



universidad
de león



Facultad de Veterinaria

Departamento de Sanidad Animal

**Estrategias en el manejo reproductivo de la cerda para la
mejora de la fertilidad**

Reproductive management strategies for improving sow fertility

David Martín Hidalgo

León, 2014

Memoria presentada por el Licenciado en Veterinaria D. David Martín Hidalgo y dirigida por los doctores D. Juan Carlos Domínguez Fernández de Tejerina, Dña. Beatriz Alegre Gutiérrez y D. Rodrigo Manjarín Arredondo, para optar al grado de Doctor por la Universidad de León, dentro del programa de doctorado “Sanidad Animal y Reproducción”.

León, Septiembre 2014

Los trabajos que componen esta Tesis Doctoral y la presente memoria han sido realizados en la Facultad de Veterinaria de la Universidad de León, at the Department of Animal Science, Michigan State University (East Lansing, MI, USA) and at the Ontario Veterinary College (OVC), University of Guelph (Ontario, Canada). High Power Pork (Carthage Veterinary Service, Ltd., Illinois, USA) and Brian Dunk's Farm (OVC, University of Guelph, Ontario, Canada) are gratefully acknowledged for providing the animals used in our experiments and for the access to their facilities. David Martín Hidalgo disfrutó de una Beca Predoctoral para la Formación de Profesorado Universitario (FPU; AP2008-04039), complementada con una Estancia Breve y un Traslado Temporal, financiada por el Ministerio de Educación, Cultura y Deporte.

The authors gratefully acknowledge the financial support of the Ontario Pork and the Canadian Swine Research and Development Cluster (CSRDC) and Agriculture & Agri-Food Canada. Merck Animal Health (New Jersey, USA) donated the PG600[®] used in this study.

Deseo expresar mi más sincero agradecimiento a mis directores, Carlos, Beatriz y Rodrigo, por creer y confiar en mí durante este periodo, por vuestro trabajo, paciencia y apoyo. To my research stay mentors in the US and Canada, Drs. Nathalie Trottier, Roy Kirkwood, Robert Friendship, Glen Cassar and Laura Greiner. A todos los compañeros de León, East Lansing, Carthage y Guelph. A mis amigos de Segovia, León y otros muchos repartidos por toda la geografía española y mundial. A todos vosotros, simplemente GRACIAS.

*A mis padres y hermanos
A nuestro pequeño Rodrigo
A Luján*

*Porque vuestro apoyo incondicional y sin reservas desde el inicio
me ha permitido alcanzar el éxito en esta etapa tan maravillosa de mi vida.
Por estar siempre a mi lado. GRACIAS DE TODO CORAZÓN.*

ÍNDICE

Pág.

Índice de Tablas.

Índice de Figuras.

Capítulo 1/Chapter 1: Resumen/Summary	16
Capítulo 2/Chapter 2: Introducción y planteamiento	31
Capítulo 3/Chapter 3: Revisión bibliográfica	42
Capítulo 4/Chapter 4: Objetivos/Objectives	97
Capítulo 5/Chapter 5: Influence of gonadotrophin-induced first estrus on gilt fertility.	103
Capítulo 6/Chapter 6: Influence of lactation length and gonadotrophins administered at weaning on fertility of primiparous sows	122
Capítulo 7/Chapter 7: Relationship between estrus responses of prepubertal gilts to gonadotrophin treatment and subsequent sow fertility and retention to parity four	139
Capítulo 8/Chapter 8: Relationship between vaginal mucus conductivity and time of ovulation in weaned sows	154
Capítulo 9/Chapter 9: Resumen global de metodología y resultados	173
Capítulo 10/Chapter 10: Discusión general	187
Capítulo 11/Chapter 11: Conclusiones/Conclusions	203
Capítulo 12/Chapter 12: Bibliografía	212

Índice de Tablas

Capítulo 3/Chapter 3: Revisión bibliográfica.

Tabla 1: Edad media (\pm desviación estándar) al inicio de la pubertad de diferentes razas porcinas	81
---	----

Capítulo 5/Chapter 5: Influence of gonadotrophin-induced first estrus on gilt fertility.

Table 1. Gilts treated with PG600 [®] and boar exposure starting at 155 days of age (early responders showing heat \leq 7 d post-treatment and late responders, $>$ 7 d) compared to gilts provided with boar exposure alone (select showing heat in \leq 30 d and non select, $>$ 30 d; means \pm SE)	119
--	-----

Capítulo 6/Chapter 6: Influence of lactation length and gonadotrophins administered at weaning on fertility of primiparous sows.

Table 1. Effect of lactation length and gonadotrophin treatment at weaning on fertility of primiparous sows	137
--	-----

Capítulo 7/Chapter 7: Relationship between estrus responses of prepubertal gilts to gonadotrophin treatment and subsequent sow fertility and retention to parity four.

Table 1. Influence of estrus response to gonadotrophin treatment of prepubertal gilts on fertility and longevity as sows	152
---	-----

Índice de Figuras

Capítulo 3/Chapter 3: Revisión bibliográfica.

Figura 3.1.: Evolución de la población de oogonias y oocitos primarios en la cerda nulípara durante su vida fetal y los primeros días posteriores al nacimiento 50

Figura 3.2.: Representación gráfica de la estructura ovárica, del desarrollo folicular y de la formación del cuerpo lúteo y del cuerpo albicans 53

Figura 3.3.: Cambios en las concentraciones plasmáticas medias de los estrógenos y la LH durante la maduración sexual de la nulípara 67

Capítulo 8/Chapter 8: Relationship between vaginal mucus conductivity and time of ovulation in weaned sows.

Figure 1a: Evolution of vaginal mucosa electrical resistance (ER) mean values (\pm SE) before and after the observed time of ovulation in weaned sows in autumn 169

Figure 1b: Evolution of vaginal mucosa electrical resistance (ER) mean values (\pm SE) before and after the observed time of ovulation in weaned sows in winter 170

Figure 1c: Evolution of vaginal mucosa electrical resistance (ER) mean values (\pm SE) before and after the observed time of ovulation in weaned sows in spring 170

Figure 2a: Evolution of vaginal mucosa ER mean values (\pm SE) during the first 164 h post-weaning, grouped by sow ovulation category (groups 102, 115, 126 and 140, for sows ovulating at 102, 115, 126 and 140 h post-weaning, respectively) 171

Figure 2b: Evolution of vaginal mucosa ER mean values (\pm SE) before and after the observed time of ovulation, grouped by sow ovulation category (groups 102, 115, 126 and 140, for sows ovulating at 102, 115, 126 and 140 h post-weaning, respectively) 171

Capítulo 1. Resumen

Chapter 1. Summary

El número total de lechones destetados por cerda y año constituye el principal factor que determina la producción anual de una explotación porcina. Maximizar dicho parámetro, con el fin de obtener una elevada productividad, implica llevar a cabo un control sobre dos factores importantes: por un lado, el porcentaje de cerdas inseminadas semanalmente y, por otro lado, el rendimiento reproductivo de las cerdas multíparas presentes en la explotación. La capacidad para cumplir con el objetivo semanal de inseminaciones depende tanto del número de cerdas destetadas que salen en celo por semana como de la existencia de un suministro continuo y predecible de nulíparas de reposición en celo. En cuanto al rendimiento reproductivo de la cerda multípara, en términos de tamaño de camada, éste tiende a experimentar un descenso a partir del 5º o 6º parto. Esta situación implica la necesidad de su reemplazo con nulíparas cíclicas de reposición, las cuales se requiere que presenten un cierto grado de fertilidad probado, antes de ser incluidas en el ciclo reproductivo, para garantizar el éxito de la reposición.

Adelantar el inicio de la pubertad supone una estrategia que permite disponer de ese pool de nulíparas cíclicas con un registro de varios ciclos estrales previos a la primera inseminación, presentando una actividad ovárica cíclica y estable. Así mismo, también permite determinar el grado de fertilidad inherente a la nulípara de reemplazo, identificando a aquellas que permitan mantener unos elevados estándares reproductivos en la explotación. La exposición al verraco es uno de los métodos más comúnmente utilizados para iniciar una pronta actividad ovárica cíclica en la cerda nulípara, aunque a veces no siempre conduce a resultados satisfactorios, presentándose un retraso en el inicio de la pubertad o una falta de ciclismo en su actividad ovárica tras el inicio de la misma. En estos casos, el tratamiento

con gonadotropinas exógenas, como por ejemplo la administración de PG600[®] (400 UI eCG + 200 UI hCG), representa un instrumento eficaz para la inducción de la pubertad en cerdas nulíparas, así como para sincronizar el celo posdestete, permitiendo un mejor control del manejo reproductivo de la explotación.

El presente trabajo de Tesis Doctoral aborda 4 ensayos experimentales cuyo principal objetivo ha sido la mejora del rendimiento reproductivo de la cerda mediante la identificación de las nulíparas con el mayor potencial fértil y la implantación de nuevas técnicas de manejo de la reproducción que mejoren la fertilidad en partos subsiguientes.

El objetivo del primer trabajo fue determinar la asociación entre la respuesta de celo de cerdas nulíparas a la inyección con gonadotropinas exógenas o a la exposición al verraco, para inducir su pubertad, y su posterior índice de parto y tamaño de camada al primer parto. A los 154 días de edad, nulíparas seleccionadas aleatoriamente recibieron una inyección intramuscular de 400 UI de gonadotropina coriónica equina más 200 UI de gonadotropina coriónica humana (PG600[®]; n = 181). Del pool restante de nulíparas no tratadas con hormonas, las primeras en mostrar signos de celo fueron seleccionadas para actuar como Controles (n = 201). La exposición al verraco comenzó a los 155 días de edad en ambos grupos, y las nulíparas fueron inseminadas con un peso aproximado de 130 kg. Las comparaciones se realizaron entre las nulíparas tratadas con PG600[®] que mostraron o no signos de celo dentro de los 7 primeros días posinyección (es decir, de respuesta temprana o tardía, respectivamente) y las nulíparas Control que mostraron o no signos de

celo dentro de los 30 primeros días después del inicio de la exposición al verraco (es decir, nulíparas Control selectas y no selectas, respectivamente). A los 162 días de edad, el primer celo fue detectado en el 67.5% de las nulíparas tratadas con PG600[®], comparado con un 5.7% de las nulíparas Control ($P < 0.0001$). La proporción de nulíparas que habían mostrado 3 o más celos en el momento de la primera inseminación aumentó en el grupo de nulíparas Control selectas, comparado con los grupos de nulíparas que mostraron una respuesta de celo temprana y tardía al tratamiento con PG600[®] ($P \leq 0.001$). No se observaron diferencias significativas en el índice de parto ni en el tamaño de camada entre los cuatro grupos de tratamiento. Estos datos indican que la PG600[®] es una herramienta efectiva para inducir antes el primer celo en las nulíparas, que tanto el posterior índice de parto y como el tamaño de camada de lechones nacidos vivos se comparan de forma favorable a aquellos de las nulíparas selectas, y que las nulíparas que no responden de forma temprana a la estimulación hormonal no muestran una fertilidad comprometida.

El objetivo del segundo trabajo fue determinar el efecto de la duración de la lactación y del tratamiento con gonadotropinas exógenas al destete sobre el rendimiento reproductivo de cerdas primíparas. Después de 3 semanas de lactación, las cerdas primíparas fueron destetadas (W3; $n = 273$) o recibieron una nueva camada de lechones de 7 días de edad para una lactación de 14 días extra (W5; $n = 199$). Al destete final (3 o 5 semanas de lactación), las cerdas fueron asignadas aleatoriamente para recibir una inyección de 400 UI de gonadotropina coriónica equina más 200 UI de gonadotropina coriónica humana (PG600[®]; W3+P; $n = 108$ y W5+P; $n = 96$) o no recibir inyección alguna (W3; $n = 165$ y W5; $n = 103$). Las cerdas fueron inseminadas en el primer celo observado

después del destete final y, de nuevo, 24 horas después. La proporción de cerdas que mostraron celo dentro de los 6 primeros días posdestete fue mayor ($P < 0.01$) para el grupo W3+P (86%), comparado con el grupo W3 (64%); sin embargo, no hubo diferencia ($P = 0.13$) entre los grupos W5+P (79.4%) y W5 (69.1%). No hubo efecto ni de la duración de la lactación ni del tratamiento con gonadotropinas exógenas sobre el índice de parto ni la proporción de cerdas sacrificadas antes de la inseminación posdestete. El tamaño de camada para el total de lechones nacidos fue menor ($P = 0.05$) en el grupo W3+P (11.7 ± 0.4), comparado con el grupo W3 (12.6 ± 0.3). Sin embargo, las cerdas que lactaron durante 35 días tuvieron camadas de mayor tamaño en comparación con aquellas que lactaron únicamente durante 21 días, independientemente de que fueran o no tratadas al destete final con gonadotropinas exógenas (14.0 ± 0.5 y 14.5 ± 0.4 para los grupos W5+P y W5, respectivamente; $P < 0.001$). Estos datos indican que, en las cerdas primíparas, una lactación más duradera mejora el tamaño de camada para el total de lechones nacidos al siguiente parto. El tratamiento con gonadotropinas exógenas es útil para acortar el intervalo destete-celo pero el tamaño de camada para el total de lechones nacidos del siguiente parto puede verse negativamente afectado.

El objetivo del tercer trabajo fue determinar si una respuesta rápida de celo, en cerdas nulíparas, al tratamiento con gonadotropinas exógenas para inducir su pubertad está asociada con un mejor desarrollo reproductivo de la cerda a largo plazo. A los 154 días de edad, las cerdas nulíparas recibieron una inyección intramuscular de 400 UI de gonadotropina coriónica equina más 200 UI de gonadotropina coriónica humana (PG600®; $n = 260$). Las cerdas nulíparas Control ($n = 272$) no recibieron PG600®. Todas las nulíparas

fueron expuestas al verraco desde los 155 días de edad para la detección del celo y fueron posteriormente inseminadas, de forma artificial, con un peso aproximado de 130 kg. Las nulíparas que recibieron PG600[®] y alcanzaron la pubertad dentro de los 7 primeros días posinyección fueron clasificadas como de respuesta rápida (ER), mientras que las restantes nulíparas tratadas con PG600[®] fueron clasificadas como de respuesta tardía (LR). Dentro de la población Control, las nulíparas que presentaron su primer celo antes de o a los 185 días de edad fueron clasificadas como selectas (CS), mientras que las nulíparas Control restantes fueron clasificadas como no-selectas (NS). La respuesta de celo al tratamiento asignado tuvo efecto ($P = 0.03$) sobre el índice de retención de las nulíparas en el ciclo reproductivo, con una menor proporción de nulíparas LR alcanzando el 4° parto en comparación con las nulíparas NS (50% vs. 69.4%, respectivamente; $P = 0.09$). Los índices de retención de las nulíparas ER y CS fueron intermedios. Estos datos indican que las cerdas nulíparas que no presentan una respuesta rápida de celo a la PG600[®], administrada a los 154 días de edad, son más propensas a ser sacrificadas con un menor número de partos en su registro como hembras reproductoras.

El objetivo del cuarto trabajo fue determinar si los cambios en la resistencia eléctrica de la mucosidad vaginal (REV) de cerdas destetadas, durante los 7 primeros días posdestete, están asociados con el momento de la ovulación, determinado mediante ecografía ovárica entre las 91 y las 146 h posdestete, y la estación del año. Las mediciones de REV se llevaron a cabo a las 20, 44, 68, 91, 96, 102, 115, 120, 126, 140, 146 y 164 h posdestete. Los valores de REV disminuyeron entre las 120 y las 31 h antes de la ovulación, para luego aumentar de forma progresiva hasta las 40-50 h posovulación. La

estación del año tuvo un efecto significativo ($P < 0.01$) sobre la evolución de la REV y el momento de detección de sus valores más bajos antes de la ovulación. El celo fue observado a partir del día 4 posdestete, después de obtenerse los valores más bajos de REV. La ovulación tuvo lugar entre el final del día 5 y el final del día 6 posdestete, mientras los valores de REV seguían aumentando. La ovulación tuvo lugar antes en cerdas con un menor número de parto ($P < 0.001$). Tomando como referencia el momento de la ovulación (hora 0), la REV fue significativamente menor entre las 50 y las 5 h preovulación en el otoño, y entre las 40 y las 21 h preovulación en el invierno; sin embargo, dichas diferencias no fueron observadas en la primavera. El valor más bajo de REV no se correlacionó con el momento de la ovulación. Por lo tanto, podemos concluir que la REV aumenta antes de la ovulación y que este aumento está influido por la estación del año, pero que no puede ser utilizada para predecir con precisión la ovulación en cerdas destetadas.

Total number of weaned piglets per sow and year is the main factor determining the annual production of a sow commercial farm. Maximizing that parameter, with the aim of obtaining a high productivity, implies controlling over two important factors: on the one hand, the percentage of weekly breeding sows and, on the other hand, the reproductive performance of multiparous sows in the breeding herd. Capability to meet the weekly breeding target depends on both the number of weaned sows coming into heat per week and the existence of a continuous and predictable supply of service-ready gilts in estrus when required. Regarding the reproductive performance of the multiparous sow, in terms of litter size, this tends to experience a decrease from the 5th or 6th parity onwards. This situation implies the necessity of their replacement with service-ready cyclic gilts, which are required to show a certain degree of proven fertility before being included into the reproductive cycle, in order to guarantee the success of the replacement process.

Advancing the onset of puberty supposes a strategy that allows having a pool of cyclic gilts with a record of several estrous cycles prior to first breeding, showing a stable cyclic ovarian activity. Likewise, it also allows determining the degree of inherent fertility of the replacing gilt, identifying those which allow maintaining high reproductive standards on farm. Boar exposure is one of the most commonly used methods to initiate an early cyclic ovarian activity in the gilt, although sometimes it does not lead to satisfactory results, resulting in a delay in the onset of puberty or in a lack of cycling of the ovarian activity after its beginning. In such cases, treatment with exogenous gonadotrophins, as for example the administration of PG600[®] (400 IU eCG + 200 IU hCG), represents an effective tool for puberty induction in gilts, as well as for synchronizing the post-weaning estrus, allowing a

better control of the reproductive management on farm.

The overall objective of this Ph.D. dissertation is to improve sow reproductive performance by identifying gilts with the greatest fertile potential and implementing new reproductive management techniques that improve their fertility in subsequent farrowings.

The aim of the first study was to determine the association between the estrus response of prepubertal gilts to gonadotrophin injection or boar exposure and their subsequent farrowing rate and litter size. At 154 days of age, randomly selected prepubertal gilts received an intramuscular injection of 400 IU equine chorionic gonadotrophin plus 200 IU human chorionic gonadotrophin (PG600[®]; n = 181). From the remaining pool of animals not treated with hormones, the first gilts showing signs of estrus were selected to act as Controls (n = 201). Boar exposure began at 155 days of age for both groups and gilts were bred at a weight of approximately 130 kg. Comparisons were made between PG600[®]-treated gilts exhibiting estrus or not within 7 days post injection (early and late-responders, respectively) and Control gilts exhibiting estrus or not within 30 days after beginning of boar exposure (select and non-select Control gilts, respectively). By 162 days of age, estrus was detected in 67.5% of PG600[®]-treated gilts compared to 5.7% of Control gilts ($P < 0.0001$). The proportion of animals observed in estrus at least 3 times before breeding was greater for select Control gilts compared to early and late-responder PG600[®]-treated gilts ($P \leq 0.001$). There were no significant differences in farrowing rate and litter size between the four treatment groups. These data indicate that PG600[®] is an effective tool to induce an

earlier estrus in gilts, that subsequent farrowing rate and born alive litter size compares favorably to that of select gilts, and that gilts failing to respond promptly to hormonal stimulation do not exhibit compromised fertility.

The aim of the second study was to determine the effect of lactation length and treatment with gonadotrophins at weaning on reproductive performance of primiparous sows. After 3 weeks of lactation, primiparous sows were either weaned (W3; n = 273) or received a 7-day-old foster litter for a further 14 days of suckling (W5; n = 199). At final weaning (3 week or 5 week lactation) sows were randomly assigned to receive an injection of 400 IU equine chorionic gonadotrophin plus 200 IU human chorionic gonadotrophin (PG600[®]; W3+P; n = 108 and W5+P; n = 96) or no injection (W3; n = 165 and W5; n = 103). Sows were inseminated at first observed estrus after final weaning and 24 h later. The proportion of sows showing estrus by day 6 post-weaning was greater ($P < 0.01$) for W3+P (86%) compared to W3 (64%); however, there was not a difference ($P = 0.13$) for W5+P (79.4%) compared to W5 (69.1%). There was no effect of either lactation length or gonadotrophin treatment on farrowing rates or on the proportion of sows culled before breeding. Total born litter size was smaller ($P = 0.05$) for W3+P (11.7 ± 0.4) compared to W3 (12.6 ± 0.3). However, sows that lactated for 35 days had larger litters than sows that lactated for 21 days, regardless of gonadotrophin treatment (14.0 ± 0.5 and 14.5 ± 0.4 for W5+P and W5, respectively; $P < 0.001$). These data indicate that for primiparous sows, a longer lactation improves total born litter size at their next farrowing. Gonadotrophin treatment is useful in shortening the weaning to estrus interval but subsequent total born litter size may be negatively affected.

The aim of the third study was to determine whether a prompt estrus response of prepubertal gilts to gonadotrophin treatment is associated with improved long term sow performance. At 154 days of age, prepubertal gilts received an intramuscular injection of 400 IU equine chorionic gonadotrophin plus 200 IU human chorionic gonadotrophin (PG600[®]; n = 260). Control gilts (n = 272) did not receive PG600[®]. All gilts were boar exposed from 155 days of age for estrus detection and gilts were subsequently artificially inseminated at a weight of approximately 130 kg. Gilts receiving PG600[®] that exhibited estrus by 7 days post injection were classified as early responders (ER); remaining PG600[®]-treated gilts were classified as late responders (LR). Within the control population, gilts exhibiting estrus by 185 days of age were classified as select (CS); remaining controls were classified as non-select (NS). Treatment response impacted ($P = 0.03$) retention rate, with a lesser proportion of LR gilts reaching parity 4 compared to NS gilts (50% vs. 69.4%, respectively; $P = 0.09$), with ER and CS gilt retentions rates being intermediate. These data indicate that gilts failing to respond promptly to PG600[®] administered at 154 days of age are more likely to be culled after fewer parities.

The aim of the fourth study was to investigate whether changes in the electrical resistance of vaginal mucus (VER) of weaned sows, during the first 7 days post-weaning, are associated with time of ovulation (as determined by ovarian ultrasound between 91 and 146 h after weaning) and season. VER measures were determined at 20, 44, 68, 91, 96, 102, 115, 120, 126, 140, 146 and 164 h post weaning. VER decreased between 120 and 31 h

prior to ovulation, and then increased until 40-50 h post ovulation. Duration and timing of the nadir was affected by season ($P < 0.01$). Estrus was observed from day 4 post-weaning, following the lowest VER values. Ovulation occurred between late day 5 and late day 6 post-weaning, while VER values were still increasing. Ovulation was earlier in lower parity sows ($P < 0.001$). Compared to 0 h (ovulation time), VER was significantly lower between 50 and 5 h pre-ovulation in autumn, and between 40 and 21 h pre-ovulation in winter, but such differences were not seen in spring. Lowest VER value was not correlated with time of ovulation. We conclude that VER increases prior to ovulation and that this increase is influenced by season but cannot be used to accurately predict ovulation in weaned sows.

Capítulo 2. Introducción y planteamiento

El número total de lechones destetados por cerda y año constituye el principal factor que determina la producción anual de una explotación porcina y depende tanto del tamaño medio como del número total de camadas destetadas. Dicho parámetro está directamente relacionado con el porcentaje de cerdas inseminadas semanalmente que, a su vez, condiciona los índices de concepción y parto de la explotación (Dial *et al.*, 1996). La capacidad para cumplir con el objetivo semanal de inseminaciones está sujeta al flujo de cerdas destetadas que salen en celo por semana. Del mismo modo, este objetivo semanal está supeditado a la existencia de un suministro continuo y predecible de nulíparas de reposición en celo. Para ello, es necesario que las nulíparas de reemplazo alcancen la pubertad lo antes posible, de forma que, cuando reciban la primera inseminación artificial (IA), hayan experimentado varios ciclos estrales previos, presentando una actividad ovárica cíclica estable que maximice su fertilidad.

La exposición al verraco es uno de los métodos más comúnmente utilizados para el establecimiento de la actividad ovárica cíclica en la cerda nulípara. No obstante, este procedimiento no siempre conduce a resultados satisfactorios, bien por la dificultad para establecer un contacto físico directo entre el macho y la hembra o bien por causas reproductivas inherentes a la cerda (p. e., el anestro asociado a una patología ovárica congénita que derive en infertilidad o esterilidad) o al propio verraco (p. e., una libido disminuida que produzca la falta de estimulación necesaria a la nulípara). Esto provoca un retraso en el inicio de la pubertad, o impide que la cerda nulípara mantenga una actividad ovárica cíclica estable tras el inicio de la misma (Kirkwood and Thacker, 1992; Hughes, 1997). En estos casos, el tratamiento con gonadotropinas exógenas representa un

instrumento eficaz para la inducción de la pubertad en nulíparas (Kirkwood, 1999), así como para sincronizar el celo posdestete, permitiendo un mejor control del manejo reproductivo de la explotación. Una de las combinaciones gonadotrópicas más utilizadas es la formulación comercial PG600[®], constituida por 400 UI de gonadotropina coriónica equina (eCG) y 200 UI de gonadotropina coriónica humana (hCG), recomendándose su utilización en nulíparas, que no hayan alcanzado la pubertad, de al menos 85 kg de peso vivo y 165 días de edad. La respuesta de celo y ovulación a la inyección de PG600[®] mejora con la edad y el peso de las nulíparas (Britt *et al.*, 1989) debido a una mayor madurez fisiológica del eje hipotálamo-hipófisis-ovárico. Sin embargo, hasta un 30% de las nulíparas tratadas con PG600[®] no muestran una respuesta estral y ovulatoria (Tilton *et al.*, 1995; Kirkwood, 1999; Manjarin *et al.*, 2009a,b), y cerca de un 30% de aquellas que sí responden al tratamiento, alcanzando la pubertad, no presentan una actividad ovárica cíclica estable tras el primer celo. Además, la utilización de gonadotropinas exógenas para inducir la pubertad en nulíparas conlleva el riesgo de introducir en el ciclo reproductivo de la explotación a hembras relativamente menos fértiles, las cuáles, con un posible peor rendimiento reproductivo, van a disminuir la productividad a largo plazo de la explotación.

El principal objetivo de la presente Tesis Doctoral ha sido la mejora del rendimiento reproductivo de la cerda mediante la identificación, a una edad temprana, de las futuras hembras reproductoras con un mayor potencial fértil y la implantación de nuevas estrategias de manejo de la reproducción que mejoren su fertilidad a largo plazo. Para ello, se llevaron a cabo 4 ensayos experimentales:

- i. Efecto del tipo de respuesta estral (temprana o tardía) al tratamiento con PG600[®] en nulíparas, para la inducción de la pubertad, sobre su fertilidad al primer parto.
- ii. Efecto de la duración de la lactación (3 o 5 semanas) y del tratamiento con PG600[®] al destete en primíparas sobre su fertilidad al segundo parto.
- iii. Efecto del tipo de respuesta estral (temprana o tardía) al tratamiento con PG600[®] en nulíparas, para la inducción de la pubertad, sobre su posterior fertilidad y longevidad al cuarto parto.
- iv. Evaluación posdestete de la resistencia eléctrica del moco vaginal como herramienta reproductiva para predecir el momento de la ovulación en la cerda.

Estudios previos muestran que las nulíparas inseminadas a una edad más tardía son sacrificadas antes (Schukken *et al.*, 1994; Culbertson and Mabry, 1995; Le Cozler *et al.*, 1998), fundamentalmente debido a que presentan una producción media de lechones totales nacidos por parto más baja durante su vida reproductiva, que la observada en nulíparas inseminadas a una edad más temprana. Esto sugiere que aquellas nulíparas que alcanzan antes la pubertad podrían ser relativamente más fértiles (Nelson *et al.*, 1990; Holder *et al.*, 1995). En este sentido, Patterson y cols. (2010a) definen a la cerda nulípara “selecta” como aquella capaz de alcanzar la pubertad, de forma natural, dentro de los 30 primeros días posteriores al inicio de la exposición al verraco; y a la nulípara “no selecta” como aquella que no ha alcanzado la pubertad durante los 30 primeros días desde que se inició dicha

exposición. En este estudio de Patterson *y cols.*, en comparación con las nulíparas “no selectas”, las cerdas nulíparas “selectas” tuvieron un mejor ciclismo de su actividad ovárica, fueron inseminadas con éxito en un mayor porcentaje, presentaron mayores índices de gestación, parto y retención (con un mayor porcentaje entre las nulíparas “selectas” alcanzando el tercer parto) y mostraron un aumento en el tamaño de camada en los sucesivos partos. Hay algunos estudios que han comparado el rendimiento reproductivo entre nulíparas cuya pubertad fue inducida mediante el empleo de la PG600[®] y aquellas no tratadas hormonalmente (Kirkwood *et al.*, 2000). Sin embargo, no existe información acerca del rendimiento reproductivo de las nulíparas que presentan una respuesta de celo tardía al tratamiento con PG600[®] para la inducción de la pubertad (i.e., superior a los 7 días) pero que son retenidas en el ciclo reproductivo. Por lo tanto, el objetivo de nuestro primer experimento consistió en comparar distintos parámetros de fertilidad al primer parto entre cerdas nulíparas tratadas con PG600[®], y que presentaron una respuesta de celo temprana o tardía al tratamiento, y nulíparas Control, con una respuesta estral rápida (“selectas”) o lenta (“no selectas”) tras el inicio de la exposición al verraco. La hipótesis formulada es que una respuesta de celo más rápida al tratamiento hormonal para la inducción de la pubertad implica una mayor madurez fisiológica del eje hipotálamo-hipófisis-ovárico a una edad cronológica dada, y que dicha respuesta estral puede estar asociada a una mayor fertilidad en la cerda nulípara.

Para mejorar el rendimiento reproductivo de la cerda es clave establecer un estricto control sobre el intervalo destete-celo (IDC; Patterson *et al.*, 2010b), control que posibilite la inseminación del número semanal necesario de cerdas destetadas. Un aumento de dicho

intervalo no solo conlleva una mayor acumulación de días no productivos, sino también un adelanto del momento de la ovulación que, en ausencia de un protocolo de inducción y sincronización del celo y de la ovulación al destete, puede revertir en un descenso de la fertilidad en la cerda (Kirkwood, 2008). Comparada con la cerda múltipara, la hembra primípara tiende a presentar IDCs más largos y variables, probablemente debido a una menor ingesta nutritiva y a una mayor pérdida proteica durante la lactación, situaciones ambas que van a empeorar su estado metabólico neto y su condición corporal en el momento del destete (Clowes *et al.*, 2003). El número de lechones destetados con un peso y crecimiento aceptables se encuentra limitado por la producción láctea de la cerda en lactación. La cerda alcanza el pico de lactación hacia el día 15 posterior a su inicio, momento a partir del cual disminuye la demanda metabólica de la lactación hasta alcanzar el final de la misma (Toner *et al.*, 1996; Hansen *et al.*, 2012). Por lo tanto, es posible que un aumento del periodo de lactancia, manteniendo una ingesta adecuada, mejore el estado metabólico y corporal de la hembra primípara al destete, con la consiguiente mejora de su función ovárica y posterior fertilidad. En este sentido, la existencia de cerdas nodrizas, con una lactación prolongada, supone un gran atractivo para la cría del exceso de lechones, presentes en camadas muy numerosas, hasta alcanzar un peso aceptable al destete. El tratamiento con PG600[®] administrado al destete, tras una lactación convencional de 3 semanas, reduce y sincroniza la duración del IDC, sobre todo en cerdas de primer y segundo parto (Bates *et al.*, 1991; Estienne and Hartsock, 1998; Kirkwood *et al.*, 1998a; Knox and Zas, 2001). Además, dicho tratamiento gonadotrópico aumenta la duración del periodo de celo, controlando el intervalo celo-ovulación (ICO) y facilitando el manejo de la IA, lo que permite mejorar el subsiguiente índice de parto y el tamaño de camada (Knox *et al.*, 2001). Sin embargo, el efecto de la interacción entre el tratamiento con PG600[®] al

destete y la duración de la lactación en cerdas primíparas sobre su fertilidad al segundo parto nunca ha sido estudiado. Por tanto, nuestro segundo experimento consistió en evaluar el efecto de una lactación de 3 o 5 semanas, junto con la inyección de PG600[®] al destete final para inducir y sincronizar el celo posdestete, en la fertilidad de cerdas primíparas al segundo parto. La hipótesis formulada es que un periodo de lactación de 5 semanas en cerdas primíparas mejoraría su fertilidad al siguiente parto, respecto a aquellas destetadas tras 3 semanas de lactación; y que el tratamiento gonadotrópico al destete resultaría en una mejora del índice de parto y del subsiguiente tamaño de camada al segundo parto.

Como ya hemos expuesto anteriormente, además de la impredecibilidad de la respuesta estral y ovulatoria a la inyección con PG600[®] en nulíparas, el uso de gonadotropinas exógenas para la inducción de la pubertad puede favorecer la estimulación de nulíparas con una fertilidad reducida y, por consiguiente, con una esperada menor longevidad en la explotación, siendo incluidas en el ciclo reproductivo. En general, el periodo más prolífico en la cerda se sitúa entre el tercer y el sexto parto; sin embargo, un elevado porcentaje medio anual de cerdas son sacrificadas con un número medio de partos inferior a 3, lo cual supone una vida productiva relativamente corta y una fuente de preocupación tanto económica como de bienestar animal. En este sentido, el fallo reproductivo ha sido identificado como la principal causa de sacrificio dentro del grupo de cerdas nulíparas y de primer parto (D' Allaire y Drolet, 1999; Hughes *et al.*, 2010). La identificación y selección de las cerdas nulíparas con el mayor potencial reproductivo a largo plazo supondría un impacto muy positivo para la industria del sector porcino. Hasta el momento, existen experimentos previos que han comparado el rendimiento reproductivo de

cerdas cuya pubertad fue originalmente inducida con gonadotropinas exógenas, con el de sus homólogas no tratadas (Kirkwood *et al.*, 2000), no detectándose un descenso de rendimiento reproductivo a largo plazo en aquellas nulíparas inseminadas a una mayor edad y peso vivo en el primer celo inducido hormonalmente. En este sentido, y en una explotación porcina con rendimientos reproductivos relativamente pobres, Holtz y cols. (1999) observaron cómo la inducción de la pubertad con gonadotropinas exógenas en nulíparas, junto con su inseminación en el primer celo posterior al inducido hormonalmente, no mostró ningún efecto sobre los índices de retención de las cerdas durante los 3 primeros partos. Una falta de efecto similar sobre los índices de sacrificio fue observada tras la administración de gonadotropinas exógenas al destete a cerdas primíparas para la inducción del primer celo posdestete (Kirkwood *et al.*, 1998b; Vargas *et al.*, 2006). Sin embargo, no tenemos constancia de ningún estudio que haya valorado el efecto de una respuesta de celo temprana o tardía al tratamiento gonadotrópico para inducir la pubertad en la nulípara sobre su rendimiento reproductivo a largo plazo y su longevidad. Por lo tanto, el tercer experimento de la Tesis Doctoral tuvo como objetivo evaluar la fertilidad a largo plazo, así como su longevidad, en cerdas nulíparas que presentaron una respuesta de celo temprana o tardía al tratamiento con gonadotropinas exógenas para inducir su pubertad, en comparación con nulíparas selectas no tratadas de la misma población animal. La hipótesis propuesta es que tanto la fertilidad a largo plazo como la longevidad de las nulíparas con una respuesta rápida de celo a la estimulación hormonal podrían encontrarse en niveles semejantes a los de aquellas que alcanzan la pubertad de forma natural a una edad más temprana tras la exposición al verraco. Esta situación implicaría que una respuesta rápida de celo a la PG600[®], así como en el caso de la exposición al verraco, para la inducción de la pubertad, podría relacionarse con una mayor madurez fisiológica del eje

hipotálamo-hipófisis-ovárico a una edad cronológica dada, asociándose con y resultando en un mejor rendimiento reproductivo a largo plazo de la cerda.

La elevada variabilidad del IDC y del ICO supone un problema que afecta a la eficacia de la IA a tiempo fijo, debido a la falta de sincronía entre la IA y la ovulación (Kemp and Soede, 1996). Esta situación hace necesaria la utilización de protocolos de sincronización del celo y de la ovulación en la cerda para maximizar su fertilidad. La administración de PG600[®] al destete en la cerda es una de las técnicas más comúnmente utilizadas para la sincronización del celo y la ovulación (Kirkwood, 1999). Sin embargo, la respuesta estral y ovulatoria a dicho tratamiento es altamente variable y está influida por factores tales como el número de parto de la cerda y la estación del año (Bates *et al.*, 1991; Kirkwood, 1999; Knox and Zas, 2001), afectando negativamente a los futuros índices de parto y tamaños de camada. El uso de la ecografía ovárica transrectal para observar la dinámica del crecimiento folicular y la ovulación es un método exacto aunque ciertamente invasivo y exigente de experiencia para su desarrollo. Por tanto, la implantación de nuevas técnicas para la predicción de la ovulación en cerdas destetadas abre una ventana a la mejora del rendimiento reproductivo en el ganado porcino. Numerosos autores han demostrado la utilidad de la resistencia eléctrica del moco vaginal (REV) como una herramienta para la detección del celo en la cerda (Ko *et al.*, 1989; Řezáč *et al.*, 2009; Yamauchi *et al.*, 2009). Según estos autores, la evolución de la REV a lo largo del ciclo estral está relacionada con los cambios en la concentración plasmática de las hormonas sexuales a lo largo del mismo (Dusza *et al.*, 1996). En la cerda (Ko *et al.*, 1989), la vaca (Carter and Dufty, 1980), la oveja (Bartlewski *et al.*, 1999), la búfala (Gupta and Purohit,

2001) y la rata (Jaramillo *et al.*, 2012) se ha observado un descenso de los valores de REV durante el proestro, seguido de un aumento gradual durante el periodo de estro y la ovulación, permaneciendo en valores elevados hasta el inicio del siguiente proestro o a lo largo de la gestación. Sin embargo, la utilidad de la REV para predecir el momento de la ovulación en cerdas destetadas, estudiando posibles variaciones estacionales, nunca ha sido evaluada. Esta situación constituye el objetivo del cuarto ensayo experimental presentado en esta Tesis Doctoral. Nuestra hipótesis es que una ovulación prematura en cerdas destetadas podría estar relacionada con un aumento también prematuro de los valores de REV, en comparación con una ovulación normal o tardía posdestete; y que este aumento preovulatorio de la REV podría ser utilizado para predecir el momento de la ovulación. Con el fin de probar esta hipótesis, se llevaron a cabo dos acciones: 1) establecer el perfil de valores de REV entre los días 1 y 7 posdestete, en cerdas con diferente número de parto y en diferentes estaciones del año, y 2) valorar la relación entre los valores de REV y el momento de la ovulación en cerdas destetadas.

Capítulo 3. Revisión bibliográfica

La cerda múltipara tiende a experimentar un descenso en el tamaño de camada a partir del 5° o 6° parto (Lucia Jr. *et al.*, 2000), comprometiendo el objetivo anual del total de lechones destetados de la explotación. Esta situación implica la necesidad de su reemplazo con nulíparas cíclicas de reposición, a fin de cumplir con dicho objetivo y disminuir los días no productivos de la explotación. Para garantizar el éxito de la reposición, las nulíparas deben presentar un cierto grado de fertilidad probado antes de ser incluidas en el ciclo reproductivo. Una estrategia, que permite determinar este grado de fertilidad inherente a la nulípara, se encuentra adelantando el inicio de su pubertad (Nelson *et al.*, 1990; Holder *et al.*, 1995). Esta situación permite disponer de un pool de nulíparas cíclicas, con un registro de varios ciclos estrales previos a la primera inseminación (Kirkwood, 2008). Por contra, la cubrición de nulíparas con un retraso en el inicio de su pubertad supone llevar a cabo una reposición con hembras que, a largo plazo, van a mostrar una disminución en su rendimiento reproductivo, como demuestran los estudios de Schukken *y cols.* (1994) y Le Cozler *y cols.* (1998). Estos autores observaron que las cerdas con una menor longevidad en la explotación (i. e., con un número de parto más bajo al sacrificio) y una menor producción total de lechones durante su vida reproductiva, eran aquellas que, como nulíparas, fueron inseminadas a una edad más tardía y, por ende, presentaron una mayor edad a la concepción (i. e., > 240 días) y al primer parto (i. e., > 370 días), resultados indicativos de una fertilidad innata reducida al inicio de su pubertad. En 1960, Duncan y Lodge definen la pubertad como el momento de aparición del primer celo y la primera ovulación, en asociación con una función luteal normal. El control sobre los diversos factores que influyen sobre el inicio de la pubertad, con el fin de mejorar tanto el tamaño de camada por parto como la longevidad de la nulípara en la explotación, se vuelve imprescindible.

3.1. Embriología del ovario.

Las gónadas femeninas provienen del *mesodermo intermedio*. Su primer esbozo embrionario aparece en el techo de la cavidad celómica en forma de dos eminencias longitudinales llamadas *crestas gonadales*, y se deben a la proliferación del epitelio celómico y a la condensación del mesénquima subyacente (Climent *et al.*, 2005). En este punto del desarrollo embrionario, todavía no aparecen las *células germinales primordiales* (CGP) en las crestas gonadales, células precursoras de las *oogonias*. Las CGP han de migrar desde la pared posterior del saco vitelino, a través del mesenterio dorsal y por movimientos ameboides, hasta colonizar las crestas gonadales (Climent y Bascuas, 1989). Tras la llegada de las CGP a las crestas gonadales, una proliferación activa del epitelio celómico forma los *cordones sexuales primitivos*, que se introducen hacia el mesénquima, rodeando a las CGP. En ausencia del *factor determinante testicular*, la gónada no atrae células mesonéfricas y los cordones sexuales primitivos se disgregan en pequeños cúmulos celulares que engloban grupos de CGP. El epitelio celómico sigue proliferando y origina una segunda generación de cordones, los *cordones corticales*, que se introducen hacia el mesénquima sin perder su conexión con el epitelio engrosado (Climent y Bascuas, 1989; Climent *et al.*, 2005). Estos cordones se disgregan a su vez en cúmulos celulares que encierran también CGP, y que darán lugar a las *células foliculares*.

3.2. Oogénesis.

La oogénesis se define como el proceso de formación, crecimiento y maduración de los gametos femeninos u *oocitos*. El proceso de formación de los futuros gametos femeninos tiene lugar durante la vida embrionaria, y comienza con la migración de las CGP a las crestas gonadales. Las CGP, a través de sucesivas divisiones mitóticas, se diferencian en oogonias, las cuales se transformarán en *oocitos primarios* al término de esta fase proliferativa (Galina y Valencia, 2008). El crecimiento del oocito primario, entre el inicio de la primera división meiótica (MI) y su detención en la fase de Diplotene durante la Profase I, implica un aumento del número de orgánulos citoplasmáticos (mitocondrias, ribosomas, etc.) y la formación de los *gránulos corticales* a partir del aparato de Golgi (Stromstedt and Byskov, 1999). Toda esta maquinaria celular refleja una elevada actividad metabólica y permite la síntesis y almacenamiento de ARN, proteínas y enzimas, así como el desarrollo de la red de microtúbulos y filamentos. El proceso de maduración del oocito primario transcurre entre el reinicio de la MI (asociado a la ola preovulatoria de LH) y la Metafase de la segunda división meiótica (MII). Una serie de cambios a nivel nuclear y citoplasmático van a preparar al oocito primario para ser fecundado con éxito y proseguir con el posterior desarrollo embrionario (Martínez-Madrid, 2002). A nivel nuclear, se produce la disolución de su membrana, así como la posterior formación del huso meiótico y la condensación de la cromatina en cromosomas homólogos. A nivel citoplasmático, tiene lugar una redistribución de las mitocondrias y de los gránulos corticales, además de la síntesis de nuevas proteínas que serán esenciales en la progresión de la meiosis, la regulación de la penetración espermática y la descondensación de la cabeza del espermatozoide (p. e., el *factor de crecimiento del pronúcleo masculino*; Moor *et al.*, 1990).

La *división meiótica* o *meiosis* es un tipo de división celular, exclusiva de las células germinales (oogonias y espermatogonias), que tiene lugar durante la *gametogénesis* (*oogénesis* y *espermatogénesis*) e implica una sucesión de dos divisiones celulares, llamadas *divisiones meióticas I* (MI) y *II* (MII). Su objetivo es la reducción a un número haploide de cromosomas y la recombinación de la información genética (Polanski and Kubiak, 1999). La totalidad de los oocitos primarios inician la MI de forma sincrónica, justo antes o poco después del nacimiento, partiendo de oocitos con 4 copias de ADN y un número $2n$ de cromosomas para asegurar la obtención de gametos haploides al final de la meiosis. Tras la MI se obtienen dos células hijas con $1n$ cromosomas y 2 copias de ADN, mientras que el resultado de la MII son dos células con $1n$ cromosomas y 1 copia de ADN (Dekel, 1999). En el caso de la hembra, la meiosis sólo da lugar a un gameto y ambas divisiones meióticas son asimétricas, de tal forma que al final de cada una de ellas se obtiene una célula grande (el *oocito secundario*, tras la MI; y el *óvulo maduro*, durante la MII, que requiere ser ovulado y fecundado para completar la meiosis), y otra pequeña y abortiva (los *corpúsculos polares I* y *II*, obtenidos tras la MI y la fecundación del óvulo maduro, respectivamente; Martínez-Madrid, 2002; Galina y Valencia, 2008).

Durante la meiosis, se identifican dos puntos de detención del ciclo celular. El primero de ellos tiene lugar en la fase de Diplotene difuso durante la Profase I de la MI, que coincide con el periodo alrededor del nacimiento, y el segundo, en la Metafase de la MII, coincidente con la ovulación. La detención del ciclo celular en la MI se prolongará hasta

momentos antes de la primera ovulación o, por el contrario, de la *atresia folicular* (Tsafiriri *et al.*, 1983). La atresia folicular se trata de un proceso degenerativo del folículo que puede iniciarse en cualquier estadio de su desarrollo previo al de *folículo preovulatorio*. El control de esta primera detención del ciclo celular se lleva a cabo mediante la participación de, entre otros, el *adenosil monofosfato cíclico* (AMPc; Schultz, 1991; Mattioli, 1994; Dekel, 1999), la *hipoxantina* (Dekel, 1999; Stromstedt and Byskov, 1999) y del *factor inhibidor de la maduración o meiosis del oocito* (OMI; Dekel, 1999). La finalidad de este sistema de control es mantener inactivo al *factor promotor de la maduración o de la metafase* (MPF), elemento regulador de la transición entre la fase de Diplotene difuso durante la Profase I de la MI y la Metafase de la MII (Dekel, 1996). El MPF se compone de una *proteinkinasa* (p34^{cdc2}) y una *ciclina*. A través de una cascada de reacciones bioquímicas, el AMPc previene la defosforilación de la proteinkinasa p34^{cdc2}, ayudado por la *proteinkinasa A*, manteniendo al MPF en un estado inactivo (Dekel, 1999). La detención del ciclo celular en la MII se prolonga hasta el momento de la fecundación, cuando la penetración del espermatozoide activa al óvulo maduro para completar la meiosis (Galina y Valencia, 2008).

Al nacimiento, la mayoría de los oocitos primarios se encuentran rodeados por una capa de células foliculares planas, conocidas como *células pregranulosas*, constituyendo los *folículos primordiales*, con un diámetro aproximado de 12 μm (Franchi *et al.*, 1962). Estas células pregranulosas también ejercen un efecto inhibitorio sobre la meiosis y el crecimiento folicular. La colonia de oogonias disminuye a lo largo de la vida fetal y durante los primeros días de vida de la hembra, apareciendo los primeros oocitos primarios, dentro

de los folículos primordiales, en torno al día 50 posfecundación (pfc; figura 3.1.; Bielańska-Osuchowska, 2006). Los folículos primordiales tienen una presencia mayoritaria en el ovario hasta los 100 días de edad (Oxender *et al.*, 1979), momento a partir del cual comienza a aumentar la población de *folículos primarios* (Casida, 1935; Oxender *et al.*, 1979; Dyck and Swierstra, 1983; Grieger *et al.*, 1986). El aumento de la concentración plasmática de la hormona luteinizante (LH) entre los días 80 y 120 de edad en la cerda nulípara estimula el desarrollo folicular inicial, siendo responsable del aumento de la población de folículos primarios (Camous *et al.*, 1985; Prunier *et al.*, 1993b). Al nacimiento de la nulípara, y después de un aumento continuo de su población a lo largo de la vida fetal, existen entre 100.000 y 500.000 oocitos primarios y folículos primordiales entre ambos ovarios. Esta población constituye la cantidad definida para el resto de su vida reproductiva (Erickson, 1966; Black and Erickson, 1968), pero una gran mayoría sufrirán atresia durante la vida de la hembra y sólo un número reducido crecerán hasta alcanzar el estadio de folículo preovulatorio y llegarán a ovular.

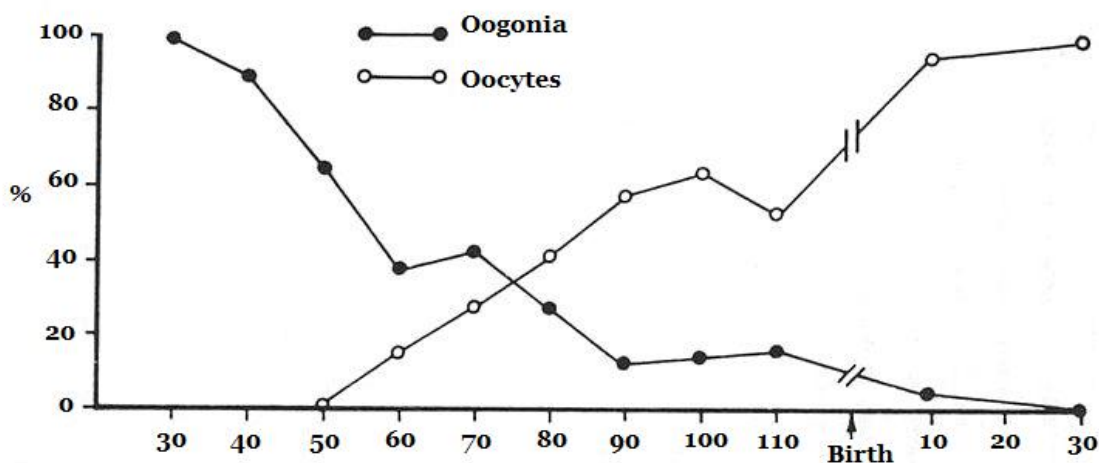


Figura 3.1.: Evolución de la población de oogonias y oocitos primarios en la cerda nulípara durante su vida fetal y los primeros días posteriores al nacimiento (de Black and Erickson, 1968).

3.3. Foliculogénesis.

De igual importancia que la producción de gametos femeninos es la formación y el crecimiento folicular o *foliculogénesis*, proceso a lo largo del cual se va a establecer una comunicación esencial entre el oocito y el folículo para el desarrollo de sus competencias.

Al inicio de la foliculogénesis, tanto el oocito primario como el folículo primordial van a crecer gracias a una intensa síntesis proteica y al almacenamiento de macromoléculas (Moor *et al.*, 1990). Este hecho supone la transformación de folículo primordial a folículo primario, máximo grado de desarrollo folicular presente en el ovario de las nulíparas que no han alcanzado la pubertad, con un diámetro aproximado de 0.12 mm (Knox, 2005). El folículo primario es de tipo preantral y presenta varias capas de *células de la granulosa* rodeando al oocito primario (Knox, 2005), que aparecen tras la división de las células

pregranulosas. Esta transformación, entendida como una *foliculogénesis independiente de las gonadotropinas*, está bajo el control de una acción hormonal sistémica (Inhibina, Activina, etc.) y de factores locales de crecimiento y diferenciación celular (TGF β , GDF-9, BMP, IGF-I, EGF, TGF α , entre otros) producidos por las células somáticas del ovario (Hirshfield, 1991), por las células de la teca interna y de la granulosa del propio folículo y por el oocito (Picton *et al.*, 1998). Sin embargo, a pesar de ser una fase de desarrollo folicular independiente de las gonadotropinas, los folículos primarios ya son sensibles a ellas en este punto de su desarrollo (Galina y Valencia, 2008). La *lámina basal*, secretada por las células de la granulosa, aparece alrededor de las mismas. Así mismo, las células de la granulosa participan en la formación de una cubierta extracelular glicoproteica llamada *zona pelúcida*, que se sitúa por debajo de ellas y que rodea la membrana celular del oocito u *oolema* (Martínez-Madrid, 2002).

En esta etapa del desarrollo folicular, la aparición de los *procesos citoplasmáticos*, procedentes de las células de la granulosa, establece una comunicación entre estas células y el oocito, así como entre las propias células de la granulosa (Albertini and Anderson, 1974; Gilula *et al.*, 1978). Este entramado de uniones intercelulares posibilita el intercambio de moléculas entre el oocito, las células de la granulosa y la circulación sanguínea, con una función nutritiva y reguladora (Canipari, 1994). En este punto del desarrollo folicular, las células del estroma ovárico comienzan a organizarse alrededor de la lámina basal, originando las *células precursoras de la teca*.

Con el inicio de la pubertad, comienza la *foliculogénesis dependiente de las gonadotropinas*. En esta etapa, el crecimiento y desarrollo del folículo primario prosigue

gracias a su estimulación por parte de las *gonadotropinas hipofisarias folículo-estimulante* (FSH) y *luteinizante* (LH), así como del estradiol producido por el propio folículo en respuesta a su estimulación por parte de las gonadotropinas hipofisarias (Galina y Valencia, 2008). El folículo primario aumenta su volumen y se da una hiperplasia e hipertrofia de las células de la granulosa, así como una diferenciación de las células precursoras de la teca. Éstas últimas se van a organizar en dos capas celulares concéntricas y vascularizadas: la *teca interna*, secretora de hormonas, y la *teca externa*, con una función contráctil de la estructura folicular (Martínez-Madrid, 2002). La suma de estos acontecimientos da lugar al *folículo secundario*, también de tipo preantral, que presenta de 3 a 20 capas de células de la granulosa y un diámetro de 0.14 a 0.40 mm (Figura 3.2.; Sacristán *et al.*, 1996; Knox, 2005).

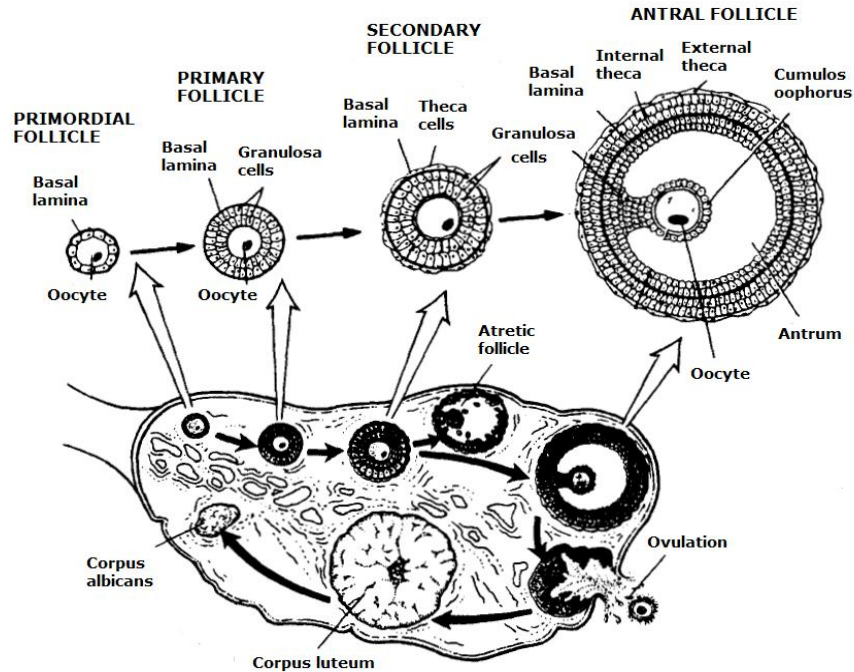


Figura 3.2.: Representación gráfica de la estructura ovárica, del desarrollo folicular y de la formación del cuerpo lúteo y del cuerpo albicans (Tomado de Sacristán et al., 1996).

Al inicio de esta fase de foliculogénesis dependiente de las gonadotropinas, las células de la granulosa del folículo primario adquieren receptores de membrana para la FSH, los cuales aumentarán en número durante el crecimiento folicular (Stromstedt and Byskov, 1999). Sin embargo, estas células todavía no presentan receptores para la LH, los cuales ya se encuentran presentes en las células de la teca interna (Galina y Valencia, 2008). Durante las últimas fases de la maduración folicular, y bajo la acción conjunta de la FSH y del estradiol, las células de la granulosa comenzarán a expresar receptores para la LH. La unión específica de la FSH a sus receptores de membrana en las células de la granulosa provoca la proliferación de estas células y un aumento en su producción de

estradiol (Sacristán *et al.*, 1996). Cuando las células de la granulosa alcanzan un número elevado, se produce una rápida expansión del folículo, dando lugar a la *cavidad antral o antro* y a la acumulación en su interior de *líquido folicular* (Canipari, 1994). Esta serie de modificaciones dan lugar al estadio de *folículo terciario, antral, preovulatorio o de Graaf*, folículo con un diámetro variable entre los 0.4 y 2.2 mm (Motlik *et al.*, 1984; Knox, 2005). La composición del líquido folicular incluye tanto sustancias plasmáticas (proteínas, enzimas, gonadotropinas hipofisarias, etc.) como sintetizadas en las células de la teca interna y de la granulosa (hormonas esteroideas, factores peptídicos no esteroideos, etc.). Como consecuencia de la formación del antro, las células de la granulosa se desplazan hacia la pared del folículo y se diferencian en dos subpoblaciones; por una parte, en las células de la granulosa que revisten la pared del folículo y que forman un epitelio estratificado (10-30 capas) en contacto con la lámina basal, y por otra, en las células del *cumulus oophorus*, que forman varias capas concéntricas alrededor del oocito (Canipari, 1994), dando lugar al *complejo cumulus-oocito* (CCO). La capa de células del cumulus oophorus más próxima a la zona pelúcida se conoce con el nombre de *corona radiata*.

3.3.1. Esteroidogénesis folicular.

La síntesis de las *hormonas esteroideas foliculares* (estrógenos y progesterona) constituye un proceso de cooperación entre la actividad endocrina de las células de la teca interna y de la granulosa, bajo el control sinérgico de la FSH y la LH hipofisarias. Este hecho permite a los folículos alcanzar su desarrollo final (Cardenas and Pope, 2002).

Las hormonas precursoras de la biosíntesis de los *estrógenos* son los *andrógenos*, los cuáles a su vez se sintetizan a partir del *colesterol*. La transformación del colesterol en *androstenediona*, previo paso por la síntesis de progesterona, tiene lugar en las células de la teca interna, tras la unión de la LH a sus receptores de membrana. La androstenediona se difunde a las células de la granulosa, a través de la lámina basal, donde es convertida en *estradiol* tras la unión específica de la FSH a sus receptores de membrana y el consiguiente aumento de actividad de la enzima *aromatasa* (Stromstedt and Byskov, 1999). El estradiol sintetizado y el *factor de crecimiento tipo insulina 1* (IGF-I), producido por las células somáticas del ovario y del folículo en crecimiento, potencian aún más la actividad de dicha enzima. Este modelo, que recibe el nombre de *dos células-dos gonadotropinas*, permite al folículo aumentar su capacidad esteroideogénica con la finalidad de producir una mayor cantidad de estradiol, fundamental para su crecimiento y maduración final (Sacristán *et al.*, 1996).

El mecanismo de acción de las gonadotropinas FSH y LH, tras su unión específica a sus respectivos receptores de membrana, se produce por mediación del AMPc. Dicha unión activa la enzima *adenilato ciclasa*, que cataliza la conversión del *adenosín trifosfato* (ATP) en AMPc. A su vez, el AMPc activa a la *proteinkinasa dependiente de AMPc* (PKA), la cual fosforila (activa) una serie de proteínas que están implicadas tanto en la síntesis de enzimas esteroideogénicas (p. e., la enzima *desmolasa*, que actúa rompiendo las cadenas laterales del colesterol, o enzimas *hidroxilasas* y *descarboxilasas*; Martínez-Madrid, 2002) como en el aumento de la actividad de otras enzimas esteroideogénicas (p. e., la enzima *aromatasa*; Sacristán *et al.*, 1996). Este conjunto de eventos intracelulares aumenta tanto la

esteroidogénesis ovárica como la concentración plasmática de estradiol, lo que va a determinar dos acciones fisiológicas a nivel hipotálamo-hipofisario. Por un lado, se da una inhibición de la secreción hipofisaria de FSH, impidiendo el desarrollo de los folículos de menor diámetro y provocando su atresia (Sacristán *et al.*, 1996); mientras que, por otro lado, tiene lugar la estimulación y activación del centro pulsátil del hipotálamo, desencadenándose un pico de liberación de la *hormona liberadora de gonadotropinas* (GnRH) que, a nivel hipofisario, estimula la liberación de la *ola preovulatoria de LH*.

La biosíntesis de *progesterona* se realiza tanto en las células de la teca interna, como paso intermedio en la conversión del colesterol a androstenodiona, como en las de la granulosa, tras el desarrollo de receptores para la LH en su membrana plasmática durante la maduración final del folículo (Sacristán *et al.*, 1996). Durante el desarrollo folicular, la progesterona sintetizada en las células de la teca interna y de la granulosa es destinada a la síntesis de estradiol. Sin embargo, tras la ovulación, tanto las células de la granulosa como las de la teca interna se transforman en células lúteas y la progesterona sintetizada en ellas es secretada a la circulación plasmática (Hillier, 1981).

3.3.2. Factores peptídicos de origen folicular.

Tras la estimulación de las células de la granulosa por parte de la FSH, una serie de *factores u hormonas peptídicas no esteroideas* se producen en ellas (Inhibina o Foliculostatina, Activina, Proteína reguladora de folículos (FRP), entre otras; Sacristán *et al.*, 1996) y se van a acumular en el líquido folicular (Stromstedt and Byskov, 1999). La

Inhibina bloquea la secreción hipofisaria de FSH sin alterar la liberación de LH, participando en la selección de los folículos dominantes e impidiendo el desarrollo del resto de folículos. La *Activina* actúa estimulando la síntesis y secreción de FSH en la hipófisis. La FRP, secretada por las células de la granulosa de folículos pequeños y medianos, inhibe la actividad de la enzima aromatasa, limitando la síntesis y secreción de estradiol en esos folículos y provocando su atresia (Stromstedt and Byskov, 1999). Otros factores peptídicos foliculares encontrados en el líquido folicular son: el *Factor inhibidor de la maduración o meiosis del oocito* (OMI), secretado por las células de la granulosa de folículos primordiales y desarrollados, que participa en la detención de la MI en su Profase; y la *Relaxina*, sintetizada en el cuerpo lúteo de cerdas gestantes y en la placenta de yegua, oveja, coneja y gata, que ayuda en el control de la contractibilidad uterina y en la dilatación del cuello uterino y la vagina antes del parto (Sacristán *et al.*, 1996; Hafez y Hafez, 2000).

3.3.3. Reclutamiento, selección y dominancia folicular.

El periodo de crecimiento y desarrollo folicular entre los estadios de folículo primordial, latente en el pool de folículos ováricos al nacimiento, y de folículo preovulatorio, destinado a ovular, engloba 3 fases diferenciadas: *el reclutamiento, la selección y la dominancia folicular*. Factores de crecimiento y diferenciación celular (IGF-I, TGF β , EGF, GDF-9, entre otros), antes de la pubertad, y de tipo hormonal (FSH, LH, estrógenos, activina, inhibina), posteriormente en cada ciclo estral, son los encargados de controlar el desarrollo y crecimiento folicular (Greenwald and Roy, 1994; Richards *et al.*, 1995). La ovulación, tras alcanzar su estadio de folículo preovulatorio y después de un continuo desarrollo y crecimiento folicular gracias a la estimulación gonadotrópica; o por el

contrario, la atresia folicular, en cualquier punto de su desarrollo y crecimiento, hasta desaparecer de la estructura ovárica, son las dos únicas alternativas posibles para cada uno de los folículos al inicio de su crecimiento y desarrollo (Knox, 2005). Este último supuesto constituye el destino más frecuente para la gran mayoría de la población folicular ovárica presente al nacimiento, siendo más habitual entre la población de folículos primordiales. Es importante señalar que no todos los folículos primordiales presentes al nacimiento en el ovario iniciarán su desarrollo al mismo tiempo. El balance entre los distintos factores de crecimiento y diferenciación celular anteriormente mencionados va a regular la susceptibilidad de cada folículo primordial para iniciar su crecimiento o, por el contrario, degenerar (Eppig, 2001; Braw-Tal, 2002).

Las fases de reclutamiento y selección folicular son relativamente cortas, en comparación con las anteriores etapas del crecimiento y desarrollo folicular (Picton, 2001). El periodo de tiempo que transcurre desde que un folículo primordial inicia su desarrollo y crecimiento hasta que aparece en él la cavidad antral es de 83 días, mientras que desde la formación del antro hasta que el folículo alcanza su estadio ovulatorio pasan tan sólo 20 días (Morbeck *et al.*, 1992). Esta estimación permitió a Morbeck y *cols.* (1992) determinar que la población de la que se reclutan los futuros folículos ovulatorios, en torno a los días 14 a 16 del ciclo estral, podría estar constituida por folículos con un diámetro de 3 mm, que hayan iniciado la formación de su antro al inicio de ese ciclo.

El término de *reclutamiento folicular* ha sido utilizado frecuentemente para hacer referencia a dos procesos importantes, pero distintos, durante el desarrollo folicular inicial (Meijs-Roelofs *et al.*, 1990; Rombauts *et al.*, 1998). Para aclarar esta situación, McGee y Hsueh (2000) establecieron dos periodos diferentes dentro del reclutamiento folicular: *los reclutamientos foliculares inicial y cíclico*. La fase de *reclutamiento inicial*, previo al inicio de la pubertad, constituye un continuo reclutamiento de folículos primordiales “latentes” para establecer un pool de folículos iniciando su desarrollo y crecimiento. Este inicio del crecimiento folicular está controlado por medio de factores de crecimiento y diferenciación celular (TGF β , GDF-9, BMP, IGF-I, EGF, TGF α , entre otros) producidos por las células somáticas del ovario (Hirshfield, 1991) y del propio folículo (Picton *et al.*, 1998). Sin embargo, el folículo ya es capaz de responder a su estimulación por parte de la FSH para iniciar su desarrollo (McGee and Hsueh, 2000). La fase de *reclutamiento cíclico*, que tiene lugar con la llegada de la pubertad, está dominada por el incremento plasmático de FSH en cada ciclo estral, el cual modifica la ratio LH:FSH (Guthrie and Bolt, 1990). La finalidad del reclutamiento cíclico es la de establecer una cohorte de folículos antrales para que inicien su desarrollo final. A pesar de la intervención de la FSH en esta fase, y más adelante de la LH para proseguir con el desarrollo folicular final, no existen garantías de una posterior ovulación de los folículos en crecimiento durante esta fase. Los folículos primordiales que no participan del reclutamiento inicial van a permanecer en estado “latente” a la espera de ser reclutados más adelante, mientras que aquellos reclutados de forma cíclica que no son seleccionados para continuar con su desarrollo final van a experimentar una degeneración atrética. Se ha estimado que el número de folículos reclutados en cada ciclo estral en la especie porcina supera las 50 unidades (Driancourt, 2001) y que esta fase de reclutamiento cíclico acontece entre los días 14 y 16 del ciclo

estral (Clark *et al.*, 1982; Foxcroft and Hunter, 1985) o en las primeras horas posteriores al destete.

La *selección folicular* hace referencia al proceso por el cual la anterior cohorte folicular reclutada, que ya ha iniciado su crecimiento y desarrollo durante el reclutamiento cíclico, comienza su desarrollo final a la vez que se ve reducido el número de folículos finalmente seleccionados a un número apropiado y específico para cada especie animal. Por lo tanto, el número final de folículos que llegan a ovular viene determinado, primero, por el total de folículos reclutados y, segundo, por su capacidad para, una vez seleccionados, seguir creciendo y adquirir el status de folículo dominante, evitando la atresia (Cardenas and Pope, 2002). Aproximadamente de un 30 a un 40% de los folículos previamente reclutados son seleccionados en esta fase para completar su desarrollo y maduración final (Stromstedt and Byskov, 1999; Driancourt, 2001). La selección folicular ha sido tradicionalmente confundida con la anterior fase de reclutamiento cíclico (Scheele and Schoemaker, 1996; Rombauts *et al.*, 1998). Esta confusión puede ser debida a que, morfológicamente, no existen diferencias entre el folículo seleccionado y otro no seleccionado de la misma cohorte. El proceso de selección folicular implica un continuo desarrollo y crecimiento del folículo puntualmente encaminado a alcanzar su estadio preovulatorio. Sin embargo, el folículo seleccionado todavía no presenta garantías de llegar a ovular, a pesar de su proximidad temporal al momento de la ovulación. La selección folicular viene determinada por la expresión de receptores de membrana para la LH en las células de la teca interna y de receptores para la FSH en las células de la granulosa (Espey, 1999), y permite establecer la cohorte folicular de la que saldrá(n) el/los folículo(s)

dominante(s) que llegará(n) a ovular. Englobados dentro de la selección folicular, se encuentran dos procesos encaminados a establecer la cohorte final de folículos seleccionados, de donde surgirá la figura del folículo dominante. Por un lado, la FSH participa en la selección positiva de los folículos previamente reclutados, mientras que estos mismos folículos positivamente seleccionados van a intervenir en la selección negativa del resto de folículos previamente reclutados y que ahora adquieren el status de subordinados. Los folículos seleccionados para proseguir con su desarrollo y crecimiento aumentan su síntesis y secreción de estrógenos e inhibina, cuya concentración plasmática se ve incrementada, impidiendo el crecimiento y desarrollo de los folículos subordinados. Ambas hormonas van a bloquear la liberación hipofisaria de FSH (sin alterar la secreción hipofisaria de LH), necesaria en este punto del desarrollo folicular para que los folículos subordinados prosigan con su crecimiento, el cual se detiene, sobreviniendo la atresia folicular.

La fase de *dominancia folicular* se centra en el periodo de desarrollo y crecimiento final del folículo antral destinado a ovular y en su papel como regulador de la cuota ovulatoria final. El folículo dominante va a continuar su crecimiento y desarrollo en un ambiente hormonal “hostil” que dificulta el desarrollo del resto de folículos seleccionados. Su tamaño y el alto índice mitótico de sus células de la granulosa permiten distinguir a dicho folículo del resto de folículos previamente seleccionados, dentro de la misma cohorte folicular. Este ambiente hormonal se caracteriza por un descenso paulatino de la concentración plasmática de FSH. La disminución, hasta su casi completa inhibición, de la secreción hipofisaria de dicha gonadotropina está asociada al aumento en la producción de

estrógenos e inhibina por parte del folículo dominante, resultando en un descenso de su concentración plasmática. El folículo dominante se vuelve muy sensible a la FSH y pequeñas concentraciones en sangre de dicha hormona son suficientes para continuar con su desarrollo. Además, el folículo dominante va a desarrollar receptores para la LH en sus células de la granulosa, y la unión de dicha hormona a sus receptores de membrana permite al folículo dominante cambiar la dependencia de su desarrollo final de la FSH a la LH. Este cambio de dependencia hormonal también permite al folículo dominante estimular aún más su producción de estrógenos e inhibina (Zelevnik and Benyo, 1994; Xu *et al.*, 1995). Los estrógenos y la inhibina van a suprimir la liberación hipofisaria de FSH, sin alterar la secreción de LH, bloqueando por completo el crecimiento del resto de folículos no dominantes. Igualmente, el folículo dominante va a sintetizar y secretar mayores cantidades de IGF-I, gracias a la acción de la FSH (Adashi, 1995), y de otros factores paracrinos y autocrinos (GDF-9, TGF β , TGF α , BMP, entre otros). Estos factores de crecimiento y diferenciación celular son ya detectables en el líquido folicular de folículos dominantes, junto con la FSH y el estradiol, y potencian un aumento de su vascularización folicular y su mejor respuesta a la escasa concentración plasmática de FSH. Esta mejor respuesta del folículo dominante a la FSH y el aumento de su síntesis estrogénica se traduce en una mayor expresión de receptores de membrana para la FSH y la LH en sus células de la granulosa. Dicho aumento del número de receptores FSH y LH, y la unión de las gonadotropinas hipofisarias a ellos, incrementa aún más la síntesis y secreción de estrógenos y estimula el crecimiento folicular final. Finalmente, y ante un nivel plasmático crítico de estradiol, se estimula el centro pulsátil hipotalámico que desencadena la liberación de un pico preovulatorio de GnRH, el cual provoca la liberación de la ola preovulatoria hipofisaria de LH y la posterior ovulación folicular.

3.4. Ovulación.

La ola preovulatoria de LH, inducida por el aumento de estradiol plasmático producido por los *folículos preovulatorios*, desencadena finalmente la ovulación (Stromstedt and Byskov, 1999). La alta concentración de gonadotropinas hipofisarias en el líquido folicular, especialmente de LH, estimula la luteinización de las células de la pared de los folículos ovulados. Este hecho supone un cambio en el patrón de síntesis de las hormonas esteroideas en las células de la granulosa y de la teca interna, transformándose de productoras de estrógenos a productoras de progesterona (Espey, 1999), que será la principal hormona producida por el cuerpo lúteo tras la ovulación (Geisert, 1999). En este momento, el oocito primario se prepara para la reanudación de la meiosis y su maduración.

Si bien anteriormente mencionábamos la actuación del AMPc en el mantenimiento del bloqueo de la MI, su reanudación viene precedida por un aumento de la concentración intrafolicular de AMPc. Dicho aumento, previo al momento de la ovulación, viene estimulado por la unión de la LH a sus receptores de membrana en las células de la granulosa. El oocito primario, detenido en fase de Diplotene en la Profase I de la MI, no es capaz de producir AMPc en los niveles necesarios para mantener su parada meiótica, por lo que requiere de los niveles basales de AMPc producidos en las células de la granulosa del folículo para dicho fin. Este AMPc es transferido de manera continua al oocito a través de los procesos citoplasmáticos (Schultz, 1991; Martínez-Madrid, 2002). Con el desarrollo de receptores para la LH en las células de la granulosa, los folículos preovulatorios responden a la ola preovulatoria de LH produciendo grandes cantidades de AMPc (Martínez-Madrid,

2002). Las elevadas concentraciones de AMPc en los folículos dominantes median en la acción de la LH sobre la *Conexina 43*, una proteína que forma parte de los procesos citoplasmáticos del folículo. Mediante reacciones de fosforilación/defosforilación, se producen cambios en la conformación de dicha proteína que inducen una inmediata reducción de las comunicaciones intercelulares en dichos folículos. Este bloqueo de los procesos citoplasmáticos disminuye la cooperación metabólica entre las células de la granulosa y el oocito (Gilula *et al.*, 1978; Schultz, 1991). Este fenómeno, conocido como *expansión o mucificación del cúmulus* (Eppig, 1979), se produce 16 horas después de la ola preovulatoria de LH. Bajo dichas condiciones, el flujo de AMPc desde las células de la granulosa hacia el oocito desciende por debajo del umbral requerido para inhibir la activación del factor promotor de la maduración o de la metafase (MPF) y el oocito reanuda la meiosis (Dekel, 1999).

En la especie porcina, existe una cierta variabilidad en cuanto al inicio de la ovulación (Flowers and Esbenshade, 1993). Si bien es aceptado ampliamente que la ovulación suele tener lugar entre 30 y 40 horas después del inicio del periodo de celo, tomando la ola preovulatoria de LH como hora 0 del ciclo estral (Geisert, 1999), según otros autores (Du Mesnil Du Buisson *et al.*, 1970), el comienzo de la ovulación es posterior (38-42 h). En cuanto a la duración de la ovulación, ésta suele transcurrir en un periodo de 1 a 3 horas. Los folículos preovulatorios tienen un tamaño de 7 a 11 mm de diámetro y, momentos antes de la ovulación, sus tensas paredes se vuelven pendulantes y flácidas como consecuencia de una disminución de la presión intrafolicular. En este momento, los CCO se desligan de la pared folicular (Hunter, 1967; Hunter, 1988). El número de oocitos liberados durante la ovulación es variable, oscilando entre 10 y 24 (Geisert, 1999; Knox, 2005), y se

encuentran detenidos en la metafase de la MII. Las células de la pared folicular que permanecen en el folículo ya ovulado se colapsan hacia la cavidad antral, la cual se llena de sangre, constituyendo el *cuerpo hemorrágico*, el cual se transformará en el *cuerpo lúteo*, constituido por células de la teca interna y de la granulosa hipertrofiadas y luteinizadas. La involución del cuerpo lúteo, si no hay fecundación o la gestación no llega a término, deja tras de sí una cicatriz fibrosa que recibe el nombre de *corpus albicans*.

3.5. Hormonas hipotalámicas, hipofisarias y esteroideas foliculares en la cerda nulípara.

3.5.1. Perfil hormonal antes de la pubertad.

En la cerda nulípara, la LH es una hormona clave en el control del desarrollo ovárico y folicular, e influye en la edad de aparición de la pubertad (Evans and O'Doherty, 2001). Al nacimiento, la concentración plasmática de LH comienza a disminuir hasta alcanzar niveles basales en torno al primer mes de vida. Posteriormente, se produce un continuo incremento de su concentración en sangre hasta, aproximadamente, los 4 meses de edad debido al inicio de la actividad del *eje hipotálamo-hipófisis-ovárico*. Este inicio de la actividad fisiológica hipotálamo-hipofisaria es el reflejo del grado de madurez alcanzado en la cerda nulípara e, inicialmente, se traduce en un aumento de la secreción tónica de GnRH por parte del centro tónico hipotalámico que, en la hipófisis, estimula un aumento progresivo de la secreción de LH. Alrededor de los 100 días de edad, y debido al establecimiento del sistema de retroalimentación negativa que ejercen los estrógenos ováricos sobre la unidad hipotálamo-hipofisaria (Christenson *et al.*, 1985), se observa un nuevo descenso en el nivel plasmático de LH hasta niveles basales. Dicha concentración

plasmática basal de LH se va a prolongar hasta, aproximadamente, los 180 días de edad (Colenbrander *et al.*, 1977; Pelletier *et al.*, 1981; Diekman *et al.*, 1983; Camous *et al.*, 1985; figura 3.3.). A partir de dicha edad y hasta la aparición de la pubertad, la concentración plasmática de LH aumenta progresivamente debido a un incremento en su frecuencia pulsátil de secreción (Pelletier *et al.*, 1981; Prunier *et al.*, 1993a), incremento asociado con el desarrollo y la maduración final de los folículos (Beltranena *et al.*, 1993) y su mayor síntesis y secreción de estrógenos.

La concentración plasmática de FSH se mantiene en niveles elevados desde el nacimiento de la nulípara y hasta los 70-125 días de edad. El posterior descenso continuo de su concentración plasmática hasta alcanzar su nivel basal, observado en el momento previo al inicio de la pubertad (Diekman *et al.*, 1983; Camous *et al.*, 1985; Prunier *et al.*, 1993a), se debe a la retroalimentación negativa que el estradiol ejerce sobre la unidad hipotálamo-hipofisaria (Prunier and Louveau, 1997).

La concentración plasmática de estradiol se encuentra en niveles basales durante la mayor parte del período previo al establecimiento de la pubertad (Esbenshade *et al.*, 1982). A pesar de ello, se trata de un nivel suficiente como para inhibir la liberación de GnRH, LH y FSH a nivel hipotálamo-hipofisario debido a la gran sensibilidad que presenta dicha unidad en este momento de su desarrollo a la presencia de mínimas cantidades de estradiol en sangre, permitiendo únicamente secreciones tónicas de dichas hormonas (Lutz *et al.*, 1984; Camous *et al.*, 1985). El nivel de estradiol en sangre va a experimentar un

incremento en los días previos al inicio de la pubertad hasta alcanzar su máxima concentración plasmática durante el proestro del primer ciclo estral, de 1 a 3 días antes del inicio de la pubertad (Sacristán *et al.*, 1996). Este incremento se debe al desarrollo y maduración final de los folículos preovulatorios, que provoca un aumento de la síntesis y secreción folicular de estradiol, el cual va a estimular positivamente a la unidad hipotálamo-hipofisaria debido a un descenso en su sensibilidad al estradiol. Este hecho induce la liberación de un pico preovulatorio de GnRH por parte del centro pulsátil hipotalámico que, a nivel hipofisario, provoca la liberación de la ola preovulatoria de LH, que estimula la primera ovulación. En torno al primer día después de alcanzarse la pubertad, dichos niveles estrogénicos regresan a valores basales. La concentración plasmática de progesterona sólo aumenta una vez alcanzada la pubertad y tras la formación de los primeros cuerpos lúteos (Esbenshade *et al.*, 1982; Prunier *et al.*, 1993b).

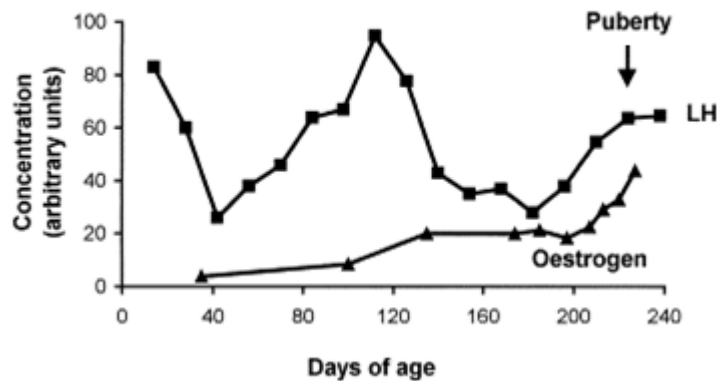


Figura 3.3.: Cambios en las concentraciones plasmáticas medias de los estrógenos y la LH durante la maduración sexual de la nulípara (de Evans and O'Doherty, 2001).

3.5.2. Regulación de la secreción endógena gonadotrópica: Teoría gonadostática.

La pubertad es la etapa del desarrollo en la que el individuo adquiere la capacidad de liberar gametos viables y, por lo tanto, de reproducirse. Se trata de un proceso dinámico, gradual y progresivo que engloba a una serie de cambios somáticos y fisiológicos que, en conjunto, permiten soportar la función reproductiva (Galina y Valencia, 2008). Pubertad no es sinónimo de madurez sexual, ya que el organismo que ha alcanzado la pubertad continúa su crecimiento y desarrollo hasta expresar su máximo potencial reproductivo. Para alcanzar la pubertad, el organismo necesita de unos estándares mínimos de peso, espesor de grasa dorsal y composición corporal, así como de un cierto grado de madurez fisiológica que active el control hormonal sobre los sistemas neuroendocrino y reproductor. Este control hormonal es fundamental en la regulación de la síntesis y secreción de las hormonas hipofisarias e hipotalámicas (GnRH, FSH, LH, entre otras) y de los estrógenos ováricos, que determinen la aparición del primer celo y la subsiguiente ovulación.

La síntesis y secreción de las gonadotropinas hipofisarias FSH y LH está regulada por medio de la *hormona liberadora de gonadotropinas* o GnRH, cuya síntesis y secreción tiene lugar en las células neurosecretoras del hipotálamo, ubicadas en sus *centros tónico y pulsátil*. Anatómicamente, el centro pulsátil se compone de tres núcleos: 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* (Sacristán *et al.*,

1996). Los axones de las células neurosecretoras de ambos centros hipotalámicos se extienden a través del tallo hipofisario donde, junto con una red de capilares fenestrados, conforman un sistema de circulación que recibe el nombre de *sistema portal hipotálamo-hipofisario* (Galina y Valencia, 2008). Este sistema de circulación portal permite a la GnRH actuar inmediata y directamente sobre las células hipofisarias que sintetizan y secretan FSH y LH. La *unidad hipotálamo-hipofisaria* o *gonadostato* se encuentra anatómicamente desarrollada en el momento del nacimiento, aunque todavía es inmadura. Sin embargo, el hipotálamo ya contiene GnRH y la hipófisis es capaz de liberar las gonadotropinas FSH y LH en respuesta a su estimulación tras la administración de GnRH exógena (Chakraborty *et al.*, 1973; Foxcroft *et al.*, 1975; Pressing *et al.*, 1992).

Las células neurosecretoras del centro tónico hipotalámico son las responsables de la secreción basal de GnRH, liberando pequeños pulsos de secreción durante períodos prolongados de tiempo. Estos pulsos, de baja frecuencia y alta amplitud, constituyen la liberación tónica de GnRH, la cual es observada a lo largo de los cuatro primeros meses de vida en la cerda, durante el periodo prepúber, y a lo largo de todo el ciclo estral, una vez alcanzada la pubertad. El centro pulsátil del hipotálamo es el responsable de la liberación del pico preovulatorio de GnRH, constituido por pulsos de alta frecuencia y baja amplitud, que únicamente tiene lugar justo antes de alcanzarse la pubertad y al final de cada ciclo estral. A partir del cuarto mes de vida, durante el periodo prepúber, el centro tónico hipotalámico presenta una alta sensibilidad a pequeñas concentraciones plasmáticas de estrógenos. Este nivel basal estrogénico en sangre durante el periodo prepúber se debe al inicio del crecimiento y desarrollo de los folículos primordiales y es suficiente para

establecer un sistema de retroalimentación negativa sobre el centro tónico hipotalámico, inhibiendo su secreción tónica de GnRH e impidiendo la estimulación de la secreción hipofisaria de las gonadotropinas FSH y LH. Durante el período inmediatamente anterior al establecimiento de la pubertad, la hipótesis predominante sobre su inicio, que recibe el nombre de **Teoría Gonadostática o del gonadostato**, reza una disminución progresiva de la excesiva sensibilidad del centro tónico hipotalámico a los estrógenos ováricos. Esta nueva situación provoca el establecimiento de un patrón de secreción hipotálamo-hipofisaria (GnRH, FSH y LH) que estimula un mayor desarrollo folicular y, como consecuencia, un incremento en la concentración plasmática de estradiol (Galina y Valencia, 2008). La desaparición del sistema de retroalimentación negativa que los estrógenos ejercen sobre la liberación de GnRH permite un incremento de su secreción hipotalámica por parte de las células neurosecretoras del centro tónico. Este aumento de la secreción tónica de GnRH incrementa a su vez la secreción de LH hipofisaria (Pelletier *et al.*, 1981; Prunier *et al.*, 1993a) en condiciones de una creciente concentración plasmática de estradiol (Lutz *et al.*, 1984; Camous *et al.*, 1985). Según se aproxima la pubertad, la capacidad del centro pulsátil hipotalámico de emitir un pico de GnRH aumenta y, ante una concentración periférica de estrógenos en sangre en un nivel suficiente, es el centro pulsátil del hipotálamo el cual se ve estimulado. Su estimulación libera un pico preovulatorio de GnRH que induce a la hipófisis a la liberación de la primera ola preovulatoria de LH, causante de la primera ovulación y del inicio de la pubertad.

La Teoría Gonadostática, apoyada por numerosos estudios (Pelletier *et al.*, 1981; Berardinelli *et al.*, 1984; Lutz *et al.*, 1984; Camous *et al.*, 1985; Prunier *et al.*, 1993a),

aboga por un inicio de la pubertad condicionado por la sensibilidad diferencial del hipotálamo a la retroalimentación negativa de los esteroides gonadales, señalando al patrón de secreción hipotalámico de GnRH como el principal factor limitante. Sin embargo, existe otra teoría, que recibe el nombre de **Teoría de la maduración central**, desarrollada por autores que no han podido demostrar esa reducción en la sensibilidad del sistema hipotálamo-hipofisario a la retroalimentación negativa del estradiol previa al inicio de la pubertad (Elsaesser *et al.*, 1991). Esta nueva teoría reza la existencia de un bloqueo específico del hipotálamo y de su secreción de GnRH por parte del Sistema Nervioso Central, a través de la monitorización neuroendocrina de diversos factores internos (metabólicos) y del medio ambiente (Davidson, 1974; Gorski, 1974; Levasseur, 1977). Igualmente señala a la maduración de diferentes sistemas neuronales (*opioides, ácido gamma-aminobutírico (GABA), glutamato, norepinefrina, dopamina y neuropéptido Y*, entre otros), y su interacción entre sí y con el hipotálamo, como el principal artífice de la aparición de la pubertad. Esta maduración neuronal difiere en el tiempo entre las distintas especies y puede tanto inhibir como estimular la secreción de GnRH en los animales que todavía no han alcanzado la pubertad. Dicha teoría también le atribuye un papel fundamental al desarrollo hipotalámico y establece que el momento en el que la inhibición prepuberal del generador de pulsos de GnRH es eliminada, aun siendo independiente de la secreción estrogénica gonadal, puede que esté eventualmente sujeta a la acción moduladora de los esteroides (Galina y Valencia, 2008).

En algunas especies, como la rata o el primate, la primera ola preovulatoria de LH y el inicio de la pubertad parecen tener lugar como resultado de la estimulación positiva del

hipotálamo vía activación de un componente de acción central como son las neuronas GnRH (Ojeda, 1991). Estas neuronas están consideradas como las mejores candidatas para transmitir la información metabólica a los distintos elementos del eje hipotálamo-hipófisis-ovárico. Cambios o alteraciones en las reservas energéticas producen fluctuaciones a corto y largo plazo tanto de las señales hormonales (*leptina*, *insulina*, IGF-I, *grelina*) como de las nutricionales (*glucosa*, *lípidos*), que retroalimentan principalmente al sistema nervioso central para regular el metabolismo y la fertilidad. Se ha observado cómo situaciones de estrés metabólico (p. e., una desnutrición crónica) alteran la síntesis de mRNA que codifica para la hormona GnRH y sus patrones de secreción (Roa, 2013).

3.5.3. Perfil hormonal y dinámica folicular después de la pubertad.

En la cerda nulípara cíclica, las secreciones basal y preovulatoria de GnRH liberadas por los centros hipotalámicos tónico y pulsátil, respectivamente, se encuentran reguladas por los niveles plasmáticos de progesterona y estradiol a lo largo del ciclo estral (Sacristán *et al.*, 1996). Durante la fase luteal del mismo, dominada por altos niveles de progesterona en sangre y su efecto inhibitorio sobre ambos centros hipotalámicos, la secreción basal de GnRH acontece cada 4-8 h (Senger, 2003). En esta fase del ciclo estral, el nivel y la frecuencia de secreción de GnRH son insuficientes para estimular la liberación hipofisaria de la cantidad necesaria de LH que estimule el desarrollo folicular final, estadio necesario para liberar cantidades preovulatorias de estrógenos foliculares a la sangre. En consecuencia, no es posible la ovulación durante la fase luteal del ciclo estral. Por el contrario, el descenso a niveles basales de la concentración plasmática de progesterona en

la fase folicular temprana, desapareciendo su efecto inhibitorio sobre el hipotálamo, permite un aumento de la frecuencia de liberación de GnRH por parte del centro tónico hipotalámico (1.5-2 h). La acción de la GnRH a nivel hipofisario incrementa la frecuencia de secreción episódica de FSH y LH y, en consecuencia, aumenta la secreción estrogénica de los folículos debido a un mayor desarrollo folicular. Durante la fase folicular tardía, y con una concentración plasmática de estradiol suficiente como para estimular al centro pulsátil hipotalámico, tiene lugar el pico preovulatorio de GnRH, conducente a la liberación de la ola preovulatoria de LH y la posterior ovulación.

Tanto en la cerda, la vaca como en la oveja, la secreción pulsátil de LH cambia de un modo de baja frecuencia y alta amplitud, durante la fase luteal, a otro de alta frecuencia y baja amplitud, durante la fase folicular (Clarke, 1989), aumentando su concentración plasmática. Este cambio en su patrón de secreción se debe al aumento de la secreción hipotalámica de GnRH durante la fase folicular, tras el descenso del nivel plasmático de progesterona y la desaparición de su inhibición sobre el hipotálamo (Clarke *et al.*, 1987). A medida que avanza la fase folicular, también varía la amplitud de los pulsos de secreción hipofisaria de LH (Clarke, 1989). En la cerda, el crecimiento de los folículos ováricos, y el consiguiente aumento progresivo de la concentración plasmática de estradiol, induce un primer efecto inhibitorio a corto plazo de la secreción de LH durante la fase folicular tardía del ciclo estral (Prunier *et al.*, 1987; Clarke, 1989). Posteriormente, se da una respuesta de retroalimentación positiva a los estrógenos, aumentando la liberación hipofisaria de LH y su concentración plasmática (Britt *et al.*, 1991). Durante las primeras 50-60 h después del aumento preovulatorio de estradiol en sangre, éste inhibe o reduce en gran medida la

liberación de GnRH para, a continuación, provocar su liberación masiva que estimula la ola preovulatoria de LH. Tras dicha ola preovulatoria, que acontece de 8 a 15 h después del pico estrogénico previo al inicio del celo, el nivel plasmático de LH alcanza una concentración de 4-6 ng/mL (Sacristán *et al.*, 1996; Noakes *et al.*, 2009), proporcional a la cantidad de GnRH previamente secretada, y supone el máximo nivel en sangre de LH durante el ciclo estral. Durante el resto del ciclo estral, los valores plasmáticos de LH permanecen en niveles basales.

La concentración plasmática de progesterona se sitúa en niveles basales (< 1 ng/mL) en el día 0 del ciclo estral, coincidiendo con la ola preovulatoria de LH dentro del periodo de celo. Entre los días 3 y 4 del ciclo, y debido a la formación de los cuerpos lúteos, su concentración plasmática experimenta un aumento brusco hasta alcanzar su valor máximo (30-35 ng/mL) entre los días 8 y 12 del ciclo estral (Sacristán *et al.*, 1996). Siempre y cuando no se mantenga la gestación, y debido a la acción de la *Prostaglandina F_{2α}* (PGF_{2α}), tendrá lugar la *luteolisis* o regresión de los cuerpos lúteos, entre los días 12 a 18 del ciclo. La luteolisis provoca una disminución del nivel plasmático de progesterona de forma precipitada, para permanecer en niveles basales durante el resto de la fase folicular. La concentración plasmática de PGF_{2α} aumenta desde el inicio del ciclo estral, alcanzando valores máximos entre los días 12 a 16 del mismo, para después regresar a niveles basales una vez concluida la luteolisis. En la fase folicular del ciclo estral, el nivel de estrógenos en sangre se eleva hasta alcanzar valores máximos de entre 10-30 y hasta 60-90 pg/mL (Sacristán *et al.*, 1996), entre las 48 y 24 h anteriores al inicio del periodo de celo. Dicho aumento del nivel estrogénico en sangre coincide con el crecimiento y la maduración final

de los folículos preovulatorios. Los folículos ováricos secretan estradiol durante todo el ciclo estral pero, durante la fase luteal, su nivel plasmático desciende hasta cotas basales debido al efecto de retroalimentación negativa que la progesterona ejerce sobre el hipotálamo. La progesterona, durante la fase luteal, limita la liberación hipofisaria de LH y, por ende, queda limitado tanto el crecimiento final de los folículos como su secreción estrogénica. Concluida la luteolisis, y tras la selección folicular de los futuros folículos ovulatorios, el nivel de estradiol en sangre periférica experimenta un aumento progresivo hasta desencadenar la liberación de las olas preovulatorias de GnRH y LH, teniendo lugar la subsiguiente ovulación.

En la cerda, los cambios en la concentración de esteroides en el líquido folicular indican dos olas de crecimiento folicular; la primera, asociada al reclutamiento folicular cíclico, y una segunda, debido a la selección folicular y al desarrollo final de los folículos dominantes (Guthrie and Cooper, 1996). Sin embargo, estas olas no se desarrollan en la misma medida que en el ganado vacuno debido a la supresión de la secreción hipofisaria de LH por parte de la progesterona. En el folículo ovárico de la cerda, el receptor de LH aparece en las células de la granulosa en una etapa relativamente inmadura del desarrollo folicular (≈ 4 mm de diámetro; Liu *et al.*, 1998; 2000), mientras que, en la vaca, dichos receptores no aparecen en las células de la granulosa hasta que los folículos alcanzan un diámetro de 9 a 10 mm (Xu *et al.*, 1995; Lucy, 2007). Esta situación explica por qué en la vaca se suceden varias ondas de crecimiento folicular a lo largo de la fase luteal del ciclo estral, con la aparición de folículos dominantes en todas ellas, mientras que los folículos en la cerda no crecen más allá de los 4 mm en presencia de altos niveles de progesterona en

sangre (Driancourt, 2001). La primera ola de crecimiento folicular acontece entre los días 2 y 8 del ciclo estral y tiene que ver con el reclutamiento cíclico de una parte de la población folicular, gracias al aumento del nivel plasmático de FSH entre los días 2 y 3 del ciclo. En dicha ola folicular, y entre los días 5 y 7 del ciclo estral, también se observa una cierta incidencia de atresia folicular dentro de las poblaciones foliculares, previamente reclutadas, de pequeño (1-2 mm) y mediano (3-4 mm) diámetro. La segunda ola de crecimiento folicular, entre los días 15 y 21 del ciclo estral, consiste en la selección y el crecimiento final de los futuros folículos ovulatorios, gracias a un aumento de la esteroidogénesis folicular. Este aumento de la esteroidogénesis está asociado a la aparición de receptores de LH en las células de la granulosa de los folículos dominantes, momento en el que el crecimiento folicular final cambia su dependencia de la FSH a la LH. Del mismo modo, en esta segunda ola de crecimiento folicular también se detecta la atresia del resto de los folículos no seleccionados para terminar su desarrollo y crecimiento durante la fase folicular del ciclo. Esta atresia se debe a un descenso de la concentración plasmática de FSH hasta su nivel basal, consecuencia de la retroalimentación negativa ejercida por el estradiol y la inhibina secretados por los folículos seleccionados para iniciar su desarrollo y crecimiento final (Guthrie *et al.*, 1995). El patrón de crecimiento folicular en la cerda cíclica entre los días 8 y 15 del ciclo estral, coincidente con las etapas media y final de la fase luteal, se caracteriza por un continuo crecimiento de los folículos reclutados (asociado a los niveles basales de FSH en esta fase del ciclo estral) y por la atresia de los folículos ováricos no reclutados (Guthrie and Cooper, 1996). A partir del día 2 o 3 del ciclo estral, tiene lugar un descenso de la concentración plasmática de FSH a niveles basales (5-7 ng/mL; Guthrie and Bolt, 1990; Sacristán *et al.*, 1996; Knox *et al.*, 2003), permaneciendo en dichos niveles hasta el siguiente pico preovulatorio de LH. Finalizado el pico

preovulatorio de LH, se da un aumento transitorio de la concentración en sangre de FSH hasta alcanzar su concentración máxima (8-10 ng/mL) entre los días 2 y 3 del ciclo estral (*liberación periovulatoria de FSH*; Sacristán *et al.*, 1996). Esta secreción hipofisaria periovulatoria de FSH permite llevar a cabo un nuevo reclutamiento cíclico folicular, reponiéndose las poblaciones de folículos pequeños y medianos (Guthrie *et al.*, 1995; Guthrie, 2005).

3.6. Factores que influyen sobre el inicio de la pubertad en la nulípara.

Entre los factores que afectan al establecimiento de la pubertad, tanto intrínsecos a la nulípara como de manejo reproductivo, consideramos los siguientes:

3.6.1. Edad, peso vivo e índice de crecimiento.

Debido a la estrecha relación existente entre estos tres factores, el efecto de cada uno de ellos sobre el inicio de la pubertad no se puede estudiar por separado. Si bien la edad cronológica de la nulípara ha sido considerada como el mejor indicador para determinar el inicio de su pubertad, tanto este indicador como su peso vivo (Prunier *et al.*, 1987; Newton and Mahan, 1992) no se muestran como índices fiables (Rozeboom *et al.*, 1995; Sacristán *et al.*, 1996). Un mínimo de edad y peso vivo son necesarios para que la nulípara pueda iniciar su periodo púber. La pubertad en la nulípara suele acontecer entre los 200 y los 220 días de edad (Duncan and Lodge, 1960; Anderson and Melampy, 1972; Dyck, 1988; Eliasson *et al.*, 1991; Evans and O'Doherty, 2001), aunque se ha registrado

una gran variedad de edades al inicio de la misma, comprendidas en un amplio rango entre los 100 (Aherne *et al.*, 1976) y los 350 días de edad (Brooks and Smith, 1980). Según varios autores (Hughes and Cole, 1975; Young *et al.*, 1990), un peso mínimo de 75 kg es necesario para que se pueda alcanzar la pubertad, encontrándose, de nuevo, un amplio registro de pesos al inicio de la misma, comprendidos entre los 55 (Aherne *et al.*, 1976) y los más de 120 kg (Hughes and Cole, 1975).

En lo referente al índice de crecimiento y su efecto sobre la edad de inicio de la pubertad en la nulípara, son varios los autores que lo han calificado de mínimo (Gossett and Sorensen, 1959; Sorensen *et al.*, 1961; Goode *et al.*, 1965; Sacristán *et al.*, 1996). Este mínimo efecto viene dado por las interrelaciones genéticas positivas existentes entre la edad a la pubertad y la ganancia media diaria de peso vivo en la nulípara (Reutzel and Sumption, 1968), lo que explica que existan variaciones en la edad de la nulípara al inicio de la pubertad entre animales del mismo genotipo, debido a variaciones en su índice de crecimiento.

3.6.2. Composición corporal y genotipos modernos.

La composición corporal viene definida, en general, por los parámetros de peso magro, grasa corporal y de su ratio peso magro:grasa corporal, siendo necesarios niveles mínimos de dichos parámetros para que se dé la pubertad en la nulípara (Cunningham *et al.*, 1974; den Hartog and van Kempen, 1980; Kirkwood and Aherne, 1985). Desde los años 70, el consumidor viene demandando una carne de cerdo más magra, lo que supuso

llevar a cabo una selección genética con el fin de disminuir el espesor de grasa dorsal y aumentar el índice de crecimiento magro corporal en los animales seleccionados (Gaughan *et al.*, 1997). Esta selección ha elevado la ratio peso magro:grasa corporal, a la vez que ha arrastrado una reducción de la ingesta voluntaria en los animales seleccionados (Webb, 1989), condicionando el peso vivo de la nulípara al inicio de la pubertad, retrasando su edad a la pubertad (Beltranena *et al.*, 1991) y afectando a su rendimiento reproductivo (Eliasson *et al.*, 1991; Rydhmer *et al.*, 1994; Kerr and Cameron, 1995). Ante esta situación de índices de crecimiento extremos y una mayor deposición de tejido magro, se presentan nulíparas con un periodo de celo más corto y un menor enrojecimiento e hinchazón vulvar durante el mismo (Rydhmer *et al.*, 1994).

Los índices de deposición grasa y proteica condicionan la madurez fisiológica y el desarrollo reproductivo de la nulípara (Edwards, 1998), sugiriéndolos como determinantes más importantes para el alcance de la pubertad que la propia edad, el peso o, incluso, la exposición al macho (Gaughan *et al.*, 1997). Durante la selección genética de las razas porcinas, y para evitar retrasos en el inicio de la pubertad, se vuelve imprescindible establecer un equilibrio entre el índice de crecimiento magro y el nivel mínimo de espesor graso dorsal (Kerr and Cameron, 1997). Niveles mínimos de 6 y 13 mm de espesor graso dorsal son necesarios para alcanzar la pubertad (Beltranena *et al.*, 1993) y para llevar a cabo el primer servicio de IA en nulíparas (Yang *et al.*, 1989), respectivamente.

3.6.3. Factores genéticos raciales.

El genotipo ejerce una incuestionable influencia sobre la edad de aparición de la pubertad en la nulípara, aunque dicho efecto puede verse enmascarado por los factores medioambientales (Sacristán *et al.*, 1996). Se han detectado diferencias raciales significativas para la edad al inicio de la pubertad en la nulípara entre las distintas razas existentes, destacando a las razas Landrace, Large White y Hampshire con un primer estro antes que otras como las razas Duroc y Yorkshire (Self *et al.*, 1955; Etienne and Legault, 1974; Christenson and Ford, 1979). Además, dentro de una misma raza puede darse cierta variabilidad en la edad a la pubertad entre sus distintas líneas genéticas y según el régimen de manejo llevado a cabo en el experimento (Tabla 1).

Los efectos de la heterosis sobre el inicio de la pubertad han sido repetidamente demostrados, destacando cómo las razas porcinas híbridas producen nulíparas que alcanzan antes la pubertad, con respecto a las hembras de razas puras (Bidanel *et al.*, 1996), debido al efecto dominante heterocigótico para este carácter.

Tabla 1: Edad media (\pm desviación estándar) al inicio de la pubertad de diferentes razas porcinas (de Evans and O'Doherty, 2001).

Raza	Edad media global (d)	Edad media \pm DE (d)	Referencia bibliográfica
Duroc	235	195 \pm 17	Haines <i>et al.</i> , 1959
		224 \pm 20	Christenson and Ford, 1979
		259 \pm 25	Bryan and Hagen, 1991
		263	Goode <i>et al.</i> , 1965
Hampshire	207	207 \pm 28	Christenson and Ford, 1979
Large White	205	173 \pm 13	Gaughan <i>et al.</i> , 1997
		200 \pm 20	Allrich <i>et al.</i> , 1985
		206 \pm 21	Sterning <i>et al.</i> , 1998
		208 \pm 20	Rydhmer <i>et al.</i> , 1994
		211 \pm 21	Christenson and Ford, 1979
		211 \pm 20	Eliasson <i>et al.</i> , 1991
		215 \pm 49	Bidanel <i>et al.</i> , 1996
Landrace	185	173 \pm 25	Christenson and Ford, 1979
		185 \pm 20	Allrich <i>et al.</i> , 1985
		198 \pm 35	Bidanel <i>et al.</i> , 1996
Meishan	97	81 \pm 9	Legault and Caritez, 1983
		94 \pm 15	Pickard and Ashworth, 1995
		115 \pm 20	Hunter <i>et al.</i> , 1993

3.6.4. Nutrición.

En la mayoría de las especies domésticas, el inicio de la pubertad está íntimamente ligado a la obtención de un peso y grasa corporales mínimos (Frisch, 1984). Por lo tanto, la nutrición durante el periodo prepúber de la nulípara es un factor determinante sobre su función reproductiva, tanto a corto como a largo plazo (Aherne and Kirkwood, 1985). Restricciones severas en la ingesta alimentaria (principalmente en el aporte proteico) y

energética disminuyen el peso corporal al inicio de la pubertad, retrasando el inicio de la misma y reduciendo los índices ovulatorios en el primer celo (den Hartog and van Kempen, 1980; den Hartog and Noordewier, 1984; Le Cozler *et al.*, 1999a). Por el contrario, restricciones moderadas (10-25% respecto a una alimentación *ad libitum*) en nulíparas durante el periodo prepúber (van Lunen and Aherne, 1987; Dziuk, 1991; Prunier, 1991) han demostrado no afectar al desarrollo reproductivo inicial de la nulípara (Klindt *et al.*, 1999; Le Cozler *et al.*, 1999b), aunque sí disminuyen su índice de retención dentro del núcleo reproductivo de la granja. Carencias nutricionales y cambios en la condición corporal antes de la pubertad afectan de forma negativa a la secreción gonadotrópica hipofisaria, y en especial a la liberación de LH, provocando una reducción del tamaño folicular previo a la primera ovulación, disminuyendo la producción estrogénica folicular y limitando, por ende, la posterior liberación preovulatoria de LH.

Señales metabólicas de origen periférico, como la insulina, el IGF-I y la leptina, se han postulado como nexo de unión entre el estado metabólico del animal y su eje hipotálamo-hipófisis-ovárico (Galina y Valencia, 2008), influyendo sobre la edad de inicio de la pubertad. Estas señales metabólicas indican al sistema nervioso central el grado de desarrollo somático alcanzado por el individuo (Booth, 1990; Cox, 1997; Cosgrove, 1998). Un aumento en la concentración plasmática circulante de *insulina* e IGF-I, gracias a un balance energético positivo, estimula la proliferación y esteroidogénesis de las células de la granulosa y de la teca interna, el reclutamiento folicular y, por tanto, el inicio de la pubertad en la nulípara (Galina y Valencia, 2008). La *leptina*, hormona secretada por las células grasas del tejido adiposo blanco, a pesar de que no supone una señal para desencadenar el

inicio de la pubertad, sí permite el inicio de la misma (Barb and Kraeling, 2004). Varios estudios han determinado la importancia de dicha hormona sobre la edad de inicio de la pubertad en la cerda nulípara (Barash *et al.*, 1996; Qian *et al.*, 1999), en ratones hembra (Ahima *et al.*, 1997) y en novillas (García *et al.*, 2002), destacando que según se acerca el inicio de la pubertad, y ante un estado metabólico positivo, aumenta su concentración circulante hasta alcanzar un nivel estimulador que activa al eje hipotálamo-hipófisis-ovárico. Esta situación, junto con el descenso de la sensibilidad a los estrógenos del centro tónico hipotalámico, permite el establecimiento de la pubertad.

Según diversos autores (Larsson *et al.*, 1966; Friend, 1973), el suplemento en la dieta de lisina y metionina es útil para reducir la edad al inicio de la pubertad, mientras que severas restricciones de Vitamina A (Hughes, 1934), B₁₂ (Johnsen *et al.*, 1952) y Manganese (Plumlee *et al.*, 1956) pueden retrasar el desarrollo sexual en la nulípara.

3.6.5. Factores ambientales.

3.6.5.1. Estación del año.

A pesar de que la cerda doméstica no tiene una estación reproductiva específica, sí deriva en sus orígenes de un animal con un periodo reproductivo estacional y es, por tanto, posible esperar diferencias en la fertilidad y en la edad al inicio de la pubertad según la estación del año de nacimiento de la nulípara (Paterson *et al.*, 1989; Hughes *et al.*, 1990; Sacristán *et al.*, 1996). Mientras unos autores sugieren que las cerdas nacidas en otoño e

invierno alcanzan antes la pubertad con respecto a las nacidas en primavera o verano (Mavrogenis and Robison, 1976), otros indican lo contrario (Scanlon and Krishnamurthy, 1974) o no observan diferencias estacionales al respecto (Christenson and Ford, 1979). En la temporada estival, el estrés por calor supone un condicionante que afecta de forma muy negativa al inicio de la pubertad (Flowers *et al.*, 1989; Flowers and Day, 1990; Paterson *et al.*, 1991).

3.6.5.2. Calidad del aire.

La calidad del aire es otro de los factores ambientales que influye sobre la edad de aparición de la pubertad en la nulípara, habiéndose demostrado cómo una pobre calidad del mismo es capaz de retrasar dicha edad. Experimentos de Malayer y *cols.* (1987) y de Zimmerman y *cols.* (1988) ya asociaron la exposición a concentraciones de gas amonio en el aire iguales o superiores a 20 ppm, entre las semanas 10 y 40 de edad, con una menor proporción de nulíparas alcanzando la pubertad en torno a la semana 26 de edad. Dichos autores sugieren controlar el nivel de dicho gas en el aire por debajo de las 5-10 ppm, durante el periodo prepúber, para evitar un retraso en el inicio de la pubertad. Los mecanismos por los cuales una pobre calidad del aire retrasa el inicio de la pubertad en la nulípara se han asociado a la presencia de gases olorosos en el ambiente, del tipo gas amonio, y su capacidad para disminuir la habilidad de la nulípara a la hora de percibir las señales olfativas procedentes del verraco (Curtis, 1972).

3.6.5.3. Fotoperiodo y temperatura ambiental.

El fotoperiodo y la temperatura del ambiente en el que se encuentran las nulíparas en desarrollo son dos factores ambientales muy influyentes en la aparición de la pubertad. Sin embargo, hoy en día la capacidad para regular de forma automática ambos parámetros en las granjas hace que su efecto se vea reducido al mínimo. En las especies con reproducción estacional, la secreción de *melatonina* juega un papel muy importante en la reproducción, elevándose durante los periodos de oscuridad y disminuyendo durante las horas de luz. Sin embargo, este patrón de secreción puede variar de acuerdo a la intensidad de la luz y a la edad del animal (Green *et al.*, 1999). En la especie porcina, debido a que la melatonina no muestra un claro ritmo circadiano (Paterson *et al.*, 1992; Bubenik *et al.*, 2000), su patrón de secreción es menos evidente (McConnell and Ellendorff, 1987; Paterson *et al.*, 1992). El incremento de las horas de luz diarias (\approx 14 horas de luz/día) puede adelantar el inicio de la pubertad en la nulípara (Hacker *et al.*, 1976; Hacker *et al.*, 1979; Ntunde *et al.*, 1979) debido a un descenso en la síntesis y secreción de melatonina por parte de la *glándula pineal*, eliminando el efecto inhibitor de dicha hormona sobre la síntesis y secreción de las gonadotropinas hipofisarias.

Por otro lado, varios autores han constatado la influencia negativa que ejercen las altas temperaturas sobre varios aspectos relativos a la reproducción en la especie porcina y, en concreto, sobre la edad de inicio de la pubertad (Schmidt and Bretschneider, 1954; Love, 1978; Stickney *et al.*, 1978), sugiriendo que temperaturas ambientales moderadamente bajas pueden facilitar la aparición temprana de la pubertad en la nulípara.

3.6.6. El estrés.

En la especie porcina, como en las distintas especies de roedores (entre otras), factores estresantes como el hacinamiento, el transporte o el *efecto macho* pueden tanto estimular como inhibir el inicio de la pubertad en la nulípara, siendo esta respuesta dependiente del tipo y nivel de “estrés” aplicado (Sacristán *et al.*, 1996). Pearce y Hughes (1987) sugirieron al *cortisol* como el mediador fisiológico entre la situación de estrés y la aparición o no de la pubertad. Un aumento moderado de la concentración circulante de cortisol en la nulípara puede estimular el inicio de la pubertad (Kingsbury and Rawlings, 1993; Turner *et al.*, 1998), en asociación con el descenso de la sensibilidad a los estrógenos por parte del centro tónico hipotálamico, aumentando la liberación hipofisaria de LH (Pearce *et al.*, 1988). Sin embargo, una masiva liberación de corticoesteroides a la circulación sanguínea, ante una situación de estrés excesivo, puede bloquear la actividad ovárica a través de una disminución de la capacidad de respuesta de la hipófisis a la GnRH hipotalámica (Galina y Valencia, 2008).

El *efecto hembra-hembra* se trata de uno de los factores de estrés más comunes en una explotación porcina. Este efecto, en relación con la densidad de población por metro cuadrado y el grado de hacinamiento, supone un estímulo para el inicio de una pubertad precoz (Mavrogenis and Robison, 1976). Dicho estímulo viene dado por la propia presencia de otras cerdas en su entorno más cercano y se ve potenciado ante la existencia de hembras cíclicas o en celo en el grupo. La superpoblación ($< 1 \text{ m}^2$ por nulípara) disminuye el

porcentaje de nulíparas que alcanzan la pubertad (Cronin *et al.*, 1983; Christenson, 1986) y está asociada a retrasos en su crecimiento (Pearce and Paterson, 1993), recomendándose una densidad de población superior a los 2 o 3 m² por nulípara (Hemsworth *et al.*, 1986). Mientras que la superpoblación se muestra como un factor que controla el inicio de la pubertad, el tamaño de los grupos de nulíparas también aparece como una variable a considerar. Nulíparas alojadas en grupos pequeños (de 3 o menos animales/grupo) alcanzan la pubertad más tarde que aquellas alojadas en grupos mayores (de 9 o más hembras), siempre y cuando se mantenga una adecuada densidad de población (Christenson, 1986).

El transporte de las nulíparas previo al inicio de su estimulación y primer contacto con el verraco, factor conocido como “*estrés del transporte*”, también ejerce una influencia decisiva adelantando el momento de aparición de la pubertad (Paredis, 1961; Signoret, 1970), aunque en sí mismo puede no ser un estímulo suficiente. A pesar de que el estrés del transporte puede potenciar el *efecto macho* del verraco, la pubertad no se verá adelantada si la nulípara no se encuentra próxima a su edad de inicio de la pubertad en el momento de iniciarse la exposición al verraco (Signoret, 1972; Hughes *et al.*, 1997). El efecto positivo que presenta el estrés del transporte puede potenciarse con otros factores de estrés, tales como la mezcla y recolocación de las nulíparas en la granja de destino.

Pero sin lugar a dudas, el factor estresante por excelencia más utilizado para estimular el inicio de la pubertad en la nulípara es la exposición al verraco (Kirkwood *et al.*, 1981).

3.6.6.1. Exposición al verraco: “*efecto macho*”.

La exposición de las nulíparas al verraco por contacto físico directo es la práctica más común para la estimulación precoz de su pubertad; si bien, para el mantenimiento de la actividad ovárica cíclica en la nulípara y para la detección del celo posdestete en primíparas y multíparas es suficiente con la exposición al verraco a través de una valla de separación. Señales tanto visuales, táctiles (contacto físico directo macho-hembra) como auditivas (gruñidos del verraco) se encuentran en relación con la estimulación de la pubertad en la nulípara, pero es la estimulación olfativa por parte de las *feromonas* del verraco la que juega un papel fundamental en dicho proceso (Hughes *et al.*, 1990; Pearce and Paterson, 1992). En 1963, Wilson y Bossert clasificaron las feromonas del macho en dos grupos, las *feromonas comunicadoras o desencadenantes*, con una reducida vida media pero de efecto inmediato, que producen una respuesta en el comportamiento de la hembra; y las *feromonas cebadoras*, con una mayor vida media y un efecto más lento, que producen un cambio fisiológico en la actividad reproductora de la misma. Kirkwood y Hughes (1980) determinaron que las feromonas cebadoras del verraco, que estimulan la pubertad en la nulípara, se encuentran en su saliva. Estas feromonas, producidas por la *glándula salival submaxilar*, son el *3 α -androstenol*, como componente activo principal y mayoritario, la *16-androstonona* y la *5 α -androstenona*.

Para garantizar la eficacia de la exposición al verraco es importante tener en cuenta ciertos aspectos, como la edad de la nulípara y del verraco al inicio de la exposición o la

duración y el lugar de exposición al verraco, entre otros (Kirkwood and Thacker 1992; Hughes, 1997). La edad de la nulípara al inicio de la exposición puede tratarse de uno de los principales factores determinante de la eficacia de la exposición al verraco como estímulo para el inicio de la pubertad (Hughes *et al.*, 1990). Nulíparas muy jóvenes (90-120 días de edad) o relativamente adultas (> 250 días) presentan una respuesta mínima y limitada a la exposición al verraco, e incluso se puede ver retrasado el inicio de su pubertad (Hughes and Cole, 1976; Doroshkov, 1974). Nulíparas expuestas por primera vez al verraco entre los 150 y los 170 días de edad son las que presentan un desarrollo precoz de la pubertad, con un intervalo primera exposición al macho-pubertad y una edad a la pubertad minimizados, así como una mejor sincronización del primer celo (Brooks and Cole, 1970; Hughes and Cole, 1976). La exposición al verraco a una edad adecuada permite alcanzar la pubertad de 7 a 20 días después del inicio de la exposición (Hughes *et al.*, 1990). Otros autores, por el contrario, indicaron que la respuesta de la nulípara a la exposición al verraco es mayor a un peso vivo establecido que a una edad cronológica dada (Hughes and Cole, 1976). Una vez alcanzada la pubertad, y para mantener la actividad ovárica cíclica, se recomienda continuar diariamente con la exposición al verraco, con el fin de evitar la aparición de celos irregulares o una parada temporal de la actividad ovárica. Igual de importante resulta el aislamiento completo de las nulíparas respecto de los verracos durante su desarrollo previo al inicio de la exposición, con el fin de eliminar cualquier estímulo visual, táctil, olfativo y/o acústico proveniente del verraco, obteniendo una mejor estimulación al iniciarse la exposición. En cuanto al verraco, y debido a que la glándula salival submaxilar no se desarrolla completamente hasta que el animal alcanza los 9 o 10 meses de edad, no se recomienda el uso de verracos de menor edad para estimular la

pubertad en nulíparas, recambiando al macho por otros con mayor libido si las hembras no responden al estímulo de su presencia (Hughes, 1994).

La duración del contacto físico directo entre la nulípara y el verraco no debe ser inferior a los 15-30 minutos diarios, realizándose, al menos, dos exposiciones al día (Hughes *et al.*, 1997) en un espacio lo suficientemente amplio (> 1.5 m² por nulípara) que permita una exposición lo más eficaz posible y por igual para todas las nulíparas del corral (Caton *et al.*, 1986; Hughes *et al.*, 1990). La recomendación es introducir a las nulíparas en el corral de los verracos y no al revés. En caso contrario, la introducción y retirada del verraco del corral de las hembras es más efectivo que el mantenimiento de una constante exposición al verraco a través de una valla de separación (Caton *et al.*, 1986), evitando que las nulíparas se acostumbren a los estímulos del macho y, de este modo, eliminar futuros problemas en la detección de celos.

3.7. Inducción hormonal de la pubertad en cerdas nulíparas con gonadotropinas exógenas.

La exposición al verraco, llevada a cabo de forma correcta y adecuada, es un método eficaz para inducir una pubertad temprana en la nulípara. Sin embargo, cuando no constituye un estímulo suficiente, el tratamiento con *gonadotropinas exógenas* se muestra como el más apropiado para dicho fin (Kirkwood, 1999; 2008). Una de las combinaciones gonadotrópicas más empleada es la preparación comercial PG600[®], formulación inyectable compuesta por 400 UI de *Gonadotropina Coriónica Equina* (eCG) y 200 UI de

Gonadotropina Coriónica Humana (hCG). Este tratamiento hormonal presenta el mismo mecanismo de acción que el de las gonadotropinas endógenas FSH y LH durante la fase folicular del ciclo estral, proporcionando una actividad tipo FSH (eCG) y LH (eCG + hCG). En yeguas, la eCG presenta únicamente actividad tipo LH. Las gonadotropinas exógenas, tras unirse a los receptores para la FSH y la LH en las células de la granulosa y de la teca interna, van a estimular el desarrollo y crecimiento final de los folículos ováricos destinados a ovular, aumentando su secreción estrogénica. Tras el descenso de la sensibilidad a los estrógenos por parte del centro tónico hipotalámico, y cuando su concentración plasmática alcanza un nivel crítico, los estrógenos van a estimular al centro pulsátil del hipotálamo para liberar un pico preovulatorio de GnRH, hormona que induce la liberación de la ola preovulatoria de LH hipofisaria, desencadenando la primera ovulación.

En 1935, Casida demostró por primera vez el efecto de las gonadotropinas exógenas PMSG (*Gonadotropina Sérica de Yegua Gestante*; actualmente conocida como eCG) y hCG como inductoras de la pubertad en cerdas nulíparas. Desde entonces, muchos autores y estudios han utilizado la PMSG o eCG y la hCG en intentos por estimular la aparición precoz de la pubertad en la nulípara. En la década de los 60 y 70, varios estudios aportaron datos sobre porcentajes de celo y ovulación en nulíparas tratadas con una inyección de PMSG (entre 250 y 2000 UI) seguida de otra inyección de hCG (500 UI), separadas ambas entre 48 y 96 h, para inducir su pubertad. Utilizando nulíparas de entre 100 y 340 días de edad y un peso de entre 45 y 170 kg, se indujo la ovulación de un 60 a un 100% de las nulíparas tratadas, con porcentajes de respuesta de celo variables entre el 0 y el 75% (Baker and Coggins, 1966; Dziuk and Gehlbach, 1966; Phillip, 1968; Dziuk and Dhindsa, 1969;

Shaw *et al.*, 1971; Segal and Baker, 1973; Rampacek *et al.*, 1976; Guthrie, 1977). Dichos autores establecieron un índice ovulatorio de entre 6 y 46 óvulos maduros, indicando una relación positiva entre dicho índice y la dosis administrada de PMSG. De igual modo, estos autores citan que, ante una dosis similar de PMSG, las variaciones encontradas para los índices de ovulación se debieron a otros factores, como los ambientales, las propias preparaciones hormonales y las diferencias fisiológicas entre las nulíparas en estudio, pero no tanto a la edad de las mismas.

A partir de los 70, se empieza a estudiar el uso de la administración conjunta de eCG y hCG, siendo la combinación más utilizada la formulación de 400 UI de eCG y 200 UI de hCG, con la atención centrada en la inducción de la pubertad en nulíparas de entre 150 y 180 días de edad. En dichos estudios (Shaw *et al.*, 1971; Schilling and Cerne, 1972; Ellicott *et al.*, 1973; Breeuwsma, 1974; Guthrie, 1977; Schlegel *et al.*, 1978; Paterson and Lindsay, 1981), se utilizaron nulíparas de entre 130 y 250 días de edad y un peso de entre 50 y 100 kg, obteniéndose unos porcentajes de respuesta de celo y ovulación de entre el 80 y el 100% de las nulíparas tratadas hormonalmente y números muy variables entre estudios para el total de óvulos maduros (de 4 a 25). En cuanto a los índices de fertilidad y tamaños de camada de dichos experimentos, los resultados fueron muy variables, con valores observados entre el 20 y el 80% y entre 6 y 10 lechones nacidos vivos por camada. Esta variabilidad fue asociada, según los autores, a una regresión prematura de los cuerpos lúteos, afectando en mayor medida en los casos con peores porcentajes y números.

Una observación común destacada por varios de los autores previos (Schilling and Cerne, 1972; Schlegel *et al.*, 1978; Paterson and Lindsay, 1981), tras inducir la pubertad con gonadotropinas exógenas, fue la presencia de una actividad ovárica muy variable e irregular en su ciclicidad y, en ocasiones, con la detención de la misma. En dichos experimentos se obtuvieron porcentajes de repetición de celo a los 21 días de entre el 40 y el 95% de las nulíparas inducidas hormonalmente. En un intento por dar respuesta, desde un punto de vista endocrino, al fallo en el mantenimiento de la actividad ovárica cíclica, Paterson y Martin (1981) estudiaron los patrones hormonales de estradiol y progesterona, durante la fase luteal posterior a la primera fase folicular inducida y hasta el momento esperado de aparición del segundo celo, en nulíparas de unos 160 días de edad inducidas a la pubertad con gonadotropinas exógenas. Ambos autores observaron que dichos patrones, durante la fase folicular inducida y la siguiente fase luteal del primer celo inducido, eran similares a aquellos registrados en cerdas cíclicas (Guthrie *et al.*, 1972; Henricks *et al.*, 1972), demostrando que los ovarios de las nulíparas a dicha edad presentan patrones de secreción normales de estradiol y progesterona en respuesta a la administración de 400 UI de eCG + 200 UI de hCG para inducir su pubertad. Sin embargo, siguiendo a la fase luteal del primer celo, determinaron tres tipos diferentes de actividad ovárica, cada una con un patrón hormonal típico asociado. Observaron (1) nulíparas cuyos ovarios eran capaces de secretar una nueva ola de estradiol, detectándose el celo y la ovulación subsiguientes; (2) nulíparas cuyos ovarios no respondieron con un aumento de la secreción folicular estrogénica en el momento esperado de aparición del segundo celo, imposibilitando toda detección de celo e impidiendo la posterior ovulación; y (3) un último grupo de nulíparas que, aun aumentando la secreción de estrógenos y exhibiendo un comportamiento de celo, no llegaron a ovular. En este último caso, la producción de estrógenos pudo no ser

suficiente como para desencadenar la ola preovulatoria de LH o la cantidad de LH liberada, en respuesta a la GnRH, no fue la suficiente como para desencadenar la ovulación.

Ante esta detención o falta de ciclicidad en la actividad ovárica de la nulípara, tras la inducción de su pubertad con gonadotropinas exógenas, Kirkwood (1999) recomienda la inseminación en el primer celo inducido para cumplir con el objetivo semanal de inseminaciones de la explotación. Igualmente señala una esperada depresión en el índice de partos y el tamaño de camada al primer parto (Kirkwood *et al.*, 2000), sin afectar al futuro rendimiento reproductivo de la nulípara (Kirkwood, 2008). La inseminación en el segundo o tercer celo, tras la inducción hormonal de la pubertad, se ofrece como una alternativa para aumentar el potencial tamaño de camada al primer parto en la nulípara debido bien a un aumento del índice ovulatorio, tras el inicio de la exposición al verraco (van Wettere *et al.*, 2006), o bien a un aumento del número de embriones viables posinseminación, tras el uso de la PG600[®] para inducir la pubertad (Bartlett *et al.*, 2009).

La etiología de la falta de respuesta estral y ovulatoria al tratamiento con gonadotropinas exógenas para la inducción de la pubertad, dentro de una población dada de nulíparas, todavía es desconocida. A pesar de ello, los resultados de Manjarin y cols. (2009a) arrojan luz sobre dos aspectos importantes en relación a la eficacia de la PG600[®] para inducir la pubertad en cerdas nulíparas. Por un lado, indican que se requiere de una población folicular inicial, en el momento de la inducción hormonal de la pubertad, con un tamaño mínimo de 3 mm de diámetro que pueda responder al estímulo hormonal externo y

completar su desarrollo final. Y por otro lado, descartan al componente hCG de la preparación comercial como el responsable de la falta de respuesta estral y ovulatoria, ante una posible ovulación prematura o luteinización de los folículos ováricos, induciendo un incremento precoz de la producción y concentración plasmática de progesterona que suprima el comportamiento estral de los animales y reduzca los porcentajes de ovulación. Estos autores, de hecho, indican necesaria la presencia del componente hCG de la PG600[®] para el desarrollo folicular final, por su actividad tipo LH; así como detectan una mayor incidencia de celos relacionada con un mayor peso de las nulíparas (i. e., 90-110 kg) en el momento del tratamiento gonadotrópico. De cualquier forma, resulta evidente que la cerda nulípara no puede alcanzar la pubertad de forma satisfactoria, ni puede establecer una actividad ovárica cíclica estable, tras alcanzar la pubertad y antes de la primera inseminación, hasta que su eje hipotálamo-hipófisis-ovárico sea lo suficientemente maduro, en términos fisiológicos, y pueda responder a los estímulos gonadotrópicos endógenos y/o exógenos.

Capítulo 4. Objetivos

Chapter 4. Objectives

En dicho contexto, el presente trabajo plantea los siguientes **objetivos**:

Objetivo general

Mejorar el rendimiento reproductivo de la cerda mediante la identificación de las nulíparas con el mayor potencial fértil y la implantación de nuevas estrategias de manejo de la reproducción que mejoren la fertilidad a largo plazo.

Objetivos específicos

1. Determinar si la inducción temprana de la pubertad en la cerda nulípara, en respuesta a la exposición al verraco o a la administración de PG600[®], está asociada con una mejora de la fertilidad al primer parto.
2. Establecer si un periodo de lactación prolongado (i.e., de 5 semanas) en cerdas primíparas, junto con la administración de PG600[®] al destete para inducir y sincronizar el celo posdestete, puede mejorar la fertilidad al segundo parto.
3. Determinar si una respuesta de celo temprana o tardía al tratamiento con PG600[®] o a la exposición al verraco en nulíparas, para la inducción de su pubertad, afecta a la fertilidad a largo plazo de la cerda y a su longevidad.
4. Establecer la relación existente entre la resistencia eléctrica del moco vaginal y el momento de la ovulación, en cerdas destetadas con diferente número de parto y en distintas estaciones del año.

In this context, the present Ph.D. dissertation proposes the following **objectives**:

Overall objective

To improve sow reproductive performance by identifying gilts with the greatest fertile potential, and the implantation of new reproductive management strategies that enhance long-term fertility.

Specific objectives

1. To determine whether an early puberty induction in the gilt, in response to boar exposure or to the administration of PG600[®], is associated with an improved fertility at first parity.
2. To establish if an extended lactation (i.e., 5 weeks) in primiparous sows, together with the administration of PG600[®] at weaning to induce and synchronize the post-weaning estrus, can improve fertility at their second parity.
3. To determine whether an early or late estrus response to PG600[®] treatment or to boar exposure for puberty induction in gilts impacts long-term sow fertility and longevity.
4. To establish the relationship between the electrical resistance of the vaginal mucus and time of ovulation in weaned sows with different parity number and in different seasons.

Capítulo 5/Chapter 5.
Influence of gonadotrophin-induced first estrus
on gilt fertility

Accepted for publication in *Reproduction in Domestic Animals*,

June, 27th 2014 (*in press*)

<http://dx.doi.org/10.1111/rda.12390>

Examination of fertility in estrus-induced gilts

Influence of gonadotrophin-induced first estrus on gilt fertility; D.M. Hidalgo^a, R.M. Friendship^{b,e}, L. Greiner^c, R. Manjarín^a, M.R. Amezcua^b, J.C. Domínguez^a, and R.N. Kirkwood^d

^aDepartment of Medicine, Surgery and Veterinary Anatomy, University of Leon, Spain

^bDepartment of Population Medicine, University of Guelph, Guelph, Ontario, Canada

^cCarthage Innovative Swine Solutions, LLC, Carthage, IL, USA

^dSchool of Animal and Veterinary Sciences, University of Adelaide, Roseworthy, SA, Australia

^eCorresponding author

Keywords: Gilts, puberty, gonadotrophins, fertility.

Contents

The aim of this study was to determine the association between the estrus response of prepubertal gilts to gonadotrophin injection or boar exposure and their subsequent farrowing rate and litter size. At 154 d of age, randomly selected prepubertal gilts received an intramuscular injection of 400 IU equine chorionic gonadotrophin plus 200 IU human chorionic gonadotrophin (PG600^{®1}; n = 181). From the remaining pool of animals not treated with hormones, the first gilts showing signs of estrus were selected to act as Controls (n = 201). Boar exposure began at 155 d of age for both groups and gilts were bred at a weight of approximately 130 kg. Comparisons were made between PG600[®]-treated gilts exhibiting estrus or not within 7 d post injection (early and late-responders, respectively) and Control gilts exhibiting estrus or not within 30 d after beginning of boar exposure (select and non-select Control gilts, respectively). By 162 d, estrus was detected in 67.5% of PG600[®]-treated gilts compared to 5.7% of Control gilts ($P < 0.0001$). The proportion of animals observed in estrus at least 3 times before breeding was greater for select Control gilts compared to early and late responder PG600[®]-treated gilts ($P \leq 0.001$). There were no significant differences in farrowing rate and litter size between the four treatment groups. These data indicate that PG600[®] is an effective tool to induce an earlier estrus in gilts, that subsequent farrowing rate and born alive litter size compares favorably to that of select gilts, and that gilts failing to respond promptly to hormonal stimulation do not exhibit compromised fertility.

¹ PG600[®], Merck Animal Health, NJ, USA.

1. Introduction

The ability to meet weekly breeding targets requires a predictable supply of service-ready gilts (i.e., gilts in estrus when required), which is most easily achieved by having gilts show an early puberty and subsequently maintain a predictable cyclic status. Gonadotrophin treatment, such as injection of a combination of 400 IU equine chorionic gonadotrophin plus 200 IU human chorionic gonadotrophin (PG600[®]), is effective for the induction of a fertile estrus in prepubertal gilts (Kirkwood 1999). Label recommendations are to treat gilts of at least 85 kg live weight and 165 days of age. Further, it is known that the estrus response to PG600[®] improves as gilts become older and heavier (Britt et al. 1989). When PG600[®] is injected into prepubertal gilts, experience has shown that up to 30% of the gilts do not show behavioral estrus within 10 d (Kirkwood 1999; Manjarin et al. 2009a,b) and, based on blood progesterone levels 10 to 14 d after treatment, about 65% (Manjarin et al. 2009a) to almost 100% (Tilton et al. 1995) of gilts ovulate. In addition to unpredictable responses, another concern with the use of hormones to induce puberty is the belief that in any population there are animals which are relatively less fertile and, using normal husbandry practices, these animals may be culled before they enter the breeding herd. However, these less fertile gilts may be included in the herd if hormones are used. There are few studies that compare performance of gilts that were hormone-treated but bred at a later estrus versus untreated gilts bred at similar ages (Kirkwood et al. 2000) and we are aware of no data concerning the fertility of gilts that fail to respond promptly to gonadotrophins but are retained in the herd.

It has been suggested that gilts that naturally achieve an early puberty may be relatively more fertile (Nelson et al. 1990; Holder et al. 1995) with the corollary being that late developing gilts will be less fertile. Indeed, it has been clearly documented using intra-herd comparisons in large population data surveys that gilts that were older at initial breeding were culled sooner with life-time production of fewer pigs (Schukken et al. 1994; Culbertson and Mabry 1995; Le Cozler et al. 1998). Each indicated no adverse effect of mating young gilts but consistently demonstrated an adverse effect of mating older gilts. Further, Patterson et al. (2010) defined select gilts as those achieving puberty by 30 d after the start of boar exposure and compared the performance of select and non-select gilts. These latter authors documented poorer performance of non-select gilts. Clearly, identifying gilts with the best potential performance is a priority for the pork industry. The objective of the present trial was to compare measures of fertility for gilts that were hormone-treated and did or did not respond promptly to treatment with non-treated select and non-select gilts chosen from the same population. Our hypothesis is that a faster response to hormonal stimulation implies an increased physiological age at a given chronological age and will be associated with improved fertility.

2. Material and methods

2.1. Animals and treatments

This study employed 382 prepubertal gilts (PIC 1050) housed on a commercial facility in Illinois, USA. Gilts were housed in a gilt developer unit (GDU) in groups of 50 to 60 in fully-slatted pens allowing 0.93 m² per gilt. From each of 5 monthly pools of approximately 300 gilts each, approximately 40 gilts were randomly selected at 154 d of age to receive an intramuscular injection of 400 IU equine chorionic gonadotrophin plus 200 IU human chorionic gonadotrophin (PG600[®]; n = 181). In the last monthly pool only 20 gilts were chosen for the PG600[®] treatment. In each of the monthly pools from which the PG600[®]-treated animals were chosen, approximately 40 Control gilts were also selected. Control gilts were chosen from the roughly 260 remaining gilts in the monthly pools on the basis of being first to achieve puberty (Control; n = 201). Starting at 155 d of age, all gilts were subjected to full contact with 2 or 3 mature boars for 20 to 30 min daily to stimulate onset of puberty and facilitate detection of their first estrus. Boars were walked through the pen of 50 to 60 gilts and were closely supervised, and then placed in an adjacent pen to provide fence-line contact for an additional 4 hours. Experienced herdsmen judged estrus status based on the gilts reaction to the boar, including: alertness and interest in the boar and demonstrating the characteristic “saw-horse” stance of a gilt in heat. Gonadotrophin-treated gilts exhibiting estrus ≤ 7 d or > 7 d after injection were classified as early or late-responders, respectively. Control gilts exhibiting estrus ≤ 30 d or > 30 d after start of boar exposure were classified as select or non-select Control gilts, respectively (Patterson et al. 2010). After observation of the first estrus, gilts were moved into automatic feeding system training pens, within the GDU, where full-contact boar exposure continued

in order to detect second estrus. Following first estrus, gilts were trained for 4 to 5 weeks to pass through the feeding system, and then transferred to the breeding/gestation barn, where they were allocated individually into breeding stalls with fence-line boar exposure. Gilts were artificially inseminated at a weight of approximately 130 kg, independently of total number of observed estruses (2 to 5), with 3×10^9 sperm in 80 mL extender (Androstar[®] Plus²) at heat detection, and again at 12 and 24 h after estrus detection, depending on whether standing reflex persisted in the presence of the boar. The routine procedure on the farm was to estimate the weight of gilts with a girth tape to determine if they were heavy enough to meet the minimum weight criteria (i.e., 130 kg) but the animals in this trial were also weighed at first breeding and their actual weight was recorded.

In the GDU, gilts were fed *ad libitum* a corn-soybean meal diet formulated to contain 14.0 MJ ME/kg, 12.3% crude protein (CP) and 0.61% lysine. In the breeding/gestation barn, gilts were fed a corn-soybean meal diet formulated to contain 13.62 MJ ME/kg, 14.9% CP and 0.53% lysine. Water was available at all times. Data recorded were the initial and breeding ages, weight and backfat depth, number of observed estruses, mating outcome (farrowed or returned) and subsequent litter size (total born and born alive).

2.2. Statistical analysis

Differences with regard to the proportion of gilts with ≥ 3 estrous periods at first breeding and proportion farrowing were assessed by logistic regression analysis using a

generalized linear mixed model (PROC GLIMMIX) in SAS 9.2. (SAS Institute Inc., Cary, NC). Treatment was included as a fixed effect, block and season as random effects and gilt initial weight as covariate. Differences for age, weight and backfat depth at gilt selection and first breeding, and level of significance of litter size (total born), were analyzed by a one-way ANOVA using a linear mixed model in SAS 9.2. (PROC MIXED), with the same fixed and random effects, and covariate used in the previous analysis. Normality of the residuals and presence of outliers were assessed by PROC UNIVARIATE (SAS 9.2.) using the Shapiro-Wilk test, Q-Q-plot and externally studentized residuals. When necessary, data were power transformed by a parameter λ whose optimal value was estimated using the maximum likelihood (ML) method (Piepho 2009). Preplanned mean comparisons of main effects were performed by orthogonal contrasts in SAS. Pair-wise comparisons between least square means were analyzed by Student's t-tests. Data are presented as probabilities and least square means \pm SE. Significant effects were considered at $P \leq 0.05$.

3. Results

Two gilts injected with PG600[®] failed to show estrus, and two other PG600[®]-treated animals were culled due to poor body condition and lameness. The proportion of gilts observed in estrus within 7 d post-treatment was higher for PG600[®]-treated gilts compared to Control gilts ($67.5 \pm 4.3\%$ vs. $5.7 \pm 1.9\%$, respectively; $P \leq 0.0001$), whereas at 30 d post-treatment, a higher proportion of Control gilts compared to PG600[®]-treated gilts had been observed in estrus ($84.7 \pm 3\%$ vs. $75.7 \pm 3.7\%$, respectively; $P = 0.08$). Early responding PG600[®]-treated and select Control gilts were younger at first breeding

compared to their late-responder and non-select counterparts, with the early responder PG600[®]-treated gilts being the youngest ($P \leq 0.001$) (Table 1). Gilts that were early responders to PG600[®] treatment were heavier at breeding than select Controls ($P \leq 0.001$). Late responder PG600[®]-treated gilts were heavier at breeding than their early-responding counterparts ($P = 0.03$). There were no significant differences in backfat thickness at breeding between groups. The proportion of animals observed in estrus at least 3 times before breeding was greater for select Control gilts compared to early and late responder PG600[®]-treated gilts ($P \leq 0.001$). There were no significant differences in farrowing rate and litter size between the four treatment groups.

4. Discussion

It is common commercial practice to treat prepubertal gilts by injecting them with gonadotrophins such as PG600[®] to initiate estrous cycles (Kirkwood 1999). Since this treatment is usually applied under conditions of delayed puberty, and earlier maturing gilts are believed to be inherently more fertile (Nelson et al. 1990), it is reasonable to suggest that gonadotrophin treatment may result in the introduction of relatively less fertile gilts in the breeding herd. The present study examined the hypothesis that gilts achieving estrus within 7 d after gonadotrophin injection are more fertile than gilts taking longer to show signs of estrus following hormonal treatment. To further increase the sensitivity of detecting less fertile gilts, a comparison was also made with select Control gilts responding rapidly to boar exposure. In the present study, 67.5% of gonadotrophin-treated gilts exhibited estrus by 7 d after injection, which is consistent with previous reports (Kirkwood

1999; Manjarin et al. 2009a,b), while only 5.7% of the Control gilt population was pubertal by 7 d after the start of boar exposure. Results from this study show that PG600[®] treatment at 154 d of age induced estrus, however, at breeding a greater proportion of Control gilts had been observed to have experienced at least 3 estrous periods. It is likely that although gonadotrophin administration provided enough stimulus for the majority of the gilts to show estrus within 7 d, many of these animals were not sufficiently mature to continue cycling regularly and show strong behavioural signs of estrus. It is possible that cycling stopped temporarily or that the gilts experienced silent heats.

To our knowledge, this is the first study to compare the reproductive performance of gilts that did or did not respond to exogenous gonadotrophins. Contrary to our expectation, there were no differences in farrowing rate and number of piglets born between PG600[®]-treated gilts exhibiting estrus by 7 d after injection and those taking longer than 7 d. This implies that our hypothesis was not proven and that a positive estrus response to gonadotrophic stimulation under the conditions of this trial did not correlate with improved subsequent fertility. In other words using hormone induction at an early age does not appear to be an effective method of determining which gilts to retain in the gilt development unit and which to cull. It should be noted that the number of gilts used in each treatment category was relatively small and this is a weakness of the study, but the tendency in the case of litter size and farrowing rate favored late responders.

The present study did not examine the association of early puberty with sow longevity but other researchers have suggested that selection of gilts for reduced age at puberty improved their reproductive performance by increasing the proportion of animals retained in the herd through the first 3 parities (Patterson et al. 2010) or the first 6 parities (Flowers 2011), and increased the average parity of culled sows at removal (Holder et al. 1995). This should be an additional consideration in evaluating gilt selection programs.

In conclusion, these data indicate that PG600[®] is an effective tool to induce an earlier estrus in gilts, that subsequent farrowing rate and born alive litter size compare favorably to that of select gilts, and that gilts failing to respond promptly to hormonal stimulation do not exhibit compromised fertility.

Acknowledgements

David Martin-Hidalgo has an FPU contract (AP2008-04039) from the Spanish Ministry of Education. The authors gratefully acknowledge the financial support of Ontario Pork and the Canadian Swine Research and Development Cluster (CSRDC); Agriculture & Agri-Food Canada. Merck Animal Health donated the PG600[®] used in this study.

Conflict of interest statement

None of the authors have any conflict of interest to declare.

Author contributions

R. M. Friendship, J. C. Domínguez and R. N. Kirkwood have directed the study, and participated in the study design and in the process of writing and reviewing the manuscript. M. R. Amezcua and R. Manjarín have participated in the data analysis and in the process of the manuscript revision. L. Greiner has participated in the study design and supervising the on-farm trial development. D. M. Hidalgo has participated in the on-farm trial development and in the study design, writing, analyzing, formatting, and discussing the manuscript.

References

Britt JH, Day BN, Webel SK, Brauer MA, 1989: Induction of fertile estrus in prepuberal gilts by treatment with a combination of pregnant mare's serum gonadotropin and human chorionic gonadotropin. *J Anim Sci* **67**, 1148-1153.

Culbertson MS, Mabry JW, 1995: Effect of age at first service on first parity and lifetime sow performance. *J Anim Sci* **73** (Suppl. 1), 21 (Abstr.).

Flowers WL, 2011: Prewaning management of replacement gilts and sow longevity. Proceedings of the ADSA-ASAS Midwest 2011 annual meeting, Des Moines, Iowa; Greg S. Lewis (ed.), 2011 Section Meeting Abstracts, *J Anim Sci* **89** (Suppl. 2), 8-9. Champaign, IL.

Holder RB, Lamberson WR, Bates RO, Safranski TJ, 1995: Lifetime productivity in gilts previously selected for decreased age at puberty. *Anim Sci* **61**, 115-121.

Kirkwood RN, 1999: Pharmacological intervention in swine reproduction. *J Swine Health Prod* **7**, 29-35.

Kirkwood RN, Aherne FX, Monaghan PG, Misutka SC, 2000: Breeding gilts at natural or a hormone-induced estrus: Effects on performance over four parities. *J Swine Health Prod* **8**, 177-179.

Le Cozler Y, Dagorn J, Lindberg JE, Aumaitre A, Dourmad JY, 1998: Effect of age at first farrowing and herd management on long-term productivity of sows. *Livest Prod Sci* **53**, 135-142.

Manjarin R, Cassar G, Sprecher DJ, Friendship RM, Dominguez JC, Kirkwood RN, 2009a: Effect of eCG or eCG plus hCG on oestrus expression and ovulation in prepubertal gilts. *Reprod Dom Anim* **44**, 411-413.

Manjarin R, Dominguez JC, Castro MJ, Vallado B, Rodriguez S, Sprecher DJ, Cassar G, Friendship RM, Kirkwood RN, 2009b: Effect of prior FSH treatment on the estrus and ovulation responses to eCG in prepubertal gilts. *Anim Reprod Sci* **110**, 123-127.

Nelson AH, Mabry JW, Benyshek LL, Marks MA, 1990: Correlated response in reproduction, growth and composition to selection in gilts for extremes in age at puberty and backfat. *Livest Prod Sci* **24**, 237-247.

Patterson JL, Beltranena E, Foxcroft GR, 2010: The effect of age at first estrus and breeding on third estrus on sow body weight changes and long-term reproductive performance. *J Anim Sci.* **88**, 2500-2513.

Piepho HP, 2009: Data Transformation in Statistical Analysis of Field Trials with Changing Treatment Variance. *Agron. J.* **101**, 865-869.

Schukken YH, Buurman J, Huirne RB, Willems AH, Vernooij JC, van den Broek J, Verheijden JH, 1994: Evaluation of optimal age at first conception in gilts from data collected in commercial swine herds. *J Anim Sci* **72**, 1387-1392.

Tilton SL, Bates RO, Prather RS, 1995: Evaluation of response to hormonal therapy in prepubertal gilts of different genetic lines. *J Anim Sci* **73**, 3062-3068.

1 Table 1. Gilts treated with PG600^{®1} and boar exposure starting at 155 days of age (early responders showing heat \leq 7 d post-treatment
 2 and late responders, $>$ 7 d) compared to gilts provided with boar exposure alone (select showing heat in \leq 30 d and non select, $>$ 30 d;
 3 means \pm SE). Gilt body weight at selection was included as covariate.

4

	PG600		No PG600		<i>P</i> -values ²
	Early-responders Estrus \leq 7 days	Late-responders Estrus $>$ 7 days	Select Estrus \leq 30 days	Non-select Estrus $>$ 30 days	
N° animals (n)	126	51	154	47	
Initial age (d)	155.0 \pm 0.8	154.5 \pm 0.8	155.1 \pm 0.8	155.2 \pm 0.9	0.195
Breeding age (d)	217.6 \pm 2.0 ^a	235.5 \pm 2.4 ^c	221.2 \pm 1.9 ^b	235.9 \pm 2.5 ^c	$<$.0001
Breeding weight (kg)	132.7 \pm 3.2 ^a	137.2 \pm 3.5 ^b	125.9 \pm 3.2 ^c	129.7 \pm 3.6 ^{ac}	0.002
Breeding backfat (mm)	17.4 \pm 0.4	18.2 \pm 0.6	18.0 \pm 0.4	18.6 \pm 0.6	0.1
Proportion of sows with \geq 3 observed heats (%)	41.7 \pm 6.9 ^a	41.8 \pm 8.7 ^a	75.8 \pm 5.3 ^b	67.3 \pm 9.8 ^{ab}	$<$.0001
Farrowing rate (%)	90.9 \pm 2.6	92.0 \pm 3.8	94.1 \pm 1.9	93.6 \pm 3.5	0.77
Total born (n)	12.3 \pm 0.6	12.2 \pm 0.7	11.8 \pm 0.7	11.2 \pm 0.7	0.14

5

^{abc} Differences between treatments are indicated with different superscripts.

¹ PG600[®] (Merck Animal Health, NJ, USA; 400 IU equine chorionic gonadotrophin plus 200 IU human chorionic gonadotrophin) given at 154 days of age.

² Overall *P*-value for treatment effect.

Corresponding author's address: Dr R. M. Friendship, Department of Population Medicine, University of Guelph, Guelph, Ontario, Canada N1G2W1.

Email: rfriends@uoguelph.ca

Capítulo 6/Chapter 6.
**Influence of lactation length and
gonadotrophins administered at weaning on
fertility of primiparous sows**

Accepted for publication in *Animal Reproduction Science*,

June, 30th 2014 (*in press*)

<http://dx.doi.org/10.1016/j.anireprosci.2014.06.034>

Influence of lactation length and gonadotrophins administered at weaning on fertility of primiparous sows.

D.M. Hidalgo,^a R.M. Friendship,^{b,*} L. Greiner,^c R. Manjarin,^a M.R. Amezcua,^b J.C. Dominguez,^a R.N. Kirkwood^d

^aDepartment of Medicine, Surgery and Veterinary Anatomy, University of Leon, Spain

^bDepartment of Population Medicine, University of Guelph, Guelph, Ontario, Canada

^cCarthage Innovative Swine Solutions, LLC, Carthage, IL, USA

^dSchool of Animal and Veterinary Sciences, University of Adelaide, Roseworthy, SA, Australia

* Corresponding author: Dr R.M. Friendship, Department of Population Medicine, University of Guelph, Guelph, Ontario, Canada N1G2W1; Tel; +1 519 824 4120 x54022; Email address: rfriends@uoguelph.ca

ABSTRACT

The aim of this study was to determine the effect of lactation length and treatment with gonadotrophins at weaning on reproductive performance of primiparous sows. After 3 wk of lactation, primiparous sows were either weaned (W3; $n = 273$) or received a 7-d-old foster litter for a further 14 d of suckling (W5; $n = 199$). At final weaning (3 wk or 5 wk lactation) sows were randomly assigned to receive an injection of 400 IU equine chorionic gonadotrophin plus 200 IU human chorionic gonadotrophin (PG600[®]; W3+P; $n = 108$ and W5+P; $n = 96$) or no injection (W3; $n = 165$ and W5; $n = 103$). Sows were inseminated at first observed estrus after final weaning and 24 h later. The proportion of sows showing estrus by 6 d post-weaning was greater ($P < 0.01$) for W3+P (86%) compared to W3 (64%); however, there was not a difference ($P = 0.13$) for W5+P (79.4%) compared to W5 (69.1%). There was no effect of either lactation length or gonadotrophin treatment on farrowing rates or on the proportion of sows culled before breeding. Total born litter size was smaller ($P = 0.05$) for W3+P (11.7 ± 0.4) compared to W3 (12.6 ± 0.3). However, sows that lactated for 35 d had larger litters than sows that lactated for 21 d regardless of gonadotrophin treatment (14.0 ± 0.5 and 14.5 ± 0.4 for W5+P and W5, respectively; $P < 0.001$). These data indicate that for primiparous sows, a longer lactation improves total born litter size at their next farrowing. Gonadotrophin treatment is useful in shortening the weaning to estrus interval but subsequent total born litter size may be negatively affected.

Keywords: Primiparous sows, lactation, weaning, gonadotrophins, fertility.

1. Introduction

The number of weaned pigs produced by a farm depends on both mean litter size and number of litters but is driven primarily by ensuring sufficient sows are bred to minimize the risk of empty farrowing pens, i.e., meeting the breeding target (Dial et al., 1996). Variability in the weaning-to-estrus interval (WEI) influences the ability to meet the breeding target, with primiparous sows being particularly prone to having longer and more variable WEI due to inadequate lactation nutrient intake and consequent impaired metabolic status at weaning. This is likely to be accentuated by current production practice of using hyper-prolific sows. There is a limit to the total number of piglets that a sow can raise uniformly with an acceptable piglet survival and weaning weight. The number of teats and milk production both constrain piglet growth and survival. Sow milk yields peak at about 15 d and then remain relatively stable until 4 wk, and then decline (Hanson et al., 2012; Toner et al., 1996). Therefore, beyond 3 wk, if daily nutrient intake is increased while the metabolic demands of lactation are stable or decreasing, the net metabolic status of the sow at weaning will be improved with potential benefits to subsequent farrowing rate and litter size. Hence, in systems employing relatively short lactation lengths, nurse sows are attracting more interest as a means to raise excess piglet production to an appropriate weight for weaning. Primiparous sows have been suggested to be appropriate foster sows as they more readily accept a new litter (Thorup et al., 2004).

When administered at weaning, gonadotrophins such as the combination of 400 IU equine chorionic gonadotrophin (eCG) plus 200 IU human chorionic gonadotrophin (hCG) are effective for reducing and synchronizing the duration of the wean-to-estrus interval in primiparous sows (Estienne and Hartsock, 1998; Kirkwood et al., 1998).

Gonadotrophin treatment has the added benefit of increasing the duration of the estrous period and so can facilitate improved breeding management and subsequent farrowing rate and litter size (Knox et al., 2001).

The objective of the present trial was to compare measures of fertility at the second parity of primiparous sows receiving a foster litter for a further 14 d nursing, and their counterparts lactating for only 21 d, that were or were not hormone-treated at final weaning for inducing and synchronizing the post-weaning estrus. It was hypothesized that primiparous sows recruited as nurse sows for an additional 2 wk of lactation would have improved fertility relative to their contemporaries weaned at 3 wk postpartum and, further, that the injection of a combination of 400 IU eCG plus 200 IU hCG at weaning will promote and synchronize the post-weaning estrus and result in improved subsequent farrowing rate and litter size.

2. Materials and methods

2.1. Animals and treatments

This study was approved by the University of Guelph Animal Care Committee. A total of 472 lactating PIC 1050 primiparous sows housed in a commercial 5,600-sow facility in Illinois, USA, were used. The trial took place over a year with seven replicate groups of sows involved in the study. Sows farrowing in January, February, March, August, September, October-November, and December of 2011 were randomly assigned to one of four treatments after 3 wk of lactation: 1) W3 ($n = 165$); weaned and no hormone injection, 2) W5 ($n = 103$); initial litter weaned and second litter of 7-d-old piglets fostered-on for an additional 2 weeks, no hormone injection when weaned after 5

weeks of lactation, 3) W3+P ($n = 108$); weaned and given IM injection of 400 IU eCG plus 200 IU hCG (PG600[®], Merck Animal Health, NJ, USA), and 4) W5+P ($n = 96$); initial litter weaned and second litter of 7-d-old piglets fostered-on for an additional 2 weeks, after a 5-week lactation, weaned and given an IM injection of PG600[®]. The normal practice on the farm was to wean after 3 weeks of lactation and move the sow to the breeding area without injecting hormones, and so in groups where there were extra sows that could not be randomly assigned a treatment (because of a shortage of piglets for fostering) the sows were placed in the W3 group and monitored in a similar manner to other sows in the trial. Because of this decision the W3 group was larger than the other three groups. The foster litters were comprised of 7-d-old pigs subjectively assessed to be small for age and requiring a nurse sow with demonstrated good milking ability. The number of piglets placed on a nurse sow was identical to the number of piglets the sow had been previously nursing.

At weaning, all sows were housed in individual stalls and had once daily fence-line contact with a boar to facilitate estrus detection. Sows were artificially inseminated at detection of their first post-weaning estrus and again 24 h later with 3×10^9 sperm cells in 80 mL extender (Androstar[®] Plus with CSP[™], Minitube, Verona, WI). The sperm was all sourced from the same boar stud throughout the trial and the same genetic lines of boars were used throughout the study. Pregnancy was confirmed at 5 wk post-breeding and pregnant sows grouped in pens of 56 to 60, allowing 1.7 m² per sow until 3 d before their next farrowing due date, when they were moved to individual farrowing pens.

2.2. Animal management

During lactation, sows were fed to-appetite a corn-soybean meal diet with 30% dried distiller's grain (DDG's) formulated to contain 14.7 MJ ME/kg, 20.4% crude protein (CP) and 1.1% total lysine (Lys). From weaning to estrus, sows were fed to-appetite a corn-soybean meal, 40% DDG's diet formulated to contain 13.62 MJ ME/kg, 14.9% CP and 0.53% Lys. Following breeding, sow daily feed intakes were 1.8 kg to 3.3 kg, depending on body condition. During the last 2 wk of gestation, feed allowances were increased by 0.5 to 1.2 kg/d until 3 d prior to their due date and from then on sows were fed 1.8 kg/d, including day of farrowing. Water was available at all times.

Data recorded were; total lactation length, the number of pigs weaned, the weaning-to-estrus interval, service outcome (farrow or not) and subsequent total and live born litter sizes.

2.3. Statistical analysis

Differences in the incidence of estrus and farrowing rates were assessed by logistic regression analysis using a generalized linear mixed model in SAS (PROC GLIMMIX; SAS 9.2., SAS Institute Inc., Cary, NC). Treatment, season, and their interactions were included as fixed effects, and replicates were treated as random effect. The relationship between first lactation length, post-weaning treatment with PG600[®], and subsequent litter size was assessed by a two-way ANOVA using a linear mixed model (PROC MIXED) that included the same fixed and random effects as above. Normality of the residuals and presence of outliers were assessed by PROC UNIVARIATE using the Shapiro-Wilk test, Q-Q-plots and externally studentized

residuals. When necessary, data were power transformed by a parameter ϕ whose optimal value was estimated using the maximum likelihood (ML) method (Piepho, 2009). *P*-values were calculated using *t*-tests. Data are presented as probabilities and least square means \pm SE. Significant effects were considered at $P \leq 0.05$.

3. Results

The mean total number of pigs weaned at first parity was greater for the sows nursing a foster litter (Table 1). Numbers of pigs weaned did not differ between W5+P and W5 or between W3+P and W3 (Table 1). The proportion of sows showing estrus within 6 d post-weaning for the W3 sows was greater for sows administered PG600[®] at weaning compared to sows not treated with PG600[®] at weaning (86.2% compared with 64.0%, respectively; $P < 0.001$). However, the proportion of W5+P sows in estrus by 6 d post-weaning was not different from the proportion of W5 sows in estrus by 6 d post-weaning (79.4% compared with 69.1%, respectively; $P = 0.13$). The proportion of sows culled before breeding for each treatment group was not affected either by the lactation length or the post-weaning estrus induction treatment. There were no differences in farrowing rates among treatments. The live born litter size tended to be larger for W5 sows compared to W5+P sows (14.0 ± 0.4 compared with 13.1 ± 0.5 , respectively; $P = 0.1$), and was also larger for W3 compared to W3+P (12.1 ± 0.4 compared with 11.3 ± 0.4 , respectively; $P < 0.05$). The total born litter size was similar for W5+P sows and W5 sows (14.0 ± 0.5 and 14.5 ± 0.4 , respectively; $P = 0.36$), but was larger for W3 compared to W3+P (12.6 ± 0.3 compared with 11.7 ± 0.4 , respectively; $P < 0.05$). Sows in the extended lactation group (W5 and W5+P) produced larger litters than the sows weaned at around 21 d of lactation ($P < 0.001$).

4. Discussion

This study confirmed that primiparous sows tend to be relatively slow to return to estrus after weaning and that treatment with PG600[®] at weaning can improve the proportion of sows in estrus within 6 d, particularly when lactation length is relatively short, and so facilitate the achievement of breeding targets (Kirkwood, 1999). Furthermore, while prolonged WEI (i.e., > 5 d) makes it more difficult to meet breeding targets, this prolongation is also associated with reduced sow performance (Wilson and Dewey, 1993) and increased likelihood of early culling (Tantasuparuk et al., 2001). Administering gonadotrophins to primiparous sows at weaning helps ensure that these sows timing of estrus will be synchronized with the rest of the breeding group. This synchronization of timing of estrus will ensure less variation in farrowing dates within the breeding group, and therefore minimize variation in piglet weaning age. A primary factor contributing to prolonged WEI is inadequate lactation nutrient intake and associated loss of body condition (Eissen et al., 2003; Schenkel et al., 2010) and is, therefore, more likely in primiparous sows due to their innately smaller appetites. Where an analysis of breeding records indicates prolonged WEI, a possible intervention to correct this problem is to use hormonal stimulation of estrus (e.g., PG600[®]). Several studies have examined the effects of gonadotrophins and all agree that treatment results in a shorter and more synchronous onset of the post-weaning estrus (De Rensis et al., 2003; Kirkwood et al., 1998) and the present data confirm this effect.

The effects of gonadotrophin treatment on subsequent fertility have proven variable. This may, in part, be due to adverse timing of insemination relative to ovulation because a gonadotrophin-induced estrus is relatively long which, if not considered, makes timing of insemination potentially more difficult (Knox et al., 2001).

In the present study, there was no difference in farrowing rates for primiparous sows following a 35-d lactation, whether or not PG600[®] was administered at weaning. There was a trend for sows weaned after 35 days of lactation and given PG600[®] to have a smaller litter compared to sows with similar lactation and not given PG600[®]. When litter size and farrowing rate are combined it can be seen that sows that are weaned after 5 weeks of lactation and given a hormone injection produced on average 1.5 pigs less per sow bred compared to sows not given PG600[®]. A decrease in performance this large is likely to offset the benefits associated with the use of PG600[®] for sows in this lactation group. Among sows weaned at 21-d of lactation, treatment with PG600[®] at weaning resulted in a subsequent smaller litter size. There may be a trade-off between reducing the time from weaning to estrus and litter size with respect to sows weaned at 21d. This smaller litter size might reflect that some of these primiparous sows induced to come into estrus are a little less fertile than sows not induced and having a few more days to recover before breeding.

The present results demonstrate a significant increase in subsequent total born litter sizes at parity 2 for those primiparous sows receiving a foster litter for a further 14 d nursing, prolonging their first lactation to 35 d. The pigs fostered onto the nurse sows were only 7 d of age and so smaller and less demanding of milk than her litter that was weaned. Further, although not measured in this study, sow feed intakes would likely be maintained. The resultant reduced metabolic demands of suckling, together with a maintained and possibly increased plane of nutrition, likely contributed to outcomes similar to that occurring with split weaning (weaning of heavier pigs in a litter a few days before the rest of the litter). Acute reductions in the energy demands of the litter result in increased circulating luteinizing hormone concentrations and re-initiation of

ovarian follicular growth (Zak et al., 2008). Although speculative, we suggest that the net effect of an improved metabolic status would be an increased ovulation rate at the post-weaning estrus and improvement in oocyte quality (Zak et al., 1997). Together, this would result in more viable embryos and an increased subsequent litter size. From an economic point of view the benefits of nursing surplus piglets and improving subsequent litter size needs to be balanced with the delay in rebreeding the sow and a lengthening of the farrow-to-farrow interval of sows used as foster mothers.

In conclusion, findings in the present study indicate that primiparous sows weaned after 21 days of lactation may be relatively slow returning to estrus after weaning, and that treatment of these sows with PG600[®] at weaning is a useful tool to increase the proportion of sows in estrus within 6 d of weaning. In contrast, among sows lactating for 5 weeks the advantages of using PG600[®] are less clear in that improvement in weaning to estrus interval is offset by a reduced reproductive performance as measured by pigs produced per sow bred. However, independent of gonadotrophin treatment, a significant increase in subsequent litter sizes at the second farrowing for primiparous sows experiencing a prolonged first lactation was observed. Primiparous nursing sows supply an alternative for raising excess piglets while also improving their subsequent litter size.

Acknowledgements

David Martin-Hidalgo has an FPU contract (AP2008-04039) from the Spanish Ministry of Education. The authors gratefully acknowledge the financial support of Ontario Pork and the Canadian Swine Research and Development Cluster (CSRDC); Agriculture & Agri-Food Canada. Merck Animal Health donated the PG600[®] used in this study. The funding sources had no further involvement in study design; in the collection, analysis and interpretation of data; in the writing of the report; and in the decision to submit the article for publication. The participating farm staff is gratefully acknowledged for their technical support and assistance on farm.

References

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

Dial, G.D., Duangkaew, C., King, V., Rademacher, C., 1996. The influence of the gilt pool on weaned pig output. In: *Proc. Allen D. Lemman Swine Conf.* 23, 39-41.

Eissen, J.J., Apeldoorn, E.J., Kanis, E., Verstegen, M.W.A., de Greef, K.H., 2003. The importance of a high feed intake during lactation of primiparous sows nursing large litters. *J. Anim. Sci.* 81, 594-603.

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

Hansen, A.V., Strathe, A.B., Kebreab, E., France, J., Theil, P.K., 2012. Predicting milk yield and composition in lactating sows: A Bayesian approach. *J. Anim. Sci.* 90, 2285-2298.

Kirkwood, R.N., 1999. Pharmacological intervention in swine reproduction. *J. Swine Health Prod.* 7, 29-35.

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

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

Piepho, H.P., 2009. Data transformation in statistical analysis of field trials with changing treatment variance. *Agron. J.* 101, 865-869.

Schenkel, A.C., Bernadi, M.L., Bortolozzo, F.P., Wentz, I., 2010. Body reserve mobilization during lactation in first parity sows and its effect on second litter size. *Livest. Sci.* 132, 165-172.

Tantasuparuk, W., Lundeheim, N., Dalin, A.-M., Kunavongkrit, A., Einarsson, S., 2001. Weaning-to-service interval in primiparous sows and its relationship with longevity and piglet production. *Livest. Prod. Sci.* 69, 155-162.

Thorup, F., Poll, K., Larsen, G.B., Schmidt, M.H., 2004. Optimal parity in nurse sows. In: Proc.18th IPVS Congress, Hamburg, Germany. Vol. 2, pp. 474.

Toner, M.S., King, R.H., Dunshea, F.R., Dove, H., Atwood, C.S., 1996. The effect of exogenous somatotropin on lactation performance of first-litter sows. *J. Anim. Sci.* 74, 167-172.

Wilson, M.R., Dewey, C.E., 1993. The association between weaning-to-estrus interval and sow efficiency. *J. Swine Health Prod.* 1, 10-15.

Zak, L.J., Xu, X., Hardin, R.T., Foxcroft, G.R., 1997. Impact of different patterns of feed intake during lactation in the primiparous sow on follicular development and oocyte maturation. *J. Reprod. Fertil.* 110, 99-106.

Zak, L.J., Foxcroft, G.R., Aherne, F.X., Kirkwood, R.N., 2008. Role of luteinizing hormone in primiparous sow responses to split weaning. *Reprod. Dom. Anim.* 43, 445-450.

Table 1. Effect of lactation length^d and gonadotrophin treatment^e at weaning on fertility of primiparous sows.

	W3+P	W3	W5+P	W5	<i>P</i> -value ^f
Sows per treatment, n	108	165	96	103	
Pigs weaned, n	10.1 ± 1.6	10.4 ± 1.7	20.5 ± 2.6	20.4 ± 2.5	
Estrus ≤ 6 d, % (n)	86.2 ^c (93)	64.0 ^a (105)	79.4 ^{bc} (76)	69.1 ^{ab} (71)	<0.01
Number bred, n	104	157	95	100	
Sows culled before breeding, % (n)	3.7 (4)	4.9 (8)	1 (1)	2.9 (3)	
Farrowed, % (n)	91.7 (95)	91.1 (143)	82.1 (78)	90.0 (90)	0.18
Total born, n	11.7 ± 0.4 ^a	12.6 ± 0.3 ^b	14.0 ± 0.5 ^c	14.5 ± 0.4 ^c	<0.0001
Live born, n	11.3 ± 0.4 ^a	12.1 ± 0.4 ^b	13.1 ± 0.5 ^c	14.0 ± 0.4 ^c	<0.0001
Total pigs, n	1111	1801	1092	1305	
Pigs/sow bred, n	10.7	11.5	11.5	13.0	

^{abc} Differences between treatment-groups indicated with letter superscripts.

^d (W3) were sows weaned at 21 d, and (W5) were sows weaning an original litter at 21 d but immediately given a foster litter of 7-d-old piglets for a further 14 d.

^e Treated sows (P) received an IM injection of 400 IU eCG plus 200 IU hCG (PG600[®]) at the time of weaning. Sows in the other two groups did not receive an injection.

^f Overall *P*-value for treatment effect.

Capítulo 7/Chapter 7.

**Relationship between estrus responses of
prepubertal gilts to gonadotrophin treatment
and subsequent sow fertility and retention to
parity four**

Submitted for publication to the *Journal of Swine, Health and*

Production,

August, 11th 2014

1 **Relationship between estrus responses of prepubertal gilts to gonadotrophin**
2 **treatment and subsequent sow fertility and retention to parity four.**

3 D.M. Hidalgo^a, R.M. Friendship^{b,e}, L. Greiner^c, R. Manjarín^a, J.C. Domínguez^a, and
4 R.N. Kirkwood^d.

5

6 ^aDepartment of Medicine, Surgery and Veterinary Anatomy, University of Leon, Spain.

7 ^bDepartment of Population Medicine, University of Guelph, Guelph, Ontario, Canada.

8 ^cCarthage Innovative Swine Solutions, LLC, Carthage, IL, USA.

9 ^dSchool of Animal and Veterinary Sciences, University of Adelaide, Roseworthy, SA,
10 Australia.

11 ^e Corresponding author: Dr. R.M. Friendship, Department of Population Medicine,
12 University of Guelph, Guelph, Ontario, Canada N1G2W1.

13 Tel; +1 519 824 4120 x54022; Email: rfriends@uoguelph.ca

14

15 **Abstract**

16 The aim of this study was to determine whether a prompt estrus response of
17 prepubertal gilts to gonadotrophin treatment is associated with improved long term sow
18 performance. At 154 d of age, prepubertal gilts received an intramuscular injection of
19 400 IU equine chorionic gonadotrophin plus 200 IU human chorionic gonadotrophin
20 (PG600[®]; n = 260). Control gilts (n = 272) did not receive PG600[®]. All gilts were boar
21 exposed from 155 d of age for estrus detection and gilts were subsequently artificially
22 inseminated at a weight of approximately 130 kg. Gilts receiving PG600[®] that exhibited
23 estrus by 7 d post injection were classified as early responders (ER); remaining
24 PG600[®]-treated gilts were classified as late responders (LR). Within the control
25 population, gilts exhibiting estrus by 185 d of age were classified as select (CS);
26 remaining controls were classified as non-select (NS). Treatment response impacted (P
27 = 0.03) retention rate, with a lesser proportion of LR gilts reaching parity 4 compared to
28 NS gilts (50% vs. 69.4%, respectively; $P = 0.09$), with ER and CS gilt retentions rates
29 being intermediate. These data indicate that gilts failing to respond promptly to PG600[®]
30 administered at 154 d of age are more likely to be culled after fewer parities.

31

32 **Keywords:** Gonadotrophins, puberty, sow longevity, sow fertility.

33

34 **1. Introduction**

35 It is accepted that sows are most prolific in parities 3 to 6 but many sows are
36 culled before achieving parity 3, which is a problem both economically and for sow
37 welfare. For gilts and primiparous sows, reproductive failure is the most common
38 reason for culling (D'Allaire and Drolet 1999; Hughes et al. 2010). This may involve
39 poor selection criteria since it has been shown that gilts achieving an early puberty may
40 be relatively more fertile (Nelson et al. 1990; Holder et al. 1995), with the corollary
41 being that late developing gilts will be less fertile. It has been documented in large
42 population data surveys that gilts that were older at first mating were culled sooner, with
43 fewer pigs born during the sow's life-time (Schukken et al. 1994; Culbertson and Mabry
44 1995; Le Cozler et al. 1998). Patterson et al. (2010) defined select gilts as those
45 achieving puberty by 30 d after the start of boar exposure and documented that,
46 compared with non-select gilts that took longer than 30 d to achieve puberty, a greater
47 proportion were successfully bred and that fall-out rates to parity 3 tended to be lower.

48
49 Identification and selection of gilts with the best potential long-term
50 performance would greatly benefit the pork industry. There are limited data comparing
51 productivity of sows that were or were not originally induced to cycle with
52 gonadotrophins. In a relatively poorly performing herd, gonadotrophin induction of first
53 estrus with breeding at the following estrus had no impact on sow retention during 3
54 parities (Holtz et al. 1999). It has further been documented that breeding relatively older
55 and heavier gilts at a gonadotrophin-induced estrus did not compromise long-term
56 productivity (Kirkwood et al. 2000). A similar lack of effect on culling was noted when
57 primiparous sows received gonadotrophins at weaning (Kirkwood et al. 1998; Vargas et

58 al. 2006). However, to our knowledge, the impact of a prompt or delayed estrus
59 response to gonadotrophic treatment on long term performance (i. e., sow herd
60 longevity and/or lifetime piglet production) has not been determined. The objective of
61 the present trial is to compare measures of fertility for gilts that were gonadotrophin-
62 treated to induce a pubertal estrus, and did or did not respond promptly to treatment,
63 with non-treated select gilts chosen from the same population. Our hypothesis is that
64 gilts having a faster response to hormonal stimulation are analogous to gilts having a
65 younger age at natural puberty, implying an increased physiological age at a given
66 chronological age, and will be associated with improved long term performance.

67

68 **2. Material and methods**

69 *2.1. Animals and treatments*

70 This study was approved by the University of Guelph Animal Care Committee.
71 A total of 532 prepubertal gilts (PIC 1050) housed in a commercial 5,600-sow facility in
72 Illinois, USA, were used. Details of the management of gilts have been documented
73 previously (Hidalgo et al. 2014a). Briefly, at 154 d of age, prepubertal gilts (n = 260)
74 received an intramuscular (IM) injection of 400 IU equine chorionic gonadotrophin
75 (eCG) plus 200 IU human chorionic gonadotrophin (hCG; PG600[®], Merck Animal
76 Health, NJ, USA). Non-treated gilts (n = 272) were selected from the same population.
77 Starting at 155 d of age, all gilts were subjected to direct boar exposure for 20 to 30 min
78 daily to stimulate onset and facilitate detection of first estrus. The PG600[®]-treated gilts
79 exhibiting estrus ≤ 7 or > 7 d after injection were classified as either early or late-
80 responders (ER and LR, respectively). Control gilts exhibiting estrus ≤ 30 or > 30 d
81 after start of boar exposure were classified as select (CS) and non-select (NS),

82 respectively. Gilts were artificially inseminated at a weight of approximately 130 kg,
83 independently of total number of observed estruses (2 to 5), with 3×10^9 sperm in 80
84 mL extender (Androstar[®] Plus with CSP[™], Minitube, Verona, WI) at heat detection,
85 and again at 12 and 24 h after estrus detection, depending on whether standing reflex
86 persisted in the presence of the boar.

87

88 A total of 480 gilts farrowed a litter and 472 out of them were randomly
89 assigned to one of four treatments after 3 wk of lactation. The remaining 8 gilts were
90 culled for non-reproductive reasons (i. e., bad body condition, lameness, rectal prolapse
91 and downer syndrome) before finishing the 3-wk lactation period. Details of
92 primiparous sows management have been documented previously (Hidalgo et al.
93 2014b). Briefly, after 3 wk of lactation, primiparous sows farrowing in January,
94 February, March, August, September, October-November, and December of 2011 were
95 randomly assigned to one of four treatments: 1) W3 (n = 165); weaned and no hormone
96 injection, 2) W5 (n = 103); initial litter weaned and second litter of 7-d-old piglets
97 fostered-on for an additional 2 weeks, no hormone injection when weaned after 5 weeks
98 of lactation, 3) W3+P (n = 108); weaned and given IM injection of 400 IU eCG plus
99 200 IU hCG (PG600[®], Merck Animal Health, NJ, USA), and 4) W5+P (n = 96); initial
100 litter weaned and second litter of 7-d-old piglets fostered-on for an additional 2 weeks,
101 after a 5-week lactation, weaned and given an IM injection of PG600[®]. No further
102 interventions were performed and the retrospective analysis encompassed the period
103 from a gilt age of 155 d until the rebreeding after weaning of the fourth litter. Sow
104 performance was assessed on the basis of litters produced and numbers of total pigs
105 delivered. These variables were chosen for analysis because we believed them to be the
106 best indicators of breeding herd performance over time.

107

108 2.2. Statistical analysis

109 Differences in overall culling rate and incidence of animals reaching parity 4
110 were assessed by multinomial and binomial regression analyses using generalized linear
111 mixed models (PROC LOGISTIC and GLIMMIX, respectively) in SAS 9.2. (SAS
112 Institute Inc., Cary, NC). Treatments and their interactions were included as fixed
113 effects in the models, and gilt weight as covariate. Differences in overall litter size (total
114 born and alive) and litters produced per sow were analysed by a one-way ANOVA
115 using a linear mixed model in SAS (PROC MIXED), with the same fixed effects and
116 covariate used above. Normality of the residuals and presence of outliers were assessed
117 by PROC UNIVARIATE (SAS 9.2.) using the Shapiro-Wilk test, Q-Q-plots and
118 externally studentized residuals. When necessary, data were power transformed by a
119 parameter ϕ whose optimal value was estimated using the maximum likelihood (ML)
120 method (Piepho, 2009). Pair-wise comparisons between least square means were
121 analysed by Student's t-tests. Data are presented as probabilities and least square means
122 \pm SE. Significant effects were considered at $P \leq 0.05$.

123

124 3. Results

125 Of the initial 532 gilts, 33 PG600[®]-treated gilts and 19 Controls were removed
126 from the study without farrowing a litter. Other 5 PG600[®]-treated gilts and 3 Controls
127 were removed from the study after farrowing a litter, but before being assigned to one of
128 the four treatment groups, due to non-reproductive reasons. Lactation length and
129 PG600[®] treatment administered to primiparous sows at weaning had no significant
130 effects on any of the parameters measured in the study, so only main effects for PG600[®]

131 treatment in prepubertal gilts are reported. Gilt retention to breeding for parity 5 tended
132 to be lower for LR compared to NS animals (50% vs. 69.4%, respectively; $P = 0.09$;
133 Table 1). Retentions of ER and CS gilts were intermediate (56.4% and 66.8%,
134 respectively). There were no significant treatment differences for mean litter size (total
135 born or alive) or mean number of litters produced per sow over the 4 parities (Table 1).

136

137 **4. Discussion**

138 This research examined whether or not the administration of gonadotrophins to
139 prepubertal gilts, with their subsequent breeding near their third estrus, would result in
140 improved sow fertility and, consequently, herd longevity. A central question we
141 attempted to answer is; does the response to PG600[®] treatment as gilts predict the likely
142 long term performance as sows? If so, with more-fertile gilts responding more rapidly to
143 PG600[®] than do less-fertile gilts, an economic advantage from the treatment could be
144 identified on the basis of numbers of litters produced and/or total piglet production
145 during a defined period. An analysis of our data revealed no long term impact on litter
146 sizes or mean number of litters produced per sow of PG600[®] treatment when
147 administered to induce puberty in gilts, showing that the long-range sow productivity of
148 prematurely induced gilts is not impaired, independently of the estrus response to
149 hormonal treatment, and confirming previous findings (Holtz et al. 1999; Kirkwood et
150 al. 2000). Similarly, in support of previous studies, we detected no effect of the
151 hormonal induction of first post weaning estrus on performance in subsequent parities
152 (Kirkwood et al. 1998; Vargas et al. 2006).

153

154 If considered that within a gilt population there will be a normal distribution of
155 potential fertilities, we further suggest that gilts with relatively high potential fertility,
156 and subsequently longer herd longevity, will respond more rapidly to PG600[®] treatment
157 administered to induce puberty. In the present study, although long-term productivity
158 after puberty induction with PG600[®] was not impaired considering estrus responses, a
159 lesser proportion of LR gilts reached parity 4 and were bred for parity 5, compared to
160 NS gilts; with ER and CS gilt retention rates being intermediate. These data are in
161 contrast to earlier results (Kirkwood et al. 2000), where gilt puberty induction with
162 PG600[®] did not affect sow herd longevity. In the previously mentioned study, although
163 they did not focus on the estrus response to hormonal therapy with PG600[®], it is likely
164 significant that gilts received treatment at a much older age (i. e., > 180 d of age) and
165 heavier weight (i. e., > 110 kg body-weight) than those of the present study. At such age
166 and weight, historically, a natural onset of puberty may be expected, but also a faster
167 estrus response to PG600[®] administered to induce puberty, whereas in significantly
168 younger and lighter gilts a certain degree of immaturity or relative infertility could be
169 expected at the time of injection, but also a wider range of estrus responses to PG600[®],
170 with a possible negative effect on their herd longevity. It should be taken into account
171 that the number of gilts used in each treatment category was quite variable and
172 especially small for the NS group, due to the selection process, which is a weakness of
173 the study. However, even in this event, the tendency in the case of litter size, litters
174 produced per sow and retention rate to parity 4 favoured the Control population.

175

176 The obvious conclusion from this study is that gonadotrophin treatment of gilts
177 does not increase the likelihood of introducing less fertile gilts in the breeding herd.
178 However, although hormonal induction at an early age does not appear to be an

179 effective reproductive tool of selecting gilts with the greatest long-term fertility, a late
180 estrus response to administration of exogenous gonadotrophins to pre-pubertal gilts at
181 154 d of age could be predictive of gilts with a reduced likelihood of retention to parity
182 4.

183

184 **Acknowledgements**

185 David Martín-Hidalgo has an FPU contract (AP2008-04039) from the Spanish
186 Ministry of Education. The authors gratefully acknowledge the financial support of
187 Ontario Pork and the Canadian Swine Research and Development Cluster (CSRDC);
188 Agriculture & Agri-Food Canada. Merck Animal Health donated the PG600[®] used in
189 this study. The staff of the participating farm is gratefully acknowledged for their
190 technical support and assistance.

191

192 **Conflict of interest**

193 None of the authors have any conflict of interest to declare.

194

195 **Author contributions**

196 R. M. Friendship, J. C. Domínguez and R. N. Kirkwood have directed the study,
197 and participated in the study design and in the process of writing and reviewing the
198 manuscript. R. Manjarín has participated in the data analysis and in the process of the
199 manuscript revision. L. Greiner has participated in the study design and supervising the
200 on-farm trial development. D. M. Hidalgo has participated in the on-farm trial

201 development and in the study design, writing, analysing, formatting, and discussing the
202 manuscript.

203

204 **References**

205 Culbertson MS, Mabry JW. Effect of age at first service on first parity and
206 lifetime sow performance. *J Anim Sci.* 1995; 73 (Suppl. 1): 21 (abstr.).

207 D´Allaire S, Drolet R. Culling and mortality in breeding animals. In: *Diseases of*
208 *Swine* (8th edition), BE Straw, S D´Allaire, WL Mengeling, DJ Taylor (Eds). 1999; pp
209 1003-1016.

210 Hidalgo DM, Friendship RM, Greiner L, Manjarin R, Amezcua MR, Dominguez
211 JC, Kirkwood RN. Influence of gonadotrophin-induced first estrus on gilt fertility.
212 *Reprod Dom Anim.* 2014a. (In press). <http://dx.doi.org/10.1111/rda.12390>

213 Hidalgo DM, Friendship RM, Greiner L, Manjarin R, Amezcua MR, Dominguez
214 JC, Kirkwood RN. Influence of lactation length and gonadotrophins administered at
215 weaning on fertility of primiparous sows. *Anim Reprod Sci.* 2014b. (In press).
216 <http://dx.doi.org/10.1016/j.anireprosci.2014.06.034>

217 Holder RB, Lamberson WR, Bates RO, Safranski TJ. Lifetime productivity in
218 gilts previously selected for decreased age at puberty. *Anim Sci.* 1995; 61: 115-121.

219 Holtz W, Schmidt-Baulain R, Welp C, Wallenhorst CK. Effect of insemination
220 of estrus-induced prepuberal gilts on ensuing reproductive performance and body
221 weight. *Anim Reprod Sci.* 1999; 57: 177-183.

222 Hughes PE, Smits RJ, Xie Y, Kirkwood RN. Relationships among gilt and sow
223 liveweight, P2 backfat depth, and culling rates. *J Swine Health Prod.* 2010; 18: 301-305.

224 Kirkwood RN, Ormand CJ, Goonewardene LA. Injection of PG600[®] at weaning
225 of the first litter: Effects on sow lifetime performance. *J. Swine Health Prod.* 1998; 6:
226 273-274.

227 Kirkwood RN, Aherne FX, Monaghan PG, Misutka SC. Breeding gilts at natural
228 or a hormone-induced estrus: Effects on performance over four parities. *J Swine Health*
229 *Prod.* 2000; 8: 177-179.

230 Le Cozler Y, Dagorn J, Lindberg JE, Aumaitre A, Dourmad JY. Effect of age at
231 first farrowing and herd management on long-term productivity of sows. *Livest Prod*
232 *Sci.* 1998; 53: 135-142.

233 Nelson AH, Mabry JW, Benyshek LL, Marks MA. Correlated response in
234 reproduction, growth and composition to selection in gilts for extremes in age at puberty
235 and backfat. *Livest Prod Sci.* 1990; 24: 237-247.

236 Patterson JL, Beltranena E, Foxcroft GR. The effect of age at first estrus and
237 breeding on third estrus on sow body weight changes and long-term reproductive
238 performance. *J Anim Sci.* 2010; 88: 2500-2513.

239 Piepho HP. Data transformation in statistical analysis of field trials with
240 changing treatment variance. *Agron J.* 2009; 101: 865-869.

241 Schukken YH, Buurman J, Huirne RB, Willemse AH, Vernooij JC, van den
242 Broek J, Verheijden JH. Evaluation of optimal age at first conception in gilts from data
243 collected in commercial swine herds. *J Anim Sci.* 1994; 72: 1387-1392.

244 Vargas AJ, Bernardi ML, Wentz I, Neto GB, Bortolozzo FP. Time of ovulation
245 and reproductive performance over three parities after treatment of primiparous sows
246 with PG600. *Theriogenology* 2006; 66: 2017-2023.

247

248 Table 1. Influence of estrus response to gonadotrophin treatment of prepubertal gilts on
 249 fertility and longevity as sows.

	ER ¹	LR ²	CS ³	NS ⁴
No sows	140	120	223	49
No sows bred	135	112	221	49
Mean litter size (total)	13.0±0.4	12.8±0.4	12.8±0.3	12.9±0.6
Mean litter size (alive)	12.3±0.3	12.0±0.4	12.2±0.3	12.2±0.6
Mean litters per sow	3.1±0.1	2.9±0.1	3.2±0.1	3.3±0.2
No total pigs born (mean per sow bred)	5382 (39.9±1.6)	4208 (37.6±1.8)	8891 (40.2±1.3)	2033 (41.5±2.7)
Sows bred for parity 5, n (%)	79 (56.4) ^{ab}	60 (50.0) ^a	149 (66.8) ^{ab}	34 (69.4) ^b

250

251 ¹Gilts responding to PG600[®] by 7 d post injection.

252 ²Gilts responding to PG600[®] at > 7 d post injection.

253 ³Control select gilts showing estrus by 30 d after onset of boar exposure.

254 ⁴Non-select gilts taking longer than 30 d to show estrus after onset of boar exposure.

255 ^{a,b}P < 0.1

Capítulo 8/Chapter 8.
Relationship between vaginal mucus
conductivity and time of ovulation in weaned
SOWS

Accepted for publication in the *Canadian Journal of Veterinary Research*,

July, 8th 2014 (*in press*)

Relationship between vaginal mucus conductivity and time of ovulation in weaned sows. D.M. Hidalgo^a, G. Cassar^b, R. Manjarin^a, J.C. Dominguez^a, R.M. Friendship^b, R.N. Kirkwood^c.

^a Department of Medicine, Surgery and Veterinary Anatomy, University of Leon, Spain.

^b Department of Population Medicine, University of Guelph, Guelph, Ontario, Canada.

^c School of Animal and Veterinary Sciences, University of Adelaide, Roseworthy, SA, Australia.

Corresponding Author: Dr. Glen Cassar, Department of Population Medicine, University of Guelph, Guelph, Ontario, Canada. N1G 2W1.

Telephone: 1 519-824-4120 ext 54038.

Fax: 1 519-763-3117.

Abstract

The study investigated whether changes in the electrical resistance of vaginal mucus (VER) of weaned sows during the first 7 days post-weaning are associated with time of ovulation, as determined by ovarian ultrasound between 91 and 146 h after weaning, and season. VER measures were determined at 20, 44, 68, 91, 96, 102, 115, 120, 126, 140, 146 and 164 h post-weaning. VER decreased between 120 and 31 h prior to ovulation, and then increased until 40-50 h post-ovulation. Duration and timing of the nadir was affected by season ($P < 0.01$). Estrus was observed from day 4 post-weaning, following the lowest VER values. Ovulation occurred between late day 5 and late day 6 post-weaning, while VER values were still increasing. Ovulation was earlier in lower parity sows ($P < 0.001$). Compared to 0 h (ovulation time), VER was significantly lower between 50 and 5 h pre-ovulation in autumn, and between 40 and 21 h pre-ovulation in winter, but such differences were not seen in spring. Lowest VER value was not correlated with time of ovulation. We conclude that VER increases prior to ovulation and that this increase is influenced by season but cannot be used to accurately predict ovulation in weaned sows.

Keywords: sows, estrus, vaginal mucus, electrical impedance, ovulation.

1. Introduction

Most swine artificial insemination (AI) protocols rely on estrus detection to estimate time of ovulation. However, a high variability in the wean-to-estrus (WEI) and estrus-to-ovulation intervals challenges the efficiency of AI, decreasing the fertility of the breeding herd (1). In weaned sows, common estrus synchronization protocols involve the use of exogenous gonadotrophins such as equine chorionic gonadotrophin (eCG) or the combination of 400 IU eCG plus 200 IU hCG (human chorionic gonadotrophin; PG600[®]) (2). However, the estrous response to hormonal treatments is affected by parity and season (3), and often results in lower farrowing rates and litter sizes (2, 4). Previous studies have reported the use of vaginal electrical resistance (VER) as a tool to predict the estrous response in sows (5, 6, 7), given that changes in electrical conductivity of vaginal mucus seem to be related to changes in sexual hormone levels during the estrous cycle (8). In pigs (5), cattle (9), sheep (10), buffaloes (11) and rats (12), a decrease of VER was observed during proestrus, followed by a gradual increase during estrus until ovulation. However, the use of VER to predict the time of ovulation has not been assessed in weaned sows. We hypothesize that sows ovulating sooner during the estrous period will show an earlier increase in VER levels compared to their delayed counterparts, and that such an increase may be used to predict the time of ovulation. In order to test this hypothesis, we established two different steps: a) profile VER values between days 1 and 7 after weaning across different seasons and parities; b) determine the relationship between VER and time of ovulation in weaned sows.

The use of transrectal real-time ultrasonography (RTU) to determine time of ovulation in sows is accurate, but is relatively invasive and requires some degree of expertise. If VER in sows can be used as a predictor of ovulation, it would represent a very user-friendly, non-invasive, simple and inexpensive method of determining the appropriate timing of insemination. With proper timing of insemination, relative to ovulation, only a single insemination may be required to achieve pregnancy. The objective of the study was to determine whether measurement of VER can be used as a predictor of time of ovulation in weaned sows and to determine possible seasonal variations.

2. Material and methods

2.1. Animals and treatments

This study was approved by the University of Guelph Animal Care Committee and was performed on a 700-sow farrow-to-finish facility near Guelph, Ontario. To examine the relationship between VER and ovulation time, a total of 76 mixed-parity Landrace × Yorkshire sows were used in 6 consecutive replicates. The following replicates were formed at weaning:

- Replicate 1: 22 sows weaned on June 4th; parity range 1-12.
- Replicate 2: 12 sows weaned on June 10th; parity range 1-11.
- Replicate 3: 12 sows weaned on June 16th; parity range 1-9.
- Replicate 4: 10 sows weaned on September 23rd; parity range 1-12.
- Replicate 5: 10 sows weaned on October 8th; parity range 1-12.
- Replicate 6: 10 sows weaned on February 9th; parity range 2-10.

Replicates were further grouped, depending on the evaluated season of the year.

Evaluated seasons were:

- Spring (March 20th–June 21st): evaluated sows = 46; Replicates 1, 2 and 3.
- Autumn (September 23rd–December 21st): evaluated sows = 20; Replicates 4 and 5.
- Winter (December 21st–March 20th): evaluated sows = 10; Replicate 6.

Weaned sows were housed individually in breeding stalls (allowing 1.8 m²) and fed daily 2.5 kg of a corn-soybean meal diet formulated to provide 14.2 MJ ME/kg, 15% crude protein and 0.61% lysine. Water was available at all times. All sows received daily 5 min fence-line boar contact for 7 days post-weaning to facilitate estrus detection. Boar exposure started on the day after weaning to stimulate ovarian activity and to determine the onset of estrus. Boar exposure was maintained until day 7 post-weaning to determine the end of the estrus period.

Ovulation time was determined by transrectal RTU at 91, 102, 115, 126, 140 and 146 h post-weaning, using an Aloka[®] SSD 500 (Aloka Inc., Wallingford, Connecticut, USA) with a 7.5 MHz linear array transducer for visualization of the ovaries. Day of weaning was Day 0 and 2.00 pm on weaning day was regarded as 0 h. The disappearance of follicles > 6.5 mm in diameter signaled the start of ovulation. The schedule for VER readings was the following:

1. Reading 1 (Day 1): 20 h post-weaning (at 10 am).
2. Reading 2 (Day 2): 44 h post-weaning (at 10 am).
3. Reading 3 (Day 3): 68 h post-weaning (at 10 am).
4. Reading 4 (Day 4; am reading): 91 h post-weaning (at 9 am).
5. Reading 5 (Day 4; pm1 reading): 96 h post-weaning (at 2 pm).
6. Reading 6 (Day 4; pm2 reading): 102 h post-weaning (at 8 pm).
7. Reading 7 (Day 5; am reading): 115 h post-weaning (at 9 am).
8. Reading 8 (Day 5; pm1 reading): 120 h post-weaning (at 2 pm).
9. Reading 9 (Day 5; pm2 reading): 126 h post-weaning (at 8 pm).
10. Reading 10 (Day 6; am reading): 140 h post-weaning (at 10 am).
11. Reading 11 (Day 6; pm reading): 146 h post-weaning (at 4 pm).
12. Reading 12 (Day 7): 164 h post-weaning (at 10 am).

The VER was determined using a cylindrical-shaped vaginal probe (Draminski[®], Electronics in Agriculture, Olsztyn, Poland), with two ring electrodes on the terminal pole. The resistance was obtained by measuring the voltage developed through the vaginal mucus (ohms; Ω) in response to an alternating electric current excitation at a frequency of 8 mA. The probe was inserted into the vaginal tract until about a quarter of the length of the probe remained outside the vulva. Readings were taken in triplicates by the same operator in order to obtain a mean value.

2.2. *Statistical analysis*

Data analysis consisted of two steps: first, we assessed whether there were significant changes in VER values post-weaning; and second, we evaluated whether VER changes were associated with the ovulation time of each animal to test the efficacy

for prediction. To assess overall changes in post-weaning VER, we normalized the data by grouping VER values of each animal in 10 h intervals before and after their time of ovulation. Whenever 2 or more readings fell within the same interval, the arithmetic mean was calculated. This method allowed us to analyze overall changes in post-weaning VER independently of the ovulation time (Figures 1a, 1b and 1c). To evaluate whether VER changes were actually associated with the ovulation time, and therefore could be used as a predictor for it, we allotted all sows in 4 treatment-groups based on their known time of ovulation (i.e., 102, 115, 126 and 140 h post-weaning); and then, we tested for differences in VER between the 4 groups at each time point between weaning and ovulation, using as time points either the hours at which VER was measured post-weaning or the ovulation intervals calculated before (Figures 2a and 2b, respectively). We also tested whether a correlation existed between the lowest VER value, within each treatment-group, and the ovulation time.

Data was analyzed by ANOVA using a linear mixed model with repeated measurements in SAS 9.2. (PROC MIXED, SAS Institute Inc., Cary, NC). The linear model included time (h or interval), season, ovulation group and their meaningful interactions as fixed effects, block as random effect, sow nested in block as repeated measurement, and parity as covariate. Normality of the residuals and presence of outliers were assessed by PROC UNIVARIATE (SAS 9.2.) using the Shapiro-Wilk test, Q-Q-plots and externally studentized residuals. When necessary, data were power transformed by a parameter ϕ whose optimal value was estimated using the maximum likelihood (ML) method (13). Preplanned comparisons and linear, quadratic and cubic trends were computed using orthogonal contrasts obtained by PROC IML (SAS 9.2.), and *P*-values calculated using Student's *t*-tests. Data are presented as least square means

\pm SE. Significant effects were considered at $P < 0.05$. The relationship between the time at lowest VER value and time of ovulation per sow was analyzed using a correlation analysis in SAS 9.2. (PROC CORR). Pearson correlation coefficient (R) was considered significant at $P \leq 0.05$.

3. Results

All 76 sows monitored in the study showed estrus behaviour before day 5 post-weaning: 8 sows (10.5%) at 91 h, 57 (75%) at 102 h and 11 (14.5%) at 120 h post-weaning. Likewise, all sows in the study ovulated by day 6 post-weaning: 14 sows (18.4%) at 102 h, 12 (15.8%) at 115 h, 46 (60.5%) at 126 h and 4 (5.3%) at 140 h post-weaning. Average parity of sows was 4.2, 4.2, 4.6, 4.7, 6.0 and 6.5 for replicates 1 to 6, respectively. There was a significant effect of parity on the time of ovulation, with younger sows ovulating earlier than their older counterparts (parity 4.21 ± 0.21 at 102 h, 4.06 ± 0.23 at 115 h, 5.30 ± 0.12 at 126 h, and 5.25 ± 0.4 at 140 h post-weaning; $P < 0.001$). The VER values showed a cubic trend throughout the study ($P = 0.0001$); it decreased between 120 and 31 h prior ovulation, and then increased until 40-50 h post-ovulation. The maximum mean value measured was $46.5 \pm 4.6 \Omega$ at 50 h post-ovulation, and the minimum was $27.2 \pm 2.7 \Omega$ at 30 h prior to ovulation. Compared to 0 h (ovulation time), VER was significantly lower between 50 and 5 h before ovulation in autumn ($P < 0.01$; Figure 1a), and between 40 and 21 h before ovulation in winter ($P < 0.01$; Figure 1b). There were no differences in VER values prior to ovulation during spring (Figure 1c). Electrical resistance values were not significantly different between sows ovulating at 102, 115, 126 and 140 h post-weaning at any time point prior to ovulation (Figure 2a). However, electrical resistance at 0 h (ovulation time) was significantly higher for sows ovulating at 126 h compared to those ovulating at 115 and

102 h (36.3 ± 0.82 , 31.8 ± 1.52 , and 31.0 ± 1.54 Ω , for 126, 115 and 102 h post-weaning, respectively; $P = 0.01$; Figure 2b). There was no relationship between time of lowest VER and time of ovulation (data not shown).

4. Discussion

Timing of sperm deposition relative to ovulation is crucial to achieve good fertility rates in weaned sows, especially if using a single timed-AI protocol or reduced sperm numbers per dose. In the present study, we assessed whether VER provided a reliable tool to predict time of ovulation in weaned sows. Numerous studies have shown that VER fluctuations reflect changes in steroid and gonadotrophic hormone levels (6, 8, 14). Consequently, vaginal probes have been employed during the periestrus period or throughout the estrous cycle for non-invasive monitoring of VER in cyclic gilts and sows in order to detect estrus but, to our knowledge, there is no information in the potential use of VER to detect ovulation.

Results from this experiment show significant VER changes in weaned sows prior to ovulation but do not support our hypothesis that preovulatory VER levels will differ between sows having an early or late ovulation. Patterns of VER in the present study did not differ from previous experiments, with a gradual decrease post-weaning followed by an increase prior to ovulation. The decrease in VER levels has been associated with the peak of estradiol which occurs prior to the LH surge, while the electrical resistance increased gradually around the LH peak (8). Changes in VER levels in the current study took place over a 4 to 5 day period, while the time difference between sows with an early and late ovulation was less than 30 h. As such, it is likely that changes in VER at different ovulation times are too small to be detected accurately,

especially since VER seems not to be directly associated with ovulation itself, but to changes in sexual hormone levels (8, 6). In addition to the lack of periovulatory changes, VER values were highly variable between sows at any given time point. This variability is likely due to the effect of external factors on the sow, such as season, parity or WEI, that act directly at the vaginal level and also through changes in the sexual hormones levels (6, 15). A previous study indicated that shorter WEI were associated with lower VER values earlier in the estrus period (6). Although we did not observe this effect in the present study, we found a significant seasonal effect on VER that could contribute to the high variability between our sows and also to the lack of correlation observed between time at the lowest VER and time of ovulation. In addition to external factors, the electrical resistance of the vaginal mucus in the sow may also be affected by internal factors such as mucus composition, its density, or the sow body temperature. Indeed, changes in the mucin content of the vaginal mucus in women influenced the mucus viscoelasticity during the menstrual cycle (16), and changes in the electrolytic composition (Na^+ , K^+ and Cl^-) of the cervical mucus has been associated with changes in estrogen levels (17). We conclude that, while changes in VER occur prior to and after ovulation, differences in VER cannot be used to accurately predict the time of ovulation in sows.

Acknowledgements

The authors gratefully acknowledge the farm staff for their technical support and assistance. Dr. Fernando de la Fuente, from the University of Leon (Spain), is gratefully acknowledged for his assistance and guidance on the statistical analysis that has been performed for this study. David Martin-Hidalgo has an FPU contract (AP2008-04039) from the Spanish Ministry of Education.

References

1. Kemp B, Soede NM. Relationship of weaning-to-estrus interval to timing of ovulation and fertilization in sows. *J. Anim. Sci.* 1996; 74:944-949.
2. Kirkwood RN. Pharmacological intervention in swine reproduction. *J. Swine Health Prod.* 1999; 7:29-35.
3. Knox RV, Zas SL. Factors influencing estrus and ovulation in weaned sows as determined by transrectal ultrasound. *J. Anim. Sci.* 2001; 79:2957-2963.
4. Bates RO, Day BN, Britt JH, Clark LK, Brauer MA. Reproductive performance of sows treated with a combination of pregnant mare's serum gonadotropin and human chorionic gonadotropin at weaning in the summer. *J. Anim. Sci.* 1991; 69:894-898.
5. Ko JCH, Evans LE, Hopkins SM. Vaginal conductivity as an indicator for optimum breeding time in the sow after weaning. *Theriogenology.* 1989; 32:961-968.
6. Řezáč P, Borkovcová M, Krivánek I. Effect of weaning to oestrus interval and equine chorionic gonadotropin on vaginal electrical impedance during peri-oestrus in sows. *Reprod. Domest. Anim.* 2009; 44:932-936.
7. Yamauchi S, Nakamura S, Yoshimoto T, Nakada T, Ashizawa K, Tatemoto H. Prediction of the estrous cycle and optimal insemination time by monitoring vaginal

electrical resistance (VER) in order to improve the reproductive efficiency of the Okinawan native Agu pig. *Anim. Reprod. Sci.* 2009; 113:311-316.

8. Dusza L, Opalka M, Kaminska B, Kaminski T, Ciereszko R. The relationship between electrical resistance of vaginal mucus and plasma hormonal parameters during periestrus in sows. *Theriogenology.* 1996; 45:1491-1503.

9. Carter PD, Dufty JH. Assessment of vaginal impedance measurements as an indicator of oestrus in cattle. *Aust. Vet. J.* 1980; 56:321-323.

10. Bartlewski PM, Beard AP, Rawlings NC. The relationship between vaginal mucous impedance and serum concentrations of estradiol and progesterone throughout the sheep estrous cycle. *Theriogenology.* 1999; 51:813-827.

11. Gupta KA, Purohit GN. Use of vaginal electrical resistance (VER) to predict estrus and ovarian activity, its relationship with plasma progesterone and its use for insemination in buffaloes. *Theriogenology.* 2001; 56:235-245.

12. Jaramillo LM, Balcazar IB, Duran C. Using vaginal wall impedance to determine estrous cycle phase in Lewis rats. *Lab. Anim.* 2012; 41:122-128.

13. Piepho HP. Data Transformation in Statistical Analysis of Field Trials with Changing Treatment Variance. *Agron. J.* 2009; 101:865-869.

14. Aboul-Ela MB, Topps JH, Macdonald DC. Relationships between intravaginal electrical resistance, cervicovaginal mucus characteristics and blood progesterone and LH. *Anim. Reprod. Sci.* 1983; 5:259-273.

15. Řezáč P, Kukla R, Pöschl M. Effect of sow parity on vaginal electrical impedance. *Anim. Reprod. Sci.* 2002; 72:223-234.

16. Wolf DP, Sokoloski JE, Litt M. Composition and function of human cervical mucus. *Biochim. Biophys. Acta.* 1980; 630:545-558.

17. Gould KG, Ansari AH. Electrolyte interactions in cervical mucus and their relationship to circulating hormone levels. *Contraception.* 1981; 23:507-516.

Figures

Caption: Evolution of vaginal mucosa electrical resistance (ER) mean values (\pm SE) before and after the observed time of ovulation in weaned sows in autumn (Fig. 1a), winter (Fig. 1b) and spring (Fig. 1c).

Evolution of vaginal mucosa ER mean values (\pm SE) during the first 164 h post-weaning (Fig. 2a) and before and after the observed time of ovulation (Fig. 2b), grouped by sow ovulation category (groups 102, 115, 126 and 140, for sows ovulating at 102, 115, 126 and 140 h post-weaning, respectively).

Figure 1a:

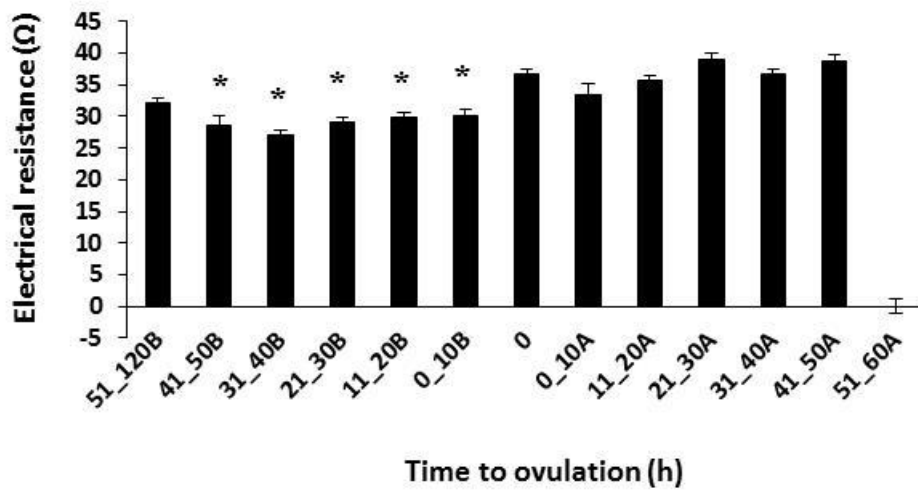


Figure 1b:

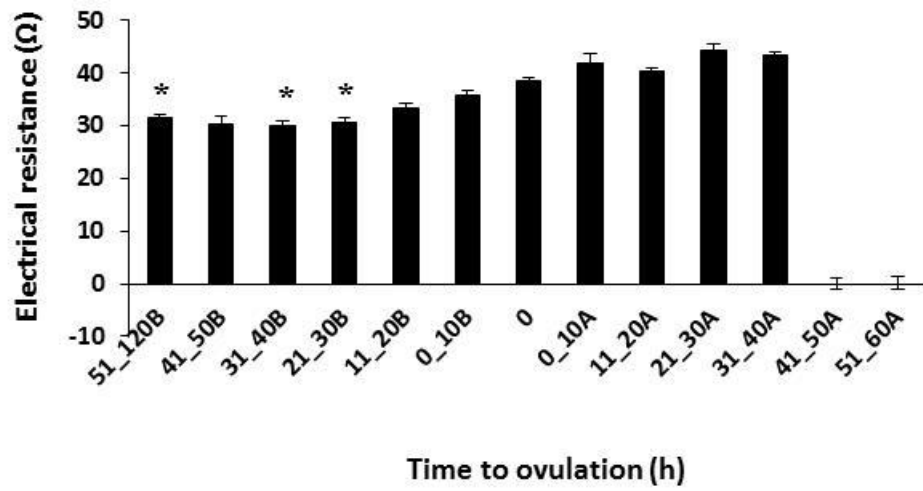


Figure 1c:

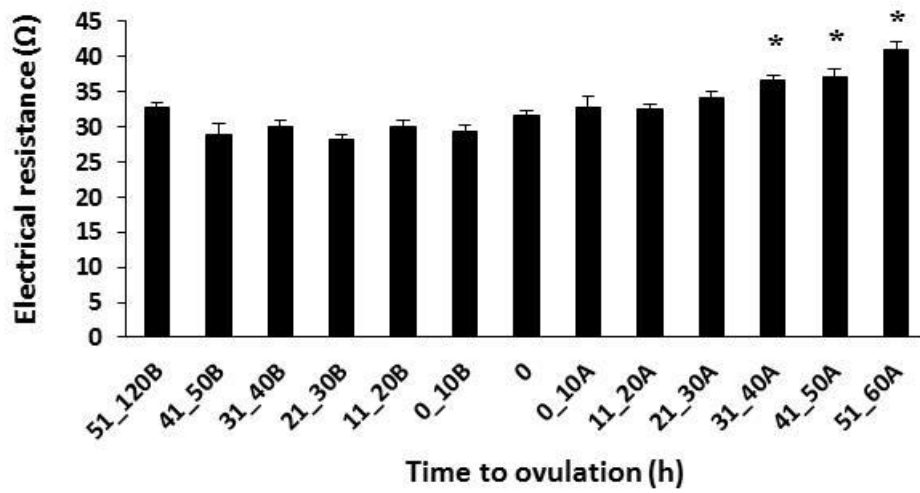


Figure 2a:

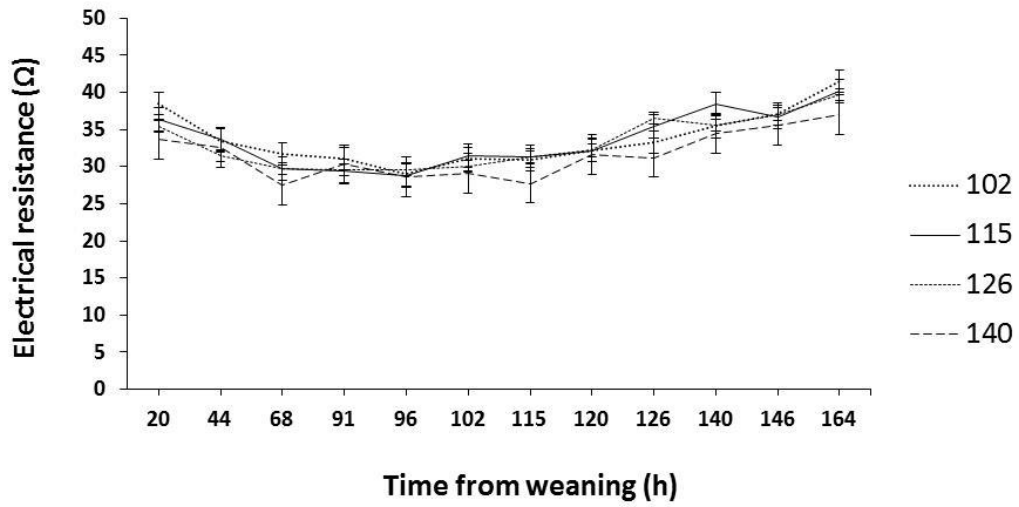
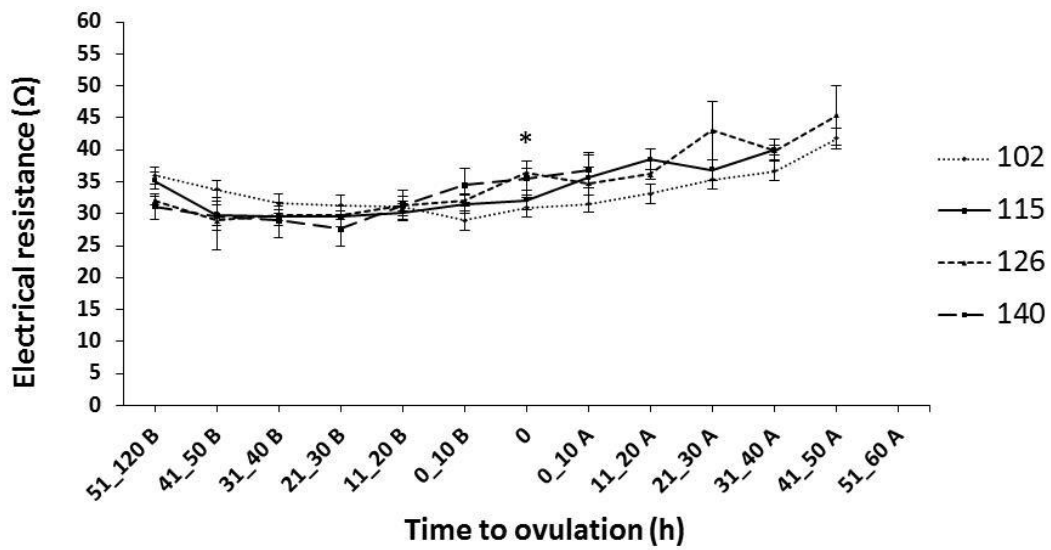


Figure 2b:



Capítulo 9. Resumen global de metodología y resultados

Con el objetivo de mejorar el rendimiento reproductivo de la cerda, en un primer lugar, identificando a las nulíparas con el mayor potencial fértil y, posteriormente, implantando nuevas estrategias de manejo de la reproducción que mejoren su fertilidad en partos subsiguientes, fueron desarrollados 4 ensayos experimentales.

El primer experimento tiene como objetivo determinar si la estimulación temprana de la pubertad en nulíparas, mediante la exposición al verraco o la administración de PG600[®], está asociada a una mejora de la fertilidad al primer parto. Para ello, 382 nulíparas que no habían alcanzado la pubertad fueron seleccionadas de 5 lotes mensuales, de aproximadamente 300 nulíparas/lote, y distribuidas en dos grupos experimentales. El primero de ellos, **grupo PG600** (n = 181), fue conformado por nulíparas seleccionadas al azar a los 154 días de edad para recibir una inyección intramuscular (IM) de PG600[®] (5mL). El segundo grupo, **grupo Control** (n = 201), fue constituido por nulíparas que no recibieron tratamiento hormonal alguno y que fueron seleccionadas de los mismos lotes mensuales de los cuáles fueron seleccionadas las nulíparas tratadas con PG600[®]. La selección de las nulíparas para el grupo Control se llevó a cabo en base a que fueron las primeras hembras no tratadas hormonalmente en alcanzar la pubertad, tras el inicio de la exposición al verraco, de cada uno de los 5 lotes mensuales. El reflejo de inmovilidad en la nulípara durante la realización del test de presión sobre la grupa, en presencia del verraco, fue considerado como una respuesta de celo positiva. La exposición al verraco se inició a los 155 días de edad y se desarrolló introduciendo a los verracos dentro de los corrales de las nulíparas por un periodo de tiempo de 20-30 min por día, para estimular el inicio de la pubertad y facilitar la detección del primer celo. Posteriormente a la exposición directa, los verracos fueron

retirados a corrales adyacentes y, durante 4 h diarias, se permitió un contacto entre nulíparas y verracos a través de la valla de separación hasta alcanzarse la pubertad.

Las nulíparas tratadas con PG600[®] que alcanzaron la pubertad dentro de los 7 primeros días o pasados los 7 primeros días posteriores al tratamiento hormonal fueron clasificadas como nulíparas de respuesta de celo temprana o tardía a la PG600[®] (nulíparas **ER** y **LR**, respectivamente). Dentro del grupo Control, una respuesta de celo dentro de los 30 primeros días o pasados los 30 primeros días desde el inicio de la exposición al verraco clasificó a las nulíparas Control como selectas (**CS**) o no selectas (**NS**), respectivamente (Patterson *et al.*, 2010a). Alcanzada la pubertad, la exposición directa al verraco continuó diariamente hasta la detección del segundo celo, periodo durante el cual las nulíparas fueron entrenadas para el uso de sistemas automáticos de alimentación. Transcurrido este periodo de aprendizaje (4-5 semanas), todas las nulíparas fueron alojadas en jaulas individuales de inseminación, donde continuó su exposición al verraco. Las nulíparas fueron inseminadas por primera vez tras alcanzar un peso aproximado de 130 kg, independientemente del número total de celos previamente observados (de 2 a 5). La primera IA se llevó a cabo a la detección del primer celo y fue repetida 12 y 24 h después, si persistía el reflejo de inmovilidad en presencia del verraco. Los datos registrados en el presente experimento fueron: la edad, el peso y el espesor del tocino dorsal tanto en la selección de las nulíparas como a la primera IA; así como el número de celos observados, los índices de parto y de retorno al celo tras la primera IA y el tamaño de camada al primer parto (i.e., número total de lechones nacidos y de lechones nacidos vivos).

Del total de nulíparas en seguimiento, cuatro de ellas tratadas con PG600[®] fueron retiradas del experimento (dos de ellas, no alcanzaron la pubertad y otras dos, fueron sacrificadas por cojera y una pobre condición corporal, respectivamente). La proporción de nulíparas que alcanzaron la pubertad dentro de los 7 primeros días postratamiento fue superior en el grupo PG600, comparado con el grupo Control ($67.5 \pm 4.3\%$ vs. $5.7 \pm 1.9\%$, respectivamente; $P \leq 0.0001$). Sin embargo, en el día 30 postratamiento, un mayor porcentaje de nulíparas Control habían alcanzado la pubertad, con respecto a aquellas tratadas con PG600[®] que habían mostrado el primer celo ($84.7 \pm 3\%$ vs. $75.7 \pm 3.7\%$, respectivamente; $P = 0.08$). Las nulíparas con una respuesta rápida de celo al tratamiento con PG600[®] y aquellas Control selectas presentaron una menor edad a la primera IA, en comparación con sus homólogas de respuesta tardía al tratamiento hormonal y a la exposición al verraco; siendo las nulíparas con una respuesta rápida de celo a la PG600[®] las de menor edad ($P \leq 0.001$; Tabla 1). Las nulíparas con una respuesta rápida de celo a la PG600[®] presentaron un mayor peso a la primera IA, con respecto a las nulíparas Control selectas ($P \leq 0.001$); siendo las nulíparas con una respuesta tardía de celo a la PG600[®] las de mayor peso a la primera IA, al ser comparadas con sus homólogas de respuesta rápida a la estimulación hormonal ($P = 0.03$). No se observaron diferencias significativas en el espesor del tocino dorsal a la primera IA entre los distintos grupos. La proporción de nulíparas con 3 o más celos observados en el momento de la primera IA fue mayor dentro del grupo de nulíparas Control selectas, en comparación con los grupos de nulíparas que presentaron tanto una respuesta de celo temprana como tardía a la PG600[®] ($P \leq 0.001$). No se detectaron diferencias significativas en el índice de partos ni en el tamaño de camada entre los cuatro grupos de tratamiento.

El segundo experimento tiene como objetivo establecer si un periodo de lactación prolongado (i.e., 5 semanas), asociado a un protocolo de inducción y sincronización del celo con PG600[®] al destete, es capaz de mejorar la fertilidad de la cerda primípara al segundo parto. Un total de 472 cerdas primíparas lactantes fueron incluidas en este experimento, el cual fue desarrollado a lo largo de un año y distribuyó a las primíparas en 7 réplicas. Después de 3 semanas de lactación, las cerdas primíparas fueron asignadas aleatoriamente a uno de cuatro tratamientos: 1) **W3** (n = 165); destete a los 21 días de lactación, sin administración de PG600[®] al destete, 2) **W5** (n = 103); destete de la camada original a los 21 días de lactación y transferencia inmediata de una segunda camada de lechones con 7 días de edad para una lactancia adicional de 2 semanas, sin administración de PG600[®] al destete final después de 5 semanas de lactación, 3) **W3+P** (n = 108); destete a los 21 días de lactación y administración de una inyección IM (5 mL) de PG600[®] al destete, y 4) **W5+P** (n = 96); destete de la camada original a los 21 días de lactación y transferencia inmediata de una segunda camada de lechones con 7 días de edad para una lactancia adicional de 2 semanas, con administración de una inyección IM (5 mL) de PG600[®] al destete final después de 5 semanas de lactación. Las camadas transferidas a las cerdas primíparas nodrizas fueron conformadas con lechones de 7 días de edad, que presentaban un peso y tamaño menores para su edad y que requerían de una nueva cerda nodriza con demostrada capacidad lactante. El número de lechones transferidos a la primípara nodriza fue idéntico al número de lechones que dicha hembra había amamantado previamente.

Tras el destete final, las cerdas primíparas fueron alojadas en jaulas individuales de inseminación para ser expuestas al verraco una vez al día, por un periodo aproximado de 1 h, y facilitar la detección del primer celo posdestete. A la detección de

dicho celo, y 24 h después si todavía persistía el reflejo de inmovilidad en presencia del verraco, fueron inseminadas. Los datos registrados en el presente experimento fueron: la duración total de la lactación de la cerda primípara, su número total de lechones destetados al primer parto, el intervalo destete-celo (IDC), los índices de parto y de retorno al celo tras la primera IA posdestete y el tamaño de camada al segundo parto (i.e., número total de lechones nacidos y de lechones nacidos vivos).

El número total medio de lechones destetados al primer parto fue superior para los grupos de cerdas primíparas que recibieron una segunda camada de lechones y prolongaron su lactación hasta las 5 semanas (W5 y W5+P; Tabla 1). Sin embargo, no existieron diferencias entre los grupos W5+P y W5 ni entre los grupos W3+P y W3 en cuanto al número total medio de lechones destetados al primer parto (Tabla 1). La proporción de primíparas W3+P que mostraron signos de celo dentro de los 6 primeros días posdestete, tras un periodo de lactación de 3 semanas y ser tratadas con PG600[®] al destete, aumentó en comparación con sus homólogas W3, que no recibieron dicho tratamiento hormonal tras 3 semanas de lactación (86.2% vs. 64.0%, respectivamente; $P < 0.001$). Sin embargo, el porcentaje de primíparas W5+P en celo hacia el día 6 posdestete no fue diferente del obtenido en el grupo de primíparas W5 observadas en celo durante los 6 primeros días posdestete (79.4% vs. 69.1%, respectivamente; $P = 0.13$). La proporción de primíparas sacrificadas antes de la primera IA posdestete para cada grupo de tratamiento no se vio afectada ni por la duración de la lactación ni por el tratamiento de inducción del celo posdestete; así como no existieron diferencias en el índice de partos entre los distintos tratamientos. En cuanto al tamaño de camada al segundo parto para el total de lechones nacidos vivos, éste mostró una tendencia a aumentar dentro del grupo de primíparas W5, en comparación con el grupo de

primíparas W5+P (14.0 ± 0.4 comparado con 13.1 ± 0.5 , respectivamente; $P = 0.1$), y también fue significativamente mayor en las primíparas W3 comparado con sus homólogas W3+P (12.1 ± 0.4 comparado con 11.3 ± 0.4 , respectivamente; $P < 0.05$). El tamaño de camada al segundo parto para el total de lechones nacidos fue similar entre las primíparas W5+P y W5 (14.0 ± 0.5 y 14.5 ± 0.4 , respectivamente; $P = 0.36$), pero fue significativamente mayor para el grupo de primíparas W3 comparado con el obtenido en el grupo W3+P (12.6 ± 0.3 comparado con 11.7 ± 0.4 , respectivamente; $P < 0.05$). En términos generales, las primíparas pertenecientes a los grupos con una lactación extendida (W5 y W5+P) presentaron camadas de mayor tamaño al segundo parto, con respecto a sus homólogas destetadas a los 21 días de lactación (W3 y W3+P; $P < 0.001$).

El tercer experimento tiene como objetivo determinar si una respuesta de celo temprana o tardía al tratamiento con PG600[®] o a la exposición al verraco en nulíparas, para la inducción de su pubertad, afecta a la fertilidad a largo plazo de la cerda y a su longevidad en el ciclo reproductivo de la explotación. Para ello, un total de 532 nulíparas que no habían alcanzado la pubertad fueron utilizadas en el presente experimento. Los detalles del manejo de las nulíparas ya han sido previamente indicados dentro de este capítulo, durante el desarrollo metodológico llevado a cabo en el primer experimento de la Tesis Doctoral (Hidalgo *et al.*, 2014a). De forma resumida, a los 154 días de edad, cerdas nulíparas que no habían alcanzado la pubertad ($n = 260$) recibieron una inyección IM de 400 UI de gonadotropina coriónica equina (eCG) más 200 UI de gonadotropina coriónica humana (hCG; PG600[®], Merck Animal Health, NJ, USA). Las nulíparas Control, no tratadas hormonalmente, ($n = 272$) fueron seleccionadas de la misma población animal. Comenzando a los 155 días de edad, todas

las nulíparas fueron expuestas directamente a la exposición al verraco durante 20-30 min diarios, para estimular el inicio del primer celo y facilitar su detección. Las nulíparas tratadas con PG600[®] que alcanzaron la pubertad dentro de los 7 primeros días o pasados los 7 primeros días posteriores al tratamiento hormonal fueron clasificadas como nulíparas de respuesta de celo temprana o tardía a la PG600[®] (nulíparas **ER** y **LR**, respectivamente). Dentro del grupo Control, una respuesta de celo dentro de los 30 primeros días o pasados los 30 primeros días desde el inicio de la exposición al verraco clasificó a las nulíparas Control como selectas (**CS**) o no selectas (**NS**), respectivamente. Las nulíparas fueron inseminadas de forma artificial tras alcanzar un peso aproximado de 130 kg, independientemente del número total de celos observados (de 2 a 5). La primera IA se realizó a la detección del celo y, posteriormente, fue repetida a las 12 y 24 h posteriores a la primera detección del celo si persistía el reflejo de inmovilidad en presencia del verraco.

Un total de 480 nulíparas produjeron una primera camada de lechones al primer parto, y 472 de ellas fueron asignadas de forma aleatoria a uno de cuatro tratamientos después de 3 semanas de lactación. Las restantes 8 cerdas primíparas fueron sacrificadas por causas no reproductivas antes de concluir el periodo de lactación. Los detalles del manejo de las cerdas primíparas ya han sido previamente indicados dentro de este capítulo, durante el desarrollo metodológico llevado a cabo en el segundo experimento de la Tesis Doctoral (Hidalgo *et al.*, 2014b). De forma resumida, después de 3 semanas de lactación, las cerdas primíparas fueron asignadas aleatoriamente a uno de cuatro tratamientos: 1) **W3** (n = 165); destete a los 21 días de lactación, sin administración de PG600[®] al destete, 2) **W5** (n = 103); destete de la camada original a los 21 días de lactación y transferencia inmediata de una segunda camada de lechones con 7 días de

edad para una lactancia adicional de 2 semanas, sin administración de PG600[®] al destete final después de 5 semanas de lactación, 3) **W3+P** (n = 108); destete a los 21 días de lactación y administración de una inyección IM (5 mL) de PG600[®] al destete, y 4) **W5+P** (n = 96); destete de la camada original a los 21 días de lactación y transferencia inmediata de una segunda camada de lechones con 7 días de edad para una lactancia adicional de 2 semanas, con administración de una inyección IM (5 mL) de PG600[®] al destete final después de 5 semanas de lactación. No se llevó a cabo ninguna intervención adicional sobre las hembras y el seguimiento de los animales en estudio comprendió el periodo desde la cerda nulípara con 155 días de edad hasta la primera IA realizada tras el destete de la camada correspondiente al cuarto parto. La fertilidad de las hembras fue examinada según el número de camadas producidas y el número total de lechones producidos en dichas camadas; su longevidad fue valorada según el índice de retención observado una vez alcanzado el cuarto parto. Estas variables fueron elegidas para realizar los análisis oportunos porque las consideramos como los mejores indicadores de evaluación del rendimiento reproductivo de la cerda a largo plazo en una explotación porcina.

De las 532 nulíparas en las que se inició el experimento, 33 hembras tratadas con PG600[®] y 19 Controles fueron eliminadas del mismo sin que hubieran alcanzado el primer parto. Otras 5 nulíparas tratadas hormonalmente y 3 Controles fueron eliminadas después de producir una primera camada pero antes de ser asignadas a uno de los 4 grupos de tratamiento tras las 3 semanas de lactación, debido a causas no reproductivas. Ni la duración de la lactación en la cerda primípara ni el tratamiento con PG600[®] administrado al destete a las cerdas primíparas tuvieron ningún efecto significativo sobre alguno de los parámetros medidos en este experimento, de tal forma que solo los

efectos principales del tratamiento con PG600[®] administrado a las cerdas nulíparas sobre los parámetros registrados fueron evaluados. El tratamiento con PG600[®] en nulíparas para la inducción de la pubertad sí tuvo un efecto significativo sobre el índice de retención de las hembras en la explotación. El índice de retención de las nulíparas hasta alcanzar la primera IA posterior al destete de la camada correspondiente al cuarto parto tendió a ser inferior para el grupo de nulíparas LR comparado con el grupo de nulíparas NS (50% vs. 69.4%, respectivamente; $P = 0.09$; Tabla 1). Los índices de retención de las nulíparas ER y CS fueron intermedios (56.4% y 66.8%, respectivamente). El tipo de respuesta de celo al tratamiento asignado a las nulíparas para la inducción de la pubertad no mostró un efecto significativo ni sobre el tamaño medio de las camadas (total de lechones nacidos y nacidos vivos) ni sobre el número medio de camadas producidas por cerda durante el periodo evaluado (Tabla 1).

El objetivo del cuarto y último experimento de la Tesis Doctoral es determinar si los valores posdestete de resistencia eléctrica del moco vaginal (REV) pueden ser utilizados para predecir el momento de la ovulación en la cerda, considerando su número de partos y posibles variaciones estacionales. Un total de 76 cerdas con distinto número de parto (rango: 1-12 partos) fueron utilizadas en el presente experimento y distribuidas en 6 réplicas consecutivas. Cada una de las réplicas fue constituida al destete (réplicas del 1 al 6, $n = 22, 12, 12, 10, 10$ y 10 , respectivamente). Las estaciones del año evaluadas fueron: primavera (réplicas 1, 2 y 3; $n = 46$), otoño (réplicas 4 y 5; $n = 20$) e invierno (réplica 6; $n = 10$). Las cerdas destetadas fueron alojadas en jaulas individuales de inseminación y expuestas durante 5 min al día al verraco durante los 7 primeros días posdestete, con el fin de facilitar la detección del celo. La exposición al verraco comenzó al día siguiente al destete y se prolongó hasta el día 7 posdestete, para

determinar el inicio y el final del periodo de celo. Se llevó a cabo un seguimiento ecográfico, vía transrectal, del crecimiento folicular y del momento de la ovulación a las 91, 102, 115, 126, 140 y 146 h posdestete. El día del destete y la hora 2.00 pm del mismo se establecieron como Día 0 y Hora 0, respectivamente. El momento de inicio de la ovulación fue definido como aquel en el que comienzan a desaparecer los folículos de más de 6.5 mm de diámetro. Las mediciones de REV (n = 12 por cerda destetada) se llevaron a cabo según el siguiente esquema de tiempos: a las 20, 44, 68, 91, 96, 102, 115, 120, 126, 140, 146 y 164 h posdestete, utilizando una sonda vaginal cilíndrica Draminski[®] con dos electrodos en su extremo terminal. La sonda fue insertada en el tracto vaginal, dejando un cuarto de su longitud fuera del mismo. Cada lectura de REV fue tomada por el mismo operario y obtenida por triplicado, de forma que los tres valores se utilizaran para calcular su media aritmética.

Todas las cerdas que formaron parte del experimento mostraron signos de celo antes del día 5 posdestete: 8 cerdas (10.5%) a las 91 h, 57 (75%) a las 102 hs y 11 (14.5%) a las 120 h posdestete. Igualmente, todas ellas ovularon alcanzado el día 6 posdestete: 14 cerdas (18.4%) a las 102 h, 12 (15.8%) a las 115 h, 46 (60.5%) a las 126 h y 4 (5.3%) a las 140 h posdestete. El número medio de partos de las cerdas pertenecientes a las réplicas 1-6 fue de 4.2, 4.2, 4.6, 4.7, 6.0 y 6.5, respectivamente. Hubo un efecto significativo del número de partos sobre el momento de la ovulación, siendo las cerdas de menor edad las que presentaron una ovulación más temprana, respecto a sus homólogas de mayor edad (cerdas con 4.21 ± 0.21 , 4.06 ± 0.23 , 5.30 ± 0.12 y 5.25 ± 0.4 partos, ovulando a las 102, 115, 126 y 140 h posdestete, respectivamente; $P < 0.001$). Los valores de REV mostraron una tendencia cúbica a lo largo del experimento ($P = 0.0001$), descendiendo entre las 120 y las 31 h previas al

momento de la ovulación (considerando, ahora, al momento de la ovulación como Hora 0), para luego aumentar hasta las 40-50 h posteriores a la ovulación. Los valores medios máximo y mínimo de REV fueron de $46.5 \pm 4.6 \Omega$ a las 50 h posovulación y de $27.2 \pm 2.7 \Omega$ a las 30 h preovulación, respectivamente. Considerando el momento de la ovulación como Hora 0, los valores de REV fueron significativamente menores entre las 50 y las 5 h previas a la ovulación en el otoño ($P < 0.01$; Figura 1a) y entre las 40 y las 21 h previas a la ovulación en el invierno ($P < 0.01$; Figura 1b). No se detectaron diferencias en los valores de REV antes de la ovulación durante la estación primaveral (Figura 1c). Los valores de REV no fueron significativamente diferentes entre las cerdas que ovularon a las 102, 115, 126 y 140 h posdestete en ninguna de las mediciones realizadas antes de la ovulación (Figura 2a). Sin embargo, la REV en el momento de la ovulación (Hora 0) fue significativamente mayor en el grupo de cerdas que ovularon a las 126 h posdestete, en comparación con aquellas que ovularon a las 115 y a las 102 h posdestete (36.3 ± 0.82 , 31.8 ± 1.52 y $31.0 \pm 1.54 \Omega$, para los grupos de cerdas que ovularon a las 126, 115 y 102 h posdestete, respectivamente; $P = 0.01$; Figura 2b). No se obtuvo relación entre el momento de la medición que aportó el valor más bajo de REV y el momento observado de la ovulación.

Capítulo 10. Discusión general

El tratamiento con gonadotropinas exógenas (p. e., PG600[®]) en cerdas nulíparas que no han alcanzado la pubertad se trata de una práctica habitual utilizada para instaurar el inicio de su actividad ovárica cíclica (Kirkwood, 1999). Sin embargo, considerando que las nulíparas que alcanzan antes la pubertad se suponen inherentemente más fértiles (Nelson *et al.*, 1990), y dado que dicho tratamiento está especialmente indicado en aquellas situaciones en las cuales se observan retrasos en el inicio de la pubertad, es razonable pensar que su empleo pueda provocar la inclusión de nulíparas relativamente menos fértiles y con un peor rendimiento reproductivo a largo plazo dentro de la explotación (Schukken *et al.*, 1994; Le Cozler *et al.*, 1998). A pesar de ello, adelantar el inicio de la pubertad y conseguir un pool de nulíparas cíclicas de reposición, que presenten un registro de varios ciclos estrales previos a la primera IA (Kirkwood, 2008), supone una estrategia que permite determinar el grado de fertilidad inherente a la nulípara, a la vez que garantiza el éxito de la reposición y el cumplimiento del objetivo anual del total de lechones destetados de la explotación.

Nuestro primer experimento fue llevado a cabo para determinar si la inducción temprana de la pubertad en la nulípara puede asociarse con una mejora de su fertilidad al primer parto. La hipótesis examinada plantea que las nulíparas que alcanzan la pubertad dentro de los 7 primeros días posteriores al tratamiento gonadotrópico son más fértiles que sus homólogas con una respuesta de celo más tardía (i. e., > 7 días) al tratamiento hormonal. En un intento por aumentar aún más la sensibilidad de la detección de las nulíparas menos fértiles, se llevó a cabo una comparación del grupo tratado con PG600[®] con un grupo de nulíparas Control selectas. Estas nulíparas fueron seleccionadas en base a que presentaron una respuesta rápida de celo (i. e., ≤ 30 días) tras el inicio de su exposición al verraco. Los resultados obtenidos indican que un

67,5% de las nulíparas tratadas con PG600[®] alcanzaron la pubertad dentro de los 7 primeros días postratamiento, resultado que coincide con los obtenidos en experimentos previos (Kirkwood, 1999; Manjarin *et al.*, 2009a,b). Por el contrario, únicamente el 5,7% de la población de nulíparas Control alcanzó la pubertad en el mismo periodo de tiempo tras el inicio de la exposición al verraco. Dichos resultados ponen de manifiesto que el tratamiento con PG600[®] a los 154 días de edad es útil para inducir una pubertad temprana. Sin embargo, y analizando el ciclismo de la actividad ovárica a través del registro de ciclos estrales previamente observados al momento de la primera IA, obtuvimos una mayor proporción de nulíparas Control con, al menos, 3 ciclos estrales antes de recibir su primer servicio de IA. Por lo tanto, aunque el tratamiento con PG600[®] proporcionó un estímulo suficiente a la mayoría de las nulíparas para alcanzar su pubertad dentro de los 7 primeros días posinyección, es posible que muchas de estas nulíparas tratadas hormonalmente no fueran lo suficientemente maduras, en términos fisiológicos, para mantener una actividad ovárica cíclica de forma regular y mostrar un adecuado comportamiento de celo. O bien la detención temporal de la actividad ovárica o la aparición de celos silentes pudieron afectar al ciclismo y/o a la regularidad de la actividad ovárica en dichas hembras, a priori, fisiológicamente menos maduras.

A nuestro juicio, este experimento se trata del primero que compara el rendimiento reproductivo de nulíparas que muestran una respuesta rápida o lenta de celo al tratamiento con gonadotropinas exógenas para la inducción de su pubertad. Sin embargo, y en contra de nuestras expectativas, no observamos diferencias en el índice de parto ni en el número de lechones nacidos al primer parto entre las nulíparas tratadas con PG600[®] que alcanzaron la pubertad dentro de los 7 primeros días postratamiento y aquellas con una respuesta de celo más tardía (i. e., > 7 días) a la inyección

gonadotrópica. En consecuencia, dicho resultado no prueba nuestra hipótesis y, bajo las condiciones del presente experimento, no se puede establecer una correlación entre una respuesta rápida de celo al tratamiento gonadotrópico para instaurar el inicio de la pubertad en la nulípara y una mejora de su fertilidad al primer parto. Es decir, que la inducción hormonal de la pubertad a una edad temprana (i. e., 154 días de edad) no parece ser un método eficaz para determinar qué nulíparas son las más indicadas para ser incluidas y retenidas dentro del ciclo reproductivo de la explotación y cuáles sacrificar antes de ser inseminadas, una vez alcancen un adecuado peso de mercado al sacrificio. Aunque observamos una tendencia a presentar tamaños de camada mayores y un mejor índice de parto en las nulíparas con una respuesta tardía de celo a la PG600[®], debemos indicar que el tamaño de la muestra en cada grupo de tratamiento fue relativamente bajo, lo cual supone una debilidad del experimento.

Este experimento no examinó una posible asociación entre la aparición de una pubertad temprana y la longevidad de la cerda dentro del ciclo reproductivo de la explotación. Sin embargo, otros investigadores han sugerido que una selección de nulíparas para una menor edad al inicio de la pubertad supone la inclusión en el ciclo reproductivo de la explotación de hembras relativamente más fértiles, con una esperada mejora de su rendimiento reproductivo a largo plazo. Dicha mejora ha sido valorada en términos de un incremento del índice de retención de dichas cerdas dentro de la explotación durante los 3 primeros (Patterson *et al.*, 2010a) o los 6 primeros partos (Flowers, 2011), o bien a través de un aumento del número medio de partos de la cerda al sacrificio (Holder *et al.*, 1995). Consideramos, por lo tanto, que se trata de un aspecto a tener en consideración dentro de los programas de evaluación y selección de las nulíparas que se convertirán en futuras hembras reproductoras.

Nuestro segundo experimento fue desarrollado con el objetivo de estudiar el efecto de una lactación prolongada (i. e., de 5 semanas) en cerdas primíparas, junto con la inducción y sincronización del celo posdestete con PG600[®], sobre su fertilidad al segundo parto. La hipótesis propone la consecución de una mejora de la fertilidad al segundo parto en las primíparas seleccionadas para experimentar una lactación de 5 semanas, con respecto a sus homólogas destetadas a los 21 días de lactación; así mismo, plantea una mejora en su inducción y sincronización del celo posdestete, resultante en un aumento del índice de parto y del tamaño de camada al segundo parto, tras la administración de PG600[®] al destete.

Los resultados obtenidos confirman a la cerda primípara como tendente a presentar una recuperación relativamente lenta de su actividad ovárica posdestete. Igualmente, se aprecia cómo el tratamiento con PG600[®] al destete incrementa la proporción de hembras en celo dentro de los 6 primeros días posdestete, situación particularmente más evidente cuando la duración de la lactación es relativamente corta, facilitando la consecución de los objetivos semanales de inseminación (Kirkwood, 1999). La presencia de intervalos destete-celo (IDC) prolongados (i. e., > 5 días), además de dificultar el cumplimiento de los objetivos de inseminación, está asociada con una reducción del rendimiento reproductivo de la cerda (Wilson and Dewey, 1993) y con un aumento de su probabilidad de sacrificio a una edad temprana (Tantasuparuk *et al.*, 2001). La administración de gonadotropinas al destete, dentro del mismo lote de cerdas destetadas, permite asegurar la sincronización del momento de aparición del celo posdestete. Esta sincronización va a asegurar una menor variación de las posteriores fechas de inseminación y parto y, por lo tanto, minimizar la variabilidad en la edad de

los lechones al destete al siguiente parto. Uno de los principales factores que contribuyen a la aparición de IDC prolongados es una ingesta nutritiva inadecuada durante la lactación, situación que desemboca en una consiguiente pérdida de condición corporal al destete. Todo ello, en conjunto, compromete el reinicio de la actividad ovárica y el crecimiento y desarrollo foliculares después de la lactación (Eissen *et al.*, 2003; Schenkel *et al.*, 2010) y, debido a su menor apetito innato, se trata de una situación que se da con más frecuencia en la cerda primípara. Por ello, frente a un análisis de los registros semanales de inseminación que muestre un aumento de los IDC, una posible actuación para corregir este problema la encontramos en el uso de la estimulación hormonal del celo posdestete (p. e., con PG600®). Varios experimentos previos han examinado los efectos de las gonadotropinas exógenas sobre los IDC, y todos ellos coinciden en que su administración al destete acorta dichos intervalos y mejora la sincronización del inicio del periodo de celo posdestete (De Rensis *et al.*, 2003; Kirkwood *et al.*, 1998a). Los resultados obtenidos en nuestro experimento también confirman dichos efectos.

Revisando la extensa bibliografía al respecto, podemos constatar la gran variabilidad de resultados de fertilidad al siguiente parto tras el uso de las gonadotropinas exógenas para inducir y sincronizar el celo posdestete. Este hecho se debe, en parte, a la falta de sincronización entre la IA y el momento de la ovulación. En este punto, es importante recordar que la inducción gonadotrópica del celo adelanta su inicio y prolonga el periodo de celo, lo cual dificulta en gran medida la elección del momento exacto de la IA y su sincronización con la ovulación, si no se tiene en consideración este aspecto (Knox *et al.*, 2001). Los resultados de nuestro experimento no muestran diferencias en los índices de parto entre las primíparas que experimentaron

una lactación de 35 días, independientemente de que recibieran o no el tratamiento con PG600[®] al destete. Sin embargo, en el grupo de primíparas destetadas después de 35 días de lactación y administradas PG600[®] al destete, sí observamos una tendencia a presentar camadas de menor tamaño al segundo parto, en comparación con sus homólogas con la misma duración de la lactación pero no tratadas con PG600[®]. Al combinar el tamaño de camada y el índice de parto, detectamos cómo las primíparas destetadas tras 5 semanas de lactación y administradas PG600[®] al destete produjeron, de media, 1,5 lechones menos por cerda inseminada, al ser comparadas con sus homólogas no tratadas con PG600[®]. Un descenso de tal calibre en rendimiento contrarresta los beneficios asociados al uso de la PG600[®] en la cerda primípara destetada tras 35 días de lactación. En el grupo de primíparas destetadas a las 21 días de lactación, el tratamiento con PG600[®] al destete también provocó un descenso en los tamaños de camada al segundo parto. Esta situación pone de manifiesto la existencia de un equilibrio o compensación entre la reducción en tiempo del IDC y el descenso del tamaño de camada al siguiente parto, en lo que respecta a las primíparas destetadas a los 21 días de lactación. Esta observación de camadas de menor tamaño podría reflejar la existencia de una menor fertilidad inherente en algunas de las hembras primíparas que fueron inducidas hormonalmente para salir en celo tras el destete, con respecto a aquellas no inducidas con PG600[®] y que dispusieron de más tiempo para su recuperación energética y metabólica antes de la primera IA posdestete.

Independientemente de la administración o no de PG600[®] al destete, nuestros resultados muestran un aumento significativo de los tamaños de camada (número total de lechones nacidos y nacidos vivos) al segundo parto en las cerdas primíparas que recibieron una nueva camada de lechones para ser amamantados durante 14 días y

prolongaron su primera lactación hasta el día 35. Los lechones transferidos a las nuevas hembras nodrizas presentaban únicamente 7 días de edad y eran, por lo tanto, de menor tamaño y con una menor exigencia en la succión de leche que su camada originalmente destetada. Además, aunque no se determinó en este experimento, la ingesta alimentaria de la cerda probablemente se mantuvo en niveles aceptables. El resultante de la reducción en las demandas metabólicas para la lactación debido a la succión de los lechones, junto con unos planos de nutrición mantenidos o posiblemente en aumento, probablemente contribuyó a la obtención de unos resultados similares a aquellos que se producen con la técnica del “Split Weaning” o Destete Dividido. La técnica del “Split Weaning” consiste en destetar a los lechones de mayor peso de la camada unos días antes que al resto de la misma. Zak y cols. (2008) observaron cómo una reducción drástica de la demanda energética para la lactación provoca un aumento de la concentración plasmática circulante de la hormona luteinizante (LH), mejorando el reinicio del crecimiento folicular ovárico posdestete. Por lo tanto, y aunque especulativo, sugerimos que el efecto neto de una mejora del estado metabólico al destete se podría traducir en un aumento del índice ovulatorio al primer celo posdestete y en una mejora de la calidad de los oocitos ovulados (Zak *et al.*, 1997). En conjunto, todo ello resultaría en un aumento del número de embriones viables, con el consiguiente aumento del tamaño de camada al siguiente parto. Desde un punto de vista económico, los beneficios obtenidos como consecuencia de amamantar el excedente de lechones y la posterior mejora del tamaño de camada al siguiente parto necesitan ser sopesados con el retraso que se produce del momento de la inseminación de la cerda y el alargamiento del intervalo entre partos en las hembras utilizadas como madres adoptivas.

Nuestro tercer experimento fue desarrollado con el objetivo de examinar si la administración o no de gonadotropinas exógenas para la inducción de la pubertad en cerdas nulíparas afecta a la fertilidad a largo plazo de la cerda y, en consecuencia, a su longevidad dentro del ciclo reproductivo de la explotación, considerando el tipo de respuesta de celo observada al tratamiento hormonal. La hipótesis propone que tanto la fertilidad a largo plazo como la longevidad de las nulíparas con una respuesta rápida de celo a la estimulación hormonal podrían encontrarse en niveles semejantes a los de aquellas que alcanzan la pubertad de forma natural a una edad más temprana tras la exposición al verraco, consideradas como las futuras hembras reproductoras más fértiles y con una mayor longevidad en una población dada (Patterson *et al.*, 2010a). Esta situación implicaría que una respuesta rápida de celo a la PG600[®], al igual que en el caso de la exposición al verraco, para la inducción de la pubertad, podría relacionarse con una mayor madurez fisiológica del eje hipotálamo-hipófisis-ovárico a una edad cronológica dada, y asociarse con un mejor rendimiento reproductivo a largo plazo de la cerda.

La pregunta principal a la cual hemos intentado dar respuesta es; ¿podríamos utilizar la respuesta de celo al tratamiento con PG600[®] en cerdas nulíparas para la inducción de su pubertad como herramienta reproductiva para predecir su rendimiento reproductivo a largo plazo? Si esto fuera así, con las cerdas nulíparas más fértiles mostrando una respuesta de celo más rápida a la PG600[®] con respecto a las nulíparas menos fértiles, una ventaja económica del tratamiento podría identificarse en base al número de camadas producidas y/o a la producción total de lechones a lo largo de un periodo definido de tiempo. El análisis de datos no reveló un efecto a largo plazo sobre los tamaños de camada ni sobre el número medio de camadas producidas por cerda del

tratamiento con PG600[®] administrado para inducir la pubertad en cerdas nulíparas. Esta situación demuestra que la productividad a largo plazo de la cerda tras su inducción prematura de la pubertad no se ve afectada, independientemente de la respuesta de celo al tratamiento hormonal, lo que confirma resultados previos (Holtz *et al.*, 1999; Kirkwood *et al.*, 2000). De una forma similar, y apoyando los resultados de experimentos previos (Kirkwood *et al.*, 1998b; Vargas *et al.*, 2006), no encontramos ningún efecto de la inducción hormonal del primer celo posdestete tras el primer parto sobre el rendimiento reproductivo de la cerda en los siguientes partos.

Si se considera que dentro de una población dada de nulíparas, encontramos una distribución normal de potenciales fertilidades, nosotros además planteamos que las nulíparas con un potencial fértil relativamente elevado y, en consecuencia, con una mayor longevidad dentro del ciclo reproductivo de la explotación, responderán de una forma más rápida al tratamiento con PG600[®] administrado para inducir la pubertad. En el presente experimento, aunque la productividad a largo plazo después de la inducción de la pubertad con PG600[®] no se vio afectada, considerando las respuestas de celo, una menor proporción de nulíparas LR alcanzaron el cuarto parto y fueron inseminadas para producir una quinta camada, en comparación con las nulíparas NS; siendo intermedios los índices de retención al cuarto parto de las nulíparas ER y CS. Estos resultados contrastan con los observados en el estudio de Kirkwood y *cols.* (2000), en donde la inducción de la pubertad en nulíparas con PG600[®] no afectó a la longevidad de la cerda. Sin embargo, en dicho estudio, sus autores no se centraron en el tipo de respuesta de celo a la terapia hormonal con PG600[®], pero es muy significativo que las nulíparas recibieron el tratamiento gonadotrópico a una edad (i. e., > 180 días) y a un peso vivo (i. e., > 110 Kg) superiores, en comparación con los ejemplares de nuestro experimento.

En tales condiciones de edad y peso, históricamente, podría esperarse el inicio de forma natural de la pubertad, pero también una respuesta de celo más rápida a la PG600[®] administrada para inducir la pubertad. Sin embargo, bajo las condiciones de nuestro estudio, con nulíparas significativamente más jóvenes y de menor peso, es lógico pensar en la existencia de un cierto grado de inmadurez fisiológica o relativa infertilidad en el momento de la administración del tratamiento gonadotrópico, así como en la aparición de un rango más amplio de respuestas de celo a la PG600[®], con un posible efecto negativo sobre la longevidad de la cerda. En referente a nuestros resultados obtenidos, queremos indicar que debería considerarse que el tamaño muestral utilizado en cada uno de los grupos de tratamiento fue relativamente variable, y especialmente reducido para el grupo de nulíparas NS, debido al proceso de selección de las hembras, lo cual supone una debilidad de nuestro experimento. Sin embargo, incluso en esta situación, la tendencia en el caso de los tamaños de camada, el número de camadas producidas por cerda y el índice de retención al cuarto parto favoreció a la población de nulíparas Control.

El último experimento de nuestra Tesis Doctoral fue diseñado para determinar la existencia de una posible relación entre la resistencia eléctrica posdestete del moco vaginal (REV) y el momento de la ovulación. Los efectos del número de parto de la cerda y de la estación del año fueron considerados para valorar la fiabilidad de la REV como herramienta de predicción del momento de la ovulación. La hipótesis propone a las cerdas destetadas que muestran una pronta ovulación durante el periodo de celo como aquellas que van a presentar un incremento temprano de los valores posdestete de REV, tras alcanzar su valor mínimo, y que dicho incremento podría ser utilizado para predecir el momento de la ovulación.

Una correcta sincronización entre la IA y el momento de la ovulación es crucial para conseguir unos buenos índices de fertilidad en cerdas destetadas, hecho que adquiere una mayor importancia cuando se utiliza un protocolo de IA a tiempo fijo con una sola inseminación o se llevan a cabo IA con una reducción del número de espermatozoides por dosis. Numerosos experimentos han demostrado cómo la fluctuación de la REV durante el ciclo estral es el reflejo de los cambios en la concentración plasmática de las hormonas gonadotropinas y esteroideas a lo largo del mismo (Aboul-Ela *et al.*, 1983; Dusza *et al.*, 1996; Řezáč *et al.*, 2009). Por este motivo, distintas sondas vaginales (Walsmeta[®], Goldfinger[®], Draminski[®]) han sido utilizadas durante el periodo del periestro o a lo largo del ciclo estral para la monitorización no invasiva de la REV en cerdas nulíparas cíclicas, primíparas y multíparas, con el objetivo de detectar el inicio del periodo de celo. Sin embargo, y a nuestro juicio, no existe información sobre el potencial uso de la REV para detectar el momento de la ovulación.

Los resultados de nuestro experimento muestran cambios significativos en la REV de cerdas destetadas antes de la ovulación, pero no apoyan nuestra hipótesis de que los niveles preovulatorios de REV difieran entre las cerdas que presentan una ovulación temprana o tardía. La evolución posdestete de la REV en este experimento no difiere de la observada en experimentos previos, con un descenso gradual tras el destete seguido de un incremento progresivo antes de la ovulación. La disminución de los valores de REV se ha asociado con el aumento progresivo de la concentración plasmática de estradiol que tiene lugar antes de la ola preovulatoria de LH. Con el descenso paulatino de los niveles plasmáticos de estradiol, la REV aumenta gradualmente hasta que tiene lugar el pico preovulatorio de LH (Dusza *et al.*, 1996). En

nuestro experimento, los cambios en los valores de REV tuvieron lugar durante un periodo de tiempo de entre 4 y 5 días, mientras que la diferencia de tiempo registrada entre las ovulaciones tempranas y tardías observadas fue inferior a las 30 h. Por lo tanto, es muy probable que los cambios periovulatorios en los valores de REV, asociados a los diferentes momentos de ovulación observados, sean mínimos e imperceptibles como para ser detectados con precisión, especialmente cuando la REV parece no estar directamente asociada a la propia ovulación en sí, pero sí a los cambios en los niveles plasmáticos de las hormonas sexuales a lo largo del ciclo estral (Dusza *et al.*, 1996; Řezáč *et al.*, 2009). Además, los valores de REV fueron altamente variables entre las cerdas estudiadas en todas las mediciones llevadas a cabo. Esta variabilidad tiene su base muy probablemente en el efecto de diversos factores externos sobre la cerda como, por ejemplo, la estación del año, su número de parto o el IDC, factores que actúan directamente a nivel vaginal y también a través de cambios en los niveles plasmáticos de las hormonas sexuales (Řezáč *et al.*, 2002; 2009). Un experimento previo, desarrollado por Řezáč *y cols.* (2009), establece que los IDC más cortos se encuentran asociados con unos valores más bajos de REV obtenidos antes tras el inicio del periodo de celo. Aunque no observamos dicho efecto en nuestro experimento, sí encontramos un efecto estacional significativo sobre la REV que pudo contribuir a la alta variabilidad observada de sus valores entre los animales en estudio, así como a la falta de correlación detectada entre el momento en el que se observa el valor más bajo de REV y el momento de la ovulación. Además de por factores externos, la REV en la cerda también puede verse afectada por factores internos e inherentes al animal, tales como la propia composición del moco vaginal, su densidad o la temperatura corporal del animal. En este sentido, se ha observado cómo la variación en el contenido de mucina del moco vaginal de la mujer, durante el ciclo menstrual, influye en su viscoelasticidad (Wolf *et*

al., 1980) y, también, cómo los cambios en los niveles plasmáticos de estrógenos a lo largo del mismo alteran su composición electrolítica (Na^+ , K^+ y Cl^- ; Gould and Ansari, 1981).

Capítulo 11. Conclusiones

Chapter 11. Conclusions

Teniendo en cuenta que el objetivo general de la presente Tesis Doctoral es la mejora del rendimiento reproductivo de la cerda mediante la identificación de las nulíparas con el mayor potencial fértil y la implantación de nuevas estrategias de manejo de la reproducción que mejoren la fertilidad a largo plazo, y considerando los resultados obtenidos, podemos formular las siguientes conclusiones:

PRIMERA:

El tratamiento con PG600[®] en cerdas nulíparas que no han alcanzado la pubertad proporciona una herramienta reproductiva eficaz para la inducción de una pubertad temprana, obteniéndose tanto un índice de partos como unos tamaños de camada de lechones nacidos vivos al primer parto en niveles similares a los observados en el grupo de nulíparas Control selectas. De igual forma, podemos constatar que las nulíparas que no manifiestan una respuesta rápida de celo a la estimulación hormonal no ven comprometida su posterior fertilidad al primer parto.

SEGUNDA:

Las cerdas primíparas destetadas a los 21 días de lactación tienden a presentar un retorno al celo posdestete relativamente lento. Por lo tanto, su tratamiento con PG600[®] al destete permite aumentar la proporción de dichas hembras en celo dentro de los 6 primeros días posdestete. Por el contrario, podemos observar cómo las ventajas del uso del tratamiento gonadotrópico al destete para la inducción y sincronización del celo son menos evidentes en el grupo de primíparas destetadas tras 5 semanas de lactación, ya que la mejora obtenida ante la reducción del intervalo destete-celo se ve contrarrestada

por una reducción de su rendimiento reproductivo al segundo parto, rendimiento medido en términos del número total de lechones producidos por cerda inseminada.

TERCERA:

Independientemente de la administración o no del tratamiento gonadotrópico al destete, se observa un incremento significativo en los posteriores tamaños de camada al segundo parto en aquellas cerdas primíparas que experimentaron una primera lactación de 5 semanas de duración. Este resultado muestra a la cerda primípara nodriza como una alternativa para la cría del excedente de lechones, a la vez que supone una estrategia de manejo de la reproducción que permite mejorar su posterior tamaño de camada al siguiente parto.

CUARTA:

El tratamiento con gonadotropinas exógenas en cerdas nulíparas para la inducción de la pubertad no incrementa la probabilidad de incluir nulíparas menos fértiles en el ciclo reproductivo. Sin embargo, aunque la inducción hormonal de la pubertad a una edad temprana no parece ser una herramienta reproductiva eficaz para la selección de nulíparas con el mayor potencial fértil a largo plazo, una respuesta de celo tardía a la administración de gonadotropinas exógenas en cerdas nulíparas a los 154 días de edad podría ser predictiva de nulíparas con una probabilidad reducida de ser retenidas al cuarto parto.

QUINTA:

A pesar de las variaciones detectadas en la resistencia eléctrica del moco vaginal antes y después del momento de la ovulación, y considerando tanto el efecto estacional como del número de parto sobre la resistencia eléctrica del moco vaginal y el momento de la ovulación, respectivamente, podemos concluir que las diferencias en la resistencia eléctrica del moco vaginal no pueden ser utilizadas para predecir de forma exacta el momento de la ovulación en la cerda.

Given that the overall objective of the present Ph.D. dissertation is the improvement of sow reproductive performance by identifying gilts with the greatest fertile potential, and the implantation of new reproductive management strategies that enhance long-term fertility, and considering the results obtained, we can state the following conclusions:

FIRST:

PG600[®] treatment is an effective tool to induce an earlier estrus in prepubertal gilts, showing that both subsequent farrowing rate and born alive litter size at the first parity compare favorably to those of select gilts. Furthermore, gilts failing to respond promptly to hormonal stimulation do not exhibit compromised fertility at the first parity.

SECOND:

Primiparous sows weaned after 21 days of lactation may be relatively slow returning to estrus after weaning; therefore, treatment of these sows with PG600[®] at weaning is a useful tool to increase the proportion of sows in estrus within 6 days of weaning. In contrast, among sows lactating for 5 weeks, the advantages of using PG600[®] at weaning are less clear in that improvement in weaning to estrus interval is offset by a reduced reproductive performance at the second parity, as measured by pigs produced per sow bred.

THIRD:

Independently of administering or not the gonadotrophin treatment at weaning, a significant increase in subsequent litter sizes at the second farrowing for primiparous sows experiencing a 5-week-long first lactation is observed. This result shows primiparous nursing sows as an alternative for raising excess piglets while also improving their subsequent litter size at the second parity.

FOURTH:

Gonadotrophin treatment of gilts to induce puberty does not increase the likelihood of introducing less fertile gilts in the breeding herd. However, although hormonal induction of puberty at an early age does not appear to be an effective reproductive tool of selecting gilts with the greatest long-term fertility, a late estrus response to administration of exogenous gonadotrophins to pre-pubertal gilts at 154 days of age could be predictive of gilts with a reduced likelihood of retention to parity 4.

FIFTH:

In spite of the variations detected in the vaginal electrical resistance prior to and after ovulation, and considering both the seasonal effect and parity number on the vaginal electrical resistance and time of ovulation, respectively, we conclude that differences in the vaginal electrical resistance cannot be used to accurately predict the time of ovulation in sows.

Capítulo 12. Bibliografía

A

Aboul-Ela, M.B., Topps, J.H., Macdonald, D.C. 1983. Relationships between intravaginal electrical resistance, cervicovaginal mucus characteristics and blood progesterone and LH. *Animal Reproduction Science*. 5: 259-273.

Adashi, E.Y. 1995. Insuline-like growth factors as determinants of follicular fate. *Journal of the Society for Gynecologic Investigation*. 2: 721-726.

Aherne, F.X., Christopherson, R.J., Thompson, J.R., Hardin, R.T. 1976. Factors affecting the onset of puberty, postweaning oestrus and blood hormone levels of Lacombe gilts. *Canadian Journal of Animal Science*. 56: 681-692.

Aherne, F.X., Kirkwood, R.N. 1985. Nutrition and sow prolificacy. *Journal of Reproduction and Fertility*. 33 (Supplement): 169-183.

Ahima, R.S., Dushay, J., Flier, S.N., Prabakaran, D., Flier, J.S. 1997. Leptin accelerates the onset of puberty in normal female mice. *The Journal of Clinical Investigation*. 99: 391-395.

Albertini, D.F., Anderson, E. 1974. The appearance and structure of intercellular connections during the ontogeny of the rabbit ovarian follicle with particular reference to gap junctions. *The Journal of Cell Biology*. 63: 234-250.

Allrich, R.D., Christenson, R.K., Ford, J.J. 1985. Age at puberty and estrus activity of straightbred and reciprocal crossbred gilts. *Animal Reproduction Science*. 8: 281-286.

Anderson, L.L., Melampy, R.M. 1972. Factors affecting ovulation rate in the pig. In: *Pig Production* (ed. D.J.A. Cole). Pp. 329-366. London, Butterworths.

B

Baker, R.D., Coggins, E.G. 1966. Induced ovulation and fertility in immature gilts. *Journal of Animal Science*. 25: 918 (Abstract).

Barash, I.A., Cheung, C.C., Weigle, D.S., Ren, H., Kabigting, E.B., Kuijper, J.L., Clifton, D.K., Steiner, R.A. 1996. Leptin is a metabolic signal to the reproductive system. *Endocrinology*. 137: 3144-3147.

Barb, C.R., Kraeling, R.R. 2004. Role of leptin in the regulation of gonadotropin secretion in farm animals. *Animal Reproduction Science*. 82-83: 155-167.

Bartlett, A., Pain, S.J., Hughes, P.E., Stott, P., van Wettere, W.H.E.J. 2009. The effects of PG600 and boar exposure on oestrus detection and potential litter size

following mating at either the induced (pubertal) or second oestrus. *Animal Reproduction Science*. 114: 219-227.

Bartlewski, P.M., Beard, A.P., Rawlings, N.C. 1999. The relationship between vaginal mucous impedance and serum concentrations of estradiol and progesterone throughout the sheep estrous cycle. *Theriogenology*. 51: 813-827.

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

Beltranena, E., Aherne, F.X., Foxcroft, G.R., Kirkwood, R.N. 1991. Effects of pre- and postpubertal feeding on production traits at first and second estrus in gilts. *Journal of Animal Science*. 69: 886-893.

Beltranena, E., Aherne, F.X., Foxcroft, G.R. 1993. Innate variability in sexual development irrespective of body fatness in gilts. *Journal of Animal Science*. 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. *Journal of Animal Science*. 58: 165-173.

Bidanel, J.P., Gruand, J., Legault, C. 1996. Genetic variability of age and weight at puberty, ovulation rate and embryo survival in gilts and relations with production traits. *Genetics, Selection, Evolution*. 28: 103-115.

Bielańska-Osuchowska, Z. 2006. Oogenesis in pig ovaries during the prenatal period: ultrastructure and morphometry. *Reproductive Biology*. 6: 161-193.

Black, J.L., Erickson, B.H. 1968. Oogenesis and ovarian development in the prenatal pig. *The Anatomical Record*. 161: 45-55.

Booth, P.J. 1990. Metabolic influences on hypothalamic-pituitary-ovarian function in the pig. *Journal of Reproduction and Fertility*. 40 (Supplement): 89-100.

Braw-Tal, R. 2002. The initiation of follicle growth: the oocyte or the somatic cells? *Molecular and Cellular Endocrinology*. 187: 11-18.

Breeuwsma, A.J. 1974. Induction of oestrus and ovulation in prepubertal and anoestrous pigs. *Proceedings of the 3rd International Congress of the International Pig Veterinary Society*. Volume G14: 1-5. Lyon.

Britt, J.H., Day, B.N., Webel, S.K., Brauer, M.A. 1989. Induction of fertile estrus in prepubertal gilts by treatment with a combination of pregnant mare's serum gonadotropin and human chorionic gonadotropin. *Journal of Animal Science*. 67: 1148-1153.

Britt, J.H., Esbenschade, 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. *Biology of Reproduction*. 45: 478-485.

Brooks, P.H., Cole, D.J.A. 1970. Effect of the presence of a boar on attainment of puberty in gilts. *Journal of Reproduction and Fertility*. 23: 435-440.

Brooks, P.H., Smith, D.A. 1980. The effect of mating age on the reproductive performance, food utilization and liveweight change of the female pig. *Livestock Production Science*. 7: 67-78.

Bryan, K.A., Hagen, D.R. 1991. Effects of nutrient intake and sexual age of the dam at mating on fetal development in swine. *Growth, Development and Aging*. 55: 27-33.

Bubenik, G.A., Pang, S.F., Cockshut, J.R., Smith, P.S., Grovum, L.W., Friendship, R.M., Hacker, R.R. 2000. Circadian variation of portal, arterial and venous blood levels of melatonin in pigs and its relationship to food intake and sleep. *Journal of Pineal Research*. 28: 9-15.

C

Camous, S., Prunier, A., Pelletier, J. 1985. Plasma prolactin, LH, FSH and estrogen excretion patterns in gilts during sexual development. *Journal of Animal Science*. 60: 1308-1317.

Canipari, R. 1994. Cell-cell interactions and oocyte growth. *Zygote*. 2: 343-345.

Cardenas, H., Pope, W.F. 2002. Control of ovulation rate in swine. *Journal of Animal Science*. 80(Supplement 1): E36-E46.

Carter, P.D., Dufty, J.H. 1980. Assessment of vaginal impedance measurements as an indicator of oestrus in cattle. *Australian Veterinary Journal*. 56: 321-323.

Casida, L.E. 1935. Prepubertal development of the pig ovary and its relation to stimulation with gonadotrophic hormones. *The Anatomical Record*. 61: 389-396.

Caton, J.S., Jesse, G.W., Day, B.N., Eilersieck, M.R. 1986. The effect of duration of boar exposure on the frequency of gilts reaching first estrus. *Journal of Animal Science*. 62: 1210-1214.

Chakraborty, P.K., Reeves, J.J., Arimura, A., Schally, A.V. 1973. Serum LH levels in prepubertal female pigs chronically treated with synthetic luteinizing hormone-releasing hormone/follicle stimulating hormone-releasing hormone (LH-RH/FSH-RH). *Endocrinology*. 92: 55-61.

Christenson, R.K., Ford, J.J. 1979. Puberty and estrus in confinement-reared gilts. *Journal of Animal Science*. 49: 743-751.

- Christenson, R.K., Ford, J.J., Redmer, D.A. 1985.** Maturation of ovarian follicles in the prepubertal gilt. *Journal of Reproduction and Fertility*. 33(Supplement): 21-36.
- Christenson, R.K. 1986.** Swine management to increase gilt reproductive efficiency. *Journal of Animal Science*. 63: 1280-1287.
- 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.
- Clarke, I.J. 1989.** The GnRH/gonadotropin axis in the ewe, cow and sow. *Domestic Animal Endocrinology*. 6: 1-14.
- Climent, S., Bascuas, J.A. 1989.** Aparato urogenital. *En: Cuadernos de Anatomía y Embriología Veterinaria (eds. Climent-Bascuas)*. Pp. 97-176. Editorial Marban (2ª Edición), España.
- Climent, S., Sarasa, M., Muniesa, P., Latorre, R. 2005.** Desarrollo del aparato genital del macho y la hembra. *En: Manual de Anatomía y Embriología de los animales domésticos: conceptos básicos y datos aplicativos (ed. Climent)*. Pp. 311-328. Editorial Acribia, S.A. (1ª Edición), España.
- Clowes, E.J., Aherne, F.X., Schaefer, A.L., Foxcroft, G.R., Baracos, V.E. 2003.** Parturition body size and body protein loss during lactation influence performance during lactation and ovarian function at weaning in first-parity sows. *Journal of Animal Science*. 81: 1517-1528.
- Colenbrander, B., Kruip, Th.A.M., Dieleman, S.J., Wensing, C.J.G. 1977.** Changes in serum LH concentrations during normal and abnormal sexual development in the pig. *Biology of Reproduction*. 17: 506-513.
- Cosgrove, J.R. 1998.** Nutrition-endocrine interactions in the female pig. *In: Progress in Pig Science (eds. J. Wiseman-M.A. Varley-J.P. Chadwick)*. Pp. 343-360. Nottingham University Press, Nottingham.
- Cox, N.M. 1997.** Control of follicular development and ovulation rate in pigs. *Journal of Reproduction and Fertility*. 52 (Supplement): 31-46.
- Cronin, G.M., Hemsworth, P.H., Winfield, C.G., Muller, B., Chamley, W.A. 1983.** The incidence of, and factors associated with, failure to mate by 245 days of age in the gilt. *Animal Reproduction Science*. 5: 199-205.
- Culbertson, M.S., Mabry, J.W. 1995.** Effect of age at first service on first parity and lifetime sow performance. *Journal of Animal Science*. 73 (Supplement 1): 21 (Abstract).
- Cunningham, P.J., Naber, C.H., Zimmerman, D.R., Peo Jr., E.R. 1974.** Influence of nutritional regime on age at puberty in gilts. *Journal of Animal Science*. 39: 63-67.

Curtis, S.E. 1972. Air environment and animal performance. *Journal of Animal Science*. 35: 628-634.

D

D'Allaire, S., Drolet, R. 1999. Culling and mortality in breeding animals. *In: Diseases of Swine* (eds. B.E. Straw-S. D'Allaire-W.L. Mengeling-D.J. Taylor). 8th edition. Pp. 1003-1016.

Davidson, J.M. 1974. Hypothalamic-pituitary regulation of puberty: evidence from animal experimentation. *In: Control of the onset of puberty* (eds. M.M. Grumbach-G.D. Grave-F.E Mayer). Pp. 79-103. John Wiley and Sons, New York, USA.

De Rensis, F., Benedetti, S., Silva, P., Kirkwood, R.N. 2003. Fertility of sows following artificial insemination at a gonadotrophin-induced estrus coincident with weaning. *Animal Reproduction Science*. 76: 245-250.

Dekel, N. 1996. Protein phosphorylation/dephosphorylation in the meiotic cell cycle of mammalian oocytes. *Reviews of Reproduction*. 1: 82-88.

Dekel, N. 1999. Meiotic cell cycle, oocytes. *In: Encyclopedia of Reproduction* (eds. E. Knobil-J.D. Neill). Vol. 3: 168-176. Academic Press, San Diego, USA.

den Hartog, L.A., van Kempen, G.L.M. 1980. Relation between nutrition and fertility in pigs. *Netherlands Journal of Agricultural Science*. 28: 211-227.

den Hartog, L.A., Noordewier, G.J. 1984. The effect of energy intake on age at puberty in gilts. *Netherlands Journal of Agricultural Science*. 32: 263-280.

Dial, G.D., Duangkaew, C., King, V., Rademacher, C. 1996. The influence of the gilt pool on weaned pig output. *Proceedings of the Allen D. Leman Swine Conference*. 23: 39-41.

Diekman, M.A., Trout, W.E., Anderson, L.L. 1983. Serum profiles of LH, FSH and prolactin from 10 weeks of age until puberty in gilts. *Journal of Animal Science*. 56: 139-145.

Doroshkov, V.B. 1974. Stimulatory effect of males on reproductive performance of female pigs. *Animal Breeding Abstracts*. 42: 3830.

Driancourt, M.A. 2001. Regulation of ovarian follicular dynamics in farm animals. Implications for manipulation of reproduction. *Theriogenology*. 55: 1211-1239.

Du Mesnil Du Buisson, F., Manleon, P., Locatello, A., Mariana, J.C. 1970. Modification du moment et de l'étalement des ovulations après maîtrise de cycle sexual

de la truie. *Colloque st. Nat. Etude Steril-Fertil l'inhibition de l'ovulation*. Masson, Paris. Pp. 225-234.

Duncan, D.L., Lodge, G.A. 1960. Diet in relation to reproduction and viability of the young. *In: Pigs, Part III. Commonwealth Bureau of Animal Nutrition, Technical Communication No. 21*. Rowett Research Institute, Bucksburn, Aberdeen.

Dusza, L., Opalka, M., Kaminska, B., Kaminski, T., Ciereszko, R. 1996. The relationship between electrical resistance of vaginal mucus and plasma hormonal parameters during periestrus in sows. *Theriogenology*. 45: 1491-1503.

Dyck, G.W., Swierstra, E.E. 1983. Growth of the reproductive tract of the gilt from birth to puberty. *Canadian Journal of Animal Science*. 63: 81-87.

Dyck, G.W. 1988. Factors affecting sexual maturation, puberty and reproductive efficiency in the gilt. *Canadian Journal of Animal Science*. 68: 1-13.

Dziuk, P.J., Gehlbach, G.D. 1966. Induction of ovulation and fertilization in the immature gilt. *Journal of Animal Science*. 25: 410-413.

Dziuk, P.J., Dhindsa, D.S. 1969. Induction of heat, ovulation and fertility in gilts with delayed puberty. *Journal of Animal Science*. 29: 39-41.

Dziuk, P.J. 1991. Reproduction in domestic animals. *In: Reproduction in the Pig (ed. P.T. Cups)*. Pp. 471-489. Academic Press, New York.

E

Edwards, S.A. 1998. Nutrition of the rearing gilt and sow. *In: Progress in Pig Science (eds. J. Wiseman-M.A. Varley-J.P. Chadwick)*. Nottingham University Press, Nottingham, pp. 361-382.

Eissen, J.J., Apeldoorn, E.J., Kanis, E., Verstegen, M.W.A., de Greef, K.H. 2003. The importance of a high feed intake during lactation of primiparous sows nursing large litters. *Journal of Animal Science*. 81: 594-603.

Eliasson, L., Rydhmer, S., Einarsson, S., Andersson, K. 1991. Relationships between puberty and production traits in the gilt. 1. Age at puberty. *Animal Reproduction Science*. 25: 143-154.

Ellicott, A.R., Dziuk, P.J., Polge, C. 1973. Maintenance of pregnancy in prepubertal gilts. *Journal of Animal Science*. 37: 971-973.

Elsaesser, F., Parvizi, N., Schmitz, U. 1991. Inhibitory feedback action of oestradiol on tonic secretion of luteinizing hormone in pre- and postpubertal gilts. *Animal Reproduction Science*. 25: 155-168.

Eppig, J.J. 1979. Gonadotropin stimulation of the expansion of cumulus oophori isolated from mice: general conditions for expansion *in vitro*. *Journal of Experimental Zoology*. 208: 111-120.

Eppig, J.J. 2001. Oocyte control of ovarian follicular development and function in mammals. *Reproduction*. 122: 829-838.

Erickson, B.H. 1966. Development and senescence of the postnatal bovine ovary. *Journal of Animal Science*. 25: 800-805.

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. *Journal of Animal Science*. 54: 320-324.

Espey, L.L. 1999. Ovulation. In: *Encyclopedia of Reproduction* (eds. E. Knobil-JD. Neill). Vol. 3: 605-614. Academic Press, San Diego, USA.

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

Etienne, M., Legault, C. 1974. Effects of breed and diet on sexual precocity in the sow. *Journées de la recherché porcine en France*. Pp. 52-62. L'Institut Technique du Porc, Paris.

Evans, A.C.O., O'Doherty, J.V. 2001. Endocrine changes and management factors affecting puberty in gilts. *Livestock Production Science*. 68: 1-12.

F

Flowers, B., Cantley, T.C., Martin, M.J., Day, B.N. 1989. Effect of elevated ambient temperatures on puberty in gilts. *Journal of Animal Science*. 67: 779-784.

Flowers, B., Day, B.N. 1990. Alterations in gonadotropin secretion and ovarian function in prepubertal gilts by elevated environmental temperature. *Biology of Reproduction*. 42: 465-471.

Flowers, W.L., Esbenshade, K.L. 1993. Optimizing management of natural and artificial matings in swine. *Journal of Reproduction and Fertility*. 48(Supplement): 217-228.

Flowers, W.L. 2011. Prewaning management of replacement gilts and sow longevity. *Proceedings of the ADSA-ASAS Midwest 2011 annual meeting* (ed. G.S. Lewis). Des Moines, Iowa, 2011 Section Meeting Abstracts. *Journal of Animal Science*. 89 (Supplement 2): 8-9.

Foxcroft, G.R., Pomerantz, D.K., Nalbandov, A.V. 1975. Effects of estradiol-17 β on LH-RH/FSH-RH-induced, and spontaneous LH release in prepubertal female pigs. *Endocrinology*. 96: 551-557.

Foxcroft, G.R., Hunter M.G. 1985. Basic physiology of follicular maturation in the pig. *Journal of Reproduction and Fertility*. 33(Supplement): 1-19.

Franchi, L.L., Mandl, A., Zuckermann, S. 1962. The development of the ovary and the process of oogenesis. *In: The ovarian (ed. S. Zuckermann)*. Vol. 1. Academic Press, New York, USA.

Friend, D.W. 1973. Influence of dietary amino acids on the age at puberty of Yorkshire gilts. *Journal of Animal Science*. 37: 701-707.

Frisch, R.E. 1984. Body fat, puberty and fertility. *Biological Reviews of the Cambridge Philosophical Society*. 59: 161-188.

G

Galina, C., Valencia, J. 2008. Gametogénesis. *En: Reproducción de Animales Domésticos (eds. Marilise Mesquita Horn-Martina Fritsch)*. Pp. 43-57. Editorial Limusa (3ª Edición), México.

Garcia, M.R., Amstalden, M., Williams, S.W., Stanko, R.L., Morrison, C.D., Keisler, D.H., Nizielski, S.E., Williams, G.L. 2002. Serum leptin and its adipose gene expression during pubertal development, the estrous cycle, and different seasons in cattle. *Journal of Animal Science*. 80: 2158-2167.

Gaughan, J.B., Cameron, R.D., Dryden, G.M., Young, B.A. 1997. Effect of body composition at selection on reproductive development in large white gilts. *Journal of Animal Science*. 75: 1764-1772.

Geisert, R.D. 1999. Pigs. *In: Encyclopedia of Reproduction (eds. E. Knobil-J.D. Neill)*. Vol. 3: 792-799. Academic Press, San Diego, USA.

Gilula, N.B., Epstein, M.L., Beers, W.H. 1978. Cell-to-cell communication and ovulation: a study of the cumulus-oocyte complex. *The Journal of Cell Biology*. 78: 58-75.

Goode, L., Warnick, A.C., Wallace, H.D. 1965. Effect of dietary energy levels upon reproduction and the relation of endometrial phosphatase activity to embryo survival in gilts. *Journal of Animal Science*. 24: 959-963.

Gorski, R.A. 1974. Extrahypothalamic influences on gonadotrophin regulation. *In: Control of the Onset of Puberty (eds. M.M. Grumbach-G.D. Grave-F.E. Mayer)*. Pp. 182-207. John Wiley and Sons, New York, USA.

Gossett, J.W., Sorensen, A.M. 1959. The effect of two levels of energy and seasons on reproductive phenomena in gilts. *Journal of Animal Science*. 18: 40-47.

Gould, K.G., Ansari, A.H. 1981. Electrolyte interactions in cervical mucus and their relationship to circulating hormone levels. *Contraception*. 23: 507-516.

Green, M.L., Clapper, J.A., Diekman, M.A. 1999. Serum concentrations of melatonin during scotophase and photophase in 3, 4, 5 and 6 months old gilts and barrows. *Animal Reproduction Science*. 57: 99-110.

Greenwald, G.S., Roy, S. 1994. Follicular development and its control. *In: The Physiology of Reproduction (eds. E. Knobil-J.D. Neill)*. Pp. 629-724. New York: Raven Press, USA.

Grieger, D.M., Brandt, K.E., Diekman, M.A. 1986. Follicular fluid concentrations of estradiol-17 β and progesterone and secretory patterns of LH and FSH in prepubertal gilts reared in confinement or outdoor lots. *Journal of Animal Science*. 62: 751-758.

Gupta, K.A., Purohit, G.N. 2001. Use of vaginal electrical resistance (VER) to predict estrus and ovarian activity, its relationship with plasma progesterone and its use for insemination in buffaloes. *Theriogenology*. 56: 235-245.

Guthrie, H.D., Henricks, D.M., Handlin, D.L. 1972. Plasma estrogen, progesterone and luteinizing hormone prior to estrus and during early pregnancy in pigs. *Endocrinology*. 91: 675-679.

Guthrie, H.D. 1977. Induction of ovulation and fertility in prepubertal gilts. *Journal of Animal Science*. 45: 1360-1367.

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. *Domestic Animal Endocrinology*. 7: 83-91.

Guthrie, H.D., Grimes, R.W., Cooper, B.S., Hammond, J.M. 1995. Follicular atresia in pigs: Measurement and physiology. *Journal of Animal Science*. 73: 2834-2844.

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. *Biology of Reproduction*. 55: 543-547.

Guthrie, H.D. 2005. The follicular phase in pigs: Follicle populations, circulating hormones, follicle factors and oocytes. *Journal of Animal Science*. 83(Supplement): E79-E89.

H

Hacker, R.R., King, G.J., Smith, V.G. 1976. Effects of 6 and 18 hour light on reproduction in gilts. *Journal of Animal Science*. 43: 228 (Abstract).

Hacker, R.R., King, G.J., Ntunde, B.N., Narendran, R. 1979. Plasma estrogen, progesterone and other reproductive responses of gilts to photoperiod. *Journal of Reproduction and Fertility*. 57: 447-451.

Hafez, E.S.E., Hafez, B. 2000. Foliculogénesis, maduración del óvulo y ovulación. *En: Reproducción e Inseminación Artificial en Animales (eds. E.S.E. Hafez-B. Hafez)*. Pp. 70-83. Editorial McGraw-Hill Interamericana (7ª Edición), México.

Haines, C.E., Warnick, A.C., Wallace, H.D. 1959. The effect of two levels of energy intake on reproductive phenomena in Duroc Jersey gilts. *Journal of Animal Science*. 18: 347-354.

Hansen, A.V., Strathe, A.B., Kebreab, E., France, J., Theil, P.K. 2012. Predicting milk yield and composition in lactating sows: A Bayesian approach. *Journal of Animal Science*. 90: 2285-2298.

Hemsworth, P.H., Barnett, J.L., Hansen, C., Winfield, C.G. 1986. Effects of social environment on welfare status and sexual behaviour of female pigs. II. Effects of space allowance. *Applied Animal Behavior Science*. 16: 259-267.

Henricks, D.M., Guthrie, H.D., Handlin, D.L. 1972. Plasma oestrogen, progesterone and luteinizing hormone levels during the estrous cycle in pigs. *Biology of Reproduction*. 6: 210-218.

Hidalgo, D.M., Friendship, R.M., Greiner, L., Manjarin, R., Amezcua, M.R., Dominguez, J.C., Kirkwood, R.N. 2014a. Influence of gonadotrophin-induced first estrus on gilt fertility. *Reproduction in Domestic Animals*. (In press). <http://dx.doi.org/10.1111/rda.12390>

Hidalgo, D.M., Friendship, R.M., Greiner, L., Manjarín, R., Amezcua, M.R., Dominguez, J.C., Kirkwood, R.N. 2014b. Influence of lactation length and gonadotrophins administered at weaning on fertility of primiparous sows. *Animal Reproduction Science*. (In press). <http://dx.doi.org/10.1016/j.anireprosci.2014.06.034>

Hillier, S.G. 1981. Regulation of follicular oestrogen biosynthesis: a survey of current concepts. *Journal of Endocrinology*. 89 (Supplement 3): 1-148.

Hirshfield, A.N. 1991. Development of follicles in the mammalian ovary. *International Review of Cytology*. 124: 43-101.

Holder, R.B., Lamberson, W.R., Bates, R.O., Safranski, T.J. 1995. Lifetime productivity in gilts previously selected for decreased age at puberty. *Animal Science*. 61: 115-121.

Holtz, W., Schmidt-Baulain, R., Welp, C., Wallenhorst, C.K. 1999. Effect of insemination of estrus-induced prepuberal gilts on ensuing reproductive performance and body weight. *Animal Reproduction Science*. 57: 177-183.

Hughes, E.H. 1934. Some effects of Vitamin A-deficient diets on reproduction of sows. *Agricultural Research*. 49: 943-953.

Hughes, P.E., Cole, D.J.A. 1975. Reproduction in the gilt. 1. The influence of age and weight at puberty on ovulation rate and embryo survival in the gilt. *Animal Production*. 21: 183-189.

Hughes, P.E., Cole, D.J.A. 1976. Reproduction in the gilt. 2. Influence of gilt age at boar introduction on the attainment of puberty. *Animal Production*. 23: 89-94.

Hughes, P.E., Pearce, G.P., Paterson, A.M. 1990. Mechanisms mediating the stimulatory effects of the boar on gilt reproduction. *Journal of Reproduction and Fertility*. 40 (Supplement): 323-341.

Hughes, P.E. 1994. The influence of boar libido on the efficacy of the boar effect. *Animal Reproduction Science*. 35: 111-118.

Hughes, P.E. 1997. Reproductive management of the gilt. *The Pig Journal*. 40: 69-79.

Hughes, P.E., Philip, G., Siswadi, R. 1997. The effects of contact frequency and transport on the efficacy of the boar effect. *Animal Reproduction Science*. 46: 159-165.

Hughes, P.E., Smits, R.J., Xie, Y., Kirkwood, R.N. 2010. Relationships among gilt and sow liveweight, P2 backfat depth, and culling rates. *Journal of Swine, Health and Production*. 18: 301-305.

Hunter, M.G., Biggs, C., Foxcroft, G.R., McNeilly, A.S., Tilton, J.E. 1993. Comparisons of endocrinology and behavioural events during the periovulatory period in Meishan and Large-White hybrid gilts. *Journal of Reproduction and Fertility*. 97: 475-480.

Hunter, R.H.F. 1967. Porcine ovulation after injection of human chorionic gonadotrophin. *Veterinary Record*. 81: 21-23.

Hunter, R.H.F. 1988. The Fallopian tubes. Their role in fertility and infertility. *Springer-Verlag*, Berlin, Germany.

J

Jaramillo, L.M., Balcazar, I.B., Duran, C. 2012. Using vaginal wall impedance to determine estrous cycle phase in Lewis rats. *Laboratory Animals*. 41: 122-128.

Johnsen, H.H.K., Moustgaard, J., Hojgaard-Olsen, N. 1952. The significance of Vitamin B₁₂ for the fertility of sows and gilts. *Animal Breeding Abstracts*. 23: 784.

K

Kemp, B., Soede, N.M. 1996. Relationship of weaning-to-estrus interval to timing of ovulation and fertilization in sows. *Journal of Animal Science*. 74: 944-949.

Kerr, J.C., Cameron, N.D. 1995. Reproductive performance of pigs selected for components of efficient lean growth. *Animal Science*. 60: 281-290.

Kerr, J.C., Cameron, N.D. 1997. Variation in age at puberty in pigs with divergent selection for components of efficient lean growth rate. *Proceedings of the British Society of Animal Science*. Pp. 30.

Kingsbury, D.L., Rawlings, N.C. 1993. Effect of exposure to a boar on circulating concentrations of LH, FSH, cortisol and oestradiol in prepubertal gilts. *Journal of Reproduction and Fertility*. 98: 245-250.

Kirkwood, R.N., Hughes, P.E. 1980. A note on the influence of "boar effect" component stimuli on puberty attainment in the gilt. *Animal Production*. 31: 209-211.

Kirkwood, R.N., Forbes, J.M., Hughes, P.E. 1981. Influence of boar contact on attainment of puberty in gilts after removal of the olfactory bulbs. *Journal of Reproduction and Fertility*. 61: 193-196.

Kirkwood, R.N., Aherne, F.X. 1985. Energy intake, body composition and reproductive performance of the gilt. *Journal of Animal Science*. 60: 1518-1529.

Kirkwood, R.N., Thacker, P.A. 1992. Management of replacement breeding animals. *The Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice*. 8: 575-587.

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

Kirkwood, R.N., Ormand, C.J., Goonewardene, L.A. 1998b. Injection of PG600[®] at weaning of the first litter: Effects on sow lifetime performance. *Journal of Swine, Health and Production*. 6: 273-274.

Kirkwood, R.N. 1999. Pharmacological intervention in swine reproduction. *Journal of Swine, Health and Production*. 7: 29-35.

Kirkwood, R.N., Aherne, F.X., Monaghan, P.G., Misutka, S.C. 2000. Breeding gilts at natural or a hormone-induced estrus: Effects on performance over four parities. *Journal of Swine, Health and Production*. 8: 177-179.

Kirkwood, R.N. 2008. Hormonal control and manipulation of estrus and ovulation. *Journal of Swine, Health and Production.* 16: 7-14.

Klindt, J., Yen, J.T., Christenson, R.K. 1999. Effect of prepubertal feeding regimen on reproductive development of gilts. *Journal of Animal Science.* 77: 1968-1976.

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

Knox, R.V., Zas, S.L. 2001. Factors influencing estrus and ovulation in weaned sows as determined by transrectal ultrasound. *Journal of Animal Science.* 79: 2957-2963.

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. *Journal of Animal Science.* 81: 249-260.

Knox, R.V. 2005. Recruitment and selection of ovarian follicles for determination of ovulation rate in the pig. *Domestic Animal Endocrinology.* 29: 385-397.

Ko, J.C.H., Evans, L.E., Hopkins, S.M. 1989. Vaginal conductivity as an indicator for optimum breeding time in the sow after weaning. *Theriogenology.* 32: 961-968.

L

Larsson, S., Nilsson, T., Olsson, B. 1966. Some aspects of the metabolic effect of amino acid supplementation of pig diets. *Acta Veterinaria Scandinavica.* 7: 47-53.

Le Cozler, Y., Dagorn, J., Lindberg, J.E., Aumaître, A., Dourmad, J.Y. 1998. Effect of age at first farrowing and herd management on long-term productivity in sows. *Livestock Production Science.* 53: 135-142.

Le Cozler, Y., Ringmar-Cederberg, E., Johansen, S., Dourmad, J.Y., Neil, M., Stern, S. 1999a. Effect of feeding level during rearing and mating strategy on performance of Swedish Yorkshire sows. 1. Growth, puberty and conception rate. *Animal Science.* 68: 355-363.

Le Cozler, Y., Ringmar-Cederberg, E., Rydhmer, L., Lundeheim, N., Dourmad, J.Y., Neil, M. 1999b. Effect of feeding level during rearing and mating strategy on performance of Swedish Yorkshire sows. 2. Reproductive performance, food intake, backfat changes and culling rate during the first two parities. *Animal Science.* 68: 365-377.

Legault, C., Caritez J.C. 1983. L' experimentation sur le porc chinois en France. I. Performances de reproduction en race pure et en croisement. *Genetics, Selection, Evolution.* 15: 225-240.

Levasseur, M.C. 1977. Thoughts on puberty. Initiation of gonadotrophic function. *Annales de Biologie Animale, Biochimie, Biophysique*. 17: 345-361.

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. *Biology of Reproduction*. 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. *Biology of Reproduction*. 63: 942-952.

Love, R.J. 1978. Definition of a seasonal infertility problem in pigs. *Veterinary Record*. 103: 443-446.

Lucia Jr., T., Dial, G.D., Marsh, W.E. 2000. Lifetime reproductive performance in female pigs having distinct reasons for removal. *Livestock Production Science*. 63: 213-222.

Lucy, M.C. 2007. The bovine dominant ovarian follicle. *Journal of Animal Science*. 85(Supplement): E89-E99.

Lutz, J.B., Rampacek, G.B., Kraeling, R.R., Pinkert, C.A. 1984. Serum luteinizing hormone and estrogen profiles before puberty in the gilt. *Journal of Animal Science*. 58: 686-691.

M

Malayer, J.R., Kelly, D.T., Diekman, M.A., Brandt, K.E., Sutton, A.L., Long, G.G., Jones, D.D. 1987. Influence of manure gases on puberty in gilts. *Journal of Animal Science*. 64: 1476-1483.

Manjarin, R., Cassar, G., Sprecher, D.J., Friendship, R.M., Dominguez, J.C., Kirkwood, R.N. 2009a. Effect of eCG or eCG plus hCG on oestrus expression and ovulation in prepubertal gilts. *Reproduction in Domestic Animals*. 44: 411-413.

Manjarin, R., Dominguez, J.C., Castro, M.J., Vallado, B., Rodriguez, S., Sprecher, D.J., Cassar, G., Friendship, R.M., Kirkwood, R.N. 2009b. Effect of prior FSH treatment on the estrus and ovulation responses to eCG in prepubertal gilts. *Animal Reproduction Science*. 110: 123-127.

Martínez-Madrid, Belén. 2002. Estudio de la fecundación “in vitro” en porcino: reducción de la polispermia y optimización de la producción “in vitro” de embriones. *Tesis Doctoral*. Departamento de Patología Animal II, Universidad Complutense de Madrid.

Mattioli, M. 1994. Transduction mechanisms for gonadotrophin-induced oocyte maturation in mammals. *Zygote*. 2: 347-349.

Mavrogenis, A.P., Robison, O.W. 1976. Factors affecting puberty in swine. *Journal of Animal Science*. 42: 1251-1255.

McConnell, S.J., Ellendorff, F. 1987. Absence of nocturnal plasma melatonin surge under long and short artificial photoperiods in the domestic sow. *Journal of Pineal Research*. 4: 201-210.

McGee, E.A., Hsueh, A.J. 2000. Initial and cyclic recruitment of ovarian follicles. *Endocrine reviews*. 21: 200-214.

Meijs-Roelofs, H.M., van Cappellen, W.A., van Leeuwen, E.C., Kramer, P. 1990. Short- and long-term effects of an LHRH antagonist given during the prepubertal period on follicle dynamics in the rat. *Journal of Endocrinology*. 124: 247-253.

Moor, R.M., Mattioli, M., Ding, J., Nagai, T. 1990. Maturation of pig oocytes *in vivo* and *in vitro*. *Journal of Reproduction and Fertility*. 40 (Supplement): 197-210.

Morbeck, D.E., Esbenshade, K.L., Flowers, W.L., Britt, J.H. 1992. Kinetics of follicle growth in the prepuberal gilt. *Biology of Reproduction*. 47: 485-491.

Motlik, J., Crozet, N., Fulka, J., Flechon, J.E. 1984. Meiotic competence *in vitro* of pig oocytes isolated from early antral follicles. *Journal of Reproduction and Fertility*. 72: 323-328.

N

Nelson, A.H., Mabry, J.W., Benyshek, L.L., Marks, M.A. 1990. Correlated response in reproduction, growth and composition to selection in gilts for extremes in age at puberty and backfat. *Livestock Production Science*. 24: 237-247.

Newton, E.A., Mahan, D.C. 1992. Effect of feed intake during late development on pubertal onset and resulting body composition in crossbred gilts. *Journal of Animal Science*. 70: 3774-3780.

Noakes, D.E., Parkinson, T.J., England, G.C.W. 2009. Endogenous and exogenous control of ovarian activity. *In: Veterinary Reproduction and Obstetrics (ed. D.E. Noakes)*. Pp. 3-58. Ninth Edition. Saunders (Elsevier) Editorial, England.

Ntunde, B.N., Hacker, R.R., King, G.J. 1979. Influence of photoperiod on growth, puberty and plasma LH levels in gilts. *Journal of Animal Science*. 48: 1401-1406.

O

Ojeda, S.R. 1991. The mystery of mammalian puberty; how much do we know? *Perspectives in Biology and Medicine*. 34: 365-383.

Oxender, W.D., Colenbrander, B., van de Wiel, D.F.M., Wensing, C.J.G. 1979. Ovarian development in fetal and prepubertal pigs. *Biology of Reproduction*. 21: 715-721.

P

Paredis, F. 1961. Investigations on fertility and artificial insemination in the pig. *Animal Breeding Abstracts*. 30: 2697.

Paterson, A.M., Lindsay, D.R. 1981. Induction of puberty in gilts. 2. The effect of boars on maintenance of cyclic activity in gilts induced to ovulate with PMSG and HCG. *Animal Production*. 32: 51-54.

Paterson, A.M., Martin, G.B. 1981. Induction of puberty in gilts. 3. Ovulation, plasma oestradiol and progesterone in gilts injected with PMSG and HCG. *Animal Production*. 32: 55-59.

Paterson, A.M., Hughes, P.E., Pearce, G.P. 1989. The effect of season, frequency and duration of contact with boars on the attainment of puberty in gilts. *Animal Reproduction Science*. 21: 115-124.

Paterson, A.M., Pearce, G.P., D'Antuono, M.F. 1991. Seasonal variation in attainment of puberty in isolated and boar-exposed domestic gilts. *Animal Reproduction Science*. 24: 323-333.

Paterson, A.M., Martin, G.B., Foldes, A., Maxwell, C.A., Pearce, G.P. 1992. Concentrations of plasma melatonin and luteinizing hormone in domestic gilts reared under artificial long or short days. *Journal of Reproduction and Fertility*. 94: 85-95.

Patterson, J.L., Beltranena, E., Foxcroft, G.R. 2010a. The effect of age at first estrus and breeding on third estrus on sow body weight changes and long-term reproductive performance. *Journal of Animal Science*. 88: 2500-2513.

Patterson, J.L., Cameron, A.C., Smith, T.A., Kummer, A.B., Schott, R.L., Greiner, L.L., Connor, J.F., Foxcroft, G.R. 2010b. The effect of gonadotrophin treatment at weaning on primiparous sow performance. *Journal of Swine, Health and Production*. 18: 196-199.

- Pearce, G.P., Hughes, P.E. 1987.** The influence of male contact on plasma cortisol concentrations in the prepubertal gilt. *Journal of Reproduction and Fertility*. 80: 417-424.
- Pearce, G.P., Paterson, A.M., Hughes, P.E. 1988.** Effect of short-term elevations in plasma cortisol concentration on LH secretion in prepubertal gilts. *Journal of Reproduction and Fertility*. 83: 413-418.
- Pearce, G.P., Paterson, A.M. 1992.** Physical contact with the boar is required for maximum stimulation of puberty in the gilt because it allows transfer of boar pheromones and not because it induces cortisol release. *Animal Reproduction Science*. 27: 209-224.
- Pearce, G.P., Paterson, A.M. 1993.** The effects of space restriction during rearing on the attainment of puberty and subsequent reproductive activity of female pigs. *Animal Reproduction Science*. 32: 99-106.
- Pelletier, J., Carrez-Camous, S., Thiery, J.C. 1981.** Basic neuroendocrine events before puberty in cattle, sheep and pigs. *Journal of Reproduction and Fertility*. 30: 91-102.
- Phillipo, M. 1968.** Superovulation in the pig. *Advanced Reproductive Physiology*. 3: 147-166.
- Pickard, A.R., Ashworth, C.J. 1995.** Nutrition-reproduction interactions in Large White x Landrace and Chinese Meishan gilts. In: *Proceedings of the British Society of Animal Science*. Pp. 179.
- Picton, H.M., Briggs, D., Gosden, R. 1998.** The molecular basis of oocyte growth and development. *Molecular and Cellular Endocrinology*. 145: 27-37.
- Picton, H.M. 2001.** Activation of follicle development: the primordial follicle. *Theriogenology*. 55: 1193-1210.
- Plumlee, M.D., Thrasher, D.M., Beeson, W.W., Andrews, F.N., Parker, H.E. 1956.** The effects of manganese deficiency upon the growth, development and reproduction of swine. *Journal of Animal Science*. 15: 352-367.
- Polanski, Z., Kubiak, J.Z. 1999.** Meiosis. In: *Encyclopedia of Reproduction* (eds. E. Knobil-JD. Neill). Vol. 3: 160-167. Academic Press, San Diego, USA.
- Pressing, A., Dial, G.D., Esbenshade, K.L., Stroud, C.M. 1992.** Hourly administration of GnRH to prepubertal gilts: endocrine and ovulatory responses from 70 to 190 days of age. *Journal of Animal Science*. 70: 232-242.
- Prunier, A., Bonneau, M., Etienne, M. 1987.** Effects of age and live weight on the sexual development of gilts and boars fed two planes of nutrition. *Reproduction, Nutrition, Development*. 27: 689-700.

Prunier, A. 1991. Influence of age at nutritional restriction on growth and sexual development of gilts. *Reproduction, Nutrition, Development*. 31: 647-653.

Prunier, A., Chopineau, M., Mounier, A.M., Mormede, P. 1993a. Patterns of plasma LH, FSH, oestradiol and corticosteroids from birth to the first oestrous cycle in Meishan gilts. *Journal of Reproduction and Fertility*. 98: 313-319.

Prunier, A., Martin, C., Mounier, A.M., Bonneau, M. 1993b. Metabolic and endocrine changes associated with undernutrition in the peripubertal gilt. *Journal of Animal Science*. 71: 1887-1894.

Prunier, A., Louveau, I. 1997. Influence of ovariectomy on metabolic and endocrine parameters during sexual development in the female pig. *Journal of Endocrinology*. 154: 423-429.

Q

Qian, H., Barb, C.R., Compton, M.M., Hausman, G.J., Azain, M.J., Kraeling, R.R., Baile, C.A. 1999. Leptin mRNA expression and serum leptin concentrations as influenced by age, weight, and estradiol in pigs. *Domestic Animal Endocrinology*. 16: 135-143.

R

Rampacek, G.B., Schwartz, F.L., Fellows, R.E., Robison, O.W., Ulberg, L.C. 1976. Initiation of reproductive function and subsequent activity of the corpora lutea in prepubertal gilts. *Journal of Animal Science*. 46: 881-887.

Reutzel, L.F., Sumption, L.J. 1968. Genetic and phenotypic relationships involving age at puberty and growth rate of gilts. *Journal of Animal Science*. 27: 27-30.

Řezáč, P., Kukla, R., Pöschl, M. 2002. Effect of sow parity on vaginal electrical impedance. *Animal Reproduction Science*. 72: 223-234.

Řezáč, P., Borkovcová, M., Krivánek, I. 2009. Effect of weaning to oestrus interval and equine chorionic gonadotropin on vaginal electrical impedance during peri-oestrus in sows. *Reproduction in Domestic Animals*. 44: 932-936.

Richards, J.S., Fitzpatrick, S.L., Clemens, J.W., Morris, J.K., Alliston, T., Sirois, J. 1995. Ovarian cell differentiation: a cascade of multiple hormones, cellular signals, and regulated genes. *Recent Progress in Hormone Research*. 50: 223-254.

Roa, J. 2013. Role of GnRH neurons and their neuronal afferents as key integrators between food intake regulatory signals and the control of reproduction. *International*

Rombauts, L., Suikkari, A.M., MacLachlan, V., Trounson, A.O., Healy, D.L. 1998. Recruitment of follicles by recombinant human follicle-stimulating hormone commencing in the luteal phase of the ovarian cycle. *Fertility and Sterility*. 69: 665-669.

Rozeboom, D.W., Pettigrew, J.E., Moser, R.L., Cornelius, S.G., El Kandelgy, S.M. 1995. Body composition of gilts at puberty. *Journal of Animal Science*. 73: 2524-2531.

Rydhmer, L., Eliasson-Selling, L., Johansson, K., Stern, S., Andersson, K. 1994. A genetic study of estrus symptoms at puberty and their relationship to growth and leanness in gilts. *Journal of Animal Science*. 72: 1964-1970.

S

Sacristán, A.G., Montijano, F.C., Palomino, L.F.C., Gallego, J.G., López-de-Silanes, M.D.M., Ruiz, G.M.S. 1996. Reproducción en porcinos. *En: Sistema Reproductor, Fisiología Veterinaria* (eds. S.R. López-L.F.C. Palomino). Pp. 951-968. Editorial McGraw-Hill Interamericana (2ª Edición), Madrid, España.

Scanlon, P.F., Krishnamurthy, S. 1974. Puberty attainment in slaughter weight gilts in relation to month examined. *Journal of Animal Science*. 39: 160 (Abstract).

Scheele, F., Schoemaker, J. 1996. The role of follicle-stimulating hormone in the selection of follicles in human ovaries: a survey of the literature and a proposed model. *Gynecological Endocrinology: The Official Journal of the International Society of Gynecological Endocrinology*. 10: 55-66.

Schenkel, A.C., Bernadi, M.L., Bortolozzo, F.P., Wentz, I. 2010. Body reserve mobilization during lactation in first parity sows and its effect on second litter size. *Livestock Science*. 132: 165-172.

Schilling, E., Cerne, F. 1972. Induction and synchronization of oestrus in prepubertal gilts and anoestrous sows by a PMSG/HCG compound. *Veterinary Record*. 91: 471-474.

Schlegel, W., Wahner, M., Stenzel, S. 1978. Studies into the further course of the cycle following biotechnical induction of puberty in gilts. *Animal Breeding Abstracts*. 46: 585.

Schmidt, K., Bretschneider, W. 1954. The outward course of the sexual cycle in the sow. *Animal Breeding Abstracts*. 32: 1046.

Schukken, Y.H., Buurman, J., Huirne, R.B., Willemse, A.H., Vernooy, J.C., van den Broek, J., Verheijden, J.H. 1994. Evaluation of optimal age at first conception in

gilts from data collected in commercial swine herds. *Journal of Animal Science*. 72: 1387-1392.

Schultz, R.M. 1991. Meiotic maturation on mammalian oocytes. *In: Elements of Mammalian Fertilization* (ed. Wassarman, P.M.). Pp. 77-104. CRC Press, Boston, USA.

Segal, D.H., Baker, R.D. 1973. Maintenance of corpora lutea in prepubertal gilts. *Journal of Animal Science*. 37: 762-767.

Self, H.L., Grummer, R.H., Casida, L.E. 1955. The effect of various sequences of full and limited feeding on the reproductive phenomena in Chester White and Poland China gilts. *Journal of Animal Science*. 14: 573-592.

Senger, P.L. 2003. *In: Pathways to pregnancy and parturition*. Pullman, WA: Current conceptions Editorial, Inc. Second Edition.

Shaw, G.A., McDonald, B.E., Baker, R.D. 1971. Fetal mortality in the prepubertal gilt. *Canadian Journal of Animal Science*. 51: 233-236.

Signoret, J.P. 1970. Reproductive behaviour of pigs. *Journal of Reproduction and Fertility*. 11 (Supplement): 105-117.

Signoret, J.P. 1972. The mating behaviour of the sow. *In: Pig Production* (ed. D.J.A. Cole). Pp. 295-314. London, Butterworths.

Sorensen, A.M., Thomas, W.B., Gossett, J.W. 1961. A further study on the influence of level of energy intake and season on reproductive performance of gilts. *Journal of Animal Science*. 20: 347-359.

Sterning, M., Rydhmer, L., Eliasson-Selling, L. 1998. Relationships between age at puberty and interval from weaning to estrus and between estrus signs at puberty and after the first weaning in pigs. *Journal of Animal Science*. 76: 353-359.

Stickney, K., Foxcroft, G.R., Garside, D.A., Mortimer, M.J. 1978. Aspects of oestrogen-induced puberty in the gilt. *Animal Production*. 26: 388-389 (Abstract).

Stromstedt, M., Byskov, A.G. 1999. Oocyte, mammalian. *In: Encyclopedia of Reproduction* (eds. E. Knobil-JD. Neill). Vol. 3: 468-480. Academic Press, San Diego, USA.

T

Tantasuparuk, W., Lundeheim, N., Dalin, A.-M., Kunavongkrit, A., Einarsson, S. 2001. Weaning-to-service interval in primiparous sows and its relationship with longevity and piglet production. *Livestock Production Science*. 69: 155-162.

Tilton, S.L., Bates, R.O., Prather, R.S. 1995. Evaluation of response to hormonal therapy in prepubertal gilts of different genetic lines. *Journal of Animal Science*. 73: 3062-3068.

Toner, M.S., King, R.H., Dunshea, F.R., Dove, H., Atwood, C.S. 1996. The effect of exogenous somatotropin on lactation performance of first-litter sows. *Journal of Animal Science*. 74: 167-172.

Tsafiriri, A., Bar-Ami, S., Lindner, H.R. 1983. Control of development of oocyte maturation in mammals. In: *Fertilization of The Human Egg In Vitro* (eds. Beier-Lindnes). Springer-Vierlag Editorial. Berlin, Germany.

Turner, A.I., Hemsworth, P.H., Hughes, P.E., Canny, B.J., Tilbreek, A.J. 1998. The effect of repeated boar exposure on cortisol secretion and reproduction in gilts. *Animal Reproduction Science*. 51: 143-154.

V

van Lunen, T.A., Aherne, F.X. 1987. Effect of long-term feed restriction on age at puberty of gilts. *Canadian Journal of Animal Science*. 67: 797-801.

van Wettere, W.H.E.J., Revell, D.K., Mitchell, M., Hughes, P.E. 2006. Increasing the age of gilts at first boar contact improves the timing and synchrony of the pubertal response but does not affect potential litter size. *Animal Reproduction Science*. 95: 97-106.

Vargas, A.J., Bernardi, M.L., Wentz, I., Neto, G.B., Bortolozzo, F.P. 2006. Time of ovulation and reproductive performance over three parities after treatment of primiparous sows with PG600. *Theriogenology*. 66: 2017-2023.

W

Webb, A.J. 1989. Genetics of food intake in the pig. In: *Voluntary Food Intake of Pigs*, (eds. J.M. Forbes-M.A. Varley-T.L.J. Lawrence). British Society of Animal Production. Occasional Publication No. 13, pp. 41-50.

Wilson, E.O., Bossert, W.H. 1963. Chemical communication among animals. *Recent Progress in Hormone Research*. 19: 673-710.

Wilson, M.R., Dewey, C.E. 1993. The association between weaning-to-estrus interval and sow efficiency. *Journal of Swine, Health and Production*. 1: 10-15.

Wolf, D.P., Sokoloski, J.E., Litt, M. 1980. Composition and function of human cervical mucus. *Biochimica et Biophysica Acta*. 630: 545-558.

X

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. *Biology of Reproduction*. 53: 951-957.

Y

Yamauchi, S., Nakamura, S., Yoshimoto, T., Nakada, T., Ashizawa, K., Tatemoto, H. 2009. Prediction of the estrous cycle and optimal insemination time by monitoring vaginal electrical resistance (VER) in order to improve the reproductive efficiency of the Okinawan native Agu pig. *Animal Reproduction Science*. 113: 311-316.

Yang, H., Eastham, P.R., Phillips, P., Whittemore, C.T. 1989. Reproductive performance, body weight and body condition of breeding sows with different body fatness at parturition, differing nutrition during lactation and differing litter size. *Animal Production*. 48: 181-201.

Young, L.G., King, G.J., Walton, J.S., McMillan, I., Klevorick, M. 1990. Age, weight, backfat and time of mating effects on performance of gilts. *Canadian Journal of Animal Science*. 70: 469-482.

Z

Zak, L.J., Xu, X., Hardin, R.T., Foxcroft, G.R. 1997. Impact of different patterns of feed intake during lactation in the primiparous sow on follicular development and oocyte maturation. *Journal of Reproduction and Fertility*. 110: 99-106.

Zak, L.J., Foxcroft, G.R., Aherne, F.X., Kirkwood, R.N. 2008. Role of luteinizing hormone in primiparous sow responses to split weaning. *Reproduction in Domestic Animals*. 43: 445-450.

Zeleznik, A.J., Benyo, D.F. 1994. Control of follicular development, corpus luteum function, and the recognition of pregnancy in higher primates. In: *The Physiology of Reproduction* (eds. E. Knobil-J.D. Neill). Pp. 751-782, (2nd edition). Raven Press Ltd., New York, USA.

Zimmerman, D.R., Perkins, J., Hartman, L., Burosh, D. 1988. Age at puberty in gilts as affected by quality of air in confinement. *Journal of Animal Science*. 66 (Supplement 1): 237, Abstract 51.