

**M.D. Vega, M. Barrio, L.A. Quintela, J.J. Becerra, J. Cainzos, A. Prieto,
A. Rodríguez-Zamora y P.G. Herradón**

EVOLUCIÓN DEL MANEJO REPRODUCTIVO EN CUNICULTURA

Separata ITEA

INFORMACIÓN TÉCNICA ECONÓMICA AGRARIA, VOL. **108** N.º 2 (172-190), 2012

Evolución del manejo reproductivo en cunicultura

M.D. Vega, M. Barrio, L.A. Quintela¹, J.J. Becerra, J. Cainzos, A. Prieto, A. Rodríguez-Zamora y P.G. Herradón

Reproducción y Obstetricia. Departamento de Patología Animal. Facultad de Veterinaria de Lugo. 27002 Lugo

Resumen

El uso de la inseminación artificial (IA), a gran escala, en cunicultura data de finales de los 80, hace poco más de 20 años. A pesar de que en ciertas cuestiones se pudieron aprovechar los conocimientos adquiridos en otras especies en las que la IA se utilizaba desde mucho antes, en otros casos fue necesario llevar a cabo diversos estudios para solucionar problemas exclusivos de los conejos. Este artículo pretende realizar una revisión de la evolución y situación actual de la IA en cunicultura en cada uno de los diferentes pasos de esta técnica: recogida, evaluación, dilución y conservación del semen, inducción del celo, inseminación e inducción de la ovulación. La conclusión que se puede extraer de esta revisión es que en muy pocos años el avance científico en esta técnica en cunicultura ha sido enorme. Es posible, hoy en día, obtener altas fertilidades y prolificidades en ciclos de 42 días, utilizando semen refrigerado con tiempos de conservación de 48 h, lo que ha permitido el desarrollo de centros de inseminación dedicados a la producción de dosis seminales que se sirven a largas distancias.

Palabras clave: Conejos, inseminación artificial, semen, estro, ovulación.

Abstract

Reproductive management in rabbits

Artificial Insemination (AI) in rabbits, colony management, dates from the late 80's, just over 20 years. Although in certain matters it could use the knowledge acquired in other species where artificial insemination was used long before, in other cases it was necessary to carry out various studies to solve problems unique to rabbits. This review outlines the evolution and current status of AI in the rabbits in each of different steps of this technique: collection, evaluation, dilution and storage of semen, induction of estrus, insemination and induction of ovulation. The conclusion to be drawn from this review is that in a few years scientific advances in rabbit was enormous, being able now to obtain high fertility and prolificacy in cycles of 42 days, using semen refrigerated storage times 48 hours, allowing the development of male insemination centers dedicated to the production of semen doses that serve them long distances.

Key words: Rabbits, artificial insemination, semen, estrus, ovulation.

1. Autor al que debe enviarse la correspondencia a la dirección: Reproducción y Obstetricia. Departamento de Patología Animal. Facultad de Veterinaria. Campus Universitario. 27002 Lugo. E-mail: luisangel.quintela@usc.es

Introducción

El primero en utilizar la inseminación artificial (IA) en cunicultura fue Bonadonna (1937) quien además, puso a punto la primera vagina artificial para esta especie. En Francia, la IA se utilizó en los años 70 en las granjas de selección, pero se abandonó su uso por los bajos resultados obtenidos. Ya en los 80 se empezó a emplear a nivel de campo en Alemania y Hungría, y Facchin *et al.* (1987) propusieron su uso acoplado al manejo en bandas, despertando un gran interés.

Este sistema de trabajo trae consigo innumerables ventajas desde el punto de vista sanitario, de manejo, económico, así como en el campo de la selección y mejora genética. Por ello, se considera que es el más eficaz de los empleados hasta el momento.

El trabajo especializado que ocasionó este tipo de manejo provocó que los cunicultores comenzasen a considerar que era mejor, y más práctico, que los machos no estuviesen en las granjas (ya que ocupaban espacio), y que sería de gran utilidad la IA en esta especie. De este modo se crearon los centros de inseminación. Estas granjas de machos se encargan de elaborar las dosis seminales (procedentes de conejos de alto valor genético), que posteriormente se envían a las diferentes explotaciones en el día de la inseminación. Esto supone un notable avance sobre el sistema anterior, en el que cada granja poseía sus propios donantes de semen, y elaboraba sus dosis seminales.

En los últimos 20 años esta técnica ha experimentado un desarrollo muy importante, encontrándose numerosos estudios encaminados hacia su optimización. Por lo tanto, a continuación describiremos la situación actual de la IA en conejos, realizando una revisión de los trabajos más relevantes llevados a cabo en los últimos años, en cada uno de los apartados.

Estado actual de la técnica

Recogida del semen

Para la obtención del semen en esta especie, se utiliza una vagina artificial, similar a la utilizada en otras especies (vacuno, ovino, etc.), aunque de tamaño adaptado al conejo. Hasta mediados de los años 60 la vagina empleada era del tipo "Walton" (Macirone y Walton, 1938). Sin embargo, a partir de ese momento la vagina artificial propuesta por Bredderman *et al.* (1964) gana rápidamente adeptos debido a su facilidad de uso, mínima pérdida de semen y bajo coste, siendo la que aún se emplea hoy en día.

La vagina artificial se rellena de agua a una temperatura de 45°C, se coloca entre las extremidades posteriores de otro macho (también se puede emplear una hembra ó maniquí) y se acerca al donante. Éste realiza la monta e introduce el pene en la vagina artificial eyaculando en su interior. El semen se recoge en un tubo colector situado al final de la vagina, y una vez retirada la fracción de gel, si la hay, éste puede ser evaluado.

Evaluación del semen

La IA en cunicultura se realiza con mezclas heterospérmicas, pero su potencial capacidad de fecundar dependerá, en todo caso, de las características individuales de cada eyaculado (Brun *et al.*, 2002).

El proceso de evaluación del semen es esencial ya que no todos los eyaculados poseen calidad suficiente como para fecundar a una hembra. Aquellos que no cumplan unos requisitos mínimos deben ser rechazados.

La evaluación del semen de conejo se realiza de la misma forma que en otras especies, mediante un análisis macroscópico (volumen, color, olor, etc), y microscópico (motilidad, concentración, porcentaje de espermatozoi-

des vivos, porcentaje de espermatozoides anormales, etc.) (Kuzminsky *et al.*, 1996; Brun *et al.*, 2002; Nizza *et al.*, 2003), incluso se emplean métodos automatizados (CASA, citometría de flujo, etc.), aunque solo en centros de investigación (Quintero-Moreno *et al.*, 2007; Becerra *et al.*, 2008).

Las características de un eyaculado de conejo varían considerablemente en función de diferentes factores entre los que se encuentran, entre otros, la época del año y la raza o línea genética, teniendo esto en cuenta, podemos decir que el Ph oscila entre 6 y 7,3; el volumen entre 0,25 y 1,5 ml; la concentración entre 50 y 500 x 10⁶ espermatozoides /ml; la motilidad debe ser superior al 80% y la viabilidad al 70%, mientras que el porcentaje de formas anormales no debería superar el 15% (Arencibia, 2009).

Dilución y conservación del semen

El objetivo de la dilución del semen es el incremento de volumen con el fin de aumentar el número de dosis obtenidas de cada macho, y además es el medio que permitirá mantener una mayor proporción de espermatozoides vivos hasta el momento de la inseminación.

En esta especie se emplean normalmente dosis de semen de 0,5 ml (entre 15 y 25 millones de espermatozoides por dosis) refrigerado a una temperatura de 4 a 18°C, con lo que se puede mantener, utilizando los diluyentes disponibles en la actualidad, entre 24 y 72 horas. Este sistema es útil cuando empleamos mezclas heterospérmicas procedentes de varios machos, y cuando la inseminación se realiza en distancias relativamente cortas. Sin embargo, si se desea utilizar semen de un solo macho (con fines de mejora genética), o enviar el semen a larga distancia, sería necesario emplear un método de conservación en refrigeración más prolongado o bien congelar el semen como se realiza de forma rutinaria en otras especies.

Semen refrigerado

La mejor opción en este momento para poder conservar el semen el tiempo suficiente para enviarlo desde los centros de machos hasta las granjas en donde se encuentran las hembras es la refrigeración

Consultando las actas de los congresos mundiales de cunicultura vemos que, a medida que se fue avanzando en el conocimiento sobre este método, se fue alargando la viabilidad del semen en el tiempo. Los diluyentes empleados inicialmente, eran en general, simples y similares a los utilizados en otras especies. Así, en el 2º congreso mundial de cunicultura, el método de elección descrito por Sinkovics *et al.* (1980), para la inseminación en grandes explotaciones de conejos, consistía en diluir el semen en solución salina lo que permitía una autonomía máxima de cuatro horas, obteniendo resultados alentadores. Este margen de tiempo era muy pequeño para poder tener los machos en granjas diferentes a las de las hembras, por lo que era necesario aumentar el tiempo de conservación.

Unos años más tarde, Facchin *et al.* (1988) presentan los resultados de un número elevado de inseminaciones llevadas a cabo en diferentes granjas y con resultados bastante buenos para ese momento. En estos trabajos emplearon semen diluido en una solución cuya base era el Tris, yema de huevo y antibióticos, refrigerado a 5°C, lo que permitía un uso dentro de las 24-36 horas posteriores.

A partir de ese momento se emplearon distintos diluyentes (la mayoría con tris-citrato y yema de huevo, como base, y diferentes temperaturas de refrigeración (entre los 5º y los 25°C) (Battaglini *et al.*, 1988; Freychat *et al.*, 1989; Theau-Clement y Roustan, 1991; Facchin, 1992; Mercier y Rideaud, 1992; Alvariño, 1993).

La conclusión que se puede extraer de todas estas experiencias es que la mejor temperatura para la conservación de semen de conejo

refrigerado, para periodos cortos, parece ser la de 18°C (López et al., 1996). Esto fue comprobado por Alvariño et al. (1996), quienes desarrollaron un diluyente con glucosa, fructosa, EDTA y citrato sódico, que les permitió obtener excelentes resultados, tanto a las 3, como a las 24 horas, y además eran muy similares a los obtenidos con semen fresco. Un año más tarde, López y Alvariño (1998) consiguen realizar inseminaciones a las 48 horas postrecogida, sin observar una reducción significativa de la fertilidad.

En los últimos años, las líneas de investigación se han centrado en intentar aumentar el tiempo de conservación y facilitar el manejo de esta práctica en las granjas. Para ello, se ha propuesto la adición de gelatina (Nagy et al., 2002; López-Gatius et al., 2005). La gelatina presenta la característica de que solidifica a 15°C. Este hecho permite preparar las dosis seminales (a temperatura superior) e introducir las en pipetas de inseminación, siendo posteriormente refrigeradas a 15°C. Las dosis seminales se entregan de este modo solidificadas. Con este proceso se han obtenido resultados, a 72 horas, similares a los obtenidos a 24 con un diluyente estándar para refrigeración (López-Gatius et al., 2005).

Este es el punto en el que se encuentra esta técnica en la actualidad: se pueden obtener buenos resultados con semen refrigerado en torno a los 18°C, durante 48-72 horas después de su preparación, pero a partir de ese tiempo la fertilidad disminuye. Sin embargo, ese tiempo es un margen suficiente para el funcionamiento actual de la IA en cunicultura.

Semen congelado

Del mismo modo que en otras especies se ha intentado, y en muchas conseguido, congelar el semen para su conservación durante largos periodos de tiempo, en los conejos también se ha intentado. La primera referencia sobre el tema data de 1942, cuando Hoagland y Pin-

cus (1942) realizan los primeros intentos fallidos de congelar semen de conejo.

Un momento decisivo en el proceso de congelación del semen en las distintas especies domésticas fue el descubrimiento del efecto crioprotector del glicerol (Polge et al., 1949). Lamentablemente, al contrario que la mayoría de las especies domésticas, el semen de conejo es demasiado sensible al efecto tóxico del glicerol, por lo que, la concentración máxima de esta sustancia no puede exceder del 5%. Parece ser que esto es debido a que los espermatozoides de conejo presentan un bajo coeficiente de permeabilidad al agua y una alta energía de activación (Curry et al., 1995).

Debido a esto, las investigaciones se han centrado en el empleo de otros crioprotectores, solos o combinados con el glicerol, con objeto de reducir la concentración de éste en el diluyente (Mocé y Vicente, 2009); la mayoría de los estudios se han realizado con DMSO.

En los primeros estudios, en los años 80, se empezaron a utilizar las amidas (acetamida, lactamida) como crioprotectores (Hanada y Nagase, 1980). En los últimos años se ha intentado comparar el efecto de distintos crioprotectores para evaluar su eficacia. Así, Kashiwazaki et al., 2006 concluían que los mejores resultados se obtenían con las amidas, a continuación el DMSO, y los peores con los crioprotectores basados en el glicerol.

Otro punto importante en el estudio del semen congelado es determinar los métodos óptimos de congelación y descongelación. En la actualidad la rampa de congelación más empleada se basa en una refrigeración lenta hasta 5°C y luego congelación en vapores. Para la descongelación se aconseja hacerlo en baño termostático a 37°C o más.

Por último, un hito fundamental para que este método sea aplicable, es que la fertilidad y prolificidad no se vean afectadas por la conservación. Desgraciadamente, en la actua-

lidad, los resultados de fertilidad y prolificidad obtenidos con diferentes diluyentes y sistemas de congelación, son muy variables, tal y como se puede apreciar en la tabla 1. Parece evidente concluir que aún no se ha en-

contrado el protocolo adecuado que permita la congelación y descongelación del semen en esta especie con una calidad aceptable y repetible, para que su uso pueda ser extendido a granjas comerciales.

Tabla 1. Resultados de fertilidad y prolificidad en IA con semen congelado-descongelado de conejo
Table 1. Fertility and prolificacy using artificial insemination with frozen-thawed semen of rabbit

Autores	Crioprotectores	Fertilidad	Nacidos totales
Arriola y Foote (2001)	Acetamida (0,83 M)	63%	5
Samouilidis et al. (2001)	Glycerol (2,7-2,9%)	50-60%	6,8-7,0
Mocé y Vicente (2002)	DMSO 12,4%, sucrosa 0,05 M	61%	5,2
Mocé et al. (2003)	DMSO 12,4%, sucrosa 0,05 M	32-77%	4,4-7,4
Olivares et al. (2005)	DMSO 12,4%, sucrosa 0,05 M	48%	6,3
	DMSO 12,4%, sucrosa 0,05 M, gelatina 1%	44%	5,7
	DMSO 1 M, sucrosa 0,05 M, acetamida 1,25 M	17%	4,5
Blash et al. (2005)	Glicerol 7%	33-50%	7-9
Liu et al. (2007)	Acetamida 1M	80%	2,75
Cortell y Viudes de Castro (2008)	DMSO 12,4%, sucrosa 0,05 M, gelatina 0%	81-86%	8,2-8,5
	DMSO 12,4%, sucrosa 0,05 M, gelatina 1%	85-86%	7,9

Inducción del celo en la hembra

La coneja es una hembra de ovulación inducida por el coito, por ello sólo tiene fases luteínicas cuando se produce la monta, mientras que el resto del tiempo se encuentra en fase folicular (Boussit, 1989). Históricamente se han postulado dos teorías diferentes: las que proponen que las conejas se encuentran en celo permanente (Hammond y Marshall, 1925), y las que defienden que la coneja alterna estados de mayor y menor receptividad sexual (Hill y White, 1933). Esta última es sin embargo la aceptada hoy en día (Moret, 1980; Hulot et al., 1988; Nordio-Baldissera, 1980).

La alternancia de comportamiento, con mayor y menor receptividad sexual, parece deberse a que en el ovario de la coneja se suceden oleadas de crecimiento folicular, que tienen una duración de unos 10-12 días, con una superposición de 4-6 días entre un ciclo y el siguiente (Alvariño, 1993; Arias-Álvarez et al., 2007). Cuando en el ovario existe un número elevado de folículos preovulatorios se producen grandes cantidades de 17β -estradiol, y la coneja está muy receptiva; pero cuando la oleada está iniciándose existe una menor cantidad de 17β -estradiol, por lo que la coneja muestra una escasa receptividad sexual (Boussit, 1989). A todo esto debe su-

marse el antagonismo existente entre la prolactina y las gonadotropinas, ya que la IA se lleva a cabo en torno al pico de lactación de la coneja (días 7 a 11 postparto) (Rebollar et al., 1992a; Theau-Clement y Roustan, 1992).

Por lo tanto, a pesar de que se puede decir que las conejas están siempre en celo, su receptividad y el número de folículos disponibles no es siempre constante y existen variaciones individuales importantes que no han permitido determinar la concentración de estradiol a partir de la cual se pueda considerar receptiva a una coneja (Ubilla y Rebollar, 1995). Como consecuencia de esto, y para mejorar los resultados de la IA, es conveniente sincronizar a todas las conejas para que en el momento de máxima receptividad coincida con el día de la IA, lo que permitirá obtener los mejores resultados de fertilidad y prolificidad (Maertens et al., 1995).

El método más sencillo para conseguir esto era, inicialmente, el empleo de hormonas estimulantes del crecimiento folicular. Dentro de este grupo de hormonas se encontraban la eCG (equine Chorionic Gonadotrophin) y la FSH. Esta última presenta un inconveniente que la hace inutilizable a nivel práctico, y es que su vida media es muy corta, por lo que se deberían realizar varias administraciones para conseguir el efecto deseado. Tampoco podemos olvidar que su precio es muy superior al de la eCG.

Los distintos estudios encaminados a evidenciar el efecto de la eCG como método de sincronización en las conejas, permitieron comprobar que la eCG, en dosis entre 20 y 40 UI, administrada entre las 48 y 72h antes de la IA, permitía un buen grado de sincronización, y que se podía repetir la administración de esta hormona varios ciclos consecutivos sin tener efectos indeseados (Colin, 1992; Maertens et al., 1995; Bonanno et al., 1996), aunque algunos autores han observado una cierta reducción de la eficacia cuando se uti-

liza de forma repetida (Maertens, 1998; Rebollar et al., 2006).

El protocolo más empleado en la actualidad, consiste en la administración, 48 horas antes de la inseminación, de 25 UI de eCG (Rebollar y Alvariño, 2002; Milanés et al., 2004; Rebollar et al., 2006).

En los últimos años y con el objetivo de mantener la "imagen natural" de la carne de conejo, se ha producido una importante discusión sobre la sustitución de estas sustancias hormonales por diferentes métodos de bioestimulación para incrementar la receptividad sexual de las conejas en el momento de la inseminación y, como consecuencia, su fertilidad y productividad.

Los métodos propuestos son numerosos, en algunos casos aún no está demostrada totalmente su efectividad, sin embargo realizaremos un breve repaso de todos ellos.

Separación de la camada

Este método se basa en el antagonismo existente entre lactación y reproducción (Rebollar et al., 1992b; Theau-Clement y Roustan, 1992; Fortum y Bolet, 1995). Numerosas experiencias, llevadas a cabo a lo largo de las últimas décadas, demostraron un efecto positivo (+20 a +40%) de la separación de la camada (antes de la IA) sobre la receptividad Pavois et al., 1994; Maertens, 1998; Bonanno et al., 1999a y b; Szendrö et al., 1999; Bonanno et al., 2000) y la fertilidad de las conejas (+10 a +20%) (Pavois et al., 1994; Maertens, 1998; Alvariño et al., 1998; Bonanno et al., 1999a y b; Theau-Clement y Poujardieu, 1999; Virág, 1999; Szendrö et al., 1999; Bonanno et al., 2000). Incluso se ha citado un incremento en el tamaño de la camada (Maertens, 1998). Sin embargo, se ha comprobado que se produce un descenso en el peso total de la camada (-20 a -70g), así como en el crecimiento individual de cada gazapo, aunque no se ve afectada la supervivencia de los

gazapos (Maertens, 1998; Alvariño et al., 1998; Bonanno et al., 1999a y b; Theau-Clement y Poujardieu, 1999; Szendrő et al., 1999; Bonanno et al., 2000).

La inseminación se lleva a cabo cuando la coneja se encuentra en plena lactación, con lo que el estímulo de succión de los gazapos induce la liberación de prolactina, lo que inhibe, o reduce, la síntesis y liberación de GnRH (Gonadotropin releasing Hormone), LH y FSH. Esto provoca que el crecimiento folicular se reduzca y ralentice. Cano et al. (2005), demostraron en parte esta hipótesis, ya que observaron que tras la separación de la camada durante 48 horas los niveles de FSH y LH eran superiores a los del grupo de conejas que se mantuvo con los gazapos todo el tiempo. Sin embargo, prácticamente no encontraron diferencias en los niveles de prolactina. No obstante, en otros estudios se pudo demostrar que se producía un descenso en los niveles de prolactina 24 horas después de la separación de la camada, aunque no a las 48 horas (momento de la inseminación), coincidiendo con este descenso también se observaba un incremento en los niveles de FSH y, a las 48 horas, un incremento de los niveles de estradiol (Ubi-lla et al., 2000; Rebollar et al., 2006).

En definitiva, la separación de la camada produciría, inicialmente, un descenso de los niveles de prolactina que desbloquea la liberación de FSH, lo que estimularía el desarrollo folicular, produciendo una elevada cantidad de folículos preovulatorios que liberarían grandes cantidades de estrógenos, lo que aumentaría la receptividad de la coneja.

Este método puede combinarse con dos tipos de amamantamiento durante el resto de la lactación: el libre (el nido está abierto continuamente y los gazapos pueden acceder a su madre cuando quieren), o el controlado (el nido permanece cerrado y solo se abre una vez al día durante unos minutos) (Theau-Clement, 2000; Bonanno et al., 2000). Debido al

comportamiento maternal de la coneja que, independientemente de que tenga o no acceso continuo a las crías, sólo suele amamantar una vez al día durante 3-5 minutos, y siempre a la misma hora (González-Mariscal, 2001), los resultados varían poco entre utilizar un sistema u otro (Bonanno et al., 2000).

Programas alimentarios

Durante la lactación, la ingestión de alimento de la coneja aumenta rápidamente. Sin embargo, este incremento no es suficiente para cubrir los requerimientos energéticos necesarios para el mantenimiento y la producción de leche. Esto provoca un balance energético negativo que conduce a una importante movilización de las reservas de grasa corporal (Parigi-Bini et al., 1990; Fortun-Lamothe, 2006). Esta situación es más grave, si cabe, en las conejas primíparas. Estas hembras deben obtener energía suficiente tras el parto para cubrir sus necesidades de mantenimiento, producción de leche y de crecimiento, con lo que el balance energético en estos animales es muy negativo en el postparto (Parigi-Bini y Xicato, 1993).

Otro factor que complica la situación, es que a lo largo de los años, en un intento de maximizar la productividad de esta especie, se ha ido reduciendo el período entre inseminaciones/cubriciones, teniendo lugar éstas, actualmente en España, en el día 11 del postparto en la mayoría de las granjas (Rebollar et al., 2009). Esto provoca que las cubriciones/inseminaciones coincidan con el inicio de la lactación, en pleno periodo de balance energético negativo.

El efecto perjudicial del balance energético negativo sobre la reproducción se ha estudiado ampliamente en otras especies, pudiendo concluir que los animales que ganan peso en el postparto (balance energético positivo) tienen mayor facilidad para quedar gestantes que los que lo pierden (balance

energético negativo) (Theriez, 1984; Santos et al., 2009). En la coneja se han observado efectos similares. Fortun-Lamothe (2006) en su trabajo sobre la interacción entre balance energético y reproducción en la coneja, indica que el déficit energético en el postparto tiene efectos adversos sobre la producción de ovocitos, las tasas de gestación y la mortalidad embrionaria. En el mismo sentido, Brecchia et al. (2006) comprobaron que en los animales en que se indujo un balance energético negativo previo a la inseminación, mediante la privación de alimento durante 48 horas, se observaban picos de LH significativamente menores tras la administración de un análogo de GnRH. Además, la privación de alimento durante sólo 24 horas reducía significativamente la receptividad y fertilidad de las conejas.

En base a esto, se han planteado programas alimentarios con el fin de reducir el balance energético en el postparto, y de esta forma mejorar la eficiencia reproductiva. Una de las posibilidades exploradas ha sido el empleo de un precursor energético, como es el propilenglicol (administrado en el agua al 2%), en los días previos a la inseminación, con el que se mejoran las tasas de gestación (Luzi et al., 2001; González, 2005). Sin embargo, quizás el método más utilizado hoy en día es el flushing alimentario (Theau-Clement, 2000; Fortun-Lamothe, 2006; Theau-Clement, 2008). Este sistema consiste en un incremento del aporte energético (a través de la alimentación) en los días previos a la inseminación. Basándose en esto y teniendo en cuenta el sistema de alimentación utilizado habitualmente en las explotaciones (racionamiento diario de 140-150 g/día de pienso, en hembras de reposición a partir de las 12 semanas, y en conejas no lactantes), el flushing consistiría en eliminar la restricción y dar pienso a voluntad la semana anterior a la inseminación. En el caso de las conejas lactantes no es recomendable el racionamiento, con lo que se puede utilizar el

propilenglicol (González, 2005). Estos programas alimentarios permiten alcanzar resultados de fertilidad similares a los obtenidos mediante la administración de 20 UI de eCG (González, 2005).

En los últimos años se han llevado a cabo diferentes estudios en conejas de recría incrementando el contenido de fibra en su dieta con el fin de incrementar la capacidad de ingestión a largo plazo reduciendo la movilización de grasas e intentando mejorar la fertilidad después del primer parto. Arias-Álvarez et al. (2009) y Rebollar et al. (2011), han observado que con este tipo de dietas se incrementa la capacidad de ingestión durante la recría y la primera gestación con una tendencia a una mejor fertilidad a 11 días postparto. Sin embargo, la capacidad de ingestión no aumenta en lactación, reduciéndose las concentraciones de leptina en el momento de la primera IA (16 semanas de vida) y la supervivencia embrionaria *in vitro*.

Programas de iluminación

El empleo de programas lumínicos para mejorar la receptividad y la fertilidad de las conejas se basa en la existencia de una estacionalidad reproductiva de esta especie cuando se encuentra en estado salvaje (Hafez, 1993). En nuestras latitudes, el mayor porcentaje de gestaciones tienen lugar entre los meses de febrero y principios de agosto, con un pico en mayo (Hammond y Marshall, 1925; Boyd, 1986). Es evidente que los mejores resultados reproductivos se obtienen cuando la duración de las horas diurnas aumentan (Theau-Clement et al., 1998). Esta estacionalidad (cuando no se utilizan programas lumínicos) se observa también en los conejos de granja, como quedó demostrado en un trabajo de Vega et al., (1999), realizado en el noroeste de España, en el que la mejor eficiencia reproductiva se obtenía en el verano y la peor en el otoño.

Con esta base fisiológica, a lo largo de los años se han realizado números experimentos, en granjas de conejos, en busca de la mejor relación entre horas de luz y oscuridad, con el fin de alcanzar unos resultados reproductivos óptimos. De estos estudios podemos extraer que, excepto en el llevado a cabo por Schüddemage (2000), aplicar periodos de luz artificial superiores a 14 horas diarias, incrementa la productividad de las conejas (Uzcategui y Johnston, 1992; Theau-Clement y Mercier, 2004).

También se ha estudiado el posible efecto beneficioso de un incremento de las horas de luz en los días previos a la inseminación (Theau-Clement *et al.*, 1990; Mirabito *et al.*, 1994). Sin embargo, estos trabajos demostraron que el peso de los gazapos al destete era más bajo en el grupo en el que se había incrementado las horas de luz (de 8 a 16) los días anteriores a la inseminación (Mirabito *et al.*, 1994). Esto podría indicar que el cambio en las horas de luz podía tener un efecto adverso en la ingesta de los gazapos.

Recientemente fueron publicados los resultados de dos estudios realizados por Gerencsér *et al.*, (2008a, b), en los que se comparaban dos programas lumínicos: a) 16 horas de luz y 8 horas de oscuridad continuo y b) 8 horas de luz y 16 de oscuridad, modificado a 16 horas de luz y 8 horas de oscuridad 8 días antes de la inseminación. Estos autores demostraron que se producía una modificación en los hábitos alimentarios al modificar las horas de luz (en cuanto a número y duración de los periodos de amantamiento), pero, a pesar de ello, las diferencias en el peso y mortalidad de los gazapos eran poco relevantes.

A modo de resumen podemos decir que, el empleo de un fotoperiodo constante de 8 horas de luz y 16 de oscuridad hasta 7-8 días antes de la inseminación, con un incremento a 16 horas de luz los días previos a la inseminación,

provoca una notable mejora de la productividad de las conejas (en ausencia de la administración de eCG).

Manipulación de los animales

Estudios llevados a cabo por Lefevre y Moret en 1978 postulaban que un cambio brusco de ambiente facilitaba la aparición del celo en las conejas nulíparas. Estos autores explicaron este hecho como consecuencia de una descarga hormonal provocada por el estrés que le ocasionaba la brusca modificación del ambiente. Un fenómeno similar ya había sido descrito previamente en otras especies (du Mesnil du Buisson y Signoret, 1962).

Sin embargo, poco después, Veritá y Finzi (1980), comprobaron que cambiar de jaula a las conejas suponía un estrés importante para las mismas, que alteraba el comportamiento alimentario, reduciéndose la ingesta durante los tres días siguientes, y que se reducía el movimiento de las hembras durante más de una semana.

Empleando como base estos estudios, numerosos investigadores intentaron emplear esta pauta de manejo para mejorar la productividad de las conejas. Uno de los primeros fue Rebollar *et al.*, (1995), quienes demostraron que mediante el cambio de jaula de las conejas, 48 horas antes de la inseminación, era posible mejorar la fertilidad. Posteriormente varios experimentos (Luzi y Crimella, 1998; Castellini *et al.*, 1998; De Lara y Fallas, 1998; Bonanno *et al.*, 1999a y b; De Lara, 2001; Gómez-Ramos *et al.*, 2005) confirmaron la hipótesis, aunque con ciertas matizaciones. Así, se apreciaba que el efecto era muy superior en las conejas nulíparas, mientras que era prácticamente nulo en las hembras primíparas. Este efecto era más evidente sobre la receptividad de las conejas tratadas, pero no lo era tanto cuando considerábamos la fertilidad. Además, en ciertas ocasiones sólo se manifestaba como un in-

crecimiento en el tamaño de la camada y su intensidad presentaba grandes variaciones entre animales y razas. En muchos casos esta técnica se combina con la separación de la camada, siendo, en la mayoría de los casos, más efectiva que el cambio de jaula.

Estos tratamientos consisten en cambiar las conejas de jaula desde 48h hasta poco antes de la inseminación, o bien juntar en una jaula a varias conejas antes de inseminarlas (Theau-Clement, 2000 y 2008).

Teniendo en cuenta las dificultades prácticas para aplicar esta técnica (mano de obra, identificación de animales, cuestiones sanitarias, etc.) y que los resultados son muy variables, y mejorables con otras técnicas más sencillas, se trata de un método que no se suele llevar a la práctica (Theau-Clement, 2000 y 2008; De Lara, 2001).

Efecto macho

Hace tiempo que se conoce el efecto positivo del macho sobre la reproducción de la hembra en diferentes especies domésticas. (Randford y Watson, 1957; Lishman, 1969; Brooks y Cole, 1970; Kirkwood et al., 1981; Roelofs et al., 2007). Estos efectos descritos en diferentes especies desde hace décadas están relacionados, en parte, con las feromonas, sustancias químicas que excretan los animales en la orina, heces o glándulas cutáneas y que causan una reacción específica en el individuo que las percibe. Esta reacción incluye cambios en el comportamiento y/o en el sistema endocrino y/o reproductivo (Izar, 1983; Rekwot et al., 2001).

En conejos, existen pocos estudios al respecto, pero se podría suponer que estos responderían de una forma similar a la descrita en otras especies animales. Sin embargo, repasando la escasa bibliografía que existe al respecto, encontramos un mayor número de estudios que cuestionan la existencia de un efecto macho sobre la fertilidad o sobre la

prolificidad (Kustos et al., 2000; Eiben et al., 2001; Bonanno et al., 2003), que los que apoyan la existencia de un efecto positivo sobre la reproducción (Berepubo et al., 1993). Quizás la diferencia estriba en que los dos primeros utilizaron conejas multíparas y el segundo nulíparas.

A la vista de lo poco concluyentes que resultan las investigaciones sobre el tema y que, en los sistemas de explotación actuales no existen machos en las granjas (por el empleo extendido de la IA), este método de bioestimulación no se utiliza en la práctica.

Inseminación

La técnica de inseminación en la coneja es vaginal profunda, ya que la especial morfología del útero de esta especie (útero doble o didelfo) dificulta la deposición del semen a nivel del cérvix o del útero.

Para ello, habitualmente, se emplea un catéter semirrígido con la punta ligeramente doblada conectado a una jeringuilla o a una pistola de inseminación (en este caso el catéter suele ser más corto y recto).

Uno de los problemas que presenta la técnica de IA en la coneja es la sujeción e inmovilización de las hembras. Bousit (1989) y Alvarriño (1993) describieron dos técnicas para sujetar a las conejas en el momento de la inseminación:

- 1) Método con dos personas: Consiste en inmovilizar a la coneja en decúbito supino sobre el brazo de un ayudante, quien la sujeta por las orejas y la piel de la región cervical con una mano, empleando la otra para agarrar la cola y la piel de la región lumbar.
- 2) Método vertical: En este caso un único técnico sujeta con la mano izquierda la cola y la piel de la grupa, mientras que con la derecha insemina a la coneja. El ter-

cio posterior se eleva ligeramente y mediante una rotación de la mano izquierda se obtiene una posición de lordosis acentuada, lo que facilita que el tracto genital esté lo más rectilíneo posible.

En ambos casos el inseminador abre los labios de la vulva e introduce el catéter en la vagina. Cuando el extremo del catéter está próximo al cuello del útero, se presiona el émbolo de la jeringuilla y se deposita el semen.

Inducción de la ovulación

Las conejas presentan ciertas características reproductivas que contrastan con otras especies animales. Parte de estas diferencias están relacionadas con la ausencia de un ciclo estral definido y regular (Arias-Álvarez et al., 2007). Además, al contrario que en las especies de ovulación espontánea las de ovulación inducida como la coneja, no tienen picos preovulatorios de LH en respuesta a elevados niveles de esteroides (Bakker y Baum, 2000; Brecchia et al., 2006), no existiendo el típico feed-back positivo sobre la LH hipofisaria (Rebollar et al., 2008). Por tanto, la ovulación se produciría como consecuencia de un estímulo inducido por el coito. Este estímulo parece ser más fisiológico que mecánico, como indicaron Fee y Parkes (1930), quienes comprobaron que al anestesiar el cérvix de las conejas no impedían que se produjera la ovulación tras la cópula o, el hecho de que la simulación de un coito con dos conejas, inducía la ovulación en la coneja dominada (Salveti, 2008). En definitiva, el coito induce una cascada neuroendocrina compleja (Spies et al., 1997; Ramirez y Soufi, 1994; Bakker y Baum, 2000) que determina una descarga preovulatoria de LH, entre 60 y 120 minutos después (Rodríguez, 2004; Brecchia et al., 2006), produciéndose la ovulación en 10-12 horas tras el acoplamiento (Foote y Carney, 2000; Brewer, 2006).

Por este motivo, es necesario emplear algún sistema para inducir la ovulación de la coneja y obtener un pico preovulatorio de LH, cuando recurrimos a la IA. Así, la ovulación puede ser provocada interviniendo a diferentes niveles del eje hipotálamo-hipófisis-ovario, utilizando distintos métodos.

Dado que el sistema más simple para provocar la ovulación en esta especie es el coito, se han empleado machos vasectomizados (Khalifa et al., 2000) en programas de IA. Sin embargo, los resultados han sido aleatorios y generalmente poco eficaces (Hulot y Poudjardieu, 1976) y, además, requieren de mano de obra y mantener los machos en la granja, con lo que el sistema se ha desechado.

Otro intento de inducir la ovulación por métodos no hormonales fue el propuesto por Kishk et al., (2000), consistente en la inyección de sales de cobre. Se basaban en estudios en los que se mencionaba el sinergismo existente entre el cobre y las gonadotropinas (Fevold et al., 1936; Cheng et al., 1999). Los resultados obtenidos, aunque mostraban una elevación de la LH tras la administración de las sales de cobre, contrastaban con la necesidad de inyectarlo vía endovenosa y con consecuencias negativas en la integridad de estas vías que necesitarían de mayor estudio.

Debemos comentar que también se experimentó con el empleo de la hCG (human Chorionic Gonadotrophin) para inducir la ovulación (Bomssel-Helmreich et al., 1989; Romeu et al., 1995). La conclusión alcanzada en estas experiencias era que la hormona era efectiva como inductora de la ovulación en la coneja, pero las inyecciones repetidas en los sucesivos ciclos reproductivos inducían una inmunización y una pérdida de efectividad después de la 4^a-5^a administración, al contrario de lo que pasaba con los análogos de GnRH (Adams, 1981). Además, la supervivencia embrionaria también era inferior (Romeu et al., 1995; Mehaisen et al., 2006). Todo esto condujo a que su uso haya sido muy restringido.

El método más frecuentemente utilizado, en la actualidad, para inducir la ovulación en las conejas es la administración intramuscular de análogos de la GnRH en el momento de la inseminación (Quintela et al., 2004). Las primeras experiencias emplearon la gonadorelina de la que se debía administrar a cada coneja, al menos, 250 ng/Kg para provocar la ovulación (Kanematsu et al., 1974). Tomando como base estas experiencias, comenzaron a probarse diferentes análogos de esta molécula, como es el caso de la buserelina, que es eficaz a dosis de 0,8 µg/coneja (Theau-clement et al., 1990; Perrier et al., 2000). Más recientemente se ha probado la lecirelina, que demostró su eficacia, como inductora de la ovulación en esta especie, en dosis de 2 y 4 µg/coneja (Zapletal et al., 2003; Zapletal y Pavlik, 2008). Durante este tiempo la vía de administración empleada para la aplicación de la GnRH ha sido siempre la intramuscular.

En los últimos años se han realizado varios estudios probando la administración intravaginal de diferentes análogos de la GnRH (buserelina, triptorelina y alarelina) (Viudes de Castro et al., 2007; Quintela et al., 2004; Ondruska et al., 2008; Quintela et al., 2009). En estos estudios se demuestra que es posible administrar los análogos de GnRH por vía vaginal añadida a la dosis seminal sin disminución de la fertilidad y prolificidad, incluso, en algunos trabajos se indica una mejora respecto a los tratamientos intramusculares (Quintela et al., 2009). Las ventajas de esta nueva vía de administración sobre el sistema tradicional están relacionadas, principalmente, con un ahorro en tiempo de inseminación, una disminución de los riesgos sanitarios y una reducción de los errores en la aplicación de la hormona. El único inconveniente, desde un punto de vista económico, es que la dosis de GnRH debe incrementarse para conseguir el efecto deseado. Según estudios recientes es probable que este incremento de la dosis sea consecuencia de que en el plasma seminal exis-

ten enzimas proteolíticas que reducen la disponibilidad de la hormona añadida al semen (Vicente et al., 2011), junto con el estado de la mucosa vaginal (Okada et al., 1983). Actualmente en España se encuentra a la venta un diluyente de semen que incorpora un análogo de la GnRH y se empieza a generalizar su uso en explotaciones.

Conclusión

La conclusión que se puede extraer de esta revisión es que en muy pocos años el avance científico en esta técnica en cunicultura ha sido enorme. Es posible, hoy en día, obtener altas fertilidades y prolificidades en ciclos de 42 días, utilizando semen refrigerado con tiempos de conservación de 48h, lo que ha permitido el desarrollo de centros de inseminación dedicados a la producción de dosis seminales que se sirven a largas distancias.

En los últimos años se ha mejorado, además, un punto importante para la producción de carne de conejo, que es la posibilidad de sustituir las hormonas utilizadas en la sincronización del celo por métodos de bioestimulación, mejorando la percepción de carne saludable por parte del consumidor.

Los retos para el futuro próximo serán la introducción a gran escala de diluyentes que incorporen GnRH o sus análogos y la obtención de diluyentes que permitan la conservación del semen a largo plazo o incluso su congelación. En ambos casos la investigación está muy avanzada.

Bibliografía

Adams CE, 1981. Artificial insemination in the rabbit: The technique and application to practice. *J Appl Rabbit Res.*, 4: 10-13.

- Alvariño JMR, 1993. Control de la reproducción en el conejo. Editorial Mundiprensa. Edita Ministerio de Agricultura Pesca y Alimentación – IRYDA. Madrid. España. pp. 137.
- Alvariño JMR, Del Arco JA, Bueno A, 1998. Effect of mother/litter separation on reproductive performance of lactating females inseminated on day 4 or 11 postpartum. *World Rabbit Sci.*, 6: 191-194.
- Alvariño JMR, López J, Del Arco JA, Delgado F, 1996. Artificial insemination of rabbits with diluted semen stored for 24 hours. 6^o World Rabbit Congress. Toulouse. Francia. Vol. 2: 37-40.
- Arencibia DF, 2009. Consideraciones prácticas acerca de la calidad del semen de Conejos aplicado en estudios de la toxicología de la fertilidad. *REDVET* 10(8).
- Arias-Álvarez M, García-García RM, Rebollar PG, Lorenzo PL, 2007. Desarrollo folicular en la coneja. *ITEA*, 103 (4): 173-185.
- Arias-Álvarez M, García-García RM, Rebollar PG, Nicodemus N, Revuelta L, Millán P, Lorenzo PL, 2009. Effects of a lignin-rich fibre diet on productive, reproductive and endocrine parameters in nulliparous rabbit does. *Livestock Science* 123: 107–115.
- Arriola J, Foote RH, 2001. Accesory sperm as an indication of fertilizing ability of rabbit spermatozoa frozen in egg yolk-acetamide with detergent. *J. Androl.*, 22: 458-463.
- Bakker J, Baum MJ, 2000. Neuroendocrine regulation of GnRH release in induced ovulators. *Front Neuroendocrinol.*, 21: 220-262.
- Battaglini M, Costantini F, Castellini C, 1988. Fecondazione artificiale del coniglio con sperma refrigerato e congelato. *Zoot. Nut. Anim.*, 14: 267-271.
- Becerra J, Peña AI, Quintela LA, Herradón PG, (2008). Effect of artificial photoperiod and light wavelength on rabbit sexual behaviour and semen characteristics. *Reprod. Dom. Anim.*, 43 (suppl. 4): 73.
- Berepubo NA, Nodu MB, Monsi A, Amadi EN, 1993. Reproductive response of prepubertal female rabbit to photoperiod and/or male presence. *World. Rabbit Sci.*, 1 (2): 83-87.
- Blash S, Chen L, Harvey M, Gavin WG, 2005. Reestablishment of a transgenic rabbit line by artificial insemination using cryopreserved semen. *Lab. Anim.*, 34: 61-63.
- Bomse-Helmreich O, Huyen LVN, Durand-Gasselin I, 1989. Effects of varying doses of HCG on the evolution of preovulatory rabbit follicles and oocytes. *Hum. Reprod.*, 4(6): 636-642.
- Bonadonna T, 1937. Le basi scientifiche e le possibilità applicative della fecondazione artificiale negli animale domestica. Casa Ed. Vannini. Brescia. Italia.
- Bonanno A, Alabiso M, Alicata ML, Leto G, Todaro M, 1996. Effetti del trattamento “differenziato” con PMSG sull’efficienza produttiva di coniglie sottoposte ad inseminazione artificiale. *Rivista di conigliatura*, 1/2: 41-45.
- Bonanno A, Albiso M, Di Grigoli A, Alicata ML, Leto G, 1999a. Effect of 48h delayed insemination with or without a 48h doe-litter separation on performance of non-receptive rabbit does. *World Rabbit Sci.*, 7(3): 171-175.
- Bonanno A, Albiso M, Di Grigoli A, Alicata ML, 1999b. Effect of change of cage and/or 44h mother-litter separation on productivity of non-receptive lactating rabbit does. Preliminary investigation. *World. Rabbit Sci.*, 7 (2): 107-111.
- Bonnano A, Albiso M, Di Grigoli A, Alicata ML, Montalbano L, 2000. Effect of 48-hour doe-litter separation on performance of free or controlled nursing rabbit does. 7th World Rabbit Congress. Valencia. España. Vol. A: 97-103.
- Bonnano A, Mazza F, Alabiso M, Grigoli A, Alicata ML, 2003. Effects of bio-stimulation induced by contact with buck on reproductive performance of rabbit does. 15th Congr. It. J. Anim. Sci. 2 (1): 133-135.
- Boussit D, 1989. Reproduction et insemination artificielle en cuniculture. Editado por l’Association Française de Cuniculture. Lempdes. Francia. 234 pp.
- Boyd IL, 1986. Effect of day length on the breeding season in male rabbit. *Mammalian Review*, 16: 125-130.
- Brecchia G, Bonanno A, Galeati G, Federici C, Maranesi M, Gobbetti A, Zerani M, Boiti C, 2006.

- Hormonal and metabolic adaptation to fasting: Effects on the hypothalamic-pituitary-ovarian axis and reproductive performance of rabbit does. *Domest. Anim. Endocrinol.* 31: 105-122.
- Bredderman PJ, Foote RH, Yassen AM, 1964. An improved artificial vagina for collecting rabbit semen. *J. Reprod. Fertil.*, 7: 401-403.
- Brewer NR, 2006. Biology of the rabbit. *J. Am. Assoc. Lab. Anim. Sci.*, 45 (1): 8-2.
- Brooks PH, Cole DJ, 1970. The effect of the presence of boar on the attainment of puberty in gilts. *J. Reprod. Fertil.*, 23: 435-440.
- Brun JM, Theau-Clement M, Bolet G, 2002. The relationship between rabbit semen characteristics and reproductive performance after artificial insemination. *Anim. Reprod. Sci.*, 70: 139-149.
- Cano P, Jiménez V, Álvarez MP, Alvariño M, Cardinali P, Esquifino AI, 2005. Effect of litter separation on 24-hour rhythmicity of plasma prolactin, follicle-stimulating hormone and luteinizing hormone levels in lactating rabbit does. *J. Circad. Rhythms*, 3: 9-13.
- Castellini C, Canali C, Boiti C, 1998. Effect of mother-litter separation for 24 hours, by closing the nestbox or change of cage, on rabbit doe reproduction performance. *World Rabbit Sci.*, 6 (1): 199-203.
- Cheng H, Dooley MP, Hopkins SM, Anderson LL, Yibchok-anun S, Hsu WH, 1999. Development of rabbit embryos during a 96-h period of in vitro culture after superovulatory treatment under conditions of elevated ambient temperature. *Anim. Reprod. Sci.*, 56 (3-4): 279-290.
- Colin M, 1992. Cycle synchronisation in rabbit production. *J. Appl. Rabbit Res.*, 15: 398-406.
- Cortell LC, Viudes de Castro MP, 2008. Effect of gelatin addition to freezing extender on rabbit semen parameters and reproductive performance. 9th World Rabbit Congress, Verona, Italia. pp: 327-332.
- Curry MR, Redding BJ, Watson PF, 1995. Determination of water permeability coefficient and its activation energy for rabbit spermatozoa. *Cryobiology*, 32: 175-181.
- De Lara R, 2001. Manejo reproductivo de una empresa cunícola. *Lagomorpha*, 118: 24-34.
- De Lara R, Fallas LM, 1998. Sincronización de estros en conejas nulíparas mediante cambios de lugar y jaula y su efecto sobre el comportamiento reproductivo en inseminación artificial. *Lagomorpha*, 97: 32-36.
- Du Mesnil du Buisson F, Signoret JP, 1962. Influence de facteurs externes sur le déclenchement de la puberté chez la truie. *Ann. Zootech.*, 11: 53-59.
- Eiben C, Kustos K, Sendrő Zs, Theau-Clement M, Gódor-Surmann K, 2001. Effect of male presence before artificial insemination on receptivity and prolificacy in lactating rabbit does. 12th Symposium on housing and diseases of rabbits, furbearing animals and pet animals. Celle, Alemania. Pp. 1-6.
- Facchin E, 1992. Artificial insemination in rabbit. *J. Appl. Rabbit Res.*, 15: 95-103.
- Facchin E, Cancellotti FM, Gallazi D, 1987. Rabbit breeding systems and performances: weekly cycled production. Report EUR 10983 EN. Pp. 69-82.
- Facchin E, Zanirato MG, Gualterio L, Valentini A, 1988. Artificial insemination in rabbit breeding: Note n°1: A.I. service/program for meat rabbit breedings. 4^o World Rabbit Congress. Budapest. Hungría. Vol 1: 121-129
- Fee AR, Parkes AS, 1930. Studies on ovulation: III. Effect of vaginal anaesthesia on ovulation in the rabbit. *J. Physiol.*, 70: 385-388.
- Fevold HL, Hisaw FL, Greep R, 1936. Augmentation of the gonad stimulating action of pituitary extracts by inorganic substances, particularly cooper salts. *Am. J. Physiol.*, 117: 68-74.
- Foote RH, Carney EW, 2000. The rabbit as a model for reproductive and developmental toxicity studies. *Reproductive Toxicology*, 14: 477-493.
- Fortun L, Bolet G, 1995. Les effets de la lactation sur les performances de reproduction chez la lapine. *INRA Prod. Anim.*, 8: 49-56.
- Fortun-Lamothe L, 2006. Energy balance and reproductive performance in rabbit does. *Anim. Reprod. Sci.*, 93: 1-15.

- Freychat JL, Coudert P, Ponceau JP, 1989. Rôle du temps de conservation du serme et d autres facteurs sur les resultats obtenus en insemination artificielle. *Cuniculture*, 16: 25-32.
- Gerencsér Zs, Matics Zs, Nagy I, Princz Z, Orova Z, Biró-Németh E, Radnai I, Szendrő Zs, 2008a. Effect of a light stimulation on the reproductive performance of rabbit does. 9th World Rabbit Congress. Verona. Italia. Pp. 371-374.
- Gerencsér Zs, Matics Zs, Nagy I, Princz Z, Orova Z, Biró-Németh E, Radnai I, Szendrő Zs, 2008b. Effect of lighting program on the nursing behaviour of rabbit does. 9th World Rabbit Congress. Verona, Italia. Pp. 1177-1182.
- Gómez-Ramos B, Becerril-Pérez CM, Torres-Hernández G, Pro-Martínez A, Rodríguez de Lara R, 2005. Relación del nivel de alimentación, cambio de jaula y ayuno con el comportamiento reproductivo de conejas nulíparas Nueva Zelanda blanco y californiana. *Agrociencia*, 39: 491-499.
- González R, 2005. Bioestimulación en la coneja reproductora. ¿Alternativa a los tratamientos hormonales?. *Cunicultura*, Febrero. Pp. 7-16.
- González-Mariscal G, 2001. Neuroendocrinology of maternal behavior in the rabbit. *Hormones and Behavior*, 40: 125-132.
- Hafez ESE, 1993. Reproducción e Inseminación Artificial en Animales. 6th edn. Hafez E.S.E. (Ed), Mexico, DF: Interamericana-McGraw-Hill.
- Hammond J, Marxhall FHA, 1925. Reproduction in the rabbit. Ed: Oliver and Boyd. Edinburg. Escocia. Pp 210.
- Hanada A, Nagase H, 1980. Cryoprotective effects of some amides on rabbit spermatozoa. *J. Reprod. Fertil.*, 60: 247-252.
- Hill M, White WE, 1933. The growth and regression of follicles in the oestrous rabbit. *J. Physiol.*, 80: 174-178.
- Hoagland H, Pincus G, 1942. Revival of mammalian sperm after immersion in liquid nitrogen. *J. Gen. Physiol.*, 25: 337-344.
- Hulot F, Mariana JC, Cattiau G, 1988. HCG induced ovulation in two rabbits breeds: effects of dose, season and sexual behavior. *Livest. Prod. Sci.*, 20: 635-643.
- Hulot F, Poujardieu B, 1976. Induction of ovulation and fertility in the lactating and non-lactating rabbit (*Oryctolagus cuniculus*). *Ann. Biol. Anim. Bioch. Biophys.*, 16: 635-643.
- Izar MK, 1983. Pheromones and reproduction in domestic animals. In: Vandervergh J.G. (Ed.). *Pheromones and reproduction in mammals*. Academic Press. New York. USA. pp. 253-285.
- Kanematsu S, Scaramuzzi RJ, Hilliard J, Sawyer CH, 1974. Patterns of ovulation-inducing LH release following coitus, electrical stimulation and exogenous LH-RH in the rabbit. *Endocrin.*, 95(1): 247-252.
- Kashiwazaki N, Okuda Y, Seita Y, Hisamatsu S, Sonoki S, Shino M, Masaoka T, Inomata T, 2006. Comparison of glycerol, lactamide, acetamide and dimethylsulfoxide as cryoprotectants of Japanese White rabbit spermatozoa. *J. Reprod. Dev.*, 52: 511-516.
- Khalifa RM, El-Alamy MA, Beshir MA, 2000. Vasectomized buck gave better reproductive results in artificial insemination techniques in rabbits than GnRH or HCG. 7th World Rabbit Congress. Valencia. España. Pp. 147-153.
- Kirkwood RN, Forbes JM, Hughes PE, 1981. Influence of boar contact on attainment of puberty in gilts after removal of the olfactory bulbs. *J. Reprod. Fertil.*, 61: 193-198.
- Kishk W, Awad M, Ayoub M, 2000. Non-hormonal substances for the induction of ovulation in rabbit does. 7th World Rabbit Congress. Valencia. España.
- Kustos K, Eiben Cs, Sendrő Zs, Theau-Clement M, Gódor-Surmann K, Jováncai Zs, 2000. Effect on reproductive traits of male presence among rabbit does before artificial insemination (preliminary results). 7th World Rabbit Congress. Valencia. España.
- Kuzminsky G, Fausto A.M, Morera P, 1996. Morphological abnormalities of rabbit spermatozoa studied by scanning electron microscope and quantified by light microscope. *Reprod. Nutr. Dev.*, 36: 565-575.
- Lefebvre B, Moret B, 1978. Influence d'une modification brutale de l'environnement sur l'appari-

- tion de l'oestrus chez la lapine nullipare. *Ann. Biol. Anim. Bioch. Biophys.*, 18 (3): 695-698.
- Lishman AW, 1969. The seasonal pattern of oestrus amongst ewes affected by isolation from and joining with rams. *Agroanimalia.*, 1: 95-101.
- Liu E, Kitajima S, Wiese E, Reifenberg K, Morimoto M, Watanabe T, Fan J, 2007. Re-establishment of complement C6-deficient rabbit colony by cryopreserved sperm transported from abroad. *Exp. Anim.*, 56:167-171.
- López FJ, Alvariño JMR, 1998. Artificial insemination of rabbits with diluted semen stored up to 96 hours. *World. Rab. Sci.*, 6: 251-253.
- López J, Alvariño JMR, Del Arco JA, Delgado F, Ramiro JL, 1996. Effect of cooling temperature on 24 hours stored semen for artificial inseminations of rabbits. 6^o World Rabbit Congress. Toulouse. Francia. Vol. 2: 79-81.
- López-Gatius F, Sances G, Sancho M, Yáñez J, Santolaria P, Gutiérrez R, Núñez M, Núñez J, Soler C, 2005. Effect of solid storage at 15°C on the subsequent motility and fertility of rabbit semen. *Theriogenology.*, 64: 252-260.
- Luzi F, Barbieri, S.; Lazzaroni, C.; Cavani, C.; Zecchini, M.; Crimella, C. (2001). Effects de l'addition de propylene glycol dans l'eau de boisson sur les performances de reproduction des lapines. *World Rabbit Sci.* 9: 15-18.
- Luzi F, Crimella C, 1998. Effect of change of cage 2 days before artificial insemination on reproductive performance of rabbit does. *World. Rab. Sci.*, 6 (1): 195-198.
- Macirone C, Walton A, 1938. Fecundity of male rabbits as determined by "dummy matings". *J. Agric. Sci.*, 28: 122-134.
- Maertens L, 1998. Effect of flushing, mother-litter separation and PMSG on the fertility of lactating does and the performance of the litter. *World Rabit Sci.*, 6: 185-190.
- Maertens L, Luzi F, Grilli G, 1995. Effects of PMSG induced oestrus on the performances of rabbit does: A review. *World. Rab. Sci.*, 3(4): 191-199.
- Mehaisen GM, Viudes-de-Castro M.P, Vicente JS, Lavara R, 2006. In vitro and in vivo viability of vitrified and non-vitrified embryos derived from eCG and FSH treatment in rabbit does. *Theriogenology*, 65: 1279-1291.
- Mercier P, Rideaud P, 1992. Bacteriological study of rabbit sperm and the effects of antibiotic supplements in the conservation medium. *J. Appl. Rabbit Res.*, 15: 520-529.
- Milanés A, Pereda N, Burgos L, Lorenzo PL, Rebollar PG, 2004. Parámetros reproductivos de conejas sometidas a diferentes métodos de sincronización de celo. XXIX Symposium de Cunicultura de ASESCU. Lugo. España. Pp. 101-105.
- Mirabito L, Galliot P, Souchet C, 1994. Effect de l'utilisation de la PMSG et de la modification de la photoperiode sur les performances de reproduction de la lapine. 6^{èmes} Journées de la Recherche Cunicole. La Rochelle. Francia. Vol. 1: 169-178.
- Mocé E, Vicente JS, 2002. Effect of cooling and freezing, the two first steps of a freezing protocol, on the fertilizing ability of the rabbit sperm. *Reprod. Nutr. Dev.*, 42: 189-196.
- Mocé E, Vicente JS, 2009. Rabbit sperm cryopreservation: a review. *Anim. Reprod. Sci.*, 110: 1-24.
- Mocé E, Vicente JS, Lavara R, 2003. Effect of freezing-thawing protocols on the performance of semen from three rabbit lines after artificial insemination. *Theriogenology*, 60: 115-123.
- Moret B, 1980. Comportement d'oestrus chez la lapine. *Cuniculture*, 33: 159-161.
- Nagy Sz, Sinkovics Gy, Kovács A, 2002. Viability and acrosome integrity of rabbit spermatozoa processed in a gelatin-supplemented extender. *Anim. Reprod. Sci.*, 70: 283-286.
- Nizza A, Di Meo C, Taranto S, 2003. Effect of collection rhythms and season on rabbit semen production. *Reprod. Dom. Anim.*, 38: 436-439.
- Nordio-Baldissera C, 1980. Recent advances on rabbit physiology. 2th World Rabbit Congress. Barcelona. España. Vol. 1: 1-60.
- Okada H, Yamazaki I, Yashiki T, Mima H, 1983. Vaginal absorption of a potent luteinizing hormone releasing hormone analog (leuprolide) in rats. II. Mechanism of absorption enhancement with organic acids. *J. Pharm. Sci.*, 72: 75-8.

- Olivares M, Viudes de Castro MP, Lavara F, Lavara R, Vicente JS, 2005. Effect of gelatine or acetamide in post-thawing rabbit sperm parameters. *Reprod. Domest. Anim.*, 40. vol. 382. Abstract, p. 164.
- Ondruska L, Parkanyi V, Rafay J, Chlebec I, 2008. Effect of LHRH analogue included in seminal dose on kindling rate and prolificacy of rabbits artificially inseminated. 9th World Rabbit Congress. Verona. Italia. Pp. 423-426.
- Parigi-Bini R, Xicato G, 1993. Recherches sur l'interaction entre alimentation, reproduction et lactation chez la lapine, une revue. *World. Rab. Sci.*, 1: 155-161.
- Parigi-Bini R, Xicato G, Cinetto M, 1990. Energy and protein retention and partition in rabbit does during first pregnancy. *Cuni. Sci.*, 6: 19-29.
- Pavois V, LeNaour J, Ducep O, Perrin G, Duperray J, 1994. Une méthode naturelle pour améliorer la réceptivité des lapines allaitantes en insémination artificielle. 6^{èmes} Journées Rech. Cunicole. La Rochelle. Francia. Vol II: 528-535.
- Perrier G, Theau-Clement M, Jouanno M, Drouet JP, 2000. Reduction of the GnRH dose and inseminated rabbit doe reproductive performance. 7th World Rabbit Congress. Valencia. España. Vol. A: 225-230.
- Polge C, Smith AU, Parkes AS, 1949. Revival of spermatozoa after vitrification and dehydration at low temperatures. *Nature*, 164: 666.
- Quintela LA, Peña AI, Vega M^aD, Gullón J, Prieto M^aC, Barrio M, Becerra JJ, Maseda F, y Herradón PG, 2004. Ovulation induction in rabbit does submitted to artificial insemination by adding buserelin to the seminal dose. *Reprod. Nutr. Dev.*, 44: 79-88.
- Quintela LA, Peña AI, Vega MD, Gullón J, Prieto C, Barrio M, Becerra JJ, Herradón PG, 2009. Reproductive Performance of Rabbit Does Artificially Inseminated via Intravaginal Administration of [des-Gly 10,_D-Ala₆]-LHRH Ethylamide as Ovulation Inductor. *Reprod. Dom. Anim.*, 44: 829-833.
- Quintero-Moreno A, Rigau T, Rodríguez-Gil JE, 2007. Multivariate cluster analysis regression procedures as tools to identify motile sperm subpopulations in rabbit semen and to predict semen fertility and litter size. *Reprod. Dom. Anim.*, 42: 312-319.
- Ramírez VD, Soufi WL, 1994. The neuroendocrine control of the rabbit ovarian cycle. In *The physiology of reproduction*. Edited by: Knobil E, Neill J. New York: Raven Press. Pp. 595-611.
- Ranford HM, Watson R H, 1957. Influence of rams on ovarian activity and oestrus in Merino ewes in the spring and early summer. *Aust. J. Agric. Sci.*, 8: 260.
- Rebollar PG, Alvariño JMR, Del Arco JA, Bueno A, 1995. Control del celo en conejas nulíparas: manejo y tratamiento con PMSG. *Inf. Tech. Eco. Agr.*, 16 (1): 455-457.
- Rebollar PG, Alvariño MR, 2002. Evolución del manejo reproductivo en cunicultura. *Boletín de cunicultura.*, 124: 6-15.
- Rebollar PG, Bonanno A, Di Grigoli A, Tornambe G, Lorenzo PL, 2008 Endocrine and ovarian response after a 2-day controlled suckling and eCG treatment in lactating rabbit does. *Animal Reproduction Science* 104, 316-328
- Rebollar PG, Milanés A, Pereda N, Millán P, Cano P, Esquifino AI, Villaroel M, Silvaán G, Lorenzo PL, 2006. Oestrus synchronisation of rabbit does at early post-partum by doe-litter separation or eCG injection: Reproductive parameters and endocrine profiles. *Anim. Reprod. Sci.*, 93: 218-230.
- Rebollar PG, Pereda N, Schwarz BF, Millán P, Lorenzo PL, Nicodemus N, 2011. Effect of feed restriction or feeding high-fibre diet during the rearing period on body composition, serum parameters and productive performance of rabbit does. *Animal Feed Science and Technology*, 163: 67-76.
- Rebollar PG, Pérez-Cabal MA, Pereda N, Lorenzo PL, Arias-Álvarez M, García-Rebollar P, 2009. Effects of parity order and reproductive management on the efficiency of rabbit productive systems. *Livestock Sci.*, 121 (2009) 227-233.
- Rebollar PG, Ubilla E, Rodríguez JM, 1992a. Influence of the parturition-insemination interval in the conception rate in rabbits artificially inseminated with fresh semen. *J. Appl. Rabbit Sci.*, 15, 407-411.

- Rebollar PG, Ubilla E, Rodríguez JM, Illera JC, Silvan G, 1992b. Influencia del nivel de receptividad sexual sobre el estradiol plasmático y la respuesta ovulatoria durante el postparto en la coneja. *Rev. Españ. de Fisiol.*, 48 (1): 13-18.
- Rekwot PI, Ogbu D, Oyedipe EO, Sekoni VO, 2001. The role of feromones and biostimulation in animal reproduction. *Anim. Reprod. Sci.*, 65: 157-170.
- Rodríguez TM, 2004. Inducción de la ovulación. *Boletín de Cunicultura*, 134: 51-54.
- Roelofs JB, Soede NM, Dieleman SJ, Voskamp-Harkema W, Kemp B, 2007. The acute effect of bull presence on the plasma profiles of luteinizing hormone in postpartum, anoestrous dairy cows. *Theriogenology*, 68: 902-907.
- Romeu A, Molina I, Tresguerres JAF, Pla M, Peinado JA, 1995. Effect of recombinant human luteinizing hormone versus human chorionic gonadotrophin: effects on ovulation, embryo quality and transport, steroid balance and implantation in rabbits. *Mol. Hum. Reprod.*, 1(3): 126-132.
- Salvetti P, 2008. Production des embryons et cryoconservation des ovocytes chez la lapine: Application à la gestion des ressources génétiques. Tesis Doctoral. Universidad de Lyon. Francia.
- Samouilidis S, Saoulidis K, Foukos A, Ypsilantis P, Demertzis A, Sbiraki AP, 2001. Freezing of rabbit semen after the addition of glycerol and dimethylsulfoxide in the extender. *J. Hellenic Vet. Med. Soc.*, 52: 299-302.
- Santos JEP, Rutigliano HM, Sá Filho MF, 2009. Risk factors for resumption of postpartum estrous cycles and embryonic survival in lactating dairy cows. *Anim. Reprod. Sci.*, 110: 207-221.
- Schüddemage M, 2000. Untersuchungen zum einfluß von naturlicht im vergleich zu zwei verschiedenen kunstlichtregimen auf die reproduktionsparameter weiblicher und männlicher kaninchen (*Orytolagus cuniculus*). Tesis Doctoral. Universidad de Gießen. Alemania.
- Sinkovics G, Szerémy Zs, Kehoul I, 1980. Artificial insemination system in large rabbit farm. 2^o World Rabbit Congress. Barcelona. España.
- Spies HG, Pau KY, Yang SP, 1997. Coital and estrogen signals: a contrast in the preovulatory neuroendocrine networks of rabbits and rhesus monkeys. *Biol Reprod.*, 56: 310-319.
- Szendrő Zs, Jovánczai Zs, Theau-Clément M, Radnai I, Bíró-Németh E, Milisits G, 1999. The effect of doe-litter separation on production performance in rabbit does and their kits. *World Rab. Sci.*, 7(3): 165-169.
- Theau-Clement M, 2000. Advances in biostimulation methods applied to rabbit reproduction. 7th World Rabbit Congress. Valencia. Pp. 61-79.
- Theau-Clement M, 2008. Facteurs de réussite de l'insemination chez la lapine et méthodes d'induction de l'oestrus. *INRA Prod. Anim.*, 21 (3): 221-230.
- Theau-Clement M, Bolet G, Roustan A, Mercier P, 1990. Comparison of different modes d'induction de l'ovulation chez les lapines multipares en relation avec leur stade physiologique et la receptivite au moment de la mise a la reproduction. 5^{emes} Journees de la Recherche Cunicole. 12-13 diciembre. Paris. Francia. Tome 1, comm. 6.
- Theau-Clément M, Castellini C, Maertens L, Boiti C, 1998. Biostimulations applied to rabbit reproduction: Theory and practice. *World Rabbit Sci.*, 6: 179-184.
- Theau-Clement M, Mercier P, 2004. Influence of lighting programmes on the productivity of rabbit does of two genetic types. 8th World Rabbit Congress. Puebla. Mexico. Pp: 358-363.
- Theau-Clement M, Poujardieu B, 1999. Effect of 24h mother-litter separation on rabbit does reproductive performance and young growth. *World Rabbit Sci.*, 7(3): 177-179.
- Theau-Clément M, Poujardieu B, Bellereaud J, 1990. Influence des traitements lumineux, modes de reproduction et états physiologiques sur la productivité de lapines multipares. 5^{emes} Journees de la Recherche Cunicole. 12-13 diciembre. Paris. Francia. Tome 1, comm. 7.
- Theau-Clement M, Roustan A, 1991. L'insemination artificielle chez la lapine. *El & Ins.*, 245: 3-12.
- Theau-Clément M, Roustan A, 1992. A study on relationships between receptivity and lactation in the doe, and their influence on reproductive performances. *J. Appl. Rabbit Res.*, 15: 412-421.

- Theriez M, 1984. Influence de l'alimentation sur les performances de reproduction des ovins. 9^{èmes} Journ. Rech. Ovine et Caprine, Paris, Francia. Pp. 294-326.
- Ubilla E, Rebollar PG, 1995. Influence of the postpartum day on plasma estradiol-17beta levels, sexual behaviour and conception rate in artificially inseminated lactating rabbits. Anim. Reprod. Sci. 38, 337-344.
- Ubilla E, Rebollar PG, Pazo D, Esquifino AI, Alvaríño MR, 2000. Pituitary and ovarian response to transient doe-litter separation in nursing rabbits. J. Reprod. Fertil., 118: 361-366.
- Uzcategui ME, Johnston NP, 1992. The effect of 10, 12 and 14 hour continuous and intermittent photoperiods on the reproductive performance of female rabbits. J. Appl. Rabbit. Res., 15: 553-559.
- Vega M^aD, Prieto M^aC, Gullón J, Herradón PG y Quintela LA, 1999. Resultados de inseminación artificial en explotaciones cunícolas de Galicia. II Congreso Ibérico de Reproducción Animal. Lugo. España. Pp. 509-511.
- Verità P, Finzi A, 1980. Cage changing as a stressor in rabbit. 2th World Rabbit Congress. Barcelona. España. Vol. 1: 417-423.
- Vicente JS, Lavara R, Marco-Jiménez F, Viudes-de-Castro MP, 2011. Detrimental effect on availability of buserelin acetate administered in seminal doses in rabbits. Theriogenology, 76: 1120-1125.
- Virág Gy, 1999. Doe-litter separation. Effects upon reproductive traits and discriminant functions on fertility. World Rabbit Sci., 7(3): 155-159.
- Viudes-de-Castro MP, Lavara R, Marco-Jimenez F, Cortell C, Vicente JS, 2007. Ovulation induced by mucosa vaginal absorption of buserelin and triptorelin in rabbit. Theriogenology, 68: 1031-1036.
- Zapletal D, Adamec V, Klecker D, 2003. Effect of GnRH hormones application on performance of artificial inseminated rabbits (*Oryctogalus cuniculus*) during year. Acta Univ. Agric. Silvic. Mendel. Brun., 5: 123-132.
- Zapletal D, Pavlik A, 2008. The effect of lecorelin (GnRH) dosage on the reproductive performance of nulliparous and lactating rabbit does. Anim. Reprod. Sci., 104: 306-315.
- (Aceptado para publicación el 16 de noviembre de 2011)