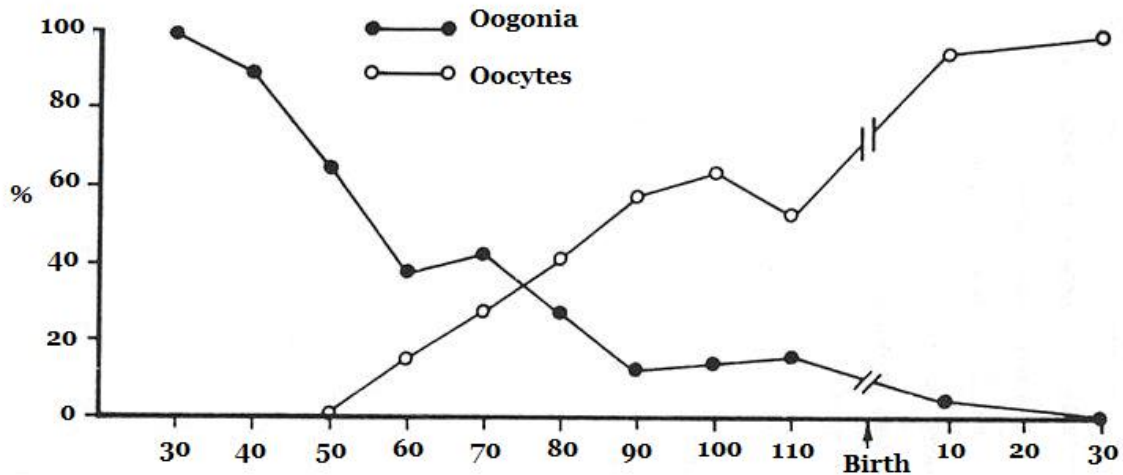


Figura 2.1 Distribución de las oogonias y oocitos durante el periodo embrionario y posterior al nacimiento en la cerda (tomado de Black and Erickson, 1968)

Dentro de los primeros 10 días después del nacimiento, algunos folículos primordiales se transforman en folículos primarios (0.12 mm), que consisten en oocitos con una a tres capas de células de la granulosa (Knox, 2000). La iniciación del crecimiento de los folículos primordiales implica tanto la acción hormonal a nivel sistémico como el efecto regulador de factores locales producidos por las células somáticas del folículo (Hirshfield, 1991) y, probablemente, de la propios oocitos en crecimiento (Picton et al., 1998). Las células foliculares continúan proliferando para formar varias capas de células de la granulosa, así como las células de la teca que las rodean, transformado los folículos primarios en secundarios (Sacristán et al., 1996; **Figura 2.2**). La transformación de folículo primario a secundario es independiente de las gonadotropinas hipofisarias, ya que se observan también

en los animales hipofisectomizados. El folículo entra en la etapa secundaria con 3 a 20 capas de células de la granulosa y un diámetro de 0.14 a 0.40 mm. El crecimiento más allá de los 0.4 mm se asocia con la formación del antro o folículo terciario. Los folículos antrales tienen una amplia variación en su diámetro (0.4-1.5 mm), así como en el número de capas de células de la granulosa (10-30; Knox 2005). El fluido folicular deriva tanto de la sangre, como de sustancias sintetizadas por las células de la granulosa y teca. Durante la fase antral, las células de la granulosa siguen proliferando y empiezan a desarrollar receptores para la hormona folículo estimulante (FSH). Al mismo tiempo, las células de la teca aparecen completamente diferenciadas formando dos capas concéntricas: la teca interna, con receptores para la hormona luteinizante, (LH) y la teca externa.

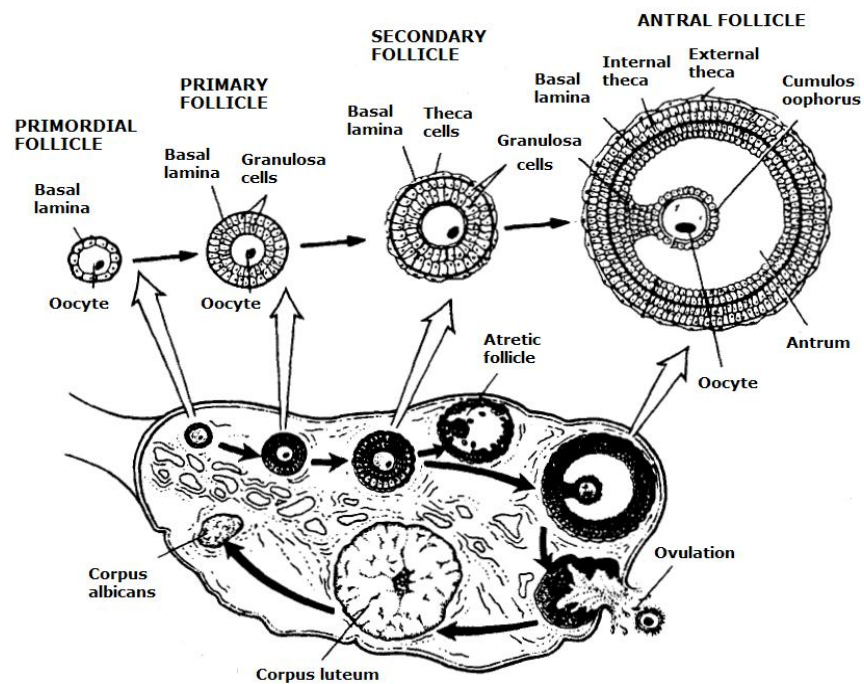


Figure 2.2 Figura representativa de la estructura del ovario y de las diferentes fases del desarrollo del folículo, cuerpo lúteo y cuerpo albicans (Tomado de Sacristán, 1996)

Durante la maduración folicular, las células de la teca y la granulosa sintetizan y secretan grandes cantidades de esteroides, que junto con las hormonas hipofisarias FSH y LH, permiten a los folículos crecer y alcanzar su desarrollo final (Cárdenas and Pope, 2002). El mecanismo implicado consiste en que, durante el desarrollo folicular, la LH se une a receptores de membrana LH-específicos localizados en las células de la teca interna del folículo en desarrollo, activando una cascada de eventos intracelulares resultantes en última instancia en la conversión de colesterol a testosterona. La testosterona se difunde fuera de las células de la teca interna y entra en las células de la granulosa, que tienen receptores para FSH. Cuando la FSH se une a su receptor, provoca la conversión de testosterona a estradiol mediante la enzima aromatasa. Al mismo tiempo, el estradiol, junto con el factor de crecimiento insulínico 1 (IGF-1), complementa el efecto de la FSH y LH para aumentar aún más la actividad de la aromatasa en los folículos.

Una vez que el folículo alcanza un tamaño crítico, las células de la granulosa unidas a la lámina basal se distancian del complejo oocito-cumulus, y establecen un segundo microambiente dentro del folículo (Richards, 2001). Esta separación requiere la regulación de las células de la granulosa por parte de factores y hormonas distintas a las del complejo oocito-cumulus. Localmente, la FSH induce cambios específicos en la expresión génica de las células de la granulosa, aumenta su proliferación, e induce la formación del antro que separa el componente oocito-cumulus de la capa lateral de células endocrinas. En última instancia, las células de la granulosa expresan también receptores para la LH, así como la enzima P450 aromatasa, activina e inhibina, mientras que las células de la teca se diferencian para producir andrógenos a través de la ruta biosintética P450<sub>17 $\alpha$</sub> . Todos estos cambios aumentan aún más la esteroidogénesis en el ovario, inhiben la secreción hipofisaria de FSH, de forma que los folículos de menor diámetro, cuyo desarrollo depende de la FSH, sufren



atresia, y conduce a la retroalimentación positiva del estradiol en el hipotálamo para desencadenar el pico ovulatorio de LH.

## **2.2 Perfiles hormonales y desarrollo ovárico antes de la pubertad**

### ***2.2.1 Secreción de LH y FSH***

En las cerdas prepúberes, la LH es una hormona clave en el control del desarrollo ovárico y la edad a la cual las cerdas alcanzan la pubertad (Evans and O'Doherty, 2001). Las concentraciones de LH en sangre disminuyen desde el nacimiento hasta alrededor del día 40 de edad, aumentan hasta los 120 días, y luego se reducen de nuevo hasta su punto más bajo cerca de los 180 días (Colenbrander et al., 1977; Pelletier et al., 1981; Diekman et al., 1983; Camous et al., 1985) (**Figura 2.3**). Desde los 180 días hasta el desencadenamiento de la primera ovulación, y por tanto el establecimiento de la pubertad, las concentraciones de LH en la cerda aumentan progresivamente (Pelletier et al., 1981; Prunier et al., 1993), al igual que en la mayoría de las especies. Este aumento en la secreción de LH cercano a la pubertad se caracteriza por un aumento en la media de la concentración de LH, así como incremento en la frecuencia pulsátil (Pelletier et al., 1981; Prunier et al., 1993), y está asociada con la maduración final de los folículos ováricos (Beltranena et al., 1993), culminando en el pico de LH preovulatorio.

Las concentraciones de FSH en la sangre son altas entre el nacimiento y los 70-125 días de edad, y luego disminuyen hasta el establecimiento de la pubertad (Diekman et al., 1983; Camous et al., 1985; Prunier et al., 1993). Las concentraciones de estradiol son bajas durante la mayor parte del período prepuberal, y solo aumentan antes de la pubertad

(Esbenshade et al., 1982; Lutz et al., 1984; Camous et al., 1985). Las concentraciones de progesterona sólo aumentan después de la pubertad tras la formación de los primeros cuerpos lúteos (Esbenshade et al., 1982; Prunier et al., 1993).

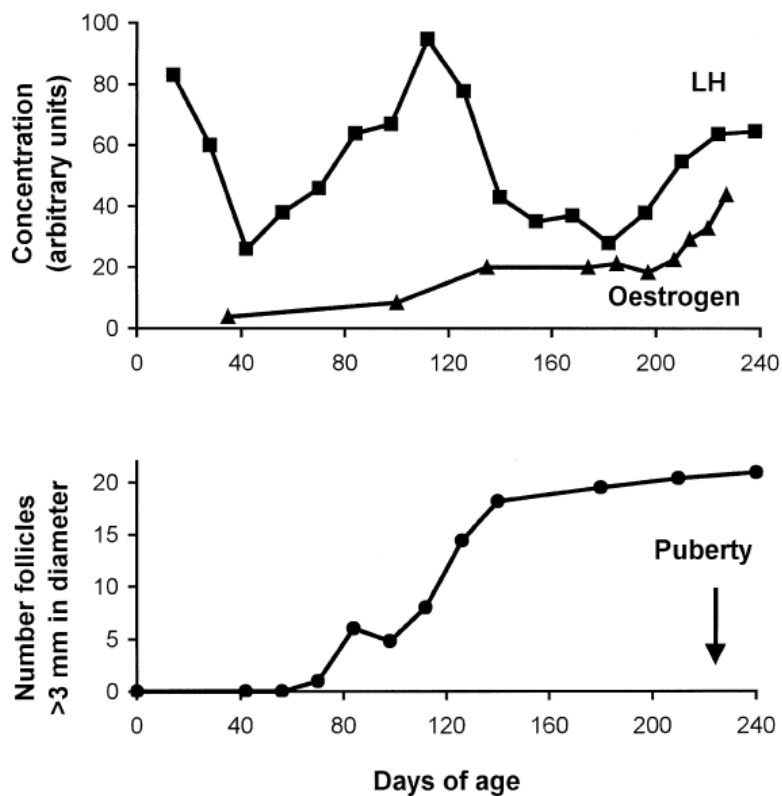


Figura 2.3 Relación entre la concentración media plasmática de estrógenos y LH, y el número de folículos de diámetro mayor de 3 mm, durante la maduración sexual de la cerda (Tomado de Evans et al. 2001).

### 2.2.2 Regulación de la secreción de gonadotropinas (la teoría gonadostática)

La secreción de las hormonas hipofisarias FSH y LH durante el período prepuberal está regulada a través de la hormona liberadora de gonadotropinas (GnRH). La síntesis de GnRH en la hembra se lleva a cabo en las células neurosecretoras ubicadas en dos áreas

separadas en el hipotálamo, el centro tónico y el centro pulsátil. Anatómicamente, el centro pulsátil se compone de tres núcleos hipotalámicos conocidos como el núcleo preóptico, el área hipotalámica anterior y el núcleo supraquiasmático, mientras que el centro tónico consta solo de dos núcleos, el ventromedial y el arqueado. Los axones de las células de los centros tónico y pulsátil se extienden en las región del tallo hipofisario, donde los nervios terminan en una red capilar llamada sistema portal hipotálamo-hipofisario. Este sistema permite a la GnRH actuar inmediatamente sobre las células de la hipófisis, causando la liberación de las gonadotropinas FSH y LH.

El centro tónico es responsable de la secreción basal de GnRH. Las neuronas en este centro liberan pequeños pulsos de GnRH durante períodos prolongados de tiempo, constituyendo la liberación tónica de GnRH que se produce durante todo el ciclo estral. El centro pulsátil es responsable de la liberación preovulatoria de GnRH, que en contraste con la liberación tónica, se produce una sola vez al final del ciclo. Antes de la instauración de la pubertad, el centro tónico tiene una alta sensibilidad a la retroalimentación negativa inducida por el estrógeno, de modo que la secreción de GnRH permanece inhibida. Durante el período inmediato anterior a la pubertad, la teoría predominante es que se produce una disminución en la sensibilidad del centro tónico a la retroalimentación negativa inducida por el estradiol, permitiendo un incremento en la secreción de GnRH (hipótesis gonadostática). El aumento en la secreción de GnRH incrementa a su vez la secreción de LH (Pelletier et al., 1981; Prunier et al., 1993) en condiciones de elevado estradiol sanguíneo (Lutz et al., 1984; Camous et al., 1985). Cuando las concentraciones de estrógeno en sangre alcanzan un determinado nivel, el centro pulsátil se estimula positivamente liberando una mayor cantidad de la GnRH. Esto estimula el pico de LH que causa la primera ovulación y el inicio de la pubertad. Aunque hay numerosas pruebas que apoyan esta teoría (Berardinelli et al., 1984; Lutz et al., 1984), otros

no han podido demostrar una reducción en la retroalimentación negativa al estradiol antes de la primera ovulación (Elsaesser et al., 1991).

### ***2.2.3 Dinámica ovárica antes de la pubertad:***

Los folículos antrales se observan histológicamente por primera vez aproximadamente a los 65 días de edad, y emergen de la superficie del ovario a los 80 días (Black and Erickson, 1968). La formación y el aumento en el número de folículos antrales alrededor de los 100 días es probablemente debido a un aumento transitorio en la secreción de LH (Evans y O'Doherty, 2001) y FSH (Camous et al., 1985) durante este intervalo de tiempo. Aunque los folículos antrales formados durante el período prepuberal poseen la capacidad potencial de ovular, todos ellos sufren atresia después del día 120, coincidiendo con una disminución del 60% en la media de la concentración plasmática de FSH y LH (Guthrie y Garret 2000). Sólo aquellos folículos desarrollados al final de la fase prepuberal son capaces de completar su desarrollo final.

La existencia de un intenso recambio folicular entre los días 140 y 180 del periodo prepuberal ha sido demostrada en cerdas nulíparas mediante laparoscopia repetida cada 20 días (Grasso et al., 1988). En un estudio, Bolamba et al., (1994) mostro cambios en el aspecto morfológico de los ovarios, que en un plazo de pocos días cambiaban de un tipo definido como "panel de abeja" (con un gran número de folículos de pequeño diámetro), a un tipo llamado "racimo de uva " (con varios folículos grandes), demostrando que en cerdas prepúberes existen olas de crecimiento folicular similares a las novillas (Evans et al., 1994; Melvin et al., 1999). Sin embargo, en contraste con las novillas, los cambios foliculares en las cerdas prepúberes parecen estar regulados por factores intraováricos locales, en vez de por las

gonadotropinas hipofisarias y el estradiol (Bolamba et al., 1994), ya que en este experimento se observó asincronía en la morfología ovárica entre el ovario izquierdo y el derecho del mismo animal.

## **2.3 Perfiles hormonales y desarrollo ovárico después de la pubertad**

### ***2.3.1 Secreción de GnRH:***

En la cerda cíclica los centros tónico y pulsátil están regulados por los niveles de progesterona y estradiol en sangre. La progesterona ejerce una retroalimentación negativa en ambos centros, aunque la mayor parte de su efecto se lleva a cabo sobre el centro tónico. En contraste, el centro pulsátil responde a un aumento en los niveles de estradiol con una retroalimentación positiva. Durante la fase luteal (con altos niveles de progesterona en sangre) la secreción de GnRH por parte del centro tónico ocurre en episodios cada 4-8 h (Senger, 2003). Esta secreción basal, aunque permite un cierto crecimiento folicular, no permite un desarrollo folicular suficiente para la producción de niveles preovulatorios de estradiol. En consecuencia, las cerdas no ovulan bajo la influencia de la progesterona, tanto durante la fase luteal del ciclo estral como durante la gestación.

Durante la fase folicular temprana, la retroalimentación negativa ejercida por la progesterona en el hipotálamo se elimina, y la GnRH es liberada por el centro tónico con una mayor frecuencia que durante la fase luteal (1.5-2 h). Esto estimula el aumento de la liberación de FSH y LH, que a su vez aumenta la secreción de estradiol por parte de los folículos. Durante la fase folicular tardía, y una vez que el estradiol alcanza un cierto nivel en sangre, el centro pulsátil es estimulado positivamente, liberando grandes cantidades de GnRH

que causan la liberación de la ola preovulatoria de LH, tal y como se ha descrito anteriormente para la establecimiento de la pubertad.

### ***2.3.2 Secreción de LH:***

En el cerdo, la vaca y la oveja, la secreción pulsátil de LH cambia de un modo de baja frecuencia y gran amplitud durante la fase lútea, a un modo de alta frecuencia y baja amplitud durante la fase folicular (Clarke, 1989). Estudios en ovejas acerca de la secreción de GnRH muestran que el aumento en la frecuencia pulsátil de LH en plasma podría reflejar la eliminación de la retroalimentación negativa de la progesterona a nivel hipotalámico (Clarke et al., 1987). Por el contrario, Guthrie and Bolt (1990) y otros no han podido demostrar un aumento en la concentración, frecuencias o amplitud de la LH en las cerdas que experimentan luteolisis de forma natural.

A medida que la fase folicular progresa, la amplitud de los pulsos de LH varía entre las diferentes especies (Clarke, 1989). En los cerdos, el crecimiento de los folículos ováricos provoca un aumento progresivo de las concentraciones plasmáticas de estradiol que provoca una inhibición a corto plazo de la secreción de LH durante la fase folicular tardía del ciclo estral (Prunier et al., 1987; Clarke, 1989). De hecho, experimentos en modelos experimentales confirman que los estrógenos pueden ejercer una retroalimentación negativa a corto plazo a nivel pituitario (Britt et al., 1991). En este experimento, los niveles plasmáticos de LH en cerdos ovariectomizados que recibieron una sola inyección de estrógenos mostraron una primera respuesta de retroalimentación negativa y, a continuación una respuesta de retroalimentación positiva. Aparentemente, estradiol puede inhibir o reducir en gran medida la liberación de GnRH por un período de aproximadamente 54 hasta 60 h , y a continuación, provocar una liberación masiva de GnRH, induciendo una ola preovulatoria de LH

proporcional a la cantidad de la GnRH secretada. La importancia fisiológica de esta inhibición temporal podría ser el darle tiempo a las células hipofisarias para preparar la maquinaria celular para el subsiguiente evento de retroalimentación positiva.

### ***2.3.3 Secreción de FSH y dinámica folicular:***

En porcino, cambios en las concentración de esteroides en el líquido folicular indican dos olas de crecimiento folicular y aumento de la esteroidogénesis (Guthrie y Cooper, 1996), aunque ambas olas no se desarrollan en la misma medida que en el ganado vacuno probablemente debido a la supresión de la secreción de LH por parte de la progesterona ovárica. En el cerdo, el receptor de LH aparece en una etapa relativamente inmadura del desarrollo folicular (~4 mm de diámetro; Liu et al., 1998 ,2000), mientras que los receptores de LH en la vaca no aparecen hasta que los folículos alcanzan 9 a 10 mm de diámetro (Xu et al., 1995). Esto explicaría por qué en la vaca existen ondas foliculares con la aparición de folículos dominantes durante la fase lútea, mientras que los folículos del cerdo no crecen más allá de 4 mm (Driancourt et al., 2001). La primera ola de crecimiento folicular consiste en la reposición de la población de folículos entre los días 2 y 8 del ciclo estral, seguido por un aumento en la incidencia de atresia entre los folículos de pequeño y mediano diámetro entre los días 5 y 7. La segunda ola de crecimiento folicular consiste en la selección y el crecimiento de los folículos preovulatorios, acompañado de la atresia del resto de los folículos durante la fase folicular del ciclo (días 15-21). El patrón de crecimiento folicular durante las etapas media y final de la fase luteal en cerdos (días 7-15) se caracteriza por el continuo crecimiento y atresia de los folículos ováricos (Guthrie and Cooper, 1996). En vacas, yeguas y ovejas, la aparición de nuevas olas de crecimiento folicular es precedida por un aumento transitorio en la secreción de FSH en plasma. En los cerdos, cambios en el número y distribución de tamaño de los folículos durante el ciclo estral están también

parcialmente asociados con cambios en las concentraciones de FSH plasmática (Guthrie et al., 1995). La atresia entre la población de folículos de pequeño y mediano diámetro coincide con una disminución en los niveles de FSH a partir de los días 1 o 2 tras la disminución de los niveles plasmáticos de progesterona (Guthrie and Bolt, 1990; Knox et al., 2003). La secreción de FSH queda suprimida hasta el pico preovulatorio de LH, y después vuelve a aumentar transitoriamente entre los días 2 y 3 posteriores de la ovulación (liberación periovulatorio de FSH), tiempo durante el cual los ovarios reponen las poblaciones de folículos pequeños (1-2 mm de diámetro) y medianos (3-6 mm, 35 a 40 por animal; Guthrie, 2005). El incremento en los niveles de atresia entre las poblaciones foliculares pequeñas y medianas entre los días 6 y 7 después de la ovulación coincide con una disminución de la concentración de FSH, y podría ser consecuencia de la retroalimentación negativa por parte de la inhibina sobre la secreción de FSH (Guthrie et al., 1995).

#### ***2.3.4 Secreción de estrógeno y progesterona:***

El estradiol es secretado por los folículos durante todo el ciclo estral, pero la concentración permanece baja durante la fase luteal debido al efecto inhibitor de la progesterona a nivel hipotalámico. Una vez que se produce la luteolisis y los folículos preovulatorios son seleccionados, los niveles circulantes de estradiol aumentan progresivamente hasta desencadenar la liberación preovulatoria de GnRH. Por el contrario, la concentración de progesterona baja inmediatamente después de la ovulación y aumenta de nuevo entre los días 3 o 4 del ciclo estral. La progesterona alcanza la máxima concentración en sangre entre los días 7 y 12 de la fase luteal, y a continuación, coincidiendo con la regresión del cuerpo lúteo entre los días 14 y 15, disminuye rápidamente y permanece baja durante el resto de la fase folicular.



### ***2.3.5 Reclutamiento y selección folicular***

Durante la fase de reclutamiento, una cohorte de folículos comienza su fase de crecimiento final, mientras que durante la selección se eligen los folículos preovulatorios y todos los demás sufren atresia. La importancia de las hormonas LH y FSH en el desarrollo folicular cambia a través de estas dos etapas. En la fase de reclutamiento, la FSH desempeña un papel más importante que la LH en el crecimiento de los folículos antrales. Una vez que los folículos entran en la fase de selección, la inhibina y el estradiol producidos por los propios folículos en crecimiento inhiben la secreción de FSH a nivel de la hipófisis, mientras que aumenta la secreción de LH. Por último, los folículos preovulatorios producen más estrógeno, que finalmente estimula la ola preovulatoria de LH.

El reclutamiento y selección folicular son procesos relativamente cortos en comparación con las etapas de desarrollo folicular anteriores. El intervalo de tiempo desde que un folículo primordial inicia su crecimiento hasta que se produce la formación del antro es de 83 días, mientras que desde la formación de antro hasta que el folículo alcanza la fase ovulatoria pasan sólo 20 días (Morbeck et al., 1992). Basándose en esta estimación de la tasa de crecimiento, Morbeck et al. (1992) planteó la hipótesis de que los folículos que comienzan la formación del antro al inicio del ciclo estral pueden llegar a alcanzar un diámetro de 3 mm en el días 14 a 16, constituyendo la población de la que se reclutan los folículos ovulatorios.

#### **Reclutamiento folicular**

El término de reclutamiento folicular se ha utilizado para describir dos etapas durante el desarrollo de los folículos. Los folículos primordiales latentes en los ovarios son reclutados

de una manera continua (reclutamiento inicial), mientras que los incrementos en la FSH circulante en cada ciclo estral causan el reclutamiento de una cohorte de folículos antrales (reclutamiento cíclico; McGee and Hsueh, 2000). Durante el reclutamiento inicial, factores intraováricos estimulan algunos folículos primordiales para iniciar el crecimiento, mientras que el resto de los folículos no reclutados permanecen en estado latente. Tras este periodo de reclutamiento, los folículos crecen pero los oocitos permanecen detenidos en la profase de la meiosis. En la fase de reclutamiento cíclico, que comienza después del inicio de la pubertad como consecuencia de los aumentos cíclicos de FSH, se forman cohortes de folículos antrales que comienzan su crecimiento final dependiente de las hormonas gonadotrópicas. A diferencia del caso anterior, durante el reclutamiento cíclico sólo un número limitado de folículos sobrevive, mientras que los demás sufren atresia. Los oocitos en los folículos reclutados han completado su crecimiento, han adquirido una zona pellúcida, y están preparados para reanudar la meiosis (McGee and Hsueh, 2000). El número de folículos reclutados es altamente variable entre las diferentes especies, con más de 50 folículos en los cerdos, de 5 a 10 en el ganado vacuno, y de 1 a 4 en el caballo (Driancourt, 2001). En la cerda, el reclutamiento folicular se produce entre los días 14 y 16 del ciclo estral (Clark et al., 1982; Foxcroft and Hunter, 1985), o poco después del destete. En el día 16, aproximadamente 40 a 50 folículos de 3 a 6 mm de diámetro están presentes en ambos ovarios, y representan la población total de folículos reclutados (Grant et al., 1989).

En el ganado bovino, el inicio de las olas de crecimiento folicular está precedido por un aumento transitorio de la FSH que estimula el desarrollo de los folículos antrales. Sin embargo, en la cerda no se ha detectado un claro incremento en las concentraciones de FSH coincidentes con el período de reclutamiento folicular (Flores et al., 1989; Guthrie and Bolt, 1990; Cárdenas and Pope, 2002), aunque las concentraciones plasmáticas de FSH estan

consistentemente más elevadas que durante el periodo preovulatorio del ciclo. Guthrie and Bolt (1990) sugieren la posibilidad de que no solo los cambios en la concentración individual de FSH, sino la alteración del ratio LH:FSH, podría estar detrás de la regulación del proceso de reclutamiento folicular.

### Selección:

Aproximadamente el 30 o 40% de los folículos reclutados se seleccionan para completar la maduración final y la ovulación, mientras que el resto de los folículos y de los oocitos que contienen sufren atresia y desaparecen de los ovarios. Por tanto, el número final de folículos ovulatorios está determinado por la cantidad de folículos reclutados y por la capacidad de estos folículos para seguir creciendo y evitar la atresia durante el proceso de selección (Cárdenas and Pope, 2002). La intensidad del proceso de selección (medido por la proporción de folículos supervivientes en la cohorte ovulatoria) es muy variable entre las especies, siendo muy baja en caballos, que tienen un pequeño tamaño de cohorte, mientras que es muy alta para el ganado bovino (un folículo seleccionado entre 5) y porcino (12 folículos seleccionados de una cohorte de 50; Driancourt, 2001).

El mecanismo de selección folicular difiere entre el ganado bovino y porcino, debido a los diferentes receptores foliculares presentes en el momento de la selección (Liu et al., 1998; 2000; Xu et al., 1995) (**Figura 2.4**). Lucy (2007) propuso dos modelos diferentes para describir el proceso de selección folicular. Ambos modelos sugieren que un folículo tiene una ventaja en su desarrollo sobre los demás en el momento de la selección folicular. Esta ventaja podría ser conferida por aspectos individuales del folículo en el comienzo de la onda

folicular, incluyendo su lecho vascular, o el número o el estado de las células de la granulosa y de la teca.

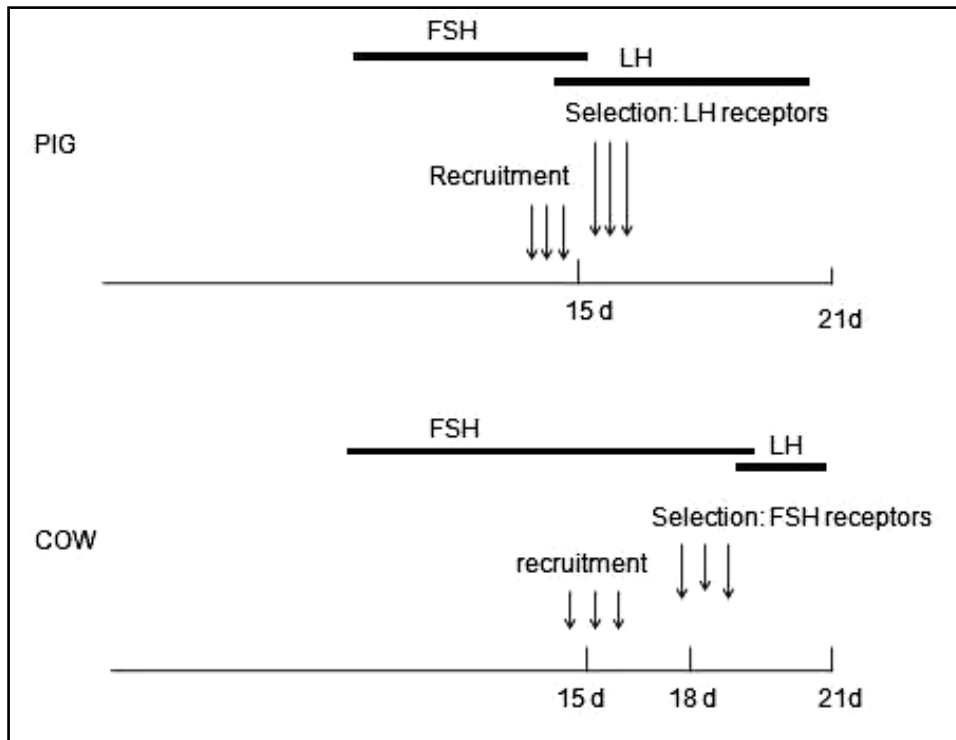


Figura 2.4 Mecanismos de selección folicular en ganado bovino y porcino (basado en información tomada de Lucy, 2007 y Driancourt, 2001).

De acuerdo con el modelo de Missouri (Xu et al., 1995), los primeros folículos en desarrollar receptores para LH teóricamente podrían causar atresia en los demás folículos a través de la inhibición selectiva de la FSH. Este modelo podría explicar el mecanismo de selección en la cerda, debido a que el desarrollo del receptor de LH en células de la granulosa se produce en una fase temprana del crecimiento folicular preovulatorio (Liu et al., 1998; 2000), permitiendo a una cohorte de folículos responder a la LH cuando las concentraciones de FSH en sangre disminuyen, escapando de este modo de la atresia. Por el contrario, en las vacas la adquisición de receptores de LH por parte de las células de la granulosa no es un

componente clave de selección folicular, ya que ocurre casi al final del crecimiento preovulatorio (Fortune et al., 2001).

De acuerdo con el modelo de Cornell (Fortune et al., 2004), el aumento de la concentración de FSH durante la proceso de reclutamiento folicular incrementa la síntesis de la enzima que degrada la proteína de unión al factor de crecimiento similar a la insulina tipo I (IGF BP) presente en el líquido folicular, y por tanto conduce a un aumento de IGF-I libre. El aumento en la concentración de IGF-I incrementa la actividad esteroidegenica intrafolicular de FSH, así como la actividad de LH, aumentando la tasa de crecimiento del folículo dominante y la concentración de estradiol en sangre. Además, el aumento en la concentración de folistatina haría que esta se una a la activina folicular, cambiando el equilibrio inhibina/activina hacia la inhibina. La inhibina producida dentro de la capa de células de la granulosa también potencia la acción de la LH a nivel de las células de la teca. Finalmente, el aumento de los niveles de estradiol disminuye la concentración de FSH causando la atresia de todos los folículos restantes. Este modelo podría explicar la selección folicular en vacas, puesto que a diferencia del cerdo, el receptor para la FSH continúa siendo expresado en la capa de células granulosa durante todo el periodo folicular del ciclo estral (Xu et al., 1995). Respecto al desarrollo de receptores de LH en las células de la granulosa en las vacas, se ha planteado la hipótesis de que este mecanismo permitiría a las células de la granulosa aumentar la actividad de la aromatasa en respuesta a la FSH y LH, y de esta forma aumentar, o al menos mantener, su capacidad para producir más estradiol que los folículos subordinados. Otra posibilidad es que los receptores de LH se desarrollen en células de la granulosa de los folículos dominantes con el fin de prepararlos para su posterior diferenciación en respuesta al pico de LH. (Fortune et al., 2004).

## **2.4 Estrategias para la estimulación de la pubertad en cerdas prepúberes**

El número de cerdos destetados semanalmente depende principalmente de la inseminación de un número suficiente de hembras cada semana (Dial et al., 1996). Con el fin de tener suficientes hembras disponibles, es necesario disponer de un suministro garantizado de cerdas de reposición. Este objetivo se consigue mediante la estimulación temprana de la pubertad y el mantenimiento de una actividad cíclica normal posterior a la primera ovulación. Los únicos métodos eficaces para la estimulación prematura de la pubertad son la exposición al verraco y la inyección de las hormonas gonadotrópicas.

### ***2.4.1 Exposición al verraco:***

La exposición a un verraco es la práctica más común para la estimulación temprana de la pubertad. Una estimulación adecuada del celo requiere el contacto físico directo entre el macho y las cerdas prepúberes, mientras que para la detección del celo solo es necesario un contacto a través de la valla de separación. Para garantizar la eficacia de la exposición al verraco, es importante seguir unas reglas mínimas (Kirkwood and Thacker 1992; Hughes, 1997):

1. Las cerdas jóvenes deberán tener por lo menos 160 días de edad, aunque estudios recientes sugieren que es preferible que tengan 180 días.
2. Los verracos deberán tener al menos 10 meses de edad. Una parte importante del estímulo del macho consiste en la producción de feromonas por la glándula salival submaxilar, y esta glándula no se desarrolla completamente hasta que el animal alcanza los 9 o 10 meses.
3. Las cerdas prepúberes deben estar en contacto físico con el jabalí durante al menos 15 minutos por día.

4. La exposición al macho debe realizarse al menos dos veces al día en un espacio suficientemente grande ( $>1.5 \text{ m}^2$  por cerda joven), ya que el hacinamiento de los animales puede retrasar la pubertad y hace más difícil la detección de celos.
5. Las cerdas prepúberes deben alojarse al menos a 1 m de distancia de los verracos para evitar que se acostumbren a los estímulos del macho, causando problemas en la detección del celo.
6. Si las hembras no responden como se esperaba, es aconsejable la utilización de un macho diferente.
7. Si las cerdas no se inseminan en su primer celo, la exposición al verraco debe seguir al menos durante 5 minutos cada día con el fin de promover los ciclos estrales regulares. En ausencia de una exposición continuada, muchas hembras desarrollan intervalos de celo irregulares.

#### ***2.4.2 Utilización de hormonas exógenas:***

Si la exposición al verraco no resulta eficaz, por ejemplo debido a un efecto estacional, la inducción del celo mediante hormonas exógenas se vuelve necesaria. Combinaciones comerciales de hormonas gonadotrópicas contienen la gonadotropina coriónica equina (eCG), que puede ser usada sola o en combinación con la gonadotropina coriónica humana (hCG). Una combinación hormonal muy común en porcino es 400 UI de eCG + 200 UI de hCG (PG600®; Intervet). La inyección de PG600 es eficaz para la inducción del estro en cerdas destetadas, pero cuando se administra a las cerdas prepúberes para la estimulación de la pubertad, hasta el 30% de los animales puede no exhibir comportamiento estral, y aproximadamente el 30% de aquellos que exhiben signos de estro pueden no ovular regularmente (Tabla 2.1).

Tabla 2.1: Porcentaje de celos en cerdas prepúberes en respuesta a la inyección con PG600<sup>1</sup>

<b>Estrous (%)</b>	<b>Ovulation (%)</b>	<b>Cycling (%)</b>	<b>Source</b>
88	100	87	Paterson (1982)
--	97	60	Paterson (1982)
70	99	--	Tilton <i>et al.</i> (1995)
78	--	67	Kirkwood (1999)

<sup>1</sup>PG600: combinación de 400 IU eCG + 200 IU hCG (Intervet International)

La etiología de la falta de respuesta a la inyección con PG600 es desconocida, aunque es posible que se deba a la hormona hCG de la preparación, que induce una ovulación inmediata en los animales o la luteinización de los folículos ováricos, causando una producción prematura de progesterona que suprimiría el comportamiento estral de los animales. Por lo tanto, es necesario el desarrollo de nuevos protocolos hormonales que mejoren las tasas de celo y ovulación en cerdas prepúberes. Sin embargo, con el fin de lograr este objetivo, primero es necesario determinar por qué el 30% de las cerdas no responden a la inyección de PG600.



**CAPÍTULO 3: Effect of eCG or eCG plus hCG on Estrus Expression and Ovulation in  
Prepubertal Gilts**

**Published in Reproduction in Domestic Animals, 2009; 44(3):411-413**



Tabla 3.1. Efecto del tratamiento con eCG o eCG + hCG en la incidencia de celo y ovulación en cerdas prepúberes, indicada por la elevación de la progesterona en sangre en el d 7 postratamiento

	eCG+hCG	eCG	Control	<i>P</i> -value <sup>1</sup>
<b>No. gilts</b>	45	45	19	--
<b>Age (d)</b>	154.1 ± 2.6	154.2 ± 2.7	150.6 ± 3.8	0.8
<b>Weight (kg)</b>	90.1 ± 1.3	91.4 ± 1.3	88.5 ± 2.0	0.9
<b>Follicle diameter (mm)</b>	2.4 ± 0.1	2.3 ± 0.1	2.3 ± 0.2	0.9
<b>Estrus<sup>2</sup></b>	33 (73.3%) <sup>a</sup>	7 (15.6%) <sup>b</sup>	0	≤0.001
<b>Estrus, +P4<sup>2</sup></b>	29 (64.4%) <sup>a</sup>	7 (15.6%) <sup>b</sup>	--	≤0.001
<b>Estrus, -P4</b>	4 (8.9%)	0	--	0.9
<b>Anestrus, +P4</b>	1 (2.2%)	0	--	0.9
<b>Anestrus, -P4<sup>2</sup></b>	11 (24.4%) <sup>a</sup>	38 (84.4%) <sup>b</sup>	19 (100%)	≤0.001

<sup>1</sup>Overall *P*-value for main effects

<sup>2</sup>Differences between treatment-groups indicated with following superscripts: <sup>a,b</sup>*P*≤0.001

Tabla 3.2. Influencia del peso de las cerdas prepúberes en la respuesta estral y ovulatoria a la eCG o eCG + hCG

Item	75-90 kg	91-110 kg	<i>P</i> -value <sup>1</sup>
<b>No. gilts</b>	45	45	--
<b>Age (d)</b>	154.9 ± 5.0	157.5 ± 3.8	0.81
<b>Estrus<sup>2</sup></b>	15 (27.1%) <sup>a</sup>	25 (58.3%) <sup>b</sup>	0.02
<b>Estrus, +P4<sup>2</sup></b>	13 (23.6%) <sup>a</sup>	23 (50.71%) <sup>b</sup>	0.03
<b>Anestrus, -P4<sup>2</sup></b>	29 (71.01%) <sup>a</sup>	20 (41.66%) <sup>b</sup>	0.04

<sup>1</sup>Overall *P*-value for main effects

<sup>2</sup>Differences between treatment-groups indicated with following superscripts: <sup>a,b</sup>*P* ≤ 0.05



**CAPÍTULO 4: Effect of Prior FSH Treatment on the Estrus and Ovulation Responses  
to eCG in Prepubertal Gilts**

**Published in Animal Reproduction Science, 2009; 110(1-2): 123-127**





Table 4.1: Celo y ovulación en respuesta a la administración de PG600 (eCG + hCG), eCG sola, y FSH seguida de eCG

Item	PG600	eCG <sup>1</sup>	FSH + eCG <sup>2</sup>	Control	<i>P</i> -value <sup>3</sup>
<b>No. gilts</b>	38	37	36	38	
<b>Estrus</b>	23 (60.81%)	17 (45.8%)	18 (50.48%)	3 (7.48%)	0.44
<b>Ovulation<sup>4</sup></b>	34 (89.47%) <sup>a</sup>	21 (57.29%) <sup>b</sup>	22 (63.1%) <sup>b</sup>	2 (5.26%)	0.01

<sup>1</sup>600 IU eCG

<sup>2</sup>75 mg FSH as 6 injections 12 h apart then 600 IU eCG 24h after last FSH

<sup>3</sup>Overall *P*-value for main effects

<sup>4</sup>Differences between treatment-groups indicated with following superscripts: <sup>a,b</sup>*P*≤0.05







**CAPÍTULO 5: Effect of hCG Treatment on the Estrous and Ovulation Responses to  
FSH in Prepubertal Gilts**

**Published in *Reproduction Domestic Animals*, 2009; 44(3):432-434.**



Tabla 5.1: Efecto de la administración de hCG, FSH seguida de eCG, o FSH seguida de hCG a cerdas prepúberes de 150 d de edad, en la incidencia de celo y ovulación indicada por un aumento en la progesterona sanguínea.

	<b>hCG<sup>1</sup></b>	<b>FSH + eCG<sup>2</sup></b>	<b>FSH + hCG<sup>3</sup></b>	<b>P-value<sup>4</sup></b>
<b>No. gilts</b>	15	23	25	
<b>Estrus<sup>5</sup></b>	1 (6.7%) <sup>c</sup>	4 (17.4%) <sup>c</sup>	16 (64%) <sup>d</sup>	≤0.001
<b>Estrus, +P4<sup>5</sup></b>	0 <sup>c</sup>	3 (13%) <sup>a</sup>	15 (60%) <sup>b,d</sup>	≤0.001
<b>Anestrus, -P4<sup>5</sup></b>	15 (93.3%) <sup>c</sup>	16 (69.6%) <sup>a</sup>	9 (36%) <sup>b,d</sup>	≤0.01
<b>Estrus, -P4</b>	1 (6.7%)	1 (4.3%)	1 (4%)	0.95
<b>Anestrus, +P4</b>	0	3 (13%)	0	0.95

<sup>1</sup>300 IU hCG

<sup>2</sup>100 mg FSH in PVP as 2 injections 24 h apart then 600 IU eCG 24h after last FSH

<sup>3</sup>100 mg FSH in PVP as 2 injections 24 h apart then 300 IU hCG 24h after last FSH

<sup>4</sup>Overall P-value for main effects

<sup>5</sup>Differences between treatment-groups indicated with following superscripts: <sup>a,b</sup>P≤0.05 <sup>c,d</sup>P≤0.01



**CAPÍTULO 6: Effect of hCG on Early Luteal Serum Progesterone Concentrations in  
PG600-treated Gilts**

**Published in *Reproduction Domestic Animals*, 2010; 45:555-557**





Tabla 6.1: Efecto de la inyección de PG60 sola o seguida por hCG a las 0, 24 y 48h en la respuesta ovulatoria en cerdas prepúberes

<b>Item</b>	<b>150d</b>	<b>200d</b>	<b>P-value<sup>1</sup></b>
<b>No. gilts</b>	39	37	--
<b>Ovulation<sup>2</sup></b>	37 (94.8%)	37 (100%)	0.99
<b>P4 &gt; 30 ng/ml<sup>3</sup></b>	18 (46.2%) <sup>a</sup>	34 (87.2 %) <sup>b</sup>	≤0.01

<sup>1</sup>Overall *P*-value for age effect

<sup>2</sup>Indicated by circulating progesterone concentrations of  $\geq 5$  ng/mL

<sup>3</sup>Differences between treatment-groups indicated with following superscripts: <sup>a,b</sup>*P*≤0.01

Tabla 6.2: Influencia de la edad en el efecto de la PG&00 sola o seguida de hCG en la respuesta ovulatoria y los niveles de progesterona en sangre en cerdas prepúberes

<b>Item</b>	<b>150d</b>	<b>200d</b>	<b>P-value<sup>1</sup></b>
<b>No. gilts</b>	39	37	--
<b>Ovulation<sup>2</sup></b>	37 (94.8%)	37 (100%)	0.99
<b>P4 &gt; 30 ng/ml<sup>3</sup></b>	18 (46.2%) <sup>a</sup>	34 (87.2 %) <sup>b</sup>	≤0.01

<sup>1</sup>Overall *P*-value for age effect

<sup>2</sup>Indicated by circulating progesterone concentrations of  $\geq 5$  ng/mL

<sup>3</sup>Differences between treatment-groups indicated with following superscripts: <sup>a,b</sup>*P*≤0.01

**CAPÍTULO 7: Effect of additional hCG on follicular growth and ovulation in PG600-treated gilts**

**Submitted to Journal of Animal Science, November 2013**

























Tabla 7.1: Efecto de la suplementación con hCG en el celo y la ovulación en cerdas nulíparas tratadas con PG600

Item	hCG-0 <sup>1</sup>	hCG-100 <sup>1</sup>	hCG-200 <sup>1</sup>	<i>P</i> -value <sup>2</sup>	
				L	Q
<b>No. gilts</b>	19	20	10	--	--
<b>Weight (kg)</b>	109 ± 2.6	107 ± 2.6	106 ± 2.3	--	--
<b>Ovulation<sup>3</sup></b>	12 (63.1%)	16 (80%)	10 (100%)	0.14	0.9
<b>No. corpora lutea</b>	19.75 ± 4.3 <sup>d</sup>	23.62 ± 4.3 <sup>d</sup>	38.4 ± 3.9 <sup>e</sup>	0.02	0.2
<b>No. gilts with follicular cysts<sup>4</sup></b>	0 <sup>a</sup>	8 (40%) <sup>b</sup>	8 (80%) <sup>c</sup>	0.0014	0.7
<b>No. cysts per gilt</b>	0 <sup>a</sup>	1.25 ± 3.3 <sup>b,d</sup>	17.5 ± 2.3 <sup>e</sup>	0.006	0.0

<sup>1</sup>100 and 200 refer to dose (IU) of hCG administered 24 h after PG600 injection

<sup>2</sup>*P*-value for linear and quadratic trends

<sup>3</sup>determined at slaughter or by transrectal ultrasonography on d 10 after PG600

## **CAPÍTULO 8: Resumen de resultados, discusión y conclusiones**

## 8.1 Resumen global de resultados

Cinco experimentos fueron desarrollados para examinar las razones de la impredecibilidad en las respuestas estral y ovulatoria en cerdas nulíparas asociada a la administración de las hormonas eCG y hCG. En el primer experimento, 109 cerdas prepúberes de 153 días de edad fueron distribuidas en dos grupos basados en el peso de los animales (75-90 kg, n=55 and 91- 110 kg, n=55), e inyectadas aleatoriamente con uno de tres posibles tratamientos hormonales: 1) inyección de 400 IU de eCG y 200 IU de hCG (PG600), 2) inyección de 600 IU de eCG sola, y 3) no inyección de gonadotropinas (grupo control). La respuesta estral fue caracterizada mediante la expresión del reflejo de inmovilidad inducido por la exposición directa a un macho adulto durante 15 min entre los días 2 y 7 posteriores a la inyección de hormonas. La respuesta ovulatoria fue valorada mediante el análisis de la concentración de progesterona (P4) en muestras de sangre obtenidas de la vena yugular en los d 0, 3 y 10 respecto a la inyección hormonal. Una elevación en la concentración de P4  $\geq 1$  ng/mL entre los d 0 y 3 posteriores al tratamiento fue definida como ovulación prematura, mientras que niveles de P4  $< 1$  ng/mL en los d 0 y 3, seguidos de P4  $\geq 5$  ng/ml en el d 10 fue considerado como una respuesta ovulatoria normal. El crecimiento folicular previo a la inyección de gonadotropinas fue determinado mediante ultrasonografía ovárica transrectal. El diámetro medio del tamaño de los folículos previo al tratamiento hormonal fue de 2.4 mm en el conjunto de la población analizada. Ninguna de las hembras del grupo control mostró celo u ovulación. En comparación con la administración de eCG sola, el tratamiento con PG600 resultó en un mayor porcentaje de hembras con síntomas de celo, así como con niveles posovulatorios de P4 en el d 10. Ninguna de las cerdas tratadas con PG600 que no tuvo síntomas de celo presentó niveles elevados de P4 en el día 10. Finalmente, tanto la tasa de



celo como de ovulación estuvieron positivamente relacionadas con el peso de las cerdas prepúberes, siendo más altas en las cerdas con mayor peso al momento del tratamiento.

En el segundo experimento, 149 cerdas prepúberes fueron seleccionadas a los 150 o 180 d de edad y distribuidas en 4 grupos con tratamientos diferentes: 1) PG600, 2) 600 IU de eCG, 3) 72 mg de FSH administrado en 6 inyecciones consecutivas a intervalos de 12 h, seguido de una inyección de 600 IU de eCG 12 h después de la última administración de FSH, y 4) no inyección hormonal (grupo control). Las tasas de celo y de la ovulación fueron medidas y analizadas usando los mismos procedimientos que en el experimento anterior, con la diferencia de que el peso de los animales fue sustituido por la edad como efecto fijo en el modelo mixto lineal. Comparado con la administración de PG600, tanto la administración de eCG sola como el tratamiento con FSH previo a la administración de eCG disminuyeron el porcentaje de hembras con niveles posovulatorios de P4, mientras que no se detectaron diferencias entre los grupos tratados con eCG y FSH + eCG. Además, la tasa de celos estuvo positivamente relacionada con la edad de los animales en el momento del tratamiento, siendo más elevada en los animales de mayor edad.

En el tercer experimento, 63 cerdas prepúberes (150 d) fueron asignadas a 3 tratamientos diferentes: 1) 300 IU de hCG, 2) 100 mg de FSH administrado en 2 inyecciones consecutivas a intervalos de 24 h, seguido de 300 IU de hCG 24 h después de la última administración de FSH, y 3) 100 mg de FSH administrado en 2 inyecciones consecutivas a intervalos de 24 h, seguido de una inyección de 600 IU de eCG 24 h después de la última administración de FSH. Las tasas de celo y de la ovulación fueron medidas y analizadas usando los mismos procedimientos que en el primer experimento. Las respuestas estral y

ovulatoria fueron mínimas en respuesta al tratamiento con hCG sola, y mejoraron con la administración de FSH seguida de

eCG. Cuando hCG fue administrada posteriormente a la FSH, las respuestas estral y ovulatoria fueron comparables a las inducidas por la PG600. En el cuarto experimento se realizaron dos experimentos diferentes. En el primer experimento, 212 cerdas prepúberes (160 d) fueron distribuidas en 5 tratamientos hormonales diferentes: 1) PG600, 2) PG600 y 200 IU de hCG administrados conjuntamente, 3) PG600 seguido de 200 IU de hCG administrado a las 24 h, 4) PG600 seguido de 200 IU de hCG administrado a las 48 h, y 5) no inyección de gonadotropinas (grupo control). La detección de celos y ovulación fue medida usando los mismos procedimientos que en el primer experimento. Comparado con la administración de PG600 sola, la administración de PG600 y hCG de forma conjunta o consecutiva no resultó en un aumento significativo del porcentaje de hembras en celo o con niveles posovulatorios de P4. Sin embargo, el porcentaje de hembras con niveles circulantes de  $P4 \geq 30$  ng/mL fue superior en todos los grupos que recibieron hCG suplementaria, en comparación con la administración de PG600 sola. En el segundo experimento 76 cerdas prepúberes fueron seleccionadas a los 150 o 200 días de edad y distribuidas en 4 tratamientos hormonales diferentes: 1) PG600, 2) PG600 seguido de 100 IU de hCG administrada a las 24 h, 3) 400 IU de eCG, seguido de 200 IU de hCG administrado a las 24 h, 3) 400 IU de eCG, seguido de 300 IU de hCG administrado a las 24 h. Comparado con la administración de PG600 sola, la administración de PG600 seguido de hCG, o de eCG seguido de hCG, no resultó en un mayor porcentaje de hembras en celo o con niveles posovulatorios de P4. Sin embargo, el porcentaje de hembras con niveles circulantes de  $P \geq 30$  ng/mL fue superior en el grupo de hembras de 150 d que recibió PG600 seguido de hCG a las 24 h, aunque este efecto no fue evidente en el grupo de cerdas nulíparas de 200 d de edad.

En el quinto experimento, 49 cerdas prepúberes fueron seleccionadas a los 160 días de edad y distribuidas en 3 tratamientos diferentes: 1) PG600 (control), 2) PG600 seguido de 100 IU de hCG administrada a las 24 h, y 3) PG600 seguido de 200 IU de hCG administrada a las 24 h. El crecimiento folicular previo a la inyección de gonadotropinas fue determinado mediante ultrasonografía ovárica. Para valorar la tasa de ovulación, veintiséis hembras fueron sacrificadas 10 días después de la inyección de PG600, y el número de cuerpos lúteos y quistes ováricos cuantificado. La ovulación en el resto de los animales se midió mediante ultrasonografía ovárica en el día 10 posterior a la PG600. En comparación con PG600, la administración de PG600 + hCG (grupos 2 y 3 en conjunto) resultó en un mayor porcentaje de hembras con niveles posovulatorios de progesterona. Además, se detectó un incremento lineal en el número de cuerpos lúteos en relación con la dosis de hCG administrada, siendo superior en el grupo que recibió 200IU comparado con la inyección de 100IU o con el grupo control. Igualmente, tanto el porcentaje de hembras con quistes ováricos como el número de quistes por hembra aumentaron linealmente con la dosis de hCG, siendo superior en el grupo que recibió 200IU comparado con la inyección de 100IU, y este último superior al grupo control. Todos los quistes ováricos fueron clasificados de naturaleza folicular.

## 8.2 Discusión

Los resultados del primer experimento indican que cuando los ovarios de las cerdas prepúberes contienen folículos de menos de 3 mm de diámetro, la falta de respuesta ovulatoria en el 30% de los animales tratados con PG600 no está asociada con una prematura ovulación o luteinización de los folículos inducida por la hormona hCG. De hecho, la escasa tasa de celos registrada en respuesta a la inyección de eCG comparado con la PG600, sugiere que la hCG tiene un papel fundamental en el desarrollo folicular y la inducción del celo. Cuatro de las hembras tratadas con PG600 que expresaron celo no tenían niveles elevados de progesterona en sangre. Es posible que en estas cerdas se produjera el crecimiento folicular necesario para causar un aumento en los niveles de estrógenos con el consiguiente celo, pero insuficiente para desencadenar el pico de LH. Sin embargo, en ausencia de la medición de los niveles de LH en sangre, esta hipótesis es especulativa.

La escasa respuesta estral y ovulatoria inducida por la administración de eCG consecutiva a la FSH en cerdas prepúberes (segundo experimento), sugiere que la falta de actividad de la eCG no es debida a su incapacidad para iniciar el crecimiento de los folículos de pequeño tamaño, como se había especulado en un principio. Aunque el desarrollo folicular en respuesta al pretratamiento con FSH no fue monitorizado en este estudio, el protocolo de administración de la FSH fue similar a estudios anteriores, en los que sí se demostró un crecimiento de los folículos hasta los 4 mm de diámetro (Guthrie et al, 1990; Bolamba et al., 1996). En este sentido, en el tercer experimento de la tesis no solo se aumentó la dosis de FSH, sino también se mezcló con un polímero de liberación retardada (polivinilpirrolidona, PVP) para aumentar su vida media en sangre. Sin embargo la inyección de eCG consecutiva a la FSH+PVP siguió sin traducirse en un incremento del número de ovulaciones.

El tratamiento con FSH previo a la administración de hCG (tercer experimento), aumentó la respuesta ovulatoria en comparación con la administración de hCG sola, lo que sugiere que la hormona FSH tiene un papel fundamental durante las primeras fases del desarrollo folicular. Además, la mayor respuesta ovulatoria obtenida con la administración de FSH seguida de hCG en vez de eCG sugiere un indispensable papel de la hormona hCG (con actividad LH) en el crecimiento folicular, una vez que los folículos han alcanzado un cierto desarrollo. Estos resultados proveen una explicación a la mejora en la inducción del celo y la ovulación en respuesta a altas dosis de eCG (700-1000 IU) observada en experimentos anteriores (Guthrie, 1977; Dial et al., 1984; Britt et al., 1986; Esbenshade, 1987; Flores et al., 1989; Bolamba, 1992), así como las tasas de celo entre el 25 % y el 52 % cuando se inyectaron solamente entre 300 y 600 IU de eCG (Britt et al., 1985; do Lago et al., 2005; Gama et al., 2005). La hormona eCG, además de actividad FSH, presenta cierta actividad LH (Combarrous et al., 1984; Guthrie et al., 1990), de forma que administrada en mayores dosis podría aportar una cantidad de LH suficiente para permitir el desarrollo de los folículos hasta la ovulación. La necesidad de la actividad LH en el desarrollo folicular también explicaría el aumento en el porcentaje de celos y ovulaciones en respuesta al tratamiento con eCG en las cerdas de mayor peso y edad, observado en experimentos 1 y 2, respectivamente. 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 la gonadotropina LH, que podría complementar la falta de actividad LH de la gonadotropina eCG para completar el desarrollo folicular previo a la ovulación.

Aunque en el tercer experimento no se monitorizó la dinámica folicular, los resultados observados nos llevaron a especular que la mejora en la respuesta ovulatoria inducida por la administración consecutiva de FSH y hCG, podría ser debida a un control bifásico del

crecimiento folicular por parte de las gonadotropinas hipofisarias. En este sentido, Driancourt et al., (1995) observó que, en cerdas nulíparas, el crecimiento folicular hasta un diámetro cercano a los 4 mm era dependiente de la FSH, mientras que el crecimiento más allá de este tamaño parecía ser controlado por pulsos de LH. Este cambio en la dependencia gonadotrópica de los folículos parece estar acoplado a un cambio en la expresión de los receptores para la LH y FSH, con una disminución del ARNm que codifica para el receptor de la FSH y un aumento del de la LH (Nakano et al., 1983; Liu et al., 1998, 2000). Interesantemente, el tratamiento de folículos con FSH aumentó la expresión del receptor de LH a nivel del ARNm *in vitro* (LaBarbera and Ryan, 1981), lo que podría explicar cómo el pretratamiento con FSH aumento la respuesta ovárica a la hCG en nuestro tercer experimento.

Los resultados del cuarto experimento respaldan el efecto positivo de la hormona hCG en el crecimiento folicular, al indicar un aumento en el porcentaje de cerdas prepúberes con niveles de P4  $\geq$  30 ng/mL cuando la PG600 fue suplementada con hCG 24 o 48 h después. Este aumento fue significativo solamente en las cerdas menores de 160 días de edad, lo que sugiere que a medida que las cerdas prepúberes maduran, la producción endógena de LH incrementa, de modo que la suplementación de la PG600 con hCG se vuelve innecesaria. Así mismo, este dato también soporta los resultados de los experimentos 1 y 2, donde la respuesta ovulatoria inducida por la hormona eCG (sin actividad LH) aumentó con la edad y el peso de las hembras prepúberes. El incremento en la respuesta ovulatoria tras la suplementación de la PG600 con hCG también respalda previos estudios (Bolamba et al., 1991; Driancourt et al., 1992), donde se observó una mejora del celo y la ovulación cuando se aumentó la dosis de hCG administrada a cerdas prepúberes. El mayor aumento en los niveles de progesterona se observó cuando la hCG se administró a las 0 y las 24 h, sugiriendo que la dependencia de

los folículos en la LH podría disminuir tras el proceso de selección inicial, debido una mayor cantidad de IGF-1 que podría actuar sinérgicamente con la LH para promover las últimas fases del desarrollo folicular (Lucy et al., 2001).

Finalmente, los resultados del quinto experimento indican que el aumento en el porcentaje de cerdas ovuladas en respuesta a la suplementación de PG600 con hCG, así como los niveles elevados de progesterona, son debidos al desarrollo de un mayor número de cuerpos lúteos, que está directamente relacionado con la dosis de hCG administrada. El aumento en el número de cuerpos lúteos podría estar asociado a una mayor producción endógena de andrógenos. En este sentido, la administración de testosterona en cerdas prepúberes aumentó el número de folículos preovulatorios y cuerpos lúteos, (Cárdenas and Pope, 1994; 1997), mientras que la superovulación del hámster mediante la administración de hCG estuvo asociada a un aumento en la síntesis de andrógenos a nivel folicular (Greenwald, 1993).

Además de un mayor número de cuerpos lúteos, la dosis más alta de hCG (200 IU) también indujo múltiples quistes foliculares en la mayoría de las cerdas, mientras que a menor dosis (100 IU) hubo una disminución tanto en la incidencia de cerdas con quistes, como en el número quistes por animal. Una relación similar entre los niveles de gonadotropinas y el desarrollo de quistes ováricos fue observada por Breen et al. (2005), que demostró un aumento en el número de quistes en cerdas nulíparas tratadas con 1.200 IU de PG600, en comparación con la administración de 900 o 600 IU. Es probable que el efecto negativo del exceso de hCG suceda a nivel ovárico, puesto que la mayoría de las cerdas tratadas con 200 IU de hCG presentaron cuerpos lúteos y quistes foliculares al mismo tiempo,

indicativo de que la señal ovulatoria fue recibida pero no actuó en todos los folículos. Teniendo en cuenta que el peso medio de las cerdas en este estudio fue de 106 kg, es posible que algunos de los animales fuesen ya bastante maduros a nivel fisiológico para responder a la PG600 sola, de modo que la suplementación con hCG pudiera haber causado un exceso en la actividad LH conduciendo al desarrollo de los quistes ováricos. Un efecto perjudicial de la suplementación con hCG asociado a la edad de las cerdas fue también observado en un estudio anterior, cuando la inyección de 200 IU de hCG 24 h después PG600 disminuyó la fertilidad en cerdas de número de parto  $\geq 3$ , pero no en los animales de primer o segundo parto (Anexo I).

Es posible que el exceso de hCG disminuyese la expresión de los receptores de LH en algunos folículos, tal como se ha demostrado en las células de la granulosa en la rata (LaPol et al., 1990), lo que podría inhibir su respuesta al pico ovulatorio de LH induciendo el desarrollo de quistes ováricos. Alternativamente, es posible que un exceso de hCG, en presencia de actividad FSH residual de la PG600, indujese la selección de folículos accesorios en algunas animales, que no alcanzarían un desarrollo suficiente antes del pico de LH. En este sentido, la ecografía transrectal previa al tratamiento gonadotrópico indicó la presencia de folículos de 3 mm en algunos de los animales, que podrían responder directamente a la actividad de LH de la PG600, como se muestra por el 63 % de respuesta ovulatoria en el grupo que no recibió hCG suplementaria. La administración de 200 UI de hCG en estos animales puede haber seleccionado folículos adicionales no solo en el momento de la inyección, sino también en los días consecutivos, que con una velocidad de crecimiento de tan solo 1 mm al día (Morbeck et al., 1992), no llegarían a tiempo para ovular en el pico de LH, convirtiéndose en quistes foliculares. Aunque especulativo, la administración de 100 IU de hCG podría haber seleccionado folículos adicionales sólo en el momento de la



inyección, que serían menos propensos a desarrollar quistes en los animales que ya respondieron a la PG600, mientras que al mismo tiempo mejoraría el crecimiento folicular en el 37 % restante de las hembras.

Es posible que la administración suplementaria de dosis más bajas de hCG (20-50 IU), inyectada a las 24 horas después de PG600, sea capaz de seleccionar folículos en la mayor parte de las cerdas jóvenes prepúberes sin inducir la formación de quistes. Alternativamente, es posible que la administración de eCG sola pueda ser capaz de sincronizar el crecimiento de la mayoría de los folículos hasta los 4 mm de diámetro, cuando se volverían receptivos a la actividad LH de la hCG. De acuerdo con esta hipótesis, la administración de 400 IU de eCG, seguida de 200 IU de hCG 24 h después, indujo la ovulación en el 100% de los animales (experimento 3), mientras que muy pocas cerdas de 150 d mostraron niveles de progesterona por encima de 30ng/mL, lo que sugiere una respuesta ovulatoria normal.

Teniendo en cuenta todo lo anterior, podemos concluir que la actividad LH y FSH contenida en la PG600 se ha optimizado para inducir la ovulación en las cerdas jóvenes sin causar el desarrollo de quistes foliculares, aunque el 25-35% de los animales no responde al tratamiento. La suplementación con hCG consecutiva a la PG600 aumentó tanto el porcentaje de cerdas ovuladas como el número de cuerpos lúteos por ovario, pero su uso se asoció con el desarrollo de quistes ováricos de forma dependiente con la dosis de hCG. El mecanismo fisiológico y la implicación en la fertilidad de la administración adicional de hCG en cerdas necesita seguir siendo investigado.

### 8.3 Conclusiones

1. La falta de respuesta ovulatoria en el 30% de los animales tratados con PG600 no está asociada con una prematura ovulación o luteinización de los folículos inducida por la hormona hCG.
2. Las tasas de celo y ovulación las cerdas prepúberes inyectadas con gonadotropinas aumentan con la edad y el peso de los animales.
3. Las hormonas eCG y hCG administradas en solitario no son eficaces para estimular la ovulación en cerdas prepúberes, debido a su incapacidad para estimular el crecimiento de los folículos en alguna etapa del desarrollo.
4. La administración consecutiva de FSH y hCG produce una respuesta ovulatoria similar a la administración de PG600.
5. La suplementación de PG600 con hCG a las 24 h mejora la respuesta ovulatoria en cerdas prepúberes, y aumenta la concentración media posovulatoria de progesterona en sangre debido a la formación de un mayor número de cuerpos lúteos. La suplementación con hCG también produce un aumento en el número de quistes foliculares, que está directamente relacionado con la dosis administrada.

## **CAPÍTULO 10: 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.
- Beltranena, E., Aherne, F.X., Foxcroft, G.R., 1993. Innate variability in sexual development irrespective of body fatness in gilts. *J. Anim. Sci.* 71, 471–480.
- Berardinelli, J.G., Ford, J.J., Christenson, R.K., Anderson, L.L., 1984. Luteinizing hormone secretion in ovariectomized gilts: effects of age, reproductive state and estrogen replacement. *J. Anim. Sci.* 58, 165–173.
- Bielańska-Osuchowska, Z., 2006. Oogenesis in pig ovaries during the prenatal period: ultrastructure and morphometry. *Reprod. Biol.* 6, 161–193
- Black, J.L., Erickson, B.H., 1968. Oogenesis and ovarian development in the prenatal pig. *Anat. Rec.* 161, 45-55.
- 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.
- Bolamba, D., Matton, P., Estrada, R., Dufour, J.J., 1992. Effect of pregnant mare's serum gonadotropin treatment on follicular populations and ovulation rates in prepubertal gilts with two morphologically different ovarian types. *J. Anim. Sci.* 70, 1916-1922.
- Bolamba, D., Matton, P., Sirard, M.A., Estrada, R., Dufour, J.J., 1991. Ovarian morphological conditions and the effect of injection of human chorionic gonadotropin on ovulation rates in prepubertal gilts with two morphologically different ovarian types. *J. Anim. Sci.* 69, 3774-3779.

- 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., Ziecik, A.J., 1991. Roles of estradiol and gonadotropin-releasing hormone in controlling negative and positive feedback associated with the luteinizing hormone surge in ovariectomized pigs. *Biol. Reprod.* 45, 478-485.
- 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.
- Camous, S., Prunier, A., Pelletier, J., 1985. Plasma prolactin, LH, FSH and estrogen excretion patterns in gilts during sexual development. *J. Anim. Sci.* 60, 1308–1317.
- Cardenas, H., Pope, W.F., 2002. Control of ovulation rate in swine. *J. Anim. Sci.* 80(E. Suppl. 1), E36-E46.
- Cardenas, H., Pope, W.F., 1994. Administration of testosterone during the follicular phase increased the number of corpora lutea in gilts. *J. Anim. Sci.* 72, 2930-2935.
- Cardenas, H., Pope, W.F., 1997. Administration of testosterone from day 13 of the estrous cycle to estrus increased the number of corpora lutea and conceptus survival in gilts. *J. Anim. Sci.* 75, 202-207.
- Clarke, I.J., 1989. The GnRH/gonadotropin axis in the ewe, cow and sow. *Domest. Anim. Endocrinol.* 6(1), 1-14.

- Clark, J. R., Brazier, S. G., Wiginton, L. M., Stevenson, G. R., Tribble, L. F., 1982. Time of ovarian follicle selection during the porcine estrous cycle. *Theriogenology* 18, 697–709.
- Clarke, I.J., Thomas, G.B., Yao, B., Cummins, J.T., 1987. GnRH secretion throughout the ovine estrous cycle. *Neuroendocrinology* 46, 82-88.
- Colenbrander, B., Kruip, T.A., Dieleman, S.J., Wensing, C.J., 1977. Changes in serum LH concentrations during normal and abnormal sexual development in the pig. *Biol. Reprod.* 17, 506–513.
- Dial, G. D., Duangkaew, C., King, V., Rademacher, C., 1996. The influence of the gilt pool on weaned pig output. *Proc. A.D. Leman Conf.* 23, 39-41.
- Dial, G.D., Dial, O.K., Wilkinson, R.S., Dziuk, P.J., 1984. Endocrine and ovulatory responses of the gilt to exogenous gonadotropins and estradiol during sexual maturation. *Biol. Reprod.* 30, 289-299.
- Driancourt, M.A. 2001. Regulation of ovarian follicular dynamics in farm animals. Implications for manipulation of reproduction. *Theriogenology* 55, 1211-1239.
- Driancourt, M.A., Locatelli, A., Prunier, A., 1995. Effects of gonadotrophin deprivation on follicular growth in gilts. *Reprod. Nutr. Dev.* 35, 663-673.
- Driancourt, M.A., Prunier, A., Bidanel, J.P., Martinat-Botte, F., 1992. HCG induced oestrus and ovulation rate and FSH concentrations in prepuberal gilts from lines differing by their adult ovulation rate. *Anim. Reprod. Sci.* 29, 297-305.
- do Lago, V., Vianna, W.L., Gama, R.D., de Campos Rosseto, A., Pinese, M.E., de Sant'Anna Moretti, A., 2005. Second oestrus synchronization and precocious embryo viability after

- puberty induction in gilts by the use of gonadotrophin treatment. *Reprod. Dom. Anim.* 40, 141-144.
- Elsaesser, F., Parvizi, N., Schmitz, U., 1991. Inhibitory feedback action of oestradiol on tonic secretion of luteinizing hormone in pre- and postpubertal gilts. *Anim. Reprod. Sci.* 25, 155–168.
- Esbenshade, K.L., 1987. Ovarian response to pregnant mare serum gonadotropin and porcine pituitary extract in gilts actively immunized against gonadotropin releasing hormone. *J. Anim. Sci.* 65, 1768-1774.
- Esbenshade, K.L., Paterson, A.M., Cantley, T.C., Day, B.N., 1982. Changes in plasma hormone concentrations associated with the onset of puberty in the gilt. *J. Anim. Sci.* 54, 320–324.
- Evans, A.C.O., O’Doherty, J.V., 2001. Endocrine changes and management factors affecting puberty in gilts. *Livest. Prod. Sci.* 68, 1-12.
- Flowers, B., Martin, M.J., Cantley, T.C., Day, B.N., 1989. The effect of pregnant mare serum gonadotropin on follicle stimulating hormone and estradiol secretion in the prepuberal gilt. *Anim. Reprod. Sci.* 21, 93-100.
- Fortune, J. E., Rivera, G. M., Evans, A. C., Turzillo, A. M., 2001. Differentiation of dominant versus subordinate follicles in cattle. *Biol. Reprod.* 65, 648–654.
- Fortune, J. E., Rivera G. M., Yang, M. Y., 2004. Follicular development: The role of the follicular microenvironment in selection of the dominant follicle. *Anim. Reprod. Sci.* 82-83, 109–126.

- Foxcroft, G. R., Hunter M. G., 1985. Basic physiology of follicular maturation in the pig. *J. Reprod. Fertil. (Suppl.)* 33, 1–19.
- 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.
- Grant, S. A., Hunter, M. G., Foxcroft, G. R., 1989. Morphological and biochemical characteristics during ovarian follicular development in the pig. *J. Reprod. Fertil.* 86, 171–183.
- Grasso, F., Castonguay, F., Daviault, E., Matton, P., Minvielle, F., Dufour, J.J., 1988. Study of follicular development and heredity of morphological types of ovaries in prepubertal gilts. *J. Anim. Sci.* 66, 923–931.
- Greenwald, G.S., 1993. How does daily treatment with human chorionic gonadotropin induce superovulation in the cyclic hamster? *Biol. Reprod.* 48, 133-142.
- Guthrie, H.D., 2005. The follicular phase in pigs: Follicle populations, circulating hormones, follicle factors and oocytes. *J. Anim Sci.* 83, E79-E89.
- Guthrie, H.D., Garret, W.M., 2000. Factors regulating apoptosis during folliculogenesis in pigs. *J. Anim. Sci.* 77, 1-15.
- Guthrie, H.D., Cooper, B.S., 1996. Follicular atresia, follicular fluid hormones, and circulating hormones during the midluteal phase of the estrous cycle in pigs. *Biol. Reprod.* 55, 543-547.



- Guthrie, H.D., Grimes, R.W., Cooper, B.S., Hammond, J.M., 1995. Follicular atresia in pigs: Measurement and physiology. *J. Anim. Sci.* 73, 2834-2844.
- Guthrie, H.D., Bolt D.J., 1990. Changes in plasma follicle-stimulating hormone, luteinizing hormone, estrogen and progesterone during growth of ovulatory follicles in the pig. *Domest. Anim. Endocrinol.* 7, 83-91.
- Guthrie, H.D., Bolt, D.J., Kiracofe, G.H., Miller, K.F., 1988. Ovarian response to injections of charcoal-extracted porcine follicular fluid and porcine follicle stimulating hormone in gilts fed a progesterone agonist (altrenogest). *Biol. Reprod.* 38, 750-755.
- Guthrie, H.D., 1977. Induction of ovulation and fertility in prepuberal gilts. *J. Anim. Sci.* 45, 1360-1367.
- Hirshfield, A.N., 1991. Development of follicles in the mammalian ovary. *Int. Rev. Cytol.* 124, 43-101.
- Huff, B.G., Esbenshade, K.L., 1992. Induction of follicular development and estrus in prepuberal gilts with gonadotropins. *Anim. Reprod. Sci.* 27, 183-194.
- Hughes, P.E., 1997. Reproductive management of the gilt. *The Pig Journal* 40, 69-79.
- Hunter, M.G., Grant, S.A., Foxcroft, G.R., 1989. Histological evidence for heterogeneity in the development of preovulatory pig follicles. *J. Reprod. Fertil.* 86, 165-170.
- Iwamura, S., Sone, M., Kawarasaki, T., Ryu, S., Ogasa, A., 1998. Precocious estrus and reproductive ability induced by PG600 in prepuberal gilts. *J. Vet. Med. Sci.* 61, 7-11.

- 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 prepuberal gilts. *Theriogenology* 66, 1042-1047.
- Jimenez, E., Cardenas, H., Pope, W.F., 2008. Effects of androgens on serum concentrations of gonadotropins and ovarian steroids in gilts. *Biol. Reprod.* 79, 1148-1152.
- Kirkwood, R.N., Aherne, F.X., Monaghan, P.G., Misutka, S.C., 2000. Breeding gilts at a hormone induced estrus: Effects on performance over four parities. *Swine Health Prod.* 8, 177-179.
- Kirkwood, R.N., 1999. Pharmacological intervention in swine reproduction. *Swine Health Prod.* 7, 29-35.
- Kirkwood, R.N., Soede, N.M., Dyck, G.W., Thacker, P.A., 1995. The effect of immunoneutralization of PMSG at a gonadotrophin-induced oestrus on the duration of ovulation and reproductive performance of sows. *Anim. Sci.* 61, 321-324.
- Kirkwood, R.N., Thacker, P.A., 1992. Management of replacement breeding animals. *Vet. Clinics North America: Food Anim. Practice* 8, 575-587.
- Knox, R.V., 2005. Recruitment and selection of ovarian follicles for determination of ovulation rate in the pig. *Dom. Anim. Endocr.* 29, 385-397
- Knox, R.V., Vatzias, G., Naber, C.H., Zimmerman, D.R., 2003. Plasma gonadotropins and ovarian hormones during the estrous cycle in high compared to low ovulation rate gilts. *J. Anim. Sci.* 81, 249-260.

- Knox, R.V., Zimmerman, D.R., 1993. Effect of administration of porcine follicular fluid to gilts during the luteal phase of the estrous cycle on plasma gonadotropins, follicular development and ovulation rate. *J. Anim. Sci.* 71, 1546-1551.
- LaBarbera, A.R., Ryan, R.J., 1981. Porcine granulosa cells in suspension culture. I. Follicle-stimulating hormone induction of human chorionic gonadotropin binding sites on cells from small follicles. *Endocrinology* 108, 1561-1570.
- Liu, J., Aronow, B.J., Witte, D.P., Pope, W.F., La Barbera, A.R., 1998. Cyclic and maturation-dependent regulation of follicle-stimulating hormone receptor and luteinizing hormone receptor messenger ribonucleic acid expression in the porcine ovary. *Biol. Reprod.* 58, 648 - 658.
- 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., 2007. The bovine dominant ovarian follicle. *J. Anim. Sci.* 85(E. Suppl.), E89–E99.
- Lucy MC, Lui J, Boyd CK, Bracken CJ, 2001: Ovarian follicular growth in sows. *Reproduction (suppl)* 58, 31–45.
- Lutz, J.B., Rampacek, G.B., Kraeling, R.R. Pinkert, C.A., 1984. Serum luteinizing hormone and estrogen profiles before puberty in the gilt. *J. Anim. Sci.* 58, 686–691.

- Manjarin, R., Garcia, J.C., Dominguez, J.C., Castro, M.J., Alegre, B., Munoz, J.D., Kirkwood, R.N. 2010. Effect of gonadotropin treatment on estrus, ovulation, and litter size in weaned and anestrous sows. *J. Anim. Sci.* 88:2356-2360.
- Manjarin, R., Dominguez, J.C., Castro, M.J., Alegre, B., Kirkwood, R.N. 2010. Effect of hCG on early luteal serum progesterone concentrations in PG600-treated gilts. *Reprod. Dom. Anim.* 45(3):555-557.
- Manjarin, R., Cassar, G., Sprecher, D.J., Friendship, R.M., Dominguez, J.C., Kirkwood, R.N. 2009. Effect of eCG or eCG plus hCG on oestrus expression and ovulation in prepuberal gilts. *Reprod. Dom. Anim.* 44(3):411-413.
- Manjarin, R., Dominguez, J.C., Castro, M.J., Sprecher, D.J., Cassar, G., Friendship, R.M., Kirkwood, R.N. 2009. Effect of hCG treatment on the oestrus and ovulation responses to FSH in prepubertal gilts. *Reprod. Dom. Anim.* 44(3):432-434.
- Manjarin, R., Dominguez, J.C., Castro, M.J., Vallado, B., Rodriguez, S., Sprecher, D.J., Cassar, G., Friendship, R.M., Kirkwood, R.N. 2009. Effect of prior FSH treatment on the estrus and ovulation responses to eCG in prepubertal gilts. *Anim. Reprod. Sci.* 110:123-127.
- McGee, E.A., Hsueh, J.W., 2000. Initial and cyclic recruitment of ovarian follicles. *Endocrine reviews* 21, 200-214.
- Melvin, E.J., Lindsey, B.R., Quintal-Franco, J., Zanella, E., Fike, K.E., Van Tassell, C.P., Kinder, J.E., 1999. Circulating concentrations of estradiol, luteinizing hormone, and follicle-stimulating hormone during waves of ovarian follicular development in prepubertal cattle. *Biol. Reprod.* 60, 405–412.

- Morbeck, D.E., Esbenshade, K.L., Flowers, W.L., Britt, J.H., 1992. Kinetics of follicle growth in the prepuberal gilt. *Biol. Reprod.* 47, 485-491.
- Nakano, R., Sasaki, K., Shima, K., Kitayama, S., 1983. Follicle-stimulating hormone and luteinizing hormone receptors on porcine granulosa cells during follicular maturation: an autoradiographic study. *Exp. Clin. Endocrinol.* 81, 17-23.
- Paterson, A.M., 1982. In, *Control of Pig Reproduction*, Butterworths, pp 197-210.
- Pelletier, J., Carrez-Camous, S., Thiery, J.C., 1981. Basic neuroendocrine events before puberty in cattle, sheep and pigs. *J. Reprod. Fertil.* 30, 91–102.
- Picton, H., Briggs, D., Gosden, R., 1998. The molecular basis of oocyte growth and development. *Mol. Cell. Endocrinol.* 145, 27-37.
- Piephø, H.P. 2009. Data Transformation in statistical analysis of field trials with changing treatment variance. *Agronomy J.* 101(4): 865-9.
- Prunier, A., Chopineau, M., Mounier, A.M. Mormede, P., 1993. Patterns of plasma LH, FSH, oestradiol and corticosteroids from birth to the first oestrous cycle in Meishan gilts. *J. Reprod. Fertil.* 98, 313–319.
- Prunier, A., Martinat-Botte, F., Ravault, J.P., Camous, S., 1987. Perioestrous patterns of circulating LH, FSH, prolactin and oestradiol-17 $\beta$  in the gilt. *Anim. Reprod. Sci.* 14, 205-218.
- Richards, J.S., 2001. The ovarian follicle: a perspective in 2001. *Endocrinology* 142, 2184-2193.

- Saal, W., Glowania, H.J., Hengst, W., Happ, J., 1991. Pharmacodynamics and pharmacokinetics after subcutaneous and intramuscular injection of human chorionic gonadotropin. *Fertil. Steril.* 56, 225-229.
- Sacristan, A.G., Montijano, F.C., de la Cruz, L.F., Gallego, J.G., 1996. *Fisiologia veterinaria*. Mc Graw Hill, Interamericana, 1<sup>a</sup> edicion.
- Senger, P. L., 2003. *Pathways to pregnancy and parturition*. Current conceptions, Inc. Second Edition.
- Tilton, S.L., Bates, R.O., Prather, R.S. 1995. Evaluation of response to hormonal therapy in prepubertal gilts of different genetic lines. *J. Anim. Sci.* 73, 3062-3068.
- Xu, Z., Garverick, H. A., Smith, G. W., Smith, M. F., Hamilton, S. A., Youngquist, R. S., 1995. Expression of follicle-stimulating hormone and luteinizing hormone receptor messenger ribonucleic acids in bovine follicles during the first follicular wave. *Biol. Reprod.* 53, 951-957.
- Waberski, D., Claassen, R., Hahn, T., Jungblut, P.W., Parvizi, N., Kallweit, E., Weitze, K.F., 1997. LH profile and advancement of ovulation after transcervical infusion of seminal plasma at different stages of oestrus in gilts. *J. Reprod. Fertil.* 109, 29-34.
- Waberski, D., Sudhoff, H., Hahn, T., Jungblut, P.W., Kallweit, E., Calvete, J.J., Ensslin, M., Hoppen, H-O., Wintergalen, N., Weitze, K.F., Topfer-Petersen, E. 1995. Advanced ovulation in gilts by the intrauterine application of a low molecular weight pronase-sensitive fraction of boar seminal plasma. *J. Reprod. Fertil.* 105, 247-252.

## **ANEXOS**

**ANEXO 1: Effect of gonadotrophin treatment on estrus, ovulation and litter size in weaned sows**

**Published in *Journal Animal Science*, 2010. 88:2356-2360**







Table 8.2: Effect of hCG supplementation on estrus, ovulation, pregnancy, farrowing rates, and subsequent litter size in we

Item	Control <sup>1</sup>		hCG-0 <sup>2</sup>		hCG-100 <sup>2</sup>	
	Total Freq <sup>4</sup>	Relative Freq <sup>4</sup>	Total Freq	Relative Freq	Total Freq	Relative Freq
<b>No. sows</b>	48		56		50	
<b>Weaning to estrus</b>	4.7±0.4		4.15±0.7		4.2±0.3	
<b>Estrus</b>	37 (76.8%) <sup>c</sup>	--	54 (96.5%) <sup>d</sup>	--	49 (98.07%)	--
<b>Ovulation</b>	32 (66.2%) <sup>a</sup>	87.20%	53 (95.09%) <sup>b</sup>	100%	48 (95.5%)	95.90%
<b>Pregnancy</b>	29 (60.2%) <sup>c</sup>	71.1% <sup>a</sup>	50 (89.4%) <sup>d</sup>	90.9% <sup>b,c</sup>	42 (84.2%)	85.60%
<b>Farrowing</b>	28 (58.1%) <sup>c</sup>	96.40%	46 (82.3%) <sup>a,d</sup>	92.10%	37 (74.3%)	88.20%
<b>Born alive</b>	9.4±0.47		9.96±0.36		10.2±0.4	
<b>Born dead</b>	0.75±0.26		0.75±0.21		0.99±0.22	

<sup>1</sup>Non gonatrophin treated animals

<sup>2</sup>0, 100 and 200 refer to dose (IU) of hCG administered 24 h after PG600 injection

<sup>3</sup>Overall P-value for main effects

<sup>4</sup>Total and relative frequencies obtained by logistic regression. Total frequencies are based on total number os sows per group. Relative

<sup>a-d</sup>Control, hCG-100 and hCG-200 groups were compared to hCG-0. Means lacking a common superscript differ at: <sup>a,b</sup> $P \leq 0.05$  <sup>c,d</sup> $P \leq 0.0$

Table 8.2: Effect of hCG supplementation on estrus, ovulation, pregnancy, farrowing rates, and subsequent litter size in weaners

Item	Control <sup>1</sup>		hCG-0 <sup>2</sup>		hCG-100 <sup>2</sup>	
	Total Freq <sup>4</sup>	Relative Freq <sup>4</sup>	Total Freq	Relative Freq	Total Freq	Relative Freq
<b>No. sows</b>	48		56		50	
<b>Weaning to estrus</b>	4.7±0.4		4.15±0.7		4.2±0.3	
<b>Estrus</b>	37 (76.8%) <sup>c</sup>	--	54 (96.5%) <sup>d</sup>	--	49 (98.07%)	--
<b>Ovulation</b>	32 (66.2%) <sup>a</sup>	87.20%	53 (95.09%) <sup>b</sup>	100%	48 (95.5%)	95.90%
<b>Pregnancy</b>	29 (60.2%) <sup>c</sup>	71.1% <sup>a</sup>	50 (89.4%) <sup>d</sup>	90.9% <sup>b,c</sup>	42 (84.2%)	85.60%
<b>Farrowing</b>	28 (58.1%) <sup>c</sup>	96.40%	46 (82.3%) <sup>a,d</sup>	92.10%	37 (74.3%)	88.20%
<b>Born alive</b>	9.4±0.47		9.96±0.36		10.2±0.4	
<b>Born dead</b>	0.75±0.26		0.75±0.21		0.99±0.22	

<sup>1</sup>Non gonatrophin treated animals

<sup>2</sup>0, 100 and 200 refer to dose (IU) of hCG administered 24 h after PG600 injection

<sup>3</sup>Overall P-value for main effects

<sup>4</sup>Total and relative frequencies obtained by logistic regression. Total frequencies are based on total number of sows per group. Relative

<sup>a-d</sup>Control, hCG-100 and hCG-200 groups were compared to hCG-0. Means lacking a common superscript differ at: <sup>a,b</sup> $P \leq 0.05$  <sup>c,d</sup> $P \leq 0.01$



## **ANEXO 2: Curriculum Vitae**

**Publicaciones Cientificas-Peer-reviewed publications**

- Manjarin, R.**, Cassar, G., Friendship, R.M., Garcia J.C., Dominguez, J.C., Kirkwood, R.N. 2013. Effect of additional hCG on follicular growth and ovulation in PG600-treated gilts. Submitted, J. Anim. Sci.
- Faramarzi, B., Halland, S., Dobson, **Manjarin, R.**, H., Kaneps, A., and McMicking, H.F. Incidence of fractures of the palmar processes of distal phalanx in Thoroughbred, Quarter Horse, and Arabian foals in Southern California. Submitted JAVMA
- Hidalgo, D.M., Dominguez, J.C., **Manjarin, R.**, Cassar, G., Friendship, R.M., Kirkwood, R. N. 2013. Examination of gilt characteristics associated with subsequent fertility. Submitted. J. Anim. Sci.
- VanKlombenberg, M.K, **Manjarin, R.**, McMicking, H.F., and Hovey, R.C. 2013. Late-gestational hyperprolactinemia accelerates mammary epithelial cell differentiation and leads to increase milk yield. J. Anim. Sci. 91(3):1102-11.
- Manjarin, R.**, Zamora, V., Wu, G., Steibel, J.P., Kirkwood, R.N., Taylor, N.P., Liesman, J., Trifilo, K., and N.L. Trottier. 2012. Effect of amino acids supply in reduced crude protein diets on performance, efficiency of mammary uptake, and transporter gene expression in lactating sows. J. Anim. Sci. 90(9): 3088-3100.
- Trott, J.F., Schennink, A., Petrie, W.K., **Manjarin, R.**, VanKlombenberg, M.K., and R.C. Hovey. 2012. Prolactin; the multi-faceted potentiator of mammary growth and function. J. Anim. Sci. 90(5):1674-86.
- Taylor, N.P., **Manjarin, R.**, Woodward, A.D., Holcombe, S.J., Trottier, N.L. 2012. Transcript profile of hexose transporters along the horse gastrointestinal tract. J. Eq. Vet Clin. 32(6):346-351.
- Manjarin, R.**, Steibel, J.P., Kirkwood, R.N., Taylor, N.P., and N. L. Trottier. 2011. Transcript abundance of hormone receptors, glucose transporters, mTOR pathway related kinases and ligand, and milk protein-encoding genes in mammary tissue of peri-parturient, lactating and post-weaned sows. J. Anim. Sci. 90(1):221-230.
- Manjarin, R.**, Trottier, N.L., Weber, P.S., Taylor, N.P., and J.P. Steibel. 2011. A simple analytical and experimental procedure for selection of reference genes for reverse-transcription quantitative PCR normalization data. J. Dairy Sci. 94(10):4950-4961.
- Manjarin, R.**, Steibel, J.P., Zamora, V., Am-in, N., Kirkwood, R.N., Ernst, C.W., Weber, P.S., Taylor, N.P., Trottier, N.L. 2011. Transcript abundance of amino acid transporters,  $\beta$ -casein and  $\alpha$ -lactalbumin in mammary tissue of peri-parturient, lactating and post-weaned sows. J. Dairy Sci. 94(7):3467-3476.
- Am-in, N., Tantasuparuk, W., **Manjarin, R.**, Kirkwood, R.N. 2011. Effect of site of sperm deposition on fertility when sows are inseminated with aged semen. J. Swine Health Prod. 19:295-297.
- García, J. C., Dominguez, J. C., **Manjarin, R.**, Alegre, B., Kirkwood, R. N. 2011. Effect of thawing frozen boar sperm in 50% seminal plasma on sow fertility. The Pig Journal 65:59-61.

- Manjarin, R.**, Garcia, J.C., Dominguez, J.C., Castro, M.J., Alegre, B., Munoz, J.D., Kirkwood, R.N. 2010. Effect of gonadotropin treatment on estrus, ovulation, and litter size in weaned and anestrous sows. *J. Anim. Sci.* 88:2356-2360.
- Manjarin, R.**, Dominguez, J.C., Castro, M.J., Alegre, B., Kirkwood, R.N. 2010. Effect of hCG on early luteal serum progesterone concentrations in PG600-treated gilts. *Reprod. Dom. Anim.* 45(3):555-557.
- Manjarin, R.**, Cassar, G., Sprecher, D.J., Friendship, R.M., Dominguez, J.C., Kirkwood, R.N. 2009. Effect of eCG or eCG plus hCG on oestrus expression and ovulation in prepuberal gilts. *Reprod. Dom. Anim.* 44(3):411-413.
- Manjarin, R.**, Dominguez, J.C., Castro, M.J., Sprecher, D.J., Cassar, G., Friendship, R.M., Kirkwood, R.N. 2009. Effect of hCG treatment on the oestrus and ovulation responses to FSH in prepubertal gilts. *Reprod. Dom. Anim.* 44(3):432-434.
- Manjarin, R.**, Dominguez, J.C., Castro, M.J., Vallado, B., Rodriguez, S., Sprecher, D.J., Cassar, G., Friendship, R.M., Kirkwood, R.N. 2009. Effect of prior FSH treatment on the estrus and ovulation responses to eCG in prepubertal gilts. *Anim. Reprod. Sci.* 110:123-127.

**Publicaciones en preparación-Manuscripts in preparation**

- Manjarin, R.**, A. Rowson, J. Trott, R.C. Hovey. In vitro neoplastic transformation of porcine mammary epithelial cells generates breast tumors in immunodeficient mice. Submission date: January 2014.
- Manjarin, R.**, Bequette, B., Wu, G., Trottier N.L. Amino acid utilization by the lactating mammary gland. Submission date: January 2014.
- McMicking, H., **Manjarín, R.**, Buckley, A., Cushman, S., Schott, H.C., Trottier, N. L. Pituitary pars intermedia dysfunction down-regulates mRNA abundance of genes encoding GLUT-4 and insulin receptor in the small intestinal mucosa of the horse. Submission date: January 2013
- Schennink, A., Trott, J.F., **Manjarin, R.**, R.C. Hovey. Transcription from the porcine prolactin receptor is regulated in a tissue-specific manner by 10 alternative first exons. Submission date: December 2013.
- VanKlompberg, M.K, **Manjarin, R.**, McMicking, H.F., Hovey, R.C. 2013. Late gestational hyperprolactinemia enhances mammary gland vasculature. Submission date: December 2013.
- Hidalgo, D.M., Dominguez, J.C., **Manjarin, R.**, Cassar, G., Friendship, R.M., Kirkwood, R. N. Examination of lactation length associated with subsequent fertility in sows. Submission date: December 2013



### Capítulos en libros-Book Chapters

Trottier, N.L. and **Manjarin, R.** 2011. Amino acid utilization. In: L. I. Chiba (Ed) Sustainable Swine Nutrition. Wiley-Blackwell, Ames, Iowa.

### Presentaciones en conferencias-Abstracts and talks in Conference Proceedings

VanKlombenberg, M.K, **Manjarin, R.**, McMicking, H.F., and Hovey, R.C. 2012. Hyperprolactinemia during late gestation increases milk yield from primiparous gilts and piglet growth. *J. Anim. Sci.* 90(E-Suppl. 3/J):89.

**Manjarin, R.**, Zamora, V., Wu, G., Steibl, J.P., Kirkwood, R.N., Taylor, N.P., Liesman, J., Trifilo, K., and N.L. Trottier. 2011. Crystalline amino acid inclusion in a reduced-crude protein diet increases mammary arginine and lysine apparent utilization and maintains sow performance independently of amino acid transporter gene expression. *J. Anim. Sci.* 89(E-Suppl. 2):80.

**Manjarin, R.**, Steibel, J.P., Kirkwood, R.N., Taylor, N.P., and N. L. Trottier. 2011. Transcript abundance of hormone receptors, glucose transporters, mTOR pathway related kinases and ligand, and milk protein-encoding genes in mammary tissue of periparturient, lactating and post-weaned sows. *J. Anim. Sci.* 89(E-Suppl. 2):141.

Buckley, A., Taylor, N., **Manjarin, R.**, Schott, H.C., Woodward, A.D., Trottier, N.L. 2011. Pars intermedia dysfunction down-regulates mRNA abundance of genes encoding GLUT-4 and insulin receptor in the small intestinal mucosa of the horse. *J. Eq. Vet. Sci.* 31:327-328.

Trottier, N.L. and **Manjarin, R.** 2010. Linking our understanding of mammary gland metabolism to amino acid nutrition. Midwest Swine Nutrition Conference, 10<sup>th</sup> Year Anniversary, Indianapolis, Indiana, September 9. Midwest Swine Nutrition Conference Proceedings: 58-63.

Buckley, A., Taylor, N., **Manjarin, R.**, Schott, H.C., Woodward, A.D., Trottier, N.L. 2010. Cushing's syndrome down-regulates glucose transporter mRNA abundance in the distal jejunum in the horse. *J. Dairy. Sci.* 93(E-Suppl. 1):762.

**Manjarin, R.**, Garcia, J.C., Dominguez, J.C., Castro, M.J., Alegre, B., Munoz, J.D., Trottier, N., Kirkwood, R.N. 2010. Effect of gonadotropin treatment on estrus, ovulation and litter size in weaned sows. *J. Anim. Sci.* 88(E-Suppl. 3):120.

**Manjarin R.**, Steibel, J.P., Zamora, V., Am-in, N., Kirkwood, R., Ernst, C., Weber, P., Taylor, N.P., Trottier, N.L. 2010. Amino acid transporter mRNA abundance in porcine mammary tissue during pregnancy, lactation and post-weaning periods. *J. Dairy. Sci.* 93(E-Suppl. 1):672.

Taylor, N.P., Woodward, A.D., **Manjarin, R.**, Holcombe, S.J., Trottier, N.L. 2010. Transcript profile of hexose transporters along the horse gastrointestinal tract. *J. Anim. Sci.* 88(E-Suppl. 3):145.

**Manjarin, R.**, Kirkwood, R.N. 2009. Effect of gonadotropin treatment on estrus expression and ovulation responses in seasonally anestrous sows. *J. Anim. Sci.* 86(E-Suppl. 3):28.

**Manjarin, R.**, Dominguez, J.C., Castro, M.J., Alegre, B., Kirkwood, R.N. 2008. Effect of hCG on estrus and ovulation responses to PG600 in prepuberal gilts. *Reprod. Dom. Anim.* 43 (E-Suppl. 4):60-61.

**Publicaciones en revistas especializadas-Specialized Publications (Bulletins, magazines)**

Dominguez, J.C., Osvaldo, H., Kirkwood, R.N., Breininger, E., Gonzalez, R., Tejerina, F., Alegre, B., Pelaez, J, Garcia, J.C., Bernal, S.E., Cardenas, S.M. Cordova, C.A., Abad, M., Abad, F., **Manjarin, R.**, Martin, D. 2008. Artificial insemination in swine production. *Albeitar.* 119: 14-15.

**Premios-Honors and awards**

2012. American Society of Animal Science Wilson Pond International Travel Award

2011. American Society of Animal Science Midwest Section Young Scholar