



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA CHAPINGO

DEPARTAMENTO DE ENSEÑANZA, INVESTIGACIÓN

Y SERVICIO EN ZOOTECNIA

POSGRADO EN PRODUCCIÓN ANIMAL

INFLUENCIA DE CAMBIO DE JAULA Y LACTACIÓN CONTROLADA EN CONEJAS INSEMINADAS ARTIFICIALMENTE E INDUCIDAS A LA OVULACIÓN CON GONADORELINA Y FERTIRELINA

TESIS

Que como requisito parcial
Para obtener el grado de:



MAESTRO EN CIENCIAS EN INNOVACIÓN GANADERA

DIRECCION GENERAL ACADEMICA
DEPTO. DE SERVICIOS ESCOLARES
OFICINA DE EXAMENES PROFESIONALES

Presenta:

MARÍA JETZABEL CISNEROS PRADO

Bajo la supervisión de: RAYMUNDO RODRÍGUEZ DE LARA, Ph.D.



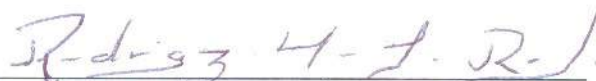
Julio de 2013

Chapingo, Estado de México

**INFLUENCIA DE CAMBIO DE JAULA Y LACTACIÓN
CONTROLADA EN CONEJAS INSEMINADAS ARTIFICIALMENTE
E INDUCIDAS A LA OVULACIÓN CON GONADORELINA Y
FERTIRELINA**

Tesis realizada por **MARÍA JETZABEL CISNEROS PRADO** bajo la supervisión del Comité Asesor indicado, aprobada por el mismo y aceptada como requisito parcial para obtener el grado de:

MAESTRO EN CIENCIAS EN INNOVACIÓN GANADERA

DIRECTOR: 
Ph.D. RAYMUNDO RODRÍGUEZ DE LARA

ASESOR: 
Ph.D. RAYMUNDO RANGEL SANTOS

ASESOR: 
DR. DEMETRIO AMBRIZ GARCÍA

CONTENIDO

CONTENIDO	iii
LISTA DE CUADROS	v
LISTA DE FIGURAS	vi
DEDICATORIA	vii
AGRADECIMIENTOS.....	viii
DATOS BIOGRÁFICOS.....	ix
1. INTRODUCCIÓN GENERAL	1
2. REVISIÓN DE LITERATURA.....	4
2.1. Particularidades de la fisiología reproductiva de la coneja	4
2.2. Métodos hormonales y naturales para sincronizar estros	6
2.3. Inducción de la ovulación	9
2.4. Naturaleza química de GnRH y sus análogos sintéticos	10
2.4.1. Análogos de GnRH	10
2.4.2. Estructura química de análogos de GnRH.....	11
2.5. Literatura Citada.....	14
3. INFLUENCIA DE CAMBIOS DE JAULA Y LACTACIÓN CONTROLADA EN CONEJAS INSEMINADAS ARTIFICIALMENTE E INDUCIDAS A LA OVULACIÓN CON GONADORELINA Y FERTIRELINA	18
3.1. Resumen	18
3.2. Abstract	19
3.3. Introducción.....	20

3.4. Materiales y Métodos	21
3.4.1. Localización	21
3.4.2. Animales y diseño experimental	21
3.4.3. Instalaciones y ambiente	22
3.4.4. Manejo alimenticio	22
3.4.5. Manejo reproductivo e inseminación artificial	23
3.4.6. Variables de respuesta	24
3.4.7. Análisis estadístico	24
3.5. Resultados	25
3.6. Discusión.....	27
3.7. Conclusiones.....	31
3.8. Literatura Citada.....	31

LISTA DE CUADROS

Cuadro 1. Estructura de GnRH y sus principales agonistas	12
Cuadro 2. Medias de cuadrados mínimos ($\pm$ error estándar) para el efecto de método de bioestímulo y tipo de análogo de GnRH en la receptividad sexual y tasa de partos en conejas lactando.	26
Cuadro 3. Medias de cuadrados mínimos ($\pm$ error estándar) para el efecto del bioestímulo y tipo de análogo de GnRH en el tamaño de camada al parto en conejas lactando.	27
Cuadro 4. Medias de cuadrados mínimos ($\pm$ error estándar) para la interacción bioestímulo y tipo de análogo de GnRH en la tasa de partos y tamaño de camada al parto en conejas lactando	27

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Esquema de los mecanismos de actividad funcional del aparato reproductor de la coneja, en distintas fases de actividad.....	5
Figura 2. Esquema del lugar de actuación según distintos métodos de inducción de ovulación.....	9
Figura 3. Estructura física de lamolécula de fertirelina.....	13
Figura 4. Estructura física de molécula de gonadorelina	13

DEDICATORIA

Con todo mi amor te dedico este trabajo mi niña linda, Reginita, eres mi motivo para vivir, mi razón para existir, mi mayor alegría. Te amo nena...

AGRADECIMIENTOS

A la Universidad Autónoma Chapingo por abrirme sus puertas y brindarme las facilidades para realizar mis estudios de posgrado.

Al Posgrado en Producción Animal del Departamento de Zootecnia, por los conocimientos adquiridos y las facilidades otorgadas en la realización de este trabajo.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología por el invaluable apoyo económico y de asesoramiento administrativo durante mi estancia en el Posgrado.

A mis asesores, por su apoyo, consejo, dirección y dedicación.

A mis padres, Bárbara y Jesús, por su comprensión, paciencia, por todo su apoyo. Papá y mamá, muchas gracias por sus palabras de aliento, por cuidar de mi hija en mis ausencias y por tenderme siempre una mano firme que incrementa mi seguridad y confianza, los amo mucho.

A mis hermanos por hacer mis días mucho mejores, porque con su entusiasmo contagian de una actitud positiva siempre. Los quiero mucho Dianita y Jesús.

A ti Fabián por tu apoyo y paciencia, te quiero mucho.

DATOS BIOGRÁFICOS

DATOS PERSONALES

Nombre: María Jetzabel Cisneros Prado
Fecha de nacimiento: 17 de noviembre de 1986
Lugar de Nacimiento: Distrito Federal
CURP: CIPJ861117MDFSRT07
Cédula profesional: 8124262



DESARROLLO ACADÉMICO

2001 - 2004 Preparatoria Agrícola, Universidad Autónoma Chapingo.
2004 - 2008 Departamento de Zootecnia.
Universidad Autónoma Chapingo.
2011 - 2012 Maestría en Ciencias en Innovación Ganadera.
Posgrado en Producción Animal.
Departamento de Zootecnia.
Universidad Autónoma Chapingo.

1. INTRODUCCIÓN GENERAL

La inseminación artificial (IA) en cunicultura ha revolucionado la producción de conejos en explotaciones intensivas de conejos para carne. Esta técnica de manejo reproductivo empezó a utilizarse en conejos de laboratorio a principios del siglo XIX en Europa y los primeros intentos de aplicación práctica en explotaciones intensivas de conejos para carne fueron iniciados en la Universidad de Bristol del Reino Unido (Rodríguez, 1984). La IA aplicada en conejos es una herramienta importante para incrementar la eficiencia, reducir los tiempos de servicios, facilitar el manejo reproductivo, reducir los riesgos de enfermedades venéreas y para realizar mejoramiento genético en la producción de conejos (Rodríguez y Fallas, 1999). La inseminación artificial es una técnica que permite la concentración de las cubriciones de un gran número de animales en un mismo día (Alvariño y García, 1995). El desarrollo de la IA en cunicultura ha dado lugar al manejo en bandas con importantes mejoras productivas (Leyún e Irurietagoiena, 1992; Argüello, 2004).

Sin embargo, los resultados de fertilidad y prolificidad a largo plazo bajo este programa de reproducción mostraron ser más bajos que en monta natural (Rodríguez, 1996) y esto era como consecuencia de que no todas las conejas que eran inseminadas estaban receptivas (Theau-Clément y Lebas, 1996). Estas experiencias concluyeron que el estado de receptividad sexual al momento de la IA constituye un factor fundamental en el éxito de este programa. En los últimos años la técnica de inseminación artificial de conejas ha sido objeto de estudio con el fin de optimizarla al máximo (Quintela *et al.*, 2007).

El estado fisiológico (nulíparas, primíparas, multíparas lactantes y no lactantes), la condición corporal y la receptividad sexual, son algunos de los factores relacionados con la coneja que pueden afectar los resultados reproductivos en

programas de inseminación artificial (Castellini, 1996). La receptividad sexual de una coneja en lactación se ve disminuida (Rodríguez y Fallas, 1999). La lactación presenta una acción antagonista en la presentación del celo, lo que representa un problema en ritmos intensivos y semi-intensivos de reproducción cuando los servicios se realizan entre los días tres a 11 después del parto (Theau-Clément y Boiti, 1998).

El control del comportamiento estral de la coneja para los diferentes estados fisiológicos reproductivos presenta grandes ventajas en las explotaciones intensivas de conejos para carne, donde una gran parte de la mano de obra se invierte en el manejo reproductivo (Rodríguez *et al.*, 2003). Reducir la proporción de conejas no receptivas ahorraría mano de obra y reduciría el intervalo entre partos, lo que tendría una inmediata repercusión económica, siendo la receptividad sexual uno de los factores más importantes que afectan el comportamiento reproductivo en conejas inseminadas (Alvariño, 1993; Milanés *et al.*, 2002).

Mejoras en el crecimiento folicular y en la receptividad sexual de las conejas han sido posibles al aplicar la hormona gonadotropina coriónica de la yegua preñada (PMSG) 48 h (horas) antes del servicio (Maertens *et al.*, 1995), mediante programas lumínicos continuos o intermitentes (Uzcategui y Johnston, 1992), al separar temporalmente los gazapos de la madre o lactación controlada (Pavois *et al.*, 1995; Castellini *et al.*, 1998; Bonano *et al.*, 1999; Espinosa *et al.*, 2004) y al cambiar las conejas a diferentes jaulas por ciertos periodos (Luzi y Crimella, 1998; Rodríguez *et al.*, 2003). Sin embargo, la eficacia de estos métodos de sincronización de estros en conejas lactando bajo programas de IA aún debe ser investigada.

Gómez *et al.* (2005) observaron que un cambio súbito de ambiente facilita la aparición del estro en conejas nulíparas, ya que se estimula el sistema nervioso central y ocasiona una descarga de corticosteroides y prolactina al torrente sanguíneo; esto libera el factor liberador de las hormonas gonadotropicas (GnRH) que a su vez estimula la síntesis de la Hormona Folículo Estimulante

(FSH) y la Hormona Luteinizante (LH) que modifica la condición fisiológica del eje hipotálamo - hipófisis – ovario. Espinosa *et al.* (2004), encontraron que la separación madre-camada por 48 h en conejas lactantes es un método efectivo para sincronizar estros en programas de IA. Rodríguez *et al.* (2003) reportaron que el porcentaje de receptividad sexual fue de 86.7% y la tasa de partos 74.3% en conejas lactando cambiadas de jaulas durante 8-10 h. La prolificidad en estas mismas conejas fue de 8.6 gazapos.

Como parte fundamental de la técnica de IA en conejos es la inducción de la ovulación inmediatamente después del servicio. Esto se realiza mediante la aplicación intramuscular de un análogo agonista de GnRH, que por su pequeña cadena molecular de aminoácidos no provoca la formación de anticuerpos después de varias aplicaciones (Alvariño, 1993). Son numerosos los trabajos que corroboran la efectividad de la utilización de diferentes análogos de GnRH para inducir la ovulación en las conejas (Vicente y García, 1994; Rodríguez, 2004; Quintela *et al.*, 2007).

Como hipótesis se plantea que la receptividad sexual y el comportamiento reproductivo en conejas lactando inseminadas artificialmente no varían cuando son expuestas a cambios de jaula por 8 h o mediante lactancia controlada durante 36 h, independientemente de que se induzca la ovulación con Gonadorelina y Acetato de Fertirelina. El objetivo del presente estudio fue evaluar la influencia de dos métodos de bioestímulo en la receptividad sexual, fertilidad y prolificidad en conejas lactantes inseminadas artificialmente. Las respuestas reproductivas de conejas inducidas a la ovulación con dos análogos diferentes de GnRH fueron estudiados.

2. REVISIÓN DE LITERATURA

2.1. Particularidades de la fisiología reproductiva de la coneja

El conocimiento de la fisiología de la reproducción es fundamental para mejorar los parámetros reproductivos en conejas en una explotación cunícola (Arias *et al.*, 2007). La coneja presenta características diferentes a las de otras especies zootécnicas, como es la ausencia de un ciclo estral definido y regular y la presencia de mecanismos reflejos neuro-humorales que dan lugar a una ovulación inducida (Rodríguez *et al.*, 2003).

La alternancia de comportamiento, con mayor y menor receptividad sexual en las conejas en los periodos inmediatamente después del parto, parece deberse a que en el ovario se suceden oleadas de crecimiento folicular, que tiene una duración de unos 10 a 12 días, con una superposición de 4 a 6 días entre un ciclo y el siguiente (Vega *et al.*, 2012). Cuando en el ovario existe un número elevado de folículos preovulatorios se producen grandes cantidades de 17- β -estradiol, y la coneja está muy receptiva pero cuando la oleada está iniciándose existe una menor cantidad de 17 β -estradiol, por lo que la coneja muestra una escasa receptividad sexual (Rodríguez, 2004).

En el momento de la cubrición, se producen estímulos emocionales generales locales a través de receptores localizados en el área genital que llegan al cerebro, el cual produce LH que hace que se dejen de producir estrógenos y desaparezcan las manifestaciones de celo. La actividad ovárica se reduce a períodos de crecimiento y regresión folicular, donde los folículos degeneran y desaparecen en el interior del ovario sin llegar a eclosionar (Egea, 1993).

El coito genera un reflejo neuroendócrino que aumenta el tono noradrenérgico, lo que estimula la liberación de GnRH del hipotálamo, aumentando la pulsabilidad de la LH que alcanza su nivel máximo de una hora y media a dos

h después. En la Figura 1 se esquematizan las reacciones hormonales que tienen lugar en la coneja con relación a su estado fisiológico (Pau *et al.*, 2000); de modo natural el hipotálamo genera pulsos de FSH que se dirigen a los ovarios, y si no hay cópula, a pesar de que suben los niveles de estradiol, el impulso se regresa al cerebro para comenzar con un nuevo ciclo; en caso de que haya habido servicio y pulsos de LH al ovario, pueden suceder una de tres cosas, que la coneja esté gestante, vacía o en condiciones de pseudogestación.

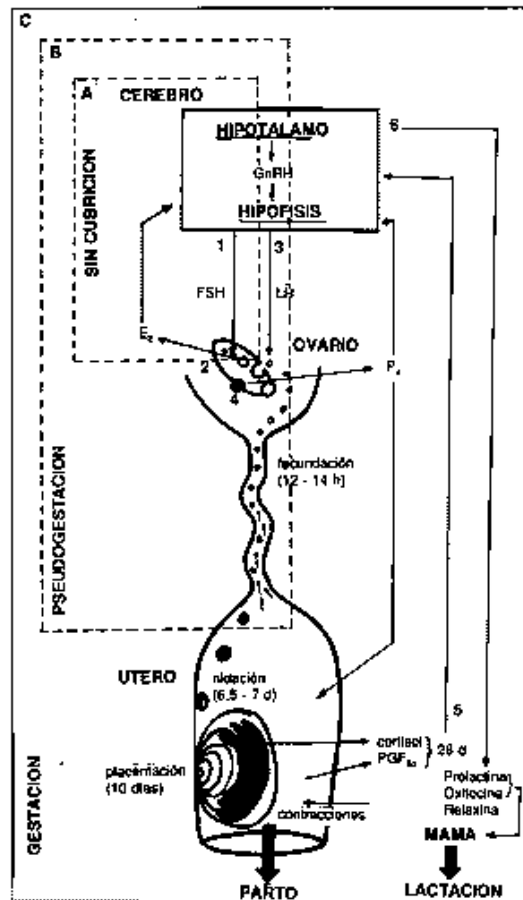


Figura 1. Esquema de los mecanismos de actividad funcional del aparato reproductor de la coneja, en distintas fases de actividad.
Fuente: Egea, 1993.

Después del coito se genera un aumento transitorio de FSH a los 60-90 minutos asociado a un aumento de esteroides foliculares y de la síntesis de proteína y ARNm, que regresan a sus valores basales al momento de la ovulación (Arias *et al.*, 2007).

2.2. Métodos hormonales y naturales para sincronizar estros

En cunicultura para obtener buenos porcentajes de fertilidad bajo ritmos intensivos y semi-intensivos de reproducción es necesaria la estimulación ovárica de las conejas, ya que la lactación reduce en gran medida la receptividad sexual (Lorenzo *et al.*, 2006). Con la intención de reducir el efecto antagónico de la prolactina en hembras lactantes, o bien, incrementar la fertilidad de las conejas nulíparas, se han estudiado métodos hormonales o naturales para sincronizar estros.

La sincronización de estros en programas de IA, permite una mejor planeación de las actividades en la granja, y hace más eficiente el manejo reproductivo. La hormona que más se utiliza para sincronizar es la PMSG (Gonadotropina coriónica de la yegua preñada) hoy en día hormona gonadotropina coriónica equina (eCG). Maertens *et al.* (1995) señalan que el uso de la PMSG incrementa la receptividad sexual y alrededor del 90% de las conejas aceptan el macho 2 a 3 días después de su aplicación y la fertilidad se ve incrementada particularmente en hembras lactantes no receptivas y en aquellas con problemas reproductivos. También mejora la prolificidad en un 5 al 10%. Sin embargo, los incrementos en el tamaño de la camada al parto al aplicar esta hormona incrementa los niveles de mortalidad que según los autores podría estar relacionado a la dosis administrada. Además reportan que su uso sistémico reduce la fertilidad debido a la formación de anticuerpos en sangre y su costo es alto. Son varios los estudios que están de acuerdo sobre las ventajas y desventajas del uso de esta hormona para sincronizar estros en conejas (Theau-Clement y Lebas, 1996; Milanés *et al.*, 2002; Burgos *et al.*, 2004).

Los métodos hormonales para la sincronización son un mecanismo muy eficiente. Sin embargo, incrementan los costos de producción y no siguen la tendencia del mercado, que exige productos más inocuos y sin residuos de algún tipo de producto químico. Es por esto que se han estudiado las formas en las que se puede provocar de manera biológica el mismo efecto.

Se han realizado estudios en los que se ha comparado la aplicación de PMSG con métodos de bioestímulo como la lactación controlada para inducir el celo, considerando algunas variables que pueden afectar este proceso. Milanés *et al.* (2002) encontraron que la separación transitoria de la camada durante un período de 24 a 48 h antes de la inseminación artificial, permite conseguir resultados de fertilidad similares a los de las conejas tratadas con PMSG a partir del segundo o del tercer parto respectivamente. Además, el tratamiento hormonal y la separación transitoria de la camada durante 24 h antes de la inseminación, mejoraron significativamente el número de gazapos nacidos totales por parto comparado con las conejas controles.

Pereda *et al.* (2001) encontraron que no hay diferencias en la estructura del sistema reproductor de las conejas cuando son sometidas a una aplicación de PMSG, o bien 24 o 48 h de control de lactancia y sostienen que los ovarios de las conejas son perfectamente sanos y viables, fisiológicamente hablando, ya que estos ovarios presentaron folículos normales en número y tamaño.

Burgos *et al.* (2004) determinaron las diferencias en índices productivos en tres tipos de tratamientos lactación controlada por 24 h (BIO24), lactación controlada por 48 h (BIO48) y la administración de 25 UI (Unidades Internacionales) de PMSG. Los gazapos con más peso a los 25 días de edad fueron los que pertenecieron al grupo BIO48, seguidos por los del grupo BIO24 y por último por el grupo de PMSG (473.6 g, 438.3 g y 401.9 g, respectivamente). El grupo BIO48 es el que mostró una mayor mortalidad, debido a la influencia de pérdida de la alimentación para los gazapos por este período de tiempo. Se obtuvieron mejores pesos al destete en el segundo, tercer y cuarto parto.

Acerca del destete transitorio de la camada se han realizado diversos estudios para conocer si hay efectos negativos tanto en la madre como en sus crías. La ausencia de amamantamiento y el ayuno podrían perjudicar el crecimiento del gazapo e inducir cambios en la estructura intestinal y pérdida de enzimas digestivas (Espinosa *et al.*, 2003). Estos autores observaron una reducción del 13% en la longitud de las vellosidades intestinales (665 vs 579 μm ; $P < 0.05$)

después el ayuno, probablemente porque la ausencia de alimento en el tracto yeyunal tiene efectos directos en la proliferación de las células epiteliales y provoca atrofia de las vellosidades.

En el aspecto de la lactación controlada también se han realizado estudios respecto a la repetición continua de este tratamiento en las conejas por varios partos. Bonanno *et al.* (2002) encontraron que la separación transitoria de la camada por tres partos consecutivos, va disminuyendo la fertilidad progresivamente. La posible explicación a este fenómeno es que se induce en las conejas una condición de adaptación fisiológica, mostrando una depresión en fertilidad y producción de leche.

Se ha observado una menor producción de leche en las conejas bioestimuladas (4593 vs 5090 g de leche en 21 días), pero no se ve afectado el consumo de alimento (Espinosa *et al.*, 2003). Los días siguientes a la separación se observan descensos en el consumo y en la producción de leche Sin embargo, los efectos de tratamiento no muestran diferencias significativas en el desarrollo final de los gazapos. Bonanno *et al.* (1999), contrario al estudio anterior, argumenta que una separación transitoria de 48 h sí influye en el peso de los gazapos.

Otro método de bioestímulo que permite inducir el celo en las conejas lactantes es el cambio de jaula (Castellin *et al.*, 1998). Rodríguez *et al.* (2003) encontraron que los cambios de las conejas a otras jaulas durante ocho a 10 h bajo un ritmo de reproducción de cuatro a 11 días después del parto resultó en 86.7% de tasa de receptividad sexual y un tamaño de camada promedio de 8.6 gazapos. Varios estudios han constatado que cambios de las conejas a otras jaulas desde ocho hasta 48 h dan buenos resultados reproductivos (Luzi y Crimella, 1998; Gómez *et al.*, 2005; Manal, 2010).

Berepubo *et al.* (1993) realizó un estudio para analizar el “efecto macho” en las conejas y encontró que la exposición de hembras jóvenes al macho puede ser utilizado como una alternativa de sincronización en unidades de producción no intensivas, ésta técnica permite inducir la pubertad temprana, amplificar la duración del ciclo estral e incrementar las tasa de partos.

2.3. Inducción de la ovulación

Es fundamental mencionar que en la coneja la ovulación es inducida como reflejo al coito en monta natural (Rodríguez, 2004; Vicente y García, 1994), de esta forma, si se realiza inseminación artificial es necesario inducir la ovulación por mecanismos exógenos, principalmente hormonales. En la Figura 2 se esquematizan algunos mecanismos de inducción de la ovulación.

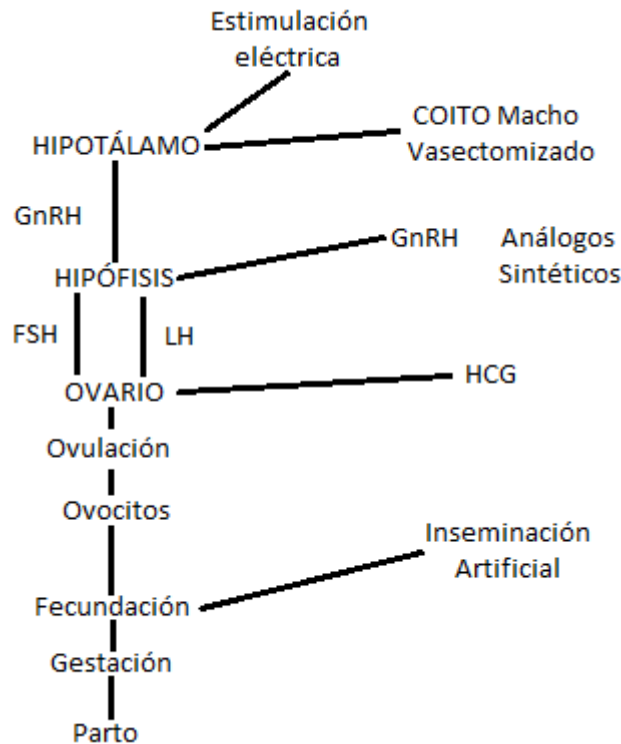


Figura 2. Esquema del lugar de actuación según distintos métodos de inducción de ovulación

Fuente: Fernández y Martorell, 2011.

Diversos autores mencionan que el uso de análogos de GnRH es lo más recomendable para inducir la ovulación en las conejas (De Mayolas, 2007; Alvariño, 1993; Quintela *et al*, 2003; Vicente, 2007). Quintela *et al*. (2003) mostraron que el pico de concentración de LH se alcanza entre los 60 y los 90 minutos, después de la aplicación del análogo GnRH. Con el uso de análogos sintéticos de GnRH se pretende obtener ventajas sobre el deca péptido original. En general los análogos de GnRH tienen mayor afinidad por el receptor que la hormona endógena y permanecen unidos más tiempo (Libertun, 2002).

La separación de las conejas lactando de sus crías antes de la IA reduce las concentraciones plasmáticas de prolactina de forma súbita, inmediatamente después de finalizado el amamantamiento promoviendo ondas de desarrollo folicular y un aumento en la esteroidogénesis, incrementando las concentraciones de estradiol y una mayor sensibilidad de la glándula pituitaria a la aplicación de GnRH exógena (Fernández y Martorell, 2011). Esto puede ser beneficioso para incrementar los picos de LH.

2.4. Naturaleza química de GnRH y sus análogos sintéticos

El gen que codifica la GnRH ha sido aislado de la rata, el ratón y el hombre. La secuencia de codificación transcribe una proteína precursora de 92 aminoácidos (Libertun, 2002; Prieto y Velázquez, 2002) que origina la GnRH aunado a un péptido de 56 aminoácidos llamado GAP (péptido asociado con GnRH).

El decapeptido GnRH es sintetizado por las neuronas ubicadas en el núcleo arcuato y en el área preóptica del hipotálamo (Chillik, 2003). La secuencia lineal de GnRH en mamíferos es:



Poco tiempo después de conocerse la estructura química de la molécula de GnRH, comenzaron a desarrollarse análogos agonistas y antagonistas.

Bayliss (2003), menciona algunas otras características importantes de la molécula de GnRH: la tasa y amplitud de los pulsos de GnRH son generadas en retroalimentación negativa controlada por hormonas esteroidales y la producción de GnRH puede ser disminuida por estrés y ejercicio vigoroso.

2.4.1. Análogos de GnRH

La vida media de la molécula de GnRH en el humano, es de aproximadamente 10 minutos. Los receptores de la GnRH se encuentran exclusivamente en membranas citoplasmáticas. El principal sitio blanco de esta hormona es el gonadotropo de la adenohipófisis. La aplicación intravenosa de GnRH, en pulsos de uno por hora produce la ovulación (Prieto y Paniagua, 2002).

Los análogos de la hormona liberadora de gonadotrofinas (GnRH), que incluyen agonistas y antagonistas, se sintetizaron por la sustitución de aminoácidos en la molécula original con el fin de obtener mayor potencia, duración y efectividad. Este objetivo se logró incrementando la afinidad por los receptores y disminuyendo la degradación o eliminación de los compuestos. Así se generaron potentes agonistas por sustitución de dos aminoácidos (posiciones 6 y 10) con potencias que superaron 200 veces la de la molécula original (Vicente, 2007).

2.4.2. Estructura química de análogos de GnRH

Los agonistas de GnRH son sustancias que tienen una gran afinidad por el receptor de GnRH de la hipófisis y una vida media prolongada, lo que los hace más potentes que la hormona endógena. Están basados en alteraciones de la estructura química de la molécula endógena de GnRH. Luego de su administración inicial producen la liberación de gonadotrofinas (Chillik, 2003; Martínez *et al.*, 2003).

Muchos agonistas de GnRH sustituyen al aminoácido glicina de la posición 6 por un D-aminoácido hidrofóbico; y al aminoácido glicina de la posición 10 con una N-etilamida (Bayliss, 2003). Esquemáticamente la representación tridimensional del decapeptido indica un plegamiento alrededor de la glicina en posición 6, y así es unido al receptor. La sustitución en dicha posición por D-aminoácidos estabiliza la molécula y decrece su metabolismo.

Prieto y Velázquez (2002) en diversos estudios muestran que existen al menos 5 variantes de la molécula de GnRH, la primera de ellas se aisló y se identificó a partir de 300,000 cerebros de pollos. La existencia de estas variantes, dio la pauta para conocer la relación estructura-función y permitió que hasta la fecha se hayan sintetizado más de 3,500 análogos.

En el Cuadro 1 se muestra la estructura química de GnRH y sus principales agonistas. En la presente investigación se utilizaron gonadorelina y fertirelina para las pruebas de inducción de la ovulación.

Cuadro 1. Estructura de GnRH y sus principales agonistas

Compuesto	Aminoácidos									
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
GnRH	Glu	His	Trp	Ser	Tyr	Gly	Leu	Arg	Pro	Gly-NH ₂
Leuprolide							Leu			NH-Et
Buserelin						Ser				NH-Et
Goserelin						Ser				AzaGly-NH ₂
Histrelin						D-His				AzaGly-NH ₂
Nafarelin						2Nal				Gly-NH ₂
Triptorelin						Trp				Gly-NH ₂
Fertirelina	5oxo-Pro									NHCH ₂ CH ₃
Gonadorelina	5oxo-Pro				Trp					Gly-NH ₂
Diacetato tetrahidratado de gonadorelin	Glp									Gly-NH ₂

Fuente: Chillik, 2003.

En la producción animal, se presta mayor atención a los análogos de GnRH factibles de utilizar en los animales, como inductores de la ovulación o bien para el tratamiento de algunos otros padecimientos como quistes ováricos y otros problemas reproductivos (Araínga *et al.*, 2003; López, 2009; Recabarren *et al.*, 2006).

Dos ejemplos de estos análogos son Fertirelina y Gonadorelina, ambos factibles de utilizarse en producción cunícola, según las especificaciones de los laboratorios donde se producen. La molécula conocida como Fertirelina es un decapeptido con un peso molecular de 1153.29 g/mol. En la Figura 3 se muestra su estructura física. La fórmula molecular es C₅₅H₇₆N₁₆O₁₂.

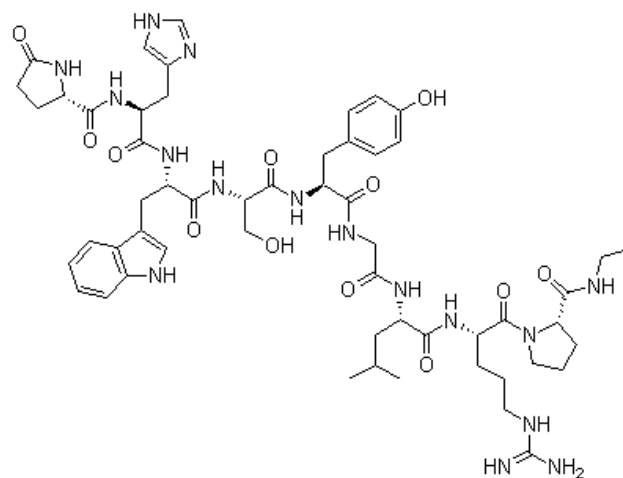


Figura 3. Estructura física de lamolécula de fertirelina

La estructura física de la molécula de Gonadorelina se muestra en la Figura 4. Su peso molecular es de 1182.29 g/mol y la fórmula molecular es $C_{55}H_{75}N_{17}O_{13}$.

El análogo de mayor uso en México para la inducción de la ovulación en las conejas es la Gonadorelina, de esta manera resulta interesante tener alternativas de elección, así que es conveniente realizar investigación científica al respecto.

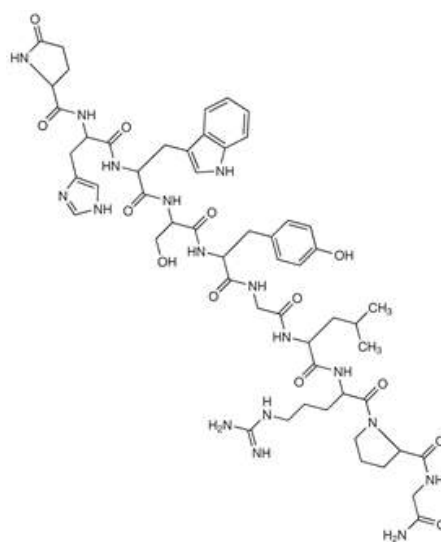


Figura 4. Estructura física de molécula de gonadorelina

2.5. Literatura Citada

- Alvariño J., M. R. y P. García R. 1995. Control de la reproducción en cunicultura: tratamientos hormonales. Boletín de cunicultura No. 77, Ene-Feb 1995.
- Alvariño, M. R., 1993. Control de la reproducción en el conejo. Editorial Mundi Prensa. Madrid, España. 137 p.
- Araínga, M. R., V. Leyva V., V. García W. y L. Franco E. 2003. Efectos de la GnRH en el proceso de reconocimiento maternal de la preñez sobre la supervivencia embrionaria en alpacas. Revista de Investigaciones Veterinarias del Perú 14(2): 104 – 110.
- Argüello, H. A. y N. Castro N. 2004. Producción Animal: Cunicultura. Guía de Clase. GC-344-2004.
- Arias A., M., G. García R. M., P. García R. y P. Lorenzo L. 2007. Desarrollo Folicular en la Coneja. Información Técnica Económica Agraria 2007, Vol. 103 (4), 173 – 175.
- Bayliss, D. 2003. GnRH and gonadotropins. Medical Pharmacology April 16, 2003.
- Berepubo, N. A., M. Nodu B., A. Monsi N. and Amadi, E., 1993. Reproductive response of prepubertal female rabbit to photoperiod and/or male presence. World Rabbit Science 1(2): 83-87.
- Bonanno A., M., A. Alabiso, A. Grigolli and M. Alicata L. 1999. Effect of change of cage and/or 44 h mother – litter separation on productivity of non – receptive lactating rabbit does. Preliminary investigation. World Rabbit Science 7 (2): 107-111.
- Bonanno, A., A. Di Grigolli, M. Alabiso and C. Boiti. 2002. Parity and number of repeated doe-litter-separation treatments affect differently the reproductive performance of lactating does. World rabbit Science 10(2): 63-70.
- Burgos, I., N. Pereda, A. Milanés, P. Lorenzo L. and P. García R. 2004. Datos productivos de las camadas de conejas sometidas a diferentes métodos de sincronización de celos. Dpto. Producción Animal. ETSI Agrónomos.
- Castellini, C., 1996. Recientes avances en la inseminación artificial en conejos. 6° World Rabbit Congress, Tolouse 2: 271-282
- Castellini, C., C., Canalli, and C., Boiti, 1998. Effect of mother-litter separation for 24 hours, by closing the nestbox or change of cage, on rabbit doe reproduction performance. World Rabbit Science 6(1): 199-203.
- Chillik, C. 2003. Agonistas y antagonistas de GnRH en reproducción asistida. Revista de la Sociedad Argentina de Endocrinología Ginecológica y Reproductiva 3(5): 22-33

- De Mayolas, E. 2007. Conejos para carne. Estrategias de producción, gestión económica y comercialización. Editorial Hemisferio Sur S. A. Buenos Aires, Argentina. 174 p.
- Egea P., M. D. 1993. Fisiología de la reproducción en el conejo doméstico. Boletín de Cunicultura No. 69, Septiembre – Octubre 1993.
- Espinosa A., P. García R. y R. Carabaño. 2003. Efectos de una separación transitoria de la camada sobre parámetros digestivos, enzimáticos e histológicos de gazapos de 9 días de edad. Dpto. Producción Animal, ETSI Agrónomos.
- Espinosa A., P. García R. y R. Carabaño. 2004. Repercusiones digestivas del destete transitorio en la producción de leche y consumo de las conejas y en parámetros digestivos de gazapos en crecimiento. XXVIII Simposium de Cunicultura. Departamento de Producción Animal, ETSI Agrónomos.
- Fernández, C. y P. Martorell. 2011. Efectos de la buserelina en los niveles de LH en conejas de producción. Reduce Serie Congresos Alumnos 3(3): 101
- Gómez R., B., C. Becerril M., G. Torres, A. Pro y R. Rodríguez. 2005. Relación del nivel de alimentación, cambio de jaula y ayuno con el comportamiento reproductivo de conejas nulíparas Nueva Zelanda Blanco y Californiana. Agrociencia (5): 491-499.
- Leyún I., M. y M. Iruretagoiena H. 1992. El manejo en bandas. XVII Simposium de Cunicultura. Salamanca, septiembre 1992.
- Libertun, C. 2002. Fisiología del GnRH, mecanismos de acción de agonistas y antagonistas. Revista de Endocrinología Ginecológica y Reproductiva.
- López L., E., 2009. La hormona liberadora de gonadotropinas (GnRH) y su papel en la reproducción bovina. Tesis Profesional. Universidad Veracruzana. Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia. Veracruz. Pp. 101
- Lorenzo, P. L., A. Bonanno, A. Arias M., B. López M. y P. García R. 2006. Estudio preliminar sobre características inmunohistoquímicas e histológicas ováricas de conejas sincronizadas. Asociación Española de Cunicultura.
- Luzi, F. y C. Crimella. 1998. Effect of change of cage 2 days before artificial insemination on reproductive performance of rabbit does. World Rabbit Science 6 (1): 195-198.
- Maertens, L., F. Luzi and G. Grilli. 1995. Effects of PMSG induced oestrus on the performances of rabbit does: a review. World Rabbit Science 3(4): 191-199.
- Manal, A. F. 2010. Flushing or does relocation as biostimulation methods for improvement of sexual behavior and performance on multiparous rabbit doe after a summer resting period. World Rabbit Science 18: 151-158.

- Martínez, M. F., R. Mapletoft J., J. Kastelic P. and C. Terry. 2003. The effects of three gonadorelin products on luteinizing hormone release, ovulation, and follicular wave emergence in cattle. *Canadian Veterinary Journal* 44(2):125-131
- Milanés, A., N. Pereda, I. Burgos, P. Lorenzo L. y P. Rebollar G. 2002. Parámetros reproductivos de conejas sometidas a diferentes métodos de sincronización de celos. Dpto. Producción Animal. ETSI Agrónomos.
- Pau, C. Y., K. Pau Y., M. Berria and H. Spies. 2000. Ovarian influence on gonadotropin and prolactin release in mated rabbits. *Endocrine* 13(1): 25-35.
- Pavois, V., J. Le Naour, O. Ducep, G. Perrin y J. Duperray. 1995. La guyostimulation: une méthode naturelle pour améliorer la réceptivité des lapines allaitantes. *Cuniculture* 121, 13–18.
- Pereda, N., I. Burgos, A. Milanés, P. García R., P. Millán y P. Lorenzo L. 2001. Estudio descriptivo del sistema reproductor de conejas sometidas a diferentes métodos de sincronización de celo. Dpto. Producción Animal. ETSI Agrónomos.
- Prieto G., B. y M. V. Paniagua. 2002. Fisiología de la Reproducción: hormona liberadora de gonadotropinas. *Rev Fac Med UNAM* Vol. 45 No. 6 Noviembre-Diciembre, 2002.
- Prieto G., B. y M. Velázquez P. 2002. Fisiología de la reproducción: hormona liberadora de gonadotrofinas. *Revista de la Facultad de Medicina de la UNAM* 45(6): 252 – 257.
- Quintela, L. A., D. Vega M. A., A. Peña L.A, J. Becerra J. A., J. Gullón B., C. Prieto M. y G. Herradón P. 2007. Inseminación Artificial en Cunicultura: colaboración Cogal – Universidad de Santiago de Compostela. *Cogal* Junio 2007: 5 – 16
- Quintela, L. A., Peña AI, Vega MD, Gullón J, Prieto MC, Barrio M, Becerra JJ, Maseda F, G. Herradón P. 2003. Ovulation induction in rabbit does submitted to artificial insemination by adding buserelin to the seminal dose. *Reproduction and Nutrition Development* 44 (1): 79 – 88.
- Recabarren, S. E., P. Muñoz, A. Lobos, C. Vilches y J. Parilo. 2006. Análogo de GnRH disminuye la secreción de hormona folículo estimulante (FSH) en ovejas prepúberes. *Archivos de Medicina Veterinaria* 38(1): 39-46
- Rodríguez L., R. and M. Fallas L. 1999. Environmental and physiological factors influencing kindling rates and litter size at birth in artificially inseminated doe rabbits. *World Rabbit Science* 7: 191–196.
- Rodríguez L., R., 1984. Productivity in rabbits in relation to breeding management. Ph.D. Thesis. University of Bristol. England.

- Rodríguez L., R. 1996, Recomendación práctica de una técnica de inseminación artificial en conejos, aplicada a granjas comerciales. Tercer Seminario Internacional de Cunicultura. COCICEMAC. Texcoco. Estado de México. 29 de abril-1 de marzo.
- Rodríguez L., R., M. Fallas-López, R. Rangel-Santos and V. Mariscal-Aguayo. 2003. Influence of short-term relocation and male exposure on sexual receptivity and reproduction in artificially inseminated doe rabbits *Animal Reproduction Science* 78: 111-121.
- Rodríguez S., T. M., 2004. Inducción de la ovulación. *Boletín de Cunicultura*, Jul – Ago, 2004 No. 134.
- Theau-Clément, M. and C. Boiti. 1998. “Bioestimulation methods” for breeding rabbit does: synthesis of the first results. *World Rabbit Science* 6(1): 205-208.
- Theau-Clément, M. y F. Lebas. 1996. Effect of a systematic PMSG treatment 48 hours before artificial insemination on the productive performance of rabbit does. *World Rabbit Science* 4(2): 47-56.
- Uzcategui, M.E. and N. Johnston P. 1992. The effect of 10, 12 and 14 hour continuous and intermittent photoperiods on the reproductive performance of female rabbits. *Journal of Applied Rabbit Research* 15: 553–559.
- Vega, M. D., M. Barrio, L. Quintela A., J. Becerra J., J. Cainzos, A. Prieto, A. Rodríguez Z. y G. Herradón P. 2012. Evolución del manejo reproductivo en cunicultura. *Información Técnica Económica Agraria* 108 (2): 172 – 190.
- Vicente, J. S. and F. García. 1994. Control Hormonal de la Reproducción. Conservación de Gametos y Embriones. *Boletín de Cunicultura* No. 72 Mar-Abr 1994.
- Vicente, J. S., 2007. Rabbit reproductive performance after insemination with buserelin acetate extender. *Livestock Science* 115: 153 – 157.

3. INFLUENCIA DE CAMBIOS DE JAULA Y LACTACIÓN CONTROLADA EN CONEJAS INSEMINADAS ARTIFICIALMENTE E INDUCIDAS A LA OVULACIÓN CON GONADORELINA Y FERTIRELINA

3.1. Resumen

El objetivo fue evaluar el efecto del método de bioestímulo y tipo de análogo del factor liberador de las hormonas gonadotrópicas (GnRH) utilizado para inducir la ovulación en la receptividad sexual, tasa de partos y tamaño de la camada al parto en conejas lactando inseminadas. Conejas Nueva Zelanda Blanco de 2 meses de edad ($n=72$) fueron asignadas aleatoriamente a uno de seis tratamientos experimentales como sigue: 1) sin bioestímulo e inducción de la ovulación con 20 μg de gonadorelina por coneja inyectada intramuscularmente inmediatamente después de la inseminación; 2) con cambio de la coneja a otra jaula por 8 h y gonadorelina; 3) con lactación controlada por 36 h y gonadorelina; 4) sin bioestímulo e inducción ovulatoria con 20 μg de fertirelina por coneja inyectada intramuscularmente; 5) con cambio de coneja a otra jaula por 8 h y fertirelina; 6) con lactación controlada por 36 h y fertirelina. El diseño experimental fue completamente al azar con 12 repeticiones por tratamiento y la unidad experimental fue la coneja. Las primeras inseminaciones se realizaron cuando las conejas alcanzaron 3500 g de peso vivo y fueron servidas a los 11 días después del parto durante un periodo de 7 meses. Del total de registros, 199 inseminaciones y 149 partos fueron de conejas lactando. La tasa de receptividad sexual en conejas lactando sin bioestímulo (0.52 ± 0.06) fue menor ($P=0.0001$) que aquellas cambiadas de jaula (0.82 ± 0.05) o bajo lactación controlada (0.86 ± 0.05). Las tasas de parto no fueron influenciadas ($P>0.05$) por el método de bioestímulo o tipo de análogo. Se encontraron efectos significativos ($P=0.01$) de método de bioestímulo en la prolificidad. Conejas sin bioestímulo produjeron menor número de gazapos nacidos totales por parto (7.17 ± 0.34) que aquellas cambiadas de jaula (8.42 ± 0.31) o bajo lactación controlada (8.44 ± 0.31). La prolificidad fue mayor ($P=0.02$) en conejas tratadas con fertirelina que con gonadorelina (8.45 ± 0.26 y 7.58 ± 0.27 gazapos). No se encontraron efectos ($P > 0.05$) de interacción entre bioestímulo y tipo de análogo para las variables estudiadas. Los cambios de las conejas a otras jaulas y la lactación controlada mejoraron la receptividad sexual y la prolificidad en conejas lactando inseminadas. El uso de acetato de fertirelina incrementa la prolificidad.

Palabras clave: conejos, bioestímulo, inducción de la ovulación

INFLUENCE OF CHANGES CAGE AND CONTROLLED NURSING IN DOE INSEMINATED ARTIFICIALLY AND INDUCED TO OVULATION WITH GONADORELINA AND FERTIRELINA

3.2. Abstract

The aim was to evaluate the effect of biostimulation methods and type of gonadotropin releasing hormone (GnRH) factor analog used to induce ovulation on sexual receptivity, kindling rate and total litter size at birth in artificially inseminated (AI) nursing doe rabbits. Two-month old New Zealand White rabbits (n=72) were assigned randomly to six experimental treatments as follows: 1) without biostimulation and ovulation induction with 20 µg of gonadorelin intramuscularly injected per doe immediately after the insemination; 2) with change of does to another cage for 8 h and gonadorelin; 3) with controlled nursing for 36 h and gonadorelin; 4) without bioestimulation and ovulation induction with 20 µg of fertirelin intramuscularly injected per doe; 5) with change of does to another cage for 8 h and fertirelin; 6) with controlled nursing for 36 h and fertirelin. A randomized experimental design was used with 12 repetitions per treatment and the experimental unit was the doe. First inseminations were carried out when does reach 3500 g body weight and were served at 11 days after parturition during a 7 month period. Of the total breeding records, 199 inseminations and 149 kindlings were from nursing does. Kindling rate was not influenced ($P>0.05$) by biostimulation method and type of analog. There was a significant effect ($P=0.01$) of biostimulation on prolificacy. Does without biostimulation produced less total number of young born in the litter (7.17 ± 0.34) than those changed of cage (8.42 ± 0.31) or under controlled nursing (8.44 ± 0.31). Prolificacy was greater ($P=0.02$) in does treated with fertirelin than gonadorelin (8.45 ± 0.26 and 7.58 ± 0.27 respectively). There was no effect of the interaction between biostimulation method and type of analog for the studied variables. The change of does to another cage and controlled nursing improved sexual receptivity and prolificacy in inseminated nursing doe rabbits. The use of fertirelin to induce ovulation increase prolificacy.

Key Words: rabbits, biostimulation, ovulation induction

3.3. Introducción

La técnica de inseminación artificial (IA) aplicada a granjas comerciales de conejos para carne ha permitido incrementar la eficiencia del manejo reproductivo y productividad en esta especie y actualmente su uso es generalizado. En explotaciones intensivas de conejos para carne las conejas son servidas a los 11 días post-parto y los porcentajes de receptividad de estas conejas lactantes son bajos lo que puede afectar la fertilidad y prolificidad en programas de IA (García *et al.*, 1992; Ubilla y García, 1995; Rodríguez *et al.*, 2003). Varios estudios han encontrado que el comportamiento reproductivo en conejas lactando depende en gran medida de la receptividad sexual al momento de la IA (Theau-Clément and Roustan, 1992; Theau-Clément *et al.*, 1996). Conforme el porcentaje de conejas receptivas incrementa, la tasa de partos y el tamaño de la camada al nacimiento aumenta (Rodríguez y Fallas, 1999; Rodríguez *et al.*, 2003).

Mejoras en el crecimiento folicular y en la receptividad sexual de las conejas han sido posibles al aplicarla hormona gonadotropina coriónica de la yegua preñada (PMSG) 48 h (h) antes del servicio (Maertens *et al.*, 1995), mediante programas lumínicos continuos o intermitentes (Uzcategui y Johnston, 1992), al separar temporalmente los gazapos de la madre o lactación controlada (Pavois *et al.*, 1995; Castellini *et al.*, 1998; Bonanno *et al.*, 1999; Espinosa *et al.*, 2004) y al cambiar las conejas lactantes a diferentes jaulas por ciertos periodos (Luzi y Crimella, 1998; Rodríguez *et al.*, 2003). Sin embargo, la eficacia de estos métodos de sincronización de estros en conejas lactando bajo programas de IA aún debe ser investigada.

Como parte fundamental de la técnica de IA en coneja es la inducción de la ovulación inmediatamente después del servicio. Paufler *et al.* (1974) trabajando con IA en conejos reportaron que la aplicación intramuscular de factores liberadores de hormonas gonadotrópicas (GnRH) inducían satisfactoriamente la ovulación sin formar anticuerpos en sangre después de aplicarse varias veces en una misma coneja. Esta aportación dió lugar para que la IA en conejos se desarrollara y difundiera ampliamente en granjas comerciales. Son numerosos

los trabajos en los que se han demostrado la eficacia de la utilización de análogos sintéticos de GnRH para inducir la ovulación en programas de IA (Vicente y García, 1994; Rodríguez, 2004; Quintela *et al.*, 2007). En los últimos años han aparecido en los mercados diferentes análogos sintéticos y agonistas de GnRH obtenidos al modificar la estructura química de la molécula natural de GnRH. Sin embargo, existen pocos estudios sobre las implicaciones de aplicar diferentes análogos de GnRH para inducir la ovulación en la respuesta reproductiva. Como hipótesis se plantea que la receptividad sexual y el comportamiento reproductivo en conejas inseminadas artificialmente no varían cuando son expuestas a cambios de jaula por 8 h o mediante lactancia restringida durante 36 h, independientemente de que se induzca la ovulación con Gonadorelina y/o acetato de Fertirelina. El objetivo del presente estudio fue valorar la influencia de dos métodos de bioestímulo en la receptividad sexual, fertilidad y prolificidad en conejas lactantes inseminadas artificialmente inducidas a la ovulación mediante la utilización de dos análogos sintéticos diferentes de GnRH.

3.4. Materiales y Métodos

3.4.1. Localización

El trabajo se realizó en “Conejos” Centro de Investigación Científica del Estado de México A.C. El centro está localizado en el Valle de México a 19° 27' N y 98° 53' O a 2240 msnm. La temperatura media anual es de 15 °C y la precipitación pluvial es de 645 mm. El experimento se desarrolló de noviembre del 2011 a mayo del 2012.

3.4.2. Animales y diseño experimental

Se utilizaron 72 conejas Nueva Zelanda Blanco de dos y medio meses de edad las cuales fueron asignadas aleatoriamente a uno de seis tratamientos experimentales como sigue: 1) sin bioestímulo e inducción de la ovulación con 0.2 mL de gonadorelina (Fertagil, Intervet) inyectada i.m. (intramuscular) equivalente a 20 µg por coneja; 2) con cambio de la coneja a otra jaula por 8 h y gonadorelina; 3) con lactación controlada por 36 h y gonadorelina; 4) sin bioestímulo e inducción ovulatoria con 0.4 mL de acetato de fertirelina (Natalise,

Shering-Plough) inyectada i.m. equivalente a 20 µg por coneja; 5) con cambio de la coneja a otra jaula y fertirelina; 6) con lactación controlada por 36 h y fertirelina. Los análogos de GnRH fueron aplicados inmediatamente después de las inseminaciones. Las primeras inseminaciones se realizaron cuando las conejas alcanzaron 3500 g de peso vivo. Las conejas primíparas y multíparas lactando de todos los tratamientos fueron inseminadas el día 11 después del parto a las 15:00 h. Los cambios de las conejas a otras jaulas en los tratamientos 2 y 5, fueron realizados a las 7:00 h y la IA se efectuó a las 15:00 h equivalente a 8 h de bioestímulo. En el caso de las conejas lactando en el tratamiento 3 y 6 sus nidos con sus crías fueron retirados y colocados arriba de la jaula a las 7.00 h el día 10 después del parto y regresados el día 11 a las 15.00 h equivalente a 36 h de bioestímulo. La IA de estas últimas conejas fue realizada una vez finalizado el amamantamiento entre 5 a 10 minutos después de introducido el nido. Las conejas lactantes repetidoras fueron tratadas e inseminadas entre los días 21 y 23 después del parto de acuerdo al mismo protocolo experimental. Las conejas se mantuvieron de acuerdo a tratamientos en líneas continuas de jaulas o en bandas.

3.4.3. Instalaciones y ambiente

Las conejas fueron instaladas en un galerón de ambiente natural provisto de aislamiento térmico en techos y paredes, y con ventanas regulables tipo guillotina. Las conejas se mantuvieron individualmente en jaulas metálicas galvanizadas tipo americana de 90 cm de largo x 60 cm de ancho x 40 cm de alto dispuestas en un sistema flat-deck. Las jaulas estuvieron provistas de bebederos automáticos tipo tetina y comederos de tolva tipo inglés. Los nidos que se utilizaron fueron de madera de 55 x 30 x 25 cm. Las hembras recibieron un programa de luminosidad constante durante todo el experimento de 16 h luz y 8 de oscuridad mediante luz natural y artificial.

3.4.4. Manejo alimenticio

Se les proporcionó un alimento comercial peletizado (Purina N) con un contenido nutricional de 17.4% de proteína cruda, 5.3% de grasa, 15.2% de fibra cruda, y

2600 kcal de energía digestible por kg. Las conejas jóvenes fueron alimentadas *ad libitum* antes de la primera inseminación y después se restringieron a 110 g día⁻¹ hasta el diagnóstico de gestación positivo. Las conejas gestantes y lactantes recibieron una alimentación *ad libitum*. Las conejas repetidoras, no confirmadas como gestantes al destete fueron restringidas a 110 g día⁻¹.

3.4.5. Manejo reproductivo e inseminación artificial

La inseminación artificial de las conejas fue realizada los días lunes y viernes de cada semana durante un período de 7 meses. El programa de IA utilizado fue de acuerdo a las metodologías de tipo práctico con semen fresco heterospermático desarrollado por Rodríguez *et al.* (2003). La colección de semen se realizó de acuerdo al método de Walton (1945). Los eyaculados se mantuvieron en Baño María a 32 °C y fueron utilizados dentro de una hora después de la colección. Aquellas muestras con apariencias cremosas lechosas y un rango de motilidad de más de 75% se seleccionaron y diluyeron en una solución buffer salina fosfatada (Dulbecco A, Oxoid). Las inseminaciones fueron heterospermáticas cuando semen de dos o más machos fueron mezclados en el medio. Las tasas de dilución variaron de 1:4 a 1:12 dependiendo del número de conejas por inseminar en un día. Las conejas se sujetaron individualmente en una posición supina y fueron inseminadas a 6 cm de profundidad utilizando una pipeta de Pyrex (Rodríguez y Fallas, 1999) proporcionando un volumen de 0.5 mL⁻¹ de medio. Siguiendo estas metodologías se aseguró que cada coneja recibiera como mínimo 10 millones de espermatozoides vivos normales y motiles por dosis. Inmediatamente después de completadas las inseminaciones las conejas fueron inducidas a la ovulación de acuerdo al protocolo experimental.

Inmediatamente después de haber concluido la inseminación y la inducción ovulatoria las conejas fueron sometidas a pruebas de receptividad, éstas consistieron en colocar un pañal a un macho y observar si la hembra aceptaba o no la monta. Las conejas que manifestaban lordosis eran consideradas como receptivas. Entre los 10 y 12 días posteriores a la IA, las conejas fueron palpadas abdominalmente para diagnosticar gestación. Las conejas diagnosticadas

negativas fueron inseminadas lo más pronto posible y a las positivas se les colocó un nido de madera con aserrín y paja de avena el día 28 de gestación. El destete se realizó el día 30 después del parto.

3.4.6. Variables de respuesta

Con la finalidad de evaluar la respuesta reproductiva en conejas lactando en relación a las diferentes técnicas de manejo planteadas se determinó la receptividad sexual, la tasa de partos y el tamaño de camada al nacimiento.

3.4.7. Análisis estadístico

Del total de 72 conejas que iniciaron el experimento sólo 61 lo finalizaron. El número de conejas que completaron el estudio para los tratamientos 1, 2, 3, 4, 5 y 6 fueron 9, 10, 11, 10, 12 y 9, respectivamente. Las causas por las cuales las conejas no finalizaron el experimento fueron por muerte, eliminaciones técnicas y patológicas. La información de conejas muertas o desechadas fue excluida de los análisis estadísticos. Los datos reproductivos procedentes de conejas lactando inseminadas artificialmente fueron empleados para su análisis. La tasa de receptividad sexual y la tasa de partos fueron consideradas como variables de Bernoulli (variable 0-1). La tasa de receptividad sexual y la tasa de partos fueron sometidas a un análisis de varianza bajo el siguiente modelo lineal:

$$Y_{ijkl} = \mu + B_i + A_j + C_k + (B \cdot A)_{ij} + b_1(X_{ijkl} - \bar{X}) + b_2(X_{ijkl} - \bar{X}) + b_3(X_{ijkl} - \bar{X}) + e_{ijkl}$$

Donde: Y_{ijk} es la variable respuesta; μ es la media general; B_i es el efecto fijo del i -ésimo bioestímulo (i = sin bioestímulo, cambio de jaula, lactación controlada); A_j es el efecto fijo del j -ésimo tipo de análogo de GnRH (j = gonadorelina, fertirelina); C_k es el efecto de la k -ésima coneja como aleatorio ($k = 1 \dots 61$); $(B \cdot A)_{ij}$ es la interacción entre bioestímulo y análogo de GnRH; b_1 es el coeficiente de regresión lineal de la covariable orden de inseminación; b_2 es la covariable peso de la coneja a la inseminación; b_3 es la covariable tamaño de la camada a la inseminación y e_{ijkl} es el efecto residual $\sim NI(0, \sigma_e^2)$. El tamaño de camada al parto fue analizado de acuerdo a un modelo incluyendo los efectos fijos de bioestímulo, tipo de análogo, coneja como efecto aleatorio y la interacción entre bioestímulo y

análogo, y las covariables orden de parto y peso de la coneja al parto. Las covariables que no mostraron efectos significativos ($p>0.05$) fueron eliminados del modelo final. Las variables de respuesta fueron analizadas mediante cuadrados medios utilizando el procedimiento PROC MIXED de SAS (2011). La comparación de medias se realizó mediante la prueba de Tukey.

3.5. Resultados

Se realizaron un total de 321 inseminaciones provenientes de 61 conejas que completaron el experimento. El peso promedio de las conejas a la primera inseminación fue de 3571 ± 46.7 g y el número promedio de partos por coneja durante el período experimental fue de 2.5. La frecuencia de partos para paridades 1, 2, 3, 4 y 5 fueron 26.5%, 26.5%, 25.7%, 16.1% y 5.2%, respectivamente. De todas las inseminaciones 98, 199 y 24 correspondieron a conejas nulíparas, lactando y no lactando, y el número de partos según el estado fisiológico fue 61, 149 y 23, respectivamente. El intervalo real promedio entre parto y la inseminación fue de 14.2 ± 0.80 días. En general el porcentaje promedio de receptividad sexual y la tasa de partos fueron de 73.9 y 74.4%, respectivamente. El número promedio de gazapos nacidos totales al parto fue de 8.06.

Las tasas de receptividad sexual y partos en relación al método de bioestímulo y tipo de análogo sintético de GnRH empleado son mostrados en el Cuadro 2. Para la tasa de receptividad, se encontró un efecto ($P<0.02$) de covariable lineal del orden de la inseminación y peso de la coneja a la inseminación ($P<0.04$). La tasa de receptividad fue ajustada a un intervalo estándar de 3.8 para el orden de inseminación y a un peso de la coneja a la inseminación de 3947 g.

La receptividad sexual fue influenciada ($P<0.0001$) por el bioestímulo. Conejas sin bioestímulo presentaron 57.7% y 65.4% menos receptividad sexual que las conejas lactando sometidas a cambios de jaula y lactación controlada, respectivamente. Como era de esperarse, el tipo de análogo de GnRH para inducir la ovulación no afectó ($P>0.05$) la tasa de receptividad sexual de las

conejas. No se encontraron efectos ($P>0.05$) de interacción entre el método de bioestímulo y el tipo de análogo utilizado en la tasa de receptividad sexual.

Cuadro 2. Medias de cuadrados mínimos ($\pm$ error estándar) para el efecto de método de bioestímulo y tipo de análogo de GnRH en la receptividad sexual y tasa de partos en conejas lactando.

Factor	N	Receptividad sexual ¹	Tasa de partos ²
Bioestímulo			
Sin	63	$0.52 \pm 0.06_a$	$0.66 \pm 0.06_a$
Con cambio de jaula	71	$0.82 \pm 0.05_b$	$0.76 \pm 0.05_a$
Con lactación controlada	65	$0.86 \pm 0.05_b$	$0.82 \pm 0.05_a$
Hormona			
Gonadorelina	91	$0.76 \pm 0.05_a$	$0.75 \pm 0.05_a$
Fertirelina	108	$0.71 \pm 0.04_a$	$0.74 \pm 0.04_a$

¹ Orden de inseminación y peso de la coneja a la inseminación utilizadas como covariables.

² Tamaño de la camada al momento de la inseminación utilizada como covariable.

Medias en la misma columna con diferentes letras son diferentes ($P < 0.0001$).

Se encontró un efecto de covariable lineal ($P < 0.0001$) del tamaño de la camada al momento de la IA en la tasa de partos, por lo que esta variable fue ajustada a un intervalo estándar de 6.7 gazapos. Las conejas sin bioestímulo presentaron 15.2% y 24.2% menores tasas de partos que las conejas cambiadas de jaula y con lactación controlada pero las diferencias no fueron significativas ($P > 0.05$). Las tasas de parto no fueron influenciadas ($P > 0.05$) por el tipo de análogo de GnRH.

La influencia de bioestímulo y el tipo de análogo en el número total de gazapos nacidos al parto es mostrada en el Cuadro 3. Se encontraron efectos significativos de bioestímulo ($P < 0.01$) y tipo de análogo ($P < 0.02$) en el tamaño de la camada al parto. En promedio las conejas sin bioestímulo produjeron 1.3 menos gazapos nacidos por parto que aquellas cambiadas de jaula y con lactación controlada mientras que las conejas inducidas con fertirelina parieron en promedio 0.9 más gazapos que aquellas inducidas con gonadorelina.

Cuadro 3. Medias de cuadrados mínimos ($\pm$ error estándar) para el efecto del bioestímulo y tipo de análogo de GnRH en el tamaño de camada al parto en conejas lactando.

Factor	N	Nacidos totales por parto ¹
Bioestímulo		
Sin	43	7.17 $\pm$ 0.34 _a
Con cambio de jaula	54	8.42 $\pm$ 0.31 _b
Con lactación controlada	52	8.44 $\pm$ 0.31 _b
Hormona		
Gonadorelina	70	7.58 $\pm$ 0.27 _a
Fertirelina	79	8.45 $\pm$ 0.26 _b

¹ Peso de la coneja al parto utilizada como covariable.

Medias en la misma columna y factor con diferentes letras (ab) son diferentes ($P < 0.01$; $P < 0.02$)

Cuadro 4. Medias de cuadrados mínimos ($\pm$ error estándar) para la interacción bioestímulo y tipo de análogo de GnRH en la tasa de partos y tamaño de camada al parto en conejas lactando

	Sin Bioestímulo		Cambio de jaula		Lactación controlada	
	Gonadorelina	Fertirelina	Gonadorelina	Fertirelina	Gonadorelina	Fertirelina
Tasa de partos ¹	0.67 $\pm$ 0.08	0.64 $\pm$ 0.07	0.79 $\pm$ 0.08	0.72 $\pm$ 0.07	0.80 $\pm$ 0.08	0.84 $\pm$ 0.08
	(n = 28)	(n = 35)	(n = 31)	(n = 40)	(n = 32)	(n = 33)
Nacidos totales por parto ²	6.44 $\pm$ 0.50	7.91 $\pm$ 0.47	7.99 $\pm$ 0.45	8.85 $\pm$ 0.42	8.31 $\pm$ 0.44	8.58 $\pm$ 0.46
	(n = 20)	(n = 23)	(n = 25)	(n = 29)	(n = 25)	(n = 27)

¹ Tamaño de la camada al momento de la inseminación utilizada como covariable.

² Peso de la coneja al parto utilizada como covariable.

La interacción entre bioestímulo y análogo no afectaron ($P > 0.05$) las tasas de partos ni los tamaños de las camadas al parto como se puede observar en el Cuadro 4.

3.6. Discusión

En el presente estudio las conejas control presentaron los niveles de fertilidad más bajos con respecto a las conejas sometidas a los dos tipos de bioestímulos independientemente que no se hayan encontrado diferencias estadísticas. Bonano *et al.* (1999) en estudios sobre aplicación de bioestímulo en conejas inseminadas artificialmente a los 11 días después del parto reportaron una tasa

de partos de 60% en el grupo testigo. Esta fertilidad es similar al 66% encontrado en el presente estudio para el grupo control. Las tasas de partos en conejas cambiadas de lugar fueron de 76%. Este resultado es superiores al 70% reportado por Bonano *et al.* (1999) cuando los cambios de jaula fueron realizados 48 h antes de la IA al día 11 post-parto y también mayores que el 66.7% reportado por Luzi y Crimella (1998) empleando el mismo método de bioestímulo y mismo día de inseminación. La fertilidad en conejas bajo lactación controlada fue de 82%. Este valor es similar al 85.6% reportado en conejas en el que el nido fue cerrado 40 h antes de la IA al día 11 después del parto pero inferior al 70% cuando el cierre de nido fue realizado durante 44 h y mismo día de inseminación. Inconsistencias entre estudios pueden ser atribuidos a diferencias en instalaciones, alimentación, genotipo y tiempos de bioestímulo. Sin embargo, diferencias en la tecnología y manejo del semen pueden tener también importantes fuentes de variación. En el presente estudio la prolificidad fue significativamente mayor en las conejas sometidas a los dos métodos de bioestímulo lo que coincide con la literatura (Luzi y Crimella, 1998 y Rodríguez *et al.*, 2003).

La tasa de receptividad sexual en conejas lactando sin bioestímulo o control en el presente estudio es similar al 56.7% reportado en un programa de inseminación artificial a largo plazo sin emplear ningún método hormonal o natural de sincronización de estros (Rodríguez y Fallas, 1999). Ubilla y García (1995) encontraron bajos niveles de receptividad sexual en conejas lactando de siete a 10 gazapos desde los días siete a 24 después del parto asociado a bajos niveles plasmáticos de estradiol. Uzcategui y Johnston (1992) sugieren que altos niveles de prolactina durante estos días post-partum interfieren en los efectos estrogénicos sobre la receptividad sexual. La disminución de la receptividad sexual durante el periodo de lactación han sido reportadas (Theau-Clément., 1996).

Tanto el cambio de conejas a otras jaulas durante 8 h como la lactación controlada durante 36 h mejoraron la tasa de partos y la prolificidad con respecto

a las conejas sin ningún tipo de bioestímulo o controles. Estos resultados pueden ser explicados debido a los incrementos en la tasa de receptividad en respuesta a los bioestímulos. Estudios en IA en conejos han demostrado que conforme la proporción de conejas receptivas incrementa la fertilidad y prolificidad mejoran (Rodríguez y Fallas, 1999). En el presente estudio la tasas de partos en conejas no receptivas y receptivas lactantes fue de 40.4% y 86.4%, mientras que los tamaños de la camada al parto fueron de 5.4 y 7.2 gazapos, respectivamente. Varios estudios han mostrado que la fertilidad y prolificidad en conejas inseminadas artificialmente es mayor en conejas receptivas que las no receptivas (Theau-Clement y Roustan, 1992; Theau-Clement et al., 1996). Similarmente, Ubilla y García (1995) reportaron mayores tasas de partos en conejas receptivas al momento de la inseminación que las no receptivas. Las mejoras reproductivas de las conejas receptivas relativas a las no receptivas han sido asociadas a un mayor número de folículos grandes (Kernabon *et al.*, 1994) y a un incremento en los estrógenos plasmáticos (Ubilla y García, 1995). La baja respuesta reproductiva de las conejas lactando no receptivas inducidas con análogos de GnRH ha sido explicada en base a la actividad antagonista entre prolactina y las hormonas gonadotrópicas (Theau-Clement *et al.*, 1996).

Los métodos de bioestímulo evaluados en el presente estudio involucran una separación de la madre de sus crías. Información de los eventos hormonales que ocurren en conejas lactando en respuesta a los métodos de bioestímulo son aún inconclusos. De acuerdo a Castellini *et al.* (1998) la mejora en la receptividad sexual y en la reproducción en respuesta a una separación madre-gazapo puede ser como resultado de cambios en varias acciones estimuladoras endocrinas actuando en el ovario. En cerdos, la separación de los lechones de la madre por periodos de 4 h o más resultan en un rápido decremento en las concentraciones plasmáticas de prolactina (PRL) y en un aumento en la secreción basal de la hormona luteinizante (Van Landeghem and Van de Wiel, 1978). En vacas, la remoción del ternero ha sido asociada con cambios similares en los patrones de PRL y LH (Wright *et al.*, 1981). Ubilla *et al.* (2000) reportaron que la separación de las conejas de sus crías antes de la IA decremento los niveles plasmáticos de

PRL lo que promueve ondas de desarrollo folicular y mayor esteroidogénesis dando como resultado en un incremento en las concentraciones de estradiol y por lo tanto una mayor sensibilidad de la glándula pituitaria al GnRH exógeno. La estimulación endocrina asociada con la ausencia de episodios de amamantamiento resulta en una mayor respuesta en la secreción de LH. De acuerdo a Sánchez (2007) la supresión temporal de la lactancia y el cambio de jaula pueden significar una situación de estrés para las conejas, y en esta condición se elevan las concentraciones de cortisol en plasma (Sánchez, 2007). Con este incremento se eleva también la producción de estradiol, lo que incrementa la receptividad sexual de las conejas.

La prolificidad en las conejas inducidas a la ovulación con Fertirelina fueron significativamente mayores que con Gonadorelina. No existen investigaciones en las que se haya comparado la eficacia de un análogo de GnRH respecto a otro en programas de inseminación artificial cuando las conejas son inyectadas intramuscularmente. Las diferencias en prolificidad observadas pudieran ser explicadas por diferencias en la estructura bioquímica de los análogos empleados. Un factor involucrado en finalizar la acción de la GnRH en los receptores de la pituitaria es la degradación de la hormona por enzimas proteolíticas (Neuberger y Van Deenen, 1988; Sakakibara *et al.*, 1996; Chen y Fernald, 2008; Ipek y Gokalp, 2011; Yablokova *et al.*, 2012). De acuerdo a estos autores el enlace peptídico formado entre Tyr⁵ y Gly⁶ parece ser el sitio más susceptible de escisión. La misma enzima actúa de forma secundaria en el enlace entre Trp³ – Ser⁴. Otra enzima citoplasmática activada por tioles actúa en el péptido Tir⁵ – Gli⁶, vinculada con una acción secundaria en His² – Trp³. También se ha identificado una enzima que actúa en el grupo amino ligado a la Gly¹⁰. La molécula de Fertirelina difiere en el grupo amino terminal con el GnRH natural, sustituyéndose por una etilamina, además el péptido Tir⁵ – Gli⁶ tiene mayor afinidad por los receptores de la GnRH, ya que es el mismo; a diferencia de la Gonadorelina que difiere en este péptido (Chillik, 2003). Estos cambios ocasionan que la Fertirelina sea más estable y afín a las funciones de la GnRH

(Neuberger y Van Deenen, 1988), lo que explica las diferencias en el número de gazapos al nacimiento por la mayor tasa de ovulación.

3.7. Conclusiones

La aplicación de bioestímulo (cambio de jaula o lactación controlada) para inducir el estro en conejas lactantes inseminadas artificialmente es una técnica que representa diferencias significativamente positivas en la tasa de fertilidad, tasa de partos y tamaño de camada al nacimiento.

La utilización de análogos de GnRH para inducir ovulación brinda mejores tamaños de camada al nacimiento. La Fertirelina ofrece mayores beneficios en el número de gazapos nacidos que la Gonadorelina.

3.8. Literatura Citada

- Bonanno, A., M. Alabiso, A. Grigolli and M. L. Alicata. 1999. Effect of change of cage and/or 44 h mother – litter separation on productivity of non – receptive lactating rabbit does. Preliminary investigation. *World Rabbit Science* 7(2): 107-111.
- Castellini, C., C. Canalli, and C. Boiti, 1998. Effect of mother-litter separation for 24 hours, by closing the nestbox or change of cage, on rabbit doe reproduction performance. *World Rabbit Science* 6(1): 199-203.
- Chen, C. C., and R. D. Fernald. 2008. Review Paper: GnRH and GnRH receptors: distribution, function and evolution. *Journal of Fish Biology* 73: 1099 – 1120.
- Chillik, C. 2003. Agonistas y antagonistas de GnRH en reproducción asistida. *Revista de Endocrinología Ginecológica y Reproductiva*.
- Espinosa, A., P. R. García y R. Carabaño. 2004. Repercusiones digestivas del destete transitorio en la producción de leche y consumo de las conejas y en parámetros digestivos de gazapos en crecimiento. XXVIII Simposium de Cunicultura. Departamento de Producción Animal, ETSI Agrónomos.
- García, R. P., E. Ubilla and J. M. Rodríguez. 1992. Influence of the parturition-insemination interval on the conception rate in rabbits artificially inseminated with fresh semen. *Journal of Applied Rabbit Reswarch*. 15: 407–411.
- Ipek M., I. and O. Gokalp. 2011. Sex Hormones and Infertility. Erciyes University. Department of Obstetric and Gynecology.

- Kernabon, A.Y., L. Belair, M. Theau-Clément, R. Salesse and J. Djiane. 1994. Effect of anoestrus and bromocryptine treatment on the expression of prolactin and LH receptors in the rabbit ovary during lactation. *Journal of Reproduction Fertility* 102: 131–138.
- Luzi, F and C. Crimella. 1998. Effect of change of cage 2 days before artificial insemination on reproductive performance of rabbit does. *World Rabbit Science* 6(1): 195-198.
- Maertens, L., F. Luzi and G. Grilli. 1995. Effects of PMSG induced oestrus on the performances of rabbit does: a review. *World Rabbit Science* 3(4): 191-199.
- Neuberger, A., L. and L. M. Van Deenen. 1988. Hormones and their actions. Part II. Elsevier Sciencia Publishers. Netherland. pp 366.
- Pavois, V., J. Le Naour, O. Ducep, G. Perrin and J. Duperray. 1995. La guyostimulation: une méthode naturelle pour améliorer la réceptivité des lapines allaitantes. *Cuniculture* 121: 13–18.
- Quintela, L. A., M. D. Vega, A. L. Peña, J. J. Becerra, J. B. Gullón, M. C. Prieto y P. G. Herradón. 2007. Inseminación Artificial en Cunicultura: colaboración Cogal – Universidad de Santiago de Compostela. Cogal VG: 568 5 – 16
- Rodríguez L., R. y L. M. Fallas. 1998. Sincronización de estros en conejas nulíparas mediante cambio de lugar y jaula y su efecto sobre el comportamiento reproductivo en inseminación artificial. *Lagomorpha*, 97: 52-56.
- Rodríguez L., R. y L. M. Fallas. 1999. Environmental and physiological factors influencing kindling rates and litter size at birth in artificially inseminated doe rabbits. *World Rabbit Science* 7(4): 191-196.
- Rodríguez L., R., L. M. Fallas, R. S. Rangel and A. V. Mariscal. 2003. Influence of short-term relocation and male exposure on sexual receptivity and reproduction in artificially inseminated doe rabbits *Animal Reproduction Science* 78: 111-121.
- Rodríguez S., T. M. 2004. Inducción de la ovulación. *Boletín de Cunicultura*, Jul – Ago, 2004 No. 134.
- Sakakibara, H., M., M. Taga, M. Ikeda, K. Kuroogi and H. Minaguchi. 1996. Continuous stimulation of Gonadotropin-Releasing Hormone (GnRH) Receptors by GnRH Agonist Decreases Pituitary GnRH Receptor Messenger Ribonucleic Acid Concentration in Immature Female Rats. *Endocrine Journal* 43(1): 115 – 118.
- Sánchez R., S. H. 2007. Respuesta Hormonal de los Organismos Superiores ante el estrés calórico. *REDVET* 1695 – 7504 (2007) Volumen VIII, Número 12 B.

- Theau-Clément, M., N. Bencheikh, P. Mercier and J. Bellereaud, 1996. Reproductive performance of does under artificial insemination. Use of deep frozen rabbit semen. In Proceedings of the Sixth World Rabbit Congress. July 9–12, Toulouse, pp. 127–132.
- Theau-Clément, M. and A. Roustan. 1992. A study on relationship between receptivity and lactation in the doe, and their influence on reproductive performance. *Journal of Applied Rabbit Research* 15: 412–421.
- Ubilla, E., G. P. Rebollar, D. Pazo, A. Esquifino and M. R. Alvarino, 2000. Pituitary and ovarian response to transient doe litter separation in nursing rabbits. *Journal of Reproduction and Fertility* (2000) 118, 361 -366.
- Ubilla, E. and R. P. García. 1995. Influence of the post-partum day on plasma estradiol 17-levels, sexual behavior and conception rate in artificially inseminated lactating rabbits. *Animal Reproduction Science* 38: 337–344.
- Uzcategui, M.E. and N. P. Johnston. 1992. The effect of 10, 12 and 14 hour continuous and intermittent photoperiods on the reproductive performance of female rabbits. *Journal of Applied Rabbit Research* 15: 553–559.
- Van Landeghem, A. A. J. and D. F. M. Van de Wiel. 1978. Radioimmunoassay for porcine prolactin plasma levels during lactation, suckling and weaning and after TRH administration. *Acta Endocrinologica* 88: 653-667.
- Vicente, J. S. and F. García. 1994. Control Hormonal de la Reproducción. Conservación de Gametos y Embriones. *Boletín de Cunicultura* No. 72 Mar-Abr 1994.
- Walton, A., 1945. Notes on the technique of artificial insemination. The Holborn Surgical Instrument Co Ltd, London.
- Yablokova, T. V., S. P. Chelushkin, Y. M. Dorosh, A. M. Efremov, S. V. Orlov and S. V. Buror. 2012. Synthesis of GnRH analogues and their application in targeted gene delivery systems. *Russian Journal of Bioorganic Chemistry* 38(1): 22 – 29.