

MÉTODOS DE SINCRONIZACIÓN DE CELO EN CONEJAS PRIMÍPARAS LACTANTES A 25 DÍAS POST-PARTO

Sakr O.G.^a; García-García R.M.^b; Arias-Álvarez M.^b; Lorenzo P.L.^b; Millán P.^b; Velasco B.^a;
Rebollar P.G.^a

^dDepartamento de Producción Animal. E.T.S.I.A. Universidad Politécnica de Madrid

^bDepartamento de Fisiología (Fisiología Animal). Facultad de Veterinaria. Universidad Complutense de Madrid
Correo electrónico: pilar.grebollar@upm.es

RESUMEN

La sincronización del celo es una técnica necesaria en las explotaciones cunícolas. En este trabajo se han utilizado un total de 60 conejas primíparas lactantes en día 25 post-parto (pp) distribuidas en 5 grupos de 12 animales: el grupo PG recibió un 2.5% de propileno glicol en el agua de bebida desde el día 22 pp, el grupo eCG se trató con 25 UI de eCG (i.m.) el día 23 pp, el grupo BIO fue separado transitoriamente de sus camadas durante 24 horas, el grupo PGBIO se suplementó con 2,5% de PG y además se le separó transitoriamente de su camada, y por último, el grupo C que no fue sincronizado. Estudiamos el efecto de estos tratamientos sobre el peso vivo, la composición corporal, el consumo de alimento, la concentración de los ácidos grasos no esterificados (AGNE), la glucosa y las proteínas plasmáticas, el crecimiento de los gazapos y la fisiología ovárica. Aunque todos los grupos tuvieron el mismo consumo de pienso, las conejas del grupo PG presentaron menos cantidad de proteína ($P<0,003$) y de grasa corporal ($P<0,06$) el día 25 pp que al principio del tratamiento. En los grupos PG y PGBIO, las concentraciones de AGNE no se modificaron y las concentraciones de proteínas plasmáticas eran más altas el día 22 que el 25 pp. En todos los grupos las concentraciones de glucosa aumentaron ($P<0,001$) y las camadas crecieron significativamente ($P<0,001$). Las poblaciones foliculares ováricas en el día 25 pp, así como la maduración nuclear *in vitro* de los oocitos no se vieron afectadas por ningún tratamiento. El grupo PG presentó una baja proporción de oocitos no madurados citoplásmicamente ($P<0,05$). En conclusión, ninguno de los tratamientos aplicados, incluido el hormonal, ha presentado resultados definitivamente mejores que el grupo control, por lo que es necesario estudiar otras combinaciones o métodos para poder conseguir mejorar sustancialmente los parámetros reproductivos en conejas primíparas lactantes en el día 25 pp.

Palabras clave: sincronización, energía, ovario

INTRODUCCIÓN

La condición corporal y el balance energético de las conejas reproductoras es un punto crítico de las granjas comerciales. Hay muchos factores que alteran este balance, el cuál es particularmente negativo en las conejas primíparas (Parigi Bini and Xiccato, 1998) y empeora los resultados reproductivos (Arias-Álvarez et al., 2009). Para actuar sobre el balance energético, se puede reducir el intervalo parto-inseminación, solapándose lactación y gestación, lo que implica una competición de requerimientos energéticos por parte de los fetos y de la glándula mamaria. De este modo, hemos demostrado en trabajos previos (Arias-Álvarez et al., 2009), que la IA a los 11 días post-parto (dpp) repercute sobre el estado metabólico y afecta negativamente a los folículos ováricos y a la calidad de los oocitos de las conejas primíparas. Si estas hembras se inseminan a 32 dpp con destete previo a 28 dpp, las reservas corporales, la función ovárica, la calidad de los oocitos, la fertilidad y la prolificidad mejoran con respecto al día 11pp. Si adelantamos más el destete a 25 dpp, el día 32 pp se observan mejoras significativas de las reservas corporales pero la actividad ovárica es similar a la de conejas primíparas en día 32 pp sin destetar (Sakr et al., 2010). Debido a que la IA en día 32 pp implica extensificar demasiado el ritmo de cubrición con consecuencias negativas en la productividad de gazapos por año, en el engrasamiento de las hembras y, en definitiva, en los resultados reproductivos en sucesivos ciclos, se requiere un ligero acortamiento de este ritmo de cubrición acompañado de tratamientos de sincronización de celo. El más común es el empleo de eCG (equine Chorionic Gonadotrophin) pero es un tratamiento hormonal que tiene connotaciones negativas en el

consumidor y la Unión Europea tiende a limitar su uso en animales de consumo (Castellini, 1996). Por otro lado están los métodos de bioestimulación, como la separación transitoria de la camada durante 24 horas antes de la IA, que reducen las concentraciones de prolactina (Ubilla et al., 2000) y mejoran la calidad folicular y de los oocitos comparados con la eCG (Arias-Álvarez et al., 2010a). Pero no se ha estudiado su efecto cuando la separación de la camada se realiza en momentos avanzados de la lactación. Además, para mejorar la ingestión de energía y las reservas corporales de las conejas y mejorar la actividad ovárica, algunos autores han sugerido la suplementación energética. Una de las sustancias que se emplea es el propileno-glicol (PG; $C_3H_8O_2$) que es un alcohol polihídrico con muy baja toxicidad (EMEA, 1996). Este precursor de la glucosa tiene un alto contenido energético (21 Mj de energía bruta/kg) y se han descrito mejores resultados de fertilidad en conejas cuando se diluye en el agua de bebida y se administra antes de la IA (Luzi et al., 2001); o también se ha observado que el intervalo de días entre el parto y la cubrición natural efectiva es más reducido cuando se suministra en el pienso (Nicodemus et al., 2005).

Con este trabajo pretendemos estudiar métodos de sincronización de celo alternativos al empleo de hormonas que tienen que ser fáciles de aplicar, baratos, en consonancia con el bienestar de los animales y bien adaptados al manejo en ciclos. El principal objetivo, por tanto, fue evaluar el efecto de 4 métodos de sincronización (eCG, separación de camada, flushing con PG y flushing con PG+separación) sobre el peso, la composición corporal, el consumo de pienso y los parámetros metabólicos de conejas primíparas lactantes inseminadas en el día 25 pp, así como sobre su fisiología ovárica y el peso de sus camadas.

MATERIAL Y MÉTODOS

Se han utilizado un total de 60 conejas primíparas lactantes (Californian x New Zealand White) alojadas en la granja experimental de la UPM, en jaulas metálicas individuales (50x70x32cm) bajo condiciones ambientales controladas (16 h de luz, 18-22°C, 60-75% humedad). Se alimentaron con un pienso comercial *ad libitum* (NANTA S.A., Tres Cantos, Madrid) que contenía un 16% de proteína, un 15,7% de fibra bruta, un 2,5% de grasa y una energía digestible de 2.700 Kcal/kg. Todos los procedimientos experimentales han sido aprobados por el Comité de Ética de la UPM siguiendo los requisitos para el cuidado y utilización de animales de experimentación (BOE, 2005, 2010).

Las camadas de las conejas se igualaron a 8 gazapos un día después del parto y este número se mantuvo constante reemplazando las bajas con gazapos de la misma edad y peso. Las conejas se distribuyeron al azar en 5 grupos de 12 animales cada uno, en los que se aplicaron diferentes estrategias de sincronización de celo justo antes de ser sacrificadas el día 25 pp: el grupo PG recibió un 2,5 % de PG en el agua de bebida durante 4 días; el grupo eCG fue tratado con 25 UI de eCG (i.m.) 48 horas antes de la eutanasia; el grupo BIO fue separado de su camada 24 horas antes de la eutanasia; el grupo PGBIO recibió la suma de los tratamientos aplicados al grupo PG y al grupo BIO; y por último, el grupo control que no recibió ningún tratamiento previo.

Se determinó: el peso, la composición corporal, los parámetros metabólicos de las conejas y el peso de las camadas de todos los grupos a los 22 y 25 dpp. Además se registró el consumo de pienso de las conejas desde el parto hasta el día 22 y entre los días 22 y 25 pp. La eutanasia se realizó en una cámara hermética de CO_2 (5 minutos) al final de los tratamientos (el día 25 pp). Para determinar la actividad ovárica, ambos ovarios se extrajeron mediante laparotomía media ventral. Uno de ellos se utilizó para los estudios histológicos y el otro para los estudios de maduración *in vitro* de los oocitos.

La composición corporal se estimó mediante un análisis de bioimpedancia (BIA) utilizando el aparato Model Quantum II (RJL Systems, Detroit, MI, USA) siguiendo el procedimiento descrito por Rebollar et al. (2011). Las muestras de sangre se obtuvieron de la vena marginal de la oreja en tubos no heparinizados a las 9:00 a.m. y el suero se obtuvo después de centrifugar a 1370 g (3500 rpm) durante 10 minutos a 4°C y se almacenó a -32°C. Los AGNE se determinaron con el kit de análisis Wako Chemicals GmbH Specialty Chemicals

(Neuss, Germany). La glucosa con el método GOD-PAP y las proteínas plasmáticas totales con el método Biuret, ambos métodos de los laboratorios RANDOX (Crumlin, UK).

De los ovarios se determinó el número de folículos antrales ≥ 1 mm de diámetro y de folículos hemorrágicos en la superficie ovárica. Después, uno de cada animal se almacenó en una solución de paraformaldehído al 4% (pH 7,2–7,4), se deshidrató en diluciones crecientes de etil-alcohol, se introdujo en parafina, se seccionó en cortes de 5 μ m de grosor y se tiñó con hematoxilina-eosina. En dichos cortes (2 por ovario) se estudiaron las poblaciones foliculares con un microscopio óptico (Olympus BX40, Hamburg, Germany), considerando los diferentes grados de desarrollo (folículos primarios, preantrales y antrales) teniendo en cuenta el número de capas de la granulosa de acuerdo a Rebollar et al. (2008).

Los complejos cúmulo-oocito (CCOs) se aspiraron de los folículos antrales ≥ 1 mm de diámetro de los ovarios restantes. Se lavaron y se maduraron durante 16h a 38°C y a una atmósfera de 5% de CO₂, a máxima humedad y en 500 μ l de un medio de maduración según la composición descrita por Lorenzo et al. (1997). Después de la maduración, los CCOs se estudiaron con microscopía confocal, tal y como describieron Arias-Álvarez et al. (2009). El grado de maduración nuclear se determinó por el porcentaje de oocitos que mostraron la configuración nuclear de metafase II. El grado de maduración citoplásmica, se determinó según el patrón de migración de los gránulos corticales (GCs) que presentaban los oocitos, clasificándose como migrados o maduros (aquéllos en los que los GCs estaban adyacentes a la membrana plasmática); parcialmente migrados (si los GCs estaban en la zona cortical indicando un inicio de maduración); inmaduros o no migrados (si los GCs estaban distribuidos por todo el citoplasma sin iniciar migración) o anormalmente migrados (con una distribución anómala compatible con oocitos de baja calidad o degenerados).

Los datos se analizaron con el software Statistical Analysis Systems (SAS/STAT 1999-2001). Las diferencias en el peso vivo, la composición corporal, el consumo, y los parámetros metabólicos se analizaron con el procedimiento MIXED para medidas repetidas con el método de sincronización de celo, el tiempo y su interacción como efectos principales. Además, el peso y la ganancia de peso de las camadas desde el día 22 al día 25 pp se analizó con el mismo procedimiento con el tratamiento de sincronización de celo como efecto principal. La categorización folicular se analizó con el procedimiento GLM. Las medias se compararon con un test *t* de Student. Para comparar las tasas de maduración nuclear y citoplásmica de los oocitos madurados in vitro se utilizó el procedimiento CATMOD. Todos los resultados se muestran como medias \pm error estándar de la media.

RESULTADOS Y DISCUSION

Las camadas crecieron desde el día 22 al 25 pp ($P < 0,001$) en todos los grupos, pero la ganancia de peso no fue igual en todos ellos ($P < 0,05$). Las camadas que no pudieron mamar durante 24 horas (BIO y PGBIO) ganaron menos peso ($+397 \pm 145$ g y $+408 \pm 139$ g, respectivamente) que las del grupo eCG ($+866 \pm 132$ g) y que las del grupo PG ($+973 \pm 133$ g); las camadas del grupo control incrementaron su peso en un valor intermedio ($+608 \pm 132$ g). Aunque esta diferencia en la ganancia de peso se debe a la ausencia de amamantamiento, éste no afecta a la viabilidad de las camadas porque el volumen de leche en sus estómagos es suficiente para mantenerlos vivos (Rebollar et al., 2004). Los gazapos recién nacidos pueden estar sin mamar y sobrevivir hasta 48 horas, y gazapos de más edad como es este caso, pueden incluso perder dos amamantamientos, sobreviviendo hasta 72 horas sin graves problema (Jilge y Hudson, 2001).

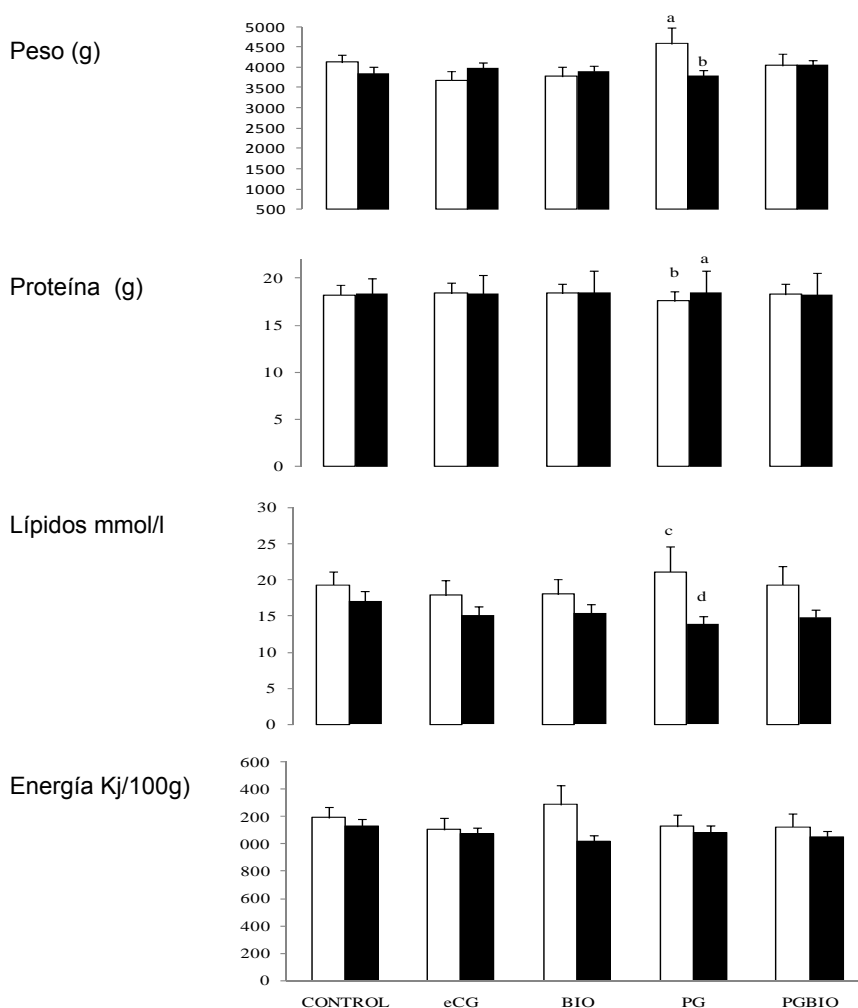
El consumo de alimento de las conejas desde el parto hasta el día 21 pp y desde el día 22 al 25 pp fue similar en todos los grupos, con una media de $335,6 \pm 15,6$ and $421 \pm 35,9$ g/día, respectivamente. Es un valor normal ya que durante la lactación, las necesidades energéticas aumentan drásticamente después del parto, pasando de 150 g/día durante la gestación a 400 g/día al final del periodo de lactación (Fortun-Lamothe y Gidenne, 2006). Además, observamos que el PG no afectó al consumo de alimento, tal y como han descrito otros autores utilizando sustancias similares al PG, como el glicerol (Donkin et al., 2007; Wang et al., 2009). No obstante, Heinz et al. (2000) observaron una reducción en este parámetro en gazapos suplementados con PG, pero el periodo de suministro fue mucho

más largo (24 días) que el de este trabajo.

Las conejas del grupo PG pesaron menos ($P < 0,003$; Figura 1), tenían más contenido en proteína corporal ($P < 0,003$) y una tendencia a tener menos lípidos ($P < 0,06$), el día 25 pp que el día 22 pp. Dado que el consumo de alimento fue igual en todos los grupos y que en el otro grupo que también consumió PG (PGBIO), la composición corporal no se vio afectada, no se puede decir con seguridad que el PG haya tenido un efecto significativo sobre el peso y la composición corporal de las conejas.

Figura 1. Peso y composición corporal de conejas primíparas lactantes desde el día 22 (□) al 25 pp (■). Control; eCG: 25 IU gonadotropina coriónica equina i.m. el día 23 pp; BIO: separación transitoria de la camada desde el día 24 al 25 pp; PG: 2,5% de propilen glicol en el agua desde el día 22 al 25 pp.; PGBIO: 2,5% de propilen glicol en el agua desde el día 22 al 25 pp y separación de camada desde el día 24 al 25 pp.

Letras diferentes muestran diferencias significativas entre días (a, b: $P < 0,003$; c, d: $P = 0,06$).

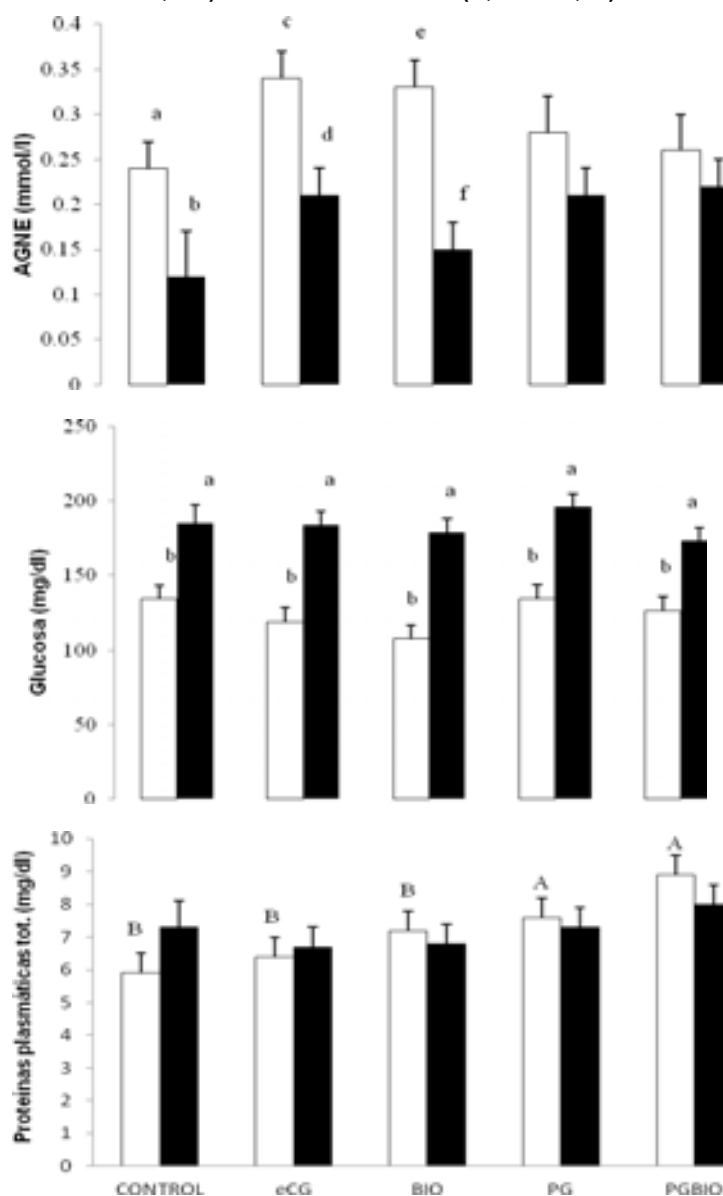


Las concentraciones séricas de AGNE se encuentran dentro de los valores observados en conejas lactantes en el mismo periodo (Rebollar et al., 2011). Estos valores bajaron el día 25 pp con respecto al día 22 (Figura 2; $P < 0,01$) pero este descenso sólo fue significativo en los grupos eCG ($P < 0,01$) y BIO ($P < 0,001$), y con una tendencia en las del grupo C ($P = 0,06$). La manipulación de los animales al ser pinchados en el grupo eCG o la ausencia de amamantamiento en el grupo BIO pudo producirles un estado de estrés que elevaría los niveles de glucosa en sangre en respuesta al cortisol. La hiperglucemia, a su vez, repercutiría en un mayor descenso de AGNE circulantes porque provoca la liberación de insulina y ésta, disminuye la lipólisis y la liberación de AGNE al plasma sanguíneo. Sin embargo, en las conejas suplementadas y separadas de sus camadas (PGBIO), los AGNE

no descendieron de manera significativa, por lo que esta hipótesis no sería válida. Además, aunque el consumo de alimento fue similar en todos los grupos, también en todos, las concentraciones de glucosa tendieron a ser más elevadas el día 25 pp con respecto al día 22 pp ($P = 0,06$). Los únicos tratamientos que tendrían que haber tenido efecto directo sobre las concentraciones séricas de glucosa deberían haber sido los que incluían la suplementación con PG. Esta ausencia de efecto del PG sobre la glucemia y la insulina se ha observado también en vacas de leche en post-parto por otros autores (Pickett et al., 2003; Castañeda-Gutiérrez et al., 2009).

Figure 2. Parámetros séricos de las conejas primíparas lactantes desde el día 22 (□) al 25 pp (■). C: control. eCG: 25 IU gonadotropina coriónica equina i.m. el día 23 pp. BIO: separación transitoria de la camada desde el día 24 al 25 pp. PG: 2,5% de propilen glicol en el agua desde el día 22 al 25 pp. PGBIO: 2,5% de propilen glicol en el agua desde el día 22 al 25 pp y separación de camada desde el día 24 al 25 pp.

Letras diferentes muestran diferencias significativas entre días (a, b: $P = 0,06$; c, d: $P < 0,01$; e, f: $P < 0,001$) o entre tratamientos (A, B: $P=0,06$).



Dado que el aumento de glucosa fue también detectado en todos los grupos puede que haya sido una consecuencia directa de las manipulaciones de los animales necesarias para pesarlos, para estimar su composición corporal o para la obtención de muestras de sangre. Estas maniobras pueden provocar cierto estado de estrés en los animales con la consiguiente estimulación del eje hipotálamo-hipofisario-adrenal, la liberación de glucocorticoides al torrente sanguíneo (Mason, 1968) y la hiperglucemia consiguiente en todos los grupos (Reis, 1996; Vallee, 1996). En cualquier caso, las concentraciones de glucosa observadas en nuestro trabajo han sido consideradas por otros autores dentro de los niveles fisiológicos para esta especie (Bakirel et al., 2008; Winiarska et al., 2008) y como se ha dicho anteriormente, no consiguen disminuir significativamente los AGNE, ni el consumo, ni mejorar el balance energético. Según Castañeda-Gutiérrez et al. (2009), el PG sólo consigue disminuir los AGNE en vacas de leche en parto pero no en post-parto, con lo cual y de acuerdo a nuestros resultados, no es eficaz a la hora de mejorar el balance energético cuando se administra en este último periodo.

Las proteínas plasmáticas totales tendieron a ser más elevadas en el grupo PG y PGBIO que en el resto de los grupos el día 22 pp ($P = 0,06$), pero no se observaron cambios a lo largo del tiempo. Este incremento no parece tener importancia biológica ya que se encuentran dentro de límites fisiológicos característicos de una hembra lactante y no tendrían por qué afectar a nivel metabólico, ni reproductivo.

Las condiciones corporales pobres al principio de la lactación se asocian con una peor respuesta folicular a las gonadotropinas (revisado por Diskin et al., 2003). En vacas se puede incrementar la foliculogénesis y las tasas de ovulación con la suplementación energética (Downing et al., 1995; Williams et al., 2001; Muñoz-Gutiérrez et al., 2004). De hecho, Miyoshi et al. (2001) demostraron una mejor calidad de los folículos y de la función ovárica en vacas suplementadas diariamente con PG durante 7 a 42 días después del parto comparadas con vacas controles no suplementadas. Sin embargo, en la misma especie, también se ha descrito la ausencia de efecto a nivel folicular con la suplementación de PG durante 21 días (Moallem et al., 2007) ó 28 días (Rizos et al., 2008) al principio del post-parto. En conejas, se han visto mejorados los porcentajes de fertilidad con una suplementación de un 2% de PG pero no se han aportado más resultados reproductivos relacionados con la actividad ovárica (Luzi et al., 2001). En el presente trabajo, no hemos visto que las poblaciones foliculares observadas en los cortes histológicos ováricos se vieran afectadas por los tratamientos, obteniéndose una media $11,5 \pm 2,4$ folículos primarios, $9,98 \pm 2,0$ preantrales y $11,0 \pm 1,6$ antrales por ovario, respectivamente. Por lo tanto, no encontramos ningún efecto del flushing administrado, ni del resto de los tratamientos sobre el desarrollo folicular.

Tabla 1. Maduración nuclear (metaphase II) y citoplásmica (migración de gránulos corticales) de los oocitos de conejas lactantes en el día 25 pp. C: control. eCG: 25 IU gonadotropina corionica equina i.m. administrada el día 23 pp. BIO: separación transitoria de la camada desde el día 24 al 25 pp. PG: 2,5% de propilen glicol en el agua desde el día 22 al 25 pp y separación de camada desde el día 24 al 25 pp. PGBIO: 2,5% de propilen glicol en el agua desde el día 22 al 25 pp y separación de camada desde el día 24 al 25 pp.
Letras diferentes muestran diferencias significativas entre tratamientos

	Grupos Experimentales					χ^2	P
	C	eCG	BIO	PG	PGBIO		
Nº oocitos	92	38	44	50	101		
Metaphase II (%)	66,3	68,4	70,5	78,0	60,4	10,07	n.s.
Gránulos corticales (%)							
Completamente migrados	11,1	19,0	7,32	16,0	10,0	2,19	n.s.
Parcialmente migrados	20,0	23,8	24,4	44,0	20,0	4,91	n.s.
No migrados	60,0a	42,9ab	60,9a	28,0b	55,0a	10,6	0,03
Degenerados	6,67	14,3	7,32	12,0	15,0	2,36	n.s.

Tal y como se muestra en la Tabla 1, no se observaron diferencias en las tasas de maduración nuclear de los oocitos. El grupo PG presentó una tasa más baja de oocitos con GCs no migrados que el grupo BIO, PGBIO y C ($P < 0,03$). No se observaron diferencias significativas entre tratamientos en el porcentaje de oocitos con GCs migrados, parcialmente migrados o degenerados. Hay muy pocos estudios que aporten información sobre el impacto del PG sobre la maduración del oocito. De acuerdo con nuestros resultados, Rizos et al. (2008) tampoco encontraron ningún efecto sobre la calidad del oocito medida mediante la tasa de blastocitos desarrollados después de la fecundación *in vitro* en vacas tratadas durante 28 días con PG durante el post-parto. Además, otras suplementaciones como los ácidos grasos tampoco parecen mejorar la calidad del oocito (Fouladi-Nashta et al., 2009) o pueden incluso tener efectos adversos sobre dicha calidad, tal y como observó Rooke et al. (2009) con dietas ricas en almidón, Arias-Álvarez et al. (2010b), en dietas ricas en lignina o Armstrong et al. (2001) con dietas altas en proteína.

CONCLUSIÓN

Las conejas primíparas lactantes suplementadas con PG tendieron a perder peso y grasa corporal cuando este tratamiento se aplicó desde el día 22 al 25 pp, afectando sólo ligeramente a la maduración citoplásmica de sus oocitos. Ningún método de los estudiados ha determinado una mejora considerable del balance energético ni de la actividad ovárica en día 25 pp para este tipo de conejas. Se requiere, por tanto, el estudio y la combinación de más estrategias no hormonales para poder conseguir efectos sustanciales a nivel reproductivo en este periodo tan crucial de la vida productiva de las conejas.

AGRADECIMIENTOS

Este trabajo se ha financiado por la CICYT (AGL08-022283) y la Comunidad de Madrid (S2009/AGR1704).

BIBLIOGRAFÍA

- Arias-Álvarez M., García-García R.M., Rebollar P.G., Revuelta L., Millán P., Lorenzo P.L., 2009. *Theriogenol.* 72, 612-623.
- Arias-Álvarez M., García-García R.M., Torres-Rovira L., González-Bulnes A., Rebollar P.G., Lorenzo P.L. 2010a. *Theriogenol.* 73, 26-35.
- Arias-Álvarez M., García-García R.M., Rebollar P.G., Nicodemus N., Millán P., Revuelta L., Lorenzo P.L. 2010b. *Reprod.Dom. Anim.* 45, 91-100.
- Armstrong D.G., McEvoy T.G., Baxter G., Robinson J.J., Hogg C.O., Woad K.J., Webb R., Sinclair K.D., 2001. *Biol. Reprod.* 64, 1624-1632.
- Bakirel T., Bakirel U., Kelep O.U., Ulgen S.G., Yardibi H 2008. *Ethnopharmacol.* 116, 64-73.
- BOE 2005. Número 252, 34367-34391. Madrid, Spain.
- Castañeda-Gutiérrez E., Pelton S.H., Gilbert R.O., Butler W.R. 2009. *Anim. Reprod. Sc.* 112, 301-15.
- Castellini C.1996. In *Proceedings of the 6th World Rabbit Congress* (eds F Lebas), pp.13-26. Toulouse, France.
- Diskin M.G., Mackey D.R., Roche J.F., Sreenan J.M. 2003. *Anim. Reprod. Sc.* 78, 345-370.
- Donkin S.S., Pallatin M.R., Doane P.H., Cecava J., White H.M., Barnes E., Koser S.L. 2007. *J. Dairy Sc* 90, 350-358.
- Downing J., Joss J., Connell P., Scaramuzzi R.J. 1995. *J. Reprod. Fert.* 103, 137-145.
- EMA 1996. The European Agency for the Evaluation of Medicinal Products. Retrieved October 10, 2011, from http://www.emea.europa.eu/docs/en_GB/document_library/Maximum_Residue_Limits_-_Report/2009/11/WC500015795.pdf
- Fortun-Lamothe L. y Gidenne T. 2006. In *Recent Advances in Rabbit Sciences* (eds L Maertens and P Coudert), pp. 201-210. Plot-it bvba Publishing, Merelbeke, Belgium.
- Fouladi-Nashta A.A., Wonnacott K.E., Gutierrez C.G., Gong J.G., Sinclair K.D., Garnsworth P.C., Webb R. 2009. *Reproduction* 138, 771-781.
- Heinzi E.L., Luzi F., Barbieri S., Zecchini M., Petracci M., Crimella C. 2000. In *Proc. 7th World Rabbit Congress* (eds A.Blasco), C Vol., pp 291-297. Valencia, Spain.
- Jilge B. y Hudson R. 2001. *Europ. Rabbit Chronobiol. Inter.* 18, 1-26.
- Lorenzo P.L., Illera J.C., Silván G., Munro C.J., Illera M.J., Illera M. 1997. *J. Reprod. Immunol.* 35, 11-29.
- Luzi F., Barbieri S., Lazzaroni C., Cavani C., Zecchini M., Crimella C. 2001. *World Rabbit Sc.* 9, 15-18.
- Mason J.W. 1968. *Psychosomatic Medicine* 30, 576-607.
- Miyoshi S., Pate J.L., Palmquist D.L. 2001. *Anim. Reprod. Sc.* 68, 29-43.
- Moallem U., Katz M., Lehrer H., Livshitz L., Yakoby S. 2007. *J. Dairy Sc.* 90, 1243-1254.
- Muñoz-Gutiérrez M., Blache D., Martin G.B., Scaramuzzi R.J. 2004. *Reprod.* 128, 1-11.

- Nicodemus N., Gómez-Conde M.S., Chamorro S., Rodríguez-Granados J.D., García J., De Blas J.C. 2005. In Proceedings of the XXX Symposium de Cunicultura (eds Instituto Tecnológico Agrario de Castilla y León and Asociación Española de Cunicultura), pp.107-114. Valladolid, Spain.
- Parigi Bini R. y Xiccato G. 1998. In The Nutrition of the Rabbit (eds De Blas JC and Wiseman J), pp.103-131. CABI Publishing, Wallingford, UK.
- Pickett M.M., Piepenbrink M.S., Overton T.R. 2003. J.Dairy Sc. 86, 2113-2121.
- Rebollar P.G., Espinosa A., Lorenzo P.L., Carabaño R. 2004. *Reprod. Nut. Dev.* 44, 437-447.
- Rebollar P.G., Bonanno A., Di Grigoli A., Tornambe G. Lorenzo P.L. 2008. *Anim. Reprod. Sc.* 104, 316-328.
- Rebollar P.G., Pereda N., Schwarz B.F., Millán P., Lorenzo P.L., Nicodemus N. 2011. *Anim. Feed Sc. Tech.* 163, 67-76.
- Reis F.M., Santos M.A., Reis A.M., Coimbra C.C. 1996. *Braz. J. Med. Biol. Res.* 29, 811-815.
- Rizos D., Kenny D.A., Griffin W., Quinn K.M., Duffy P., Mulligan F.J., Roche J.F., Boland M.P., Lonergan P. 2008. *Theriogenology* 69, 688-699.
- Rooke J.A., Ainslie A., Watt R.G., Alink F.M., McEvoy T.G., Sinclair K.D., Garnsworthy P.C., Webb R. 2009. Dietary carbohydrates and amino acids influence oocyte quality in dairy heifers. *Reprod. Fert. Dev.* 21, 419-427.
- Sakr O.G., García-García R.M., Arias-Álvarez M.P., Millán P., Lorenzo P.L., Rebollar P.G., 2010. *Anim. Reprod. Sc.*, 121, 294-300.
- SAS/STAT 1999–2001. SAS7. In *STAT User's Guide (Release 8.2)*. SAS Institute Incorporated, Cary, Newyork City, USA.
- Ubilla E., Rebollar P.G., Pazo D., Esquifino A., Alvarífo J.M.R. 2000. *Livest. Prod. Sc.* 67, 67-74.
- Vallee M., Mayo W., Maccari S., Le Moal M., Simon H. 1996. *Brain Res.* 2, 287-292.
- Wang C., Liu Q., Yang W.Z., Huo W.J., Dong K.H., Huang Y.X., Yang X.M., He D.C. 2009. *Anim. Feed Sc.Tech.* 151, 12-20.
- Williams S.A., Blache D., Martin G.B., Foot R., Blackberry M.A., Scaramuzzi R.J. 2001. *Reprod.* 122, 947-956.
- Winiarska K., Szymanchi K., Gorniak P., Dudziak M., Bryla J. 2008. *Biochimie* 91, 261-270.