

Induzione dell'ovulazione nella coniglia fattrice: il punto sullo stato della ricerca

Dal Bosco A.

Dipartimento di Biologia Applicata, Università di Perugia, Italy

Corresponding Author: Alessandro Dal Bosco, Dipartimento di Biologia Applicata, Università di Perugia, Borgo XX Giugno, 74, 61121 Perugia (PG), Italy - Tel. +39 075 5857110 - Fax: +39 075 5857122 - Email: dalbosco@unipg.it

ABSTRACT: Ovulation induction in rabbit does: a review. In the last 15 years the profitability of rabbit farms has increased mainly due to improvements in management and genetic selection, but several problems related to animal welfare have also occurred. This review recognises 66 scientific papers on rabbit does ovulation. In particular are reported: i) 23 papers, from 1905 to present, that have elucidated the ovulatory mechanisms in rabbit does; ii) 13 papers on the main GnRH analogues and their function; iii) 24 papers about the main parenteral treatments for inducing does ovulation and their efficacy; iv) 6 papers on the main intravaginal treatments for inducing ovulation in rabbit does and their efficacy. Considering the actual importance of innovative welfare oriented methods to induce ovulation in this species, strategies to optimize this physiological function are discussed.

Key words: Rabbit does, GnRH analogues, Ovulation, Reproductive performance.

INTRODUZIONE

L'uso dell'Inseminazione Artificiale (IA) in conigliicoltura è diventato ormai una pratica di routine nella maggior parte degli allevamenti europei e ciò ha comportato l'introduzione di una serie di operazioni e trattamenti volti alla massimizzazione delle performance e all'ottimizzazione delle risorse umane. Tra questi, come è noto, il trattamento con GnRH (Gonadotropin-Releasing Hormone) al momento della IA si è reso indispensabile al fine di indurre l'ovulazione nella coniglia fattrice, così da supplire alla mancanza degli stimoli nervosi indotti dal maschio; tale trattamento richiede un'iniezione intramuscolare con conseguente stress per l'animale e impegno di tempo da parte dell'operatore. Attualmente sono disponibili in commercio numerosi analoghi del GnRH, di cui si parlerà in un paragrafo successivo, che presentano un basso peso molecolare e possono pertanto essere facilmente assorbiti per diverse vie (Camier *et al.*, 1989; Donnez *et al.*, 1989).

Lo scopo della presente review è quello di fare il punto sullo stato dell'arte relativo alle diverse tecniche di induzione dell'ovulazione nella coniglia fattrice, dopo aver brevemente richiamato alcune peculiarità fisiologiche di questa specie ed alcuni concetti relativi alle sostanze ormonali oggi maggiormente utilizzate.

CENNI STORICI E RICHIAMI DI FISIOLOGIA

È ormai noto da oltre un secolo che nella coniglia l'ovulazione è normalmente indotta dal coito (Heape, 1905). Walter Heape fu un vero e proprio pioniere nello studio della fisiologia riproduttiva, tanto che il 27 Aprile del 1890 egli riuscì a trasferire degli embrioni da una coniglia ad un'altra e, nel 1905, pubblicò una prima descrizione di

ovulazioni non spontanee nella coniglia, dando inizio ad una serie di studi di grande interesse per l'IA e per le produzioni animali in generale (Biggers, 1991). Da allora la coniglia è considerata un animale in estro più o meno permanente che rientra quindi nel gruppo da quelli ad ovulazione "riflessa" o "indotta" differenziandosi dai mammiferi ad ovulazione spontanea (Hammond e Marshall, 1925).

Normalmente il riflesso ovulatorio si esplica attraverso 2 vie (Lindner *et al.*, 1977):

- la via nervosa o afferente che trasmette lo stimolo al sistema nervoso centrale;
- la via umorale o efferente che trasferisce gli impulsi all'ovaia.

A questo livello si distinguono almeno tre componenti distinte:

- la ripresa del processo meiotico negli oociti;
- uno spostamento di produzione da estrogeni follicolari a progesterone con luteinizzazione precoce delle cellule della granulosa;
- la rottura della parete del follicolo con deiscenza dell'oocita.

Tutti e tre i processi sono probabilmente iniziati da un'interazione simile tra gonadotropine e recettori di membrana in appropriati compartimenti follicolari, ma la successiva espressione della risposta dipende da numerosi meccanismi fisiologici.

Potrebbe essere interessante fare una rapida carrellata degli studi che hanno condotto a tali assunti.

Inizialmente Schochet (1916) ipotizzò che il *liquor follicoli* contenesse degli enzimi proteolitici e che la rottura del follicolo dipendesse esclusivamente da questi, mentre Robinson (1918) descrisse la secrezione di un *liquor follicoli* secondario in prossimità dell'atto ovulatorio.

Le prime intuizioni che le interazioni tra coito e ovulazione avessero un'origine nervosa furono di Guttmacher e Guttmacher (1921) e Grosser (1924) i quali osservarono una forte innervazione nervosa delle cellule del follicolo e degli strati fibro-muscolari delle membrane dello stesso che risultano coinvolte nel processo di deiscenza. Solo nel 1933 Bellerby ipotizzò che nel processo di ovulazione fosse coinvolto il lobo anteriore dell'ipofisi attraverso tre assunti:

- la rilevazione di un aumento ematico di una sostanza stimolante l'ovulazione derivante dal lobo anteriore dell'ipofisi dopo il coito;
- i risultati di uno studio sugli effetti del coito su ovaie di coniglie cui era stata rimossa l'ipofisi;
- la valutazione degli effetti di un estratto di ipofisi anteriore sulle ovaie con particolare riferimento al tempo di deiscenza.

Tale Autore concluse che dopo l'accoppiamento, l'adenoipofisi secerne un ormone (non definito in quel momento) che attiva a livello di follicolo dei cambiamenti nelle secrezioni determinandone la rottura, anche se in quel momento nulla si riusciva a dire riguardo ai fattori nervosi che stimolavano la ghiandola stessa nella secrezione.

Solo molti anni dopo si definì in maniera precisa come, sotto sollecitazione di stimoli nervosi, l'ipotalamo liberasse sostanze, dette fattori di rilascio (*releasing factors*), come il GnRH, conosciuto anche come LHRH (Luteinizing Hormone-Releasing Hormone) o LRF (luteinizing releasing factor). Nel 1971, Andrew Schally e Roger Guillemin furono i primi ad isolare, caratterizzare e sintetizzare il GnRH, tanto da ricevere per questo il premio Nobel. Successivamente, la sostituzione di molti aminoacidi presenti nella struttura iniziale del GnRH ha portato allo sviluppo di agonisti del GnRH, composti caratterizzati da un'elevata affinità per i recettori, da una resistenza alla degradazione proteolitica e da una ridotta eliminazione renale. La sequenza di aminoacidi del GnRH è comune a tutti i mammiferi, mentre si differenzia negli uccelli,

nei rettili e nei pesci e la sua secrezione è regolata da un generatore di impulsi (o oscillatore di GnRH), localizzato nell'ipotalamo mediobasale. Il GnRH è rilasciato dai neuroni ipotalamici nella circolazione portale ipofisaria ed entra poi in contatto con i suoi recettori situati sulle cellule gonadotrope dell'ipofisi anteriore, stimolando la liberazione delle gonadotropine FSH (follicolostimolante) e LH (luteinizzante). L'LH è responsabile dell'ovulazione, che avviene 10-12 h dopo l'accoppiamento per deiscenza del follicolo di Graaf. Il GnRH stimola inoltre la produzione di estradiolo, progesterone, 20α di-idrossiprogesterone e prostaglandine, inducendo anche la liberazione di ossitocina che favorisce l'ovulazione. L'ipotalamo produce inoltre molte endorfine che non esplicano azione diretta sull'ipofisi, come i *releasing factors*, ma modulano le secrezioni ormonali *in loco*. Così, un elevato livello di endorfine, conseguente a condizioni di stress, interferisce sulla produzione di GnRH e quindi di gonadotropine.

Nell'ovario maturo i follicoli si sviluppano e regrediscono continuamente, cosicché il numero di quelli in fase preovulatoria è quasi sempre costante.

Se la coniglia non si accoppia i follicoli ovarici mantengono secondo alcuni Autori notevoli dimensioni (circa 1,2-1,5 mm di diametro) per 12-16 giorni, mentre secondo altri si mantengono per soli 7-10 giorni (Shibata, 1931; Hill *et al.*, 1933; Buttner e Wienert, 1935).

In concomitanza con il picco di LH si verifica a livello ovarico una liberazione di prostaglandine che potrebbero avere un ruolo nell'indurre la rottura del follicolo in corrispondenza dello stigma. A questo proposito Thebault *et al.* (1983) hanno descritto l'azione del tessuto interstiziale del follicolo e della Prostaglandina E_2 nei meccanismi intra-ovarici di deiscenza dello stesso. Un altro interessante risultato ottenuto dagli stessi Autori è quello relativo all'assenza della rottura dello stigma quando il follicolo preovulatorio viene isolato dall'ovaia prima della scarica di gonadotropine endogene, dimostrando che il follicolo costituisce un'entità indipendente a partire da un'ora post-coito. Quattro, cinque ore dopo il coito, i livelli di LH ritornano sui valori basali, mentre 16-22 ore dopo si osserva un nuovo picco di FSH che stimola la formazione di una nuova popolazione di follicoli ovarici che si svilupperanno fino allo stadio antrale, esplicando una funzione luteotrofa fondamentale, mediata dall' 17β estradiolo, nei confronti dei corpi lutei, già a partire dalla quinta o sesta giornata dall'ovulazione.

Oltre a questi meccanismi, nella coniglia sono stati studiati e chiariti anche casi di ovulazioni spontanee in femmine non accoppiate (Walton e Hammond 1928; Parkes, 1934), che hanno fatto ipotizzare l'esistenza di altri fattori di induzione dell'ovulazione. Infatti Carlyle e Williams (1961) sono riusciti a indurre l'ovulazione in una piccola percentuale di femmine a seguito di stimolazioni meccaniche, mentre Viudez-de-Castro *et al.* (2007) hanno osservato che il 32,5% di coniglie ovulava senza alcun tipo di trattamento ormonale. In quest'ultimo caso i risultati positivi sono da imputare esclusivamente alla stimolazione prodotta dalla pipetta di inseminazione. Hammond e Asdell (1927) hanno ottenuto il 3-6% di fertilità in inseminazioni senza contatto con il maschio, mentre tale parametro raggiungeva il 33% quando l'inseminazione era accompagnata da un accoppiamento rifiutato. Se invece una coniglia recettiva veniva inseminata artificialmente e successivamente accoppiata con un maschio sterile, la fertilità raggiungeva il 90%. Il basso tasso di concepimento ottenuto nei primi due gruppi era chiaramente associato alla mancanza di induzione dell'ovulazione. Sawyer e Markee (1959) stimolando la vagina con una bacchetta di vetro hanno osservato percentuali di ovulazione del 45% in coniglie recettive e del 40%

in coniglia non recettive. Al contrario, Thielate *et al.* (1931) non osservarono alcun effetto significativo in relazione ad un'anestesia locale a livello di vagina sul riflesso copulatorio e sull'ovulazione.

Hammond e Marshall (1925) in coniglie allevate in colonia, hanno riscontrato delle monte tra coniglie gravide, senza alcun pregiudizio per la gravidanza stessa. Successivamente, Stormshak e Casida (1964) hanno osservato che un trattamento a base di LH e di gonadotropina corionica umana (hCG, human Corionic Gonadotropin) induceva l'ovulazione in coniglie gravide da 9 giorni seguita peraltro da aborto. Quando però l'hCG veniva iniettato prima del quarto giorno, la conseguente ovulazione non era accompagnata da insufficienza luteale e due generazioni di corpi lutei di età diverse convivevano a livello ovarico, dimostrando l'effetto diretto delle gonadotropine sul corpo luteo. Per giustificare l'aborto, Keyes e Nalbandov (1967) hanno ipotizzato che l'LH stimolasse l'ovulazione dei follicoli più maturi, con arresto dell'azione luteotropica, successiva regressione dei corpi lutei e conseguente interruzione della gravidanza.

Dopo questa carrellata, una citazione va fatta ad un interessante lavoro di un gruppo di ricerca svedese (Dahm-Kähler *et al.*, 2006) che ha messo a punto un metodo per l'osservazione *in vivo* ed in tempo reale dell'ovulazione della coniglia, grazie all'utilizzo di una camera organi (Figura 1). L'interesse verso questo studio è legato alle grandi opportunità che tale metodica potrebbe offrire per lo studio dei meccanismi ovulatori, specie se combinata con variabili ematiche e follicolari.

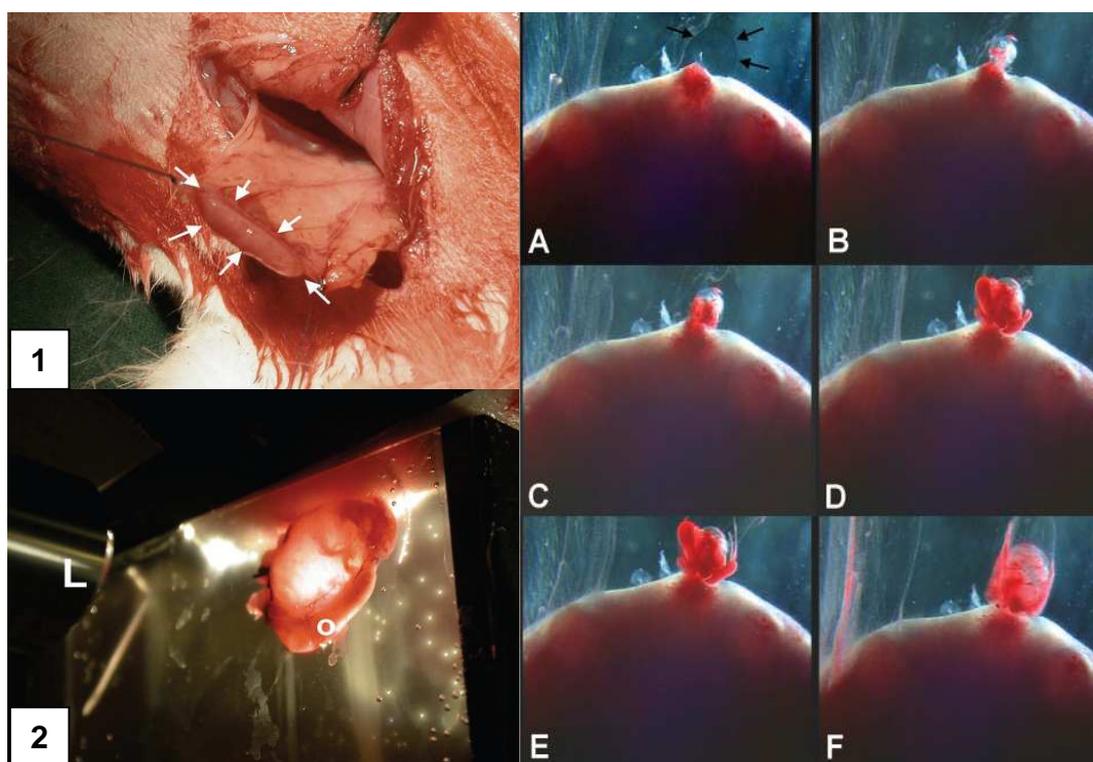


Figura 1 – Espianto dell'ovaia (1) e posizionamento in camera organi (2) per osservazione al microscopio (L). Rottura del follicolo in differenti momenti (A, 0; B, 5; C, 10; D, 55; E, 65; F, 545 secondi). Il primo segno di rottura del follicolo è la perdita di *liquor follicoli* (A). Poi si verifica l'estrusione delle cellule della granulosa (B) che successivamente è accompagnata da perdita di sangue (C-F) (Dahm-Kähler *et al.*, 2006; su concessione di Oxfordjournals, Licenza Numero: 2604170996980).

GnRH ANALOGHI: AGONISTI E ANTAGONISTI

A seconda dell'origine, gli ormoni GnRH simili possono essere ascritti in due gruppi: GnRH naturale e analoghi sintetici del GnRH. Tra questi esiste un analogo del GnRH naturale (Gonadorelina) e analoghi del GnRH sintetico, spesso chiamati Superanaloghi. Infatti, negli ultimi anni, la tecnologia di sintesi di polipetedi in fase solida ha permesso di produrre una enorme quantità di analoghi del GnRH (circa 2000; Karten and River, 1986) variabili per l'affinità dei recettori, l'assorbimento *in vivo*, la resistenza alla degradazione e le modalità di eliminazione. Recentemente, nella pratica clinica, sono stati introdotti gli antagonisti del GnRH che hanno un meccanismo d'azione completamente differente rispetto agli agonisti (Figura 2).

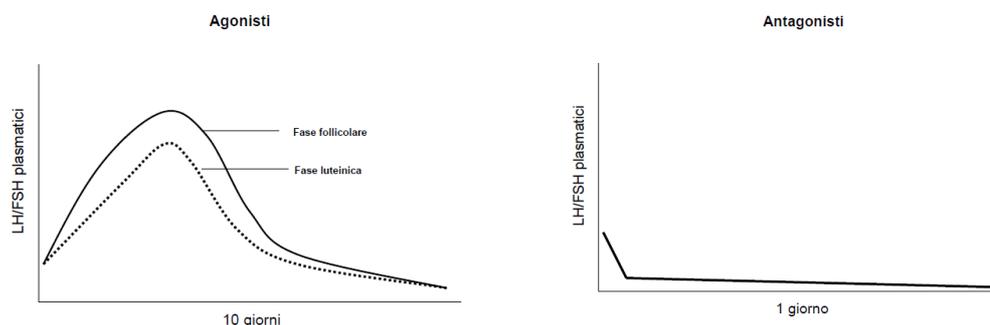


Figura 2 – Effetto degli analoghi del GnRH sulla secrezione di gonadotropine da parte dell'ipofisi (Hodgen, 1990, modificato).

Infatti, mentre gli agonisti del GnRH, dopo un iniziale effetto di stimolazione ipofisaria inducono una desensibilizzazione delle cellule gonadotropiniche e una riduzione del numero di recettori per il GnRH sulla membrana cellulare, gli antagonisti producono un immediato effetto bloccando in modo competitivo i recettori del GnRH. Con questo meccanismo d'azione, gli antagonisti inducono una soppressione acuta e rapida dell'LH senza neanche un iniziale incremento dello stesso. La struttura primaria del GnRH dei mammiferi è riportata in Tabella 1. Una caratteristica fondamentale degli agonisti è la sostituzione degli L-isomeri con i D-isomeri. I più diffusi agonisti sintetici del GnRH diffusi in commercio sono: la Buserelina, la Leuprorelina, la Goserelina e la Triptorelina e, tranne quest'ultima, sono impiegati come acetati. In generale sono sensibili alle peptidasi e quindi alla degradazione gastrointestinale, rendendo sconsigliabile la somministrazione orale (Conn e Crowley, 1991; Chrisp e Goa, 1990). Alcuni studi hanno però dimostrato che dei frammenti di GnRH possono conservare la loro efficacia biologica ed essere assorbiti a livello intestinale (Stetler-Stevenson *et al.*, 1981; Griffith e McDermott, 1984; Roberts *et al.*, 1999). Altri Autori hanno riscontrato una minore degradabilità intestinale degli analoghi rispetto al GnRH naturale (Berger *et al.*, 1991), la presenza di recettori nella mucosa gastrica a livello di cellule epiteliali (Gama e Alvarez, 2001) e di duodeno (Isakenkov *et al.*, 1979). Brussow *et al.* (2007) hanno ottenuto una un'induzione della secrezione di LH in maiali nani a seguito di una somministrazione enterale di 10 mg di D-Phe6-LHRH. Bassol *et al.* (1997), somministrando 35 µg di Buserelina (Suprefact) per via orale a bambini di età compresa tra 2 e 4 mesi, hanno notato un picco di LH nelle urine 4-6 ore dopo il trattamento, confermando che una significativa quota di GnRH analogo somministrato per via orale sfugge alla degradazione gastrointestinale ed incrementa

significativamente la produzione di LH rispetto al controllo. La somministrazione intranasale è relativamente inefficiente e fornisce risultati variabili, con solo un 20% circa di analogo disponibile rispetto al trattamento intramuscolare o sottocutaneo (Chrisp e Goa, 1990; Gudmundsson *et al.*, 1984). L'assorbimento vaginale è stato studiato per la prima volta nei ratti osservando un 20% di biodisponibilità in combinazione con acidi organici (Okada *et al.*, 1982).

TRATTAMENTI PER VIA PARENTERALE

La tecnica standard di IA in coniglicoltura prevede la somministrazione intramuscolare di GnRH analoghi al fine di indurre l'ovulazione grazie al rilascio di LH dall'ipofisi (Rodríguez *et al.*, 1988; Rebollar *et al.*, 1997). La capacità dell'LH di indurre l'ovulazione, specificatamente nel coniglio, fu evidenziata per la prima volta da Pincus nel 1940 e poi da Parkes nel 1943. Solo negli anni sessanta però, alcuni ricercatori hanno iniziato ad identificare dei meccanismi ormonali orientati alla definizione di protocolli operativi per l'IA del coniglio (Harper, 1961; Adams, 1961; Foote *et al.*, 1963). Riguardo al GnRH, inizialmente alcuni ricercatori (Foxcroft *et al.*, 1974) ne hanno testato l'efficacia a diversi dosaggi (1, 5, 10 o 20 µg) somministrandolo per via endovenosa; gli stessi riscontrarono un tasso di ovulazione significativamente più elevato al dosaggio 10 µg, legato anche alle ridotte concentrazioni di progesterone plasmatico riscontrato nelle coniglie di questo gruppo. Hulot *et al.* (1988) hanno anche dimostrato l'efficacia dell'hCG nell'induzione dell'ovulazione in diversi genotipi di conigli; infatti, sia il genotipo A1066 (origine Californiana) che quello A1077 (origine Nuova Zelanda) rispondevano positivamente al trattamento intramuscolare con 10 UI di hCG, mostrando tassi di ovulazione simili a quelli di coniglie accoppiate naturalmente. Gli stessi Autori hanno riscontrato un effetto positivo di tale trattamento anche su coniglie non recettive, che non mostravano un atteggiamento di lordosi, indispensabile, come noto, alla riuscita dell'accoppiamento nel caso di monta naturale. Theau-Clement *et al.* (1990) hanno confrontato l'efficacia di due GnRH analoghi, 0,8 µg di Buserelina (Receptal) e 20 µg di Gonadorelina (Fertagyl) somministrati per via intramuscolare immediatamente prima della IA, su coniglie recettive e non. Nelle prime il tasso di ovulazione, è stato del 72,5 e dell'87,9% rispettivamente con Fertagyl e con Receptal. Nelle coniglie recettive, invece, gli Autori non hanno riscontrato differenze neppure a livello di fertilità. Al contrario, il numero di nati vivi è stato superiore nelle coniglie in lattazione trattate con Fertagyl. Nel complesso, comunque, il numero di svezzati totali è stato pressoché identico nei due gruppi, a conferma dei risultati conseguiti da precedenti Autori (Battaglini, 1986; Lammers e Petersen, 1987; Rodriguez e Ubilla, 1988).

In generale, le azioni farmacologiche dell'hCG e dell'LH possono considerarsi simili, sebbene la farmacocinetica e la biodisponibilità di questi ormoni siano diverse; infatti l'emivita dell'LH risulta inferiore rispetto a quella dell'hCG, tanto da giustificare i vantaggi osservati con il trattamento LH (Simmon *et al.*, 1988). L'azione dell'LH nel follicolo è maggiormente selettiva e richiede un minor tempo per la deiscenza, oltre che garantire una qualità superiore di oociti e di embrioni, legata a buoni livelli di secrezione di estradiolo e progesterone durante il periodo post-ovulatorio.

Tabella 1 – Alcuni analoghi del GnRH.

Nome	Potenza relativa	Nome comm.	Sequenza aminoacidica									
			1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
GnRH	1	Fertagyl®	Pyr-glu	His	Trp	Ser	Tyr	Gli	Leu	Arg	Pro	Gly-NH ₂
Gonadorelin a												
Lecirelina		Dalmarelin®	Pyr-glu	His	Trp	Ser	Tyr	D-tertLeu	Leu	Arg-	Pro-NHEt	
Leuproride	15	Lucrin Depot®	Pyr-glu	His	Trp	Ser	Tyr	D-Leu	Leu	Arg	Pro	N-EtNH ₂
Buserelina	20	Receptal	Pyr-glu	His	Trp	Ser	Tyr	D-Ser	Leu	Arg	Pro	N-EtNH ₂
Nafarelina	150	Synarel®	Pyr-glu	His	Trp	Ser	Tyr	D-Nal	Leu	Arg	Pro	N-EtNH ₂
Deslorelina	150	Ovuplant®	Pyr-glu	His	Trp	Ser	Tyr	D-Trp	Leu	Arg	Pro	N-EtNH ₂
Istrelina	150		Pyr-glu	His	Trp	Ser	Tyr	D-Ists	Leu	Arg	Pro	N-EtNH ₂
Goserelina	100	Zoladex®	Pyr-glu	His	Trp	Ser	Tyr	D-Ser	Leu	Arg	Pro	N-EtNH ₂
Cetrorelix	Antagonista		Ac-D-Nal	D -Cpa	D-Pal	Ser	Tyr	D-Cit	Leu	Arg	Pro	AzGly-NH ₂
Ganirelix	Antagonista		Ac-D-Nal	D -Cpa	D-Pal	D-hArg	-----		Leu	hArg	Pro	D-Ala-H ₂

Rodriguez e Ubilla (1988), somministrando 20 o 40 µg (via intramuscolare) di GnRH analogo (Fertagyl, Intervet) a coniglie recettive o non, osservarono che le dosi superiori riuscivano solo parzialmente ad aumentare il tasso di ovulazione, ipotizzando un limite di sensibilità dell'ipofisi superiore al minimo dosaggio e che ciò potrebbe essere condizionato dai livelli di estrogeni presenti in circolo e quindi dal numero di follicoli pre-ovulatori. Molina *et al.* (1991), hanno confrontato l'efficacia di 50 UI di LH puro e 50 UI di hCG su coniglie nullipare, valutando la secrezione di 17/β-estradiolo e di progesterone e la qualità di oociti ed embrioni. Il numero di follicoli e di oociti recuperati sono stati ridotti dal trattamento con LH, anche se la percentuale di metafase II e oociti degenerati erano simili con i due trattamenti. Le concentrazioni di estradiolo e progesterone sono risultate più elevate nel gruppo LH e ciò potrebbe indicare un certo grado di iperstimolazione ovarica e giustificare il miglioramento del rapporto estradiolo/progesterone. Al momento dell'ovulazione si verifica una serie di eventi endocrini che culminano con la riduzione dei livelli di estradiolo in circolo e l'aumento di quelli di progesterone, che sono di solito associati al tasso di ovulazione e svolgono un importante ruolo sulla qualità degli oociti e degli embrioni. Infatti altri studi hanno evidenziato che il picco di LH determina un rapido aumento delle concentrazioni di progesterone, androgeni e estradiolo, che iniziano a ridursi circa 2 ore dopo il picco stesso fino a divenire non rilevabili al momento dell'ovulazione (LeMaire *et al.*, 1979; Janson *et al.*, 1982). Holmes *et al.* (1985) osservarono che la produzione di progesterone che normalmente la coniglia mette in atto al momento del picco dell'LH non è indispensabile per il processo ovulatorio se non a livelli molto elevati. In uno studio volto a chiarire gli effetti dell'analogo Leuprolide acetato (20 µg/kg) sull'ovulazione e sulla steroidogenesi della coniglia (Zanagnolo *et al.*, 1996) è stato osservato che a dosi farmacologiche l'analogo in esame può esercitare effetti negativi sulla funzionalità dell'oocita sia attraverso un'azione diretta sulla stesso (stato di pre-impianto e degenerazione) che una indiretta sull'ambiente intrafollicolare.

Più recentemente Mehaisen *et al.* (2005) hanno confrontato l'efficacia di due trattamenti a base di Buserelin acetato (Hoechst, S.A.; 2 µg, intramuscolare) e di hCG (Coriogon, Ovejero; 75 UI, intravenoso). Quest'ultimo trattamento ha aumentato in misura significativa il tasso di ovulazione rispetto all'analogo del GnRH (17,3 vs 13,8%). Il numero di follicoli emorragici (5,5 vs 8,8), il tasso di recupero degli embrioni (48,7 vs 34,8%) la percentuale di fattrici con almeno un embrione normale (80,4 vs 68,4) e il numero di embrioni normali per fattrice (7,5 vs 6,9) sono stati migliori nel gruppo hCG. Tali risultati confermano quelli ottenuti in precedenti studi condotti da Garcia-Ximenez and Vicente (1992) e Viudez de Castro *et al.* (1995).

Zapletal e Pavlik (2008) hanno studiato gli effetti di differenti dosaggi di lecirelina (0,05, 0,1, 0,2, 0,3, 0,5, 1,0, 1,5, 2,0, 2,5, 3,0 e 4,0 µg/fattrice) su coniglie sia nullipare che in lattazione. Nelle nullipare la fertilità ha presentato un range di variabilità dal 10,0% (0,05 µg) a 89,5% (1,5 µg); nelle multipare il valore più basso è stato riscontrato con la dose di 0,05 µg e a partire da 0,3 µg i valori sono aumentati. Il minor numero di nati vivi (6,64) nelle nullipare è stato ottenuto con la dose di 0,1 µg e a partire da 0,3 µg è migliorato in misura significativa (8,28). Nelle multipare il più basso numero di nati vivi si è osservato nel gruppo 0,05 µg ed il più alto (10,73) alla dose di 4,0 µg.

TRATTAMENTI PER VIA INTRAVAGINALE

Come già accennato, recentemente sono stati effettuati degli studi volti a valutare l'efficacia di una somministrazione intravaginale, inclusa nella dose inseminante, di

diversi GnRH analoghi. Ciò al fine di eliminare un'iniezione alla fattrice e di ridurre la possibilità di errori in allevamento, dal momento che in questo caso, le dosi inseminanti, complete di trattamento, sarebbero preparate dai centri di produzione del seme.

Il primo studio sull'argomento è stato condotto da Quintela *et al.* (2004) che hanno sottoposto tre gruppi di coniglie (secondipare) ai seguenti trattamenti:

- controllo 0,8 µg/capo di Buserelina (Receptal) per via intramuscolare;
- Gruppo 1: 8 µg/capo di Buserelina (Suprefact) per via intravaginale nella dose inseminante;
- Gruppo 2: 16 µg/capo di Buserelina (Suprefact) per via intravaginale nella dose inseminante.

La fertilità è stata influenzata dal trattamento ed in particolare solo nel gruppo 2 si sono raggiunti livelli simili al Controllo, mentre il dosaggio più basso ha ridotto significativamente la fertilità (55,6 vs 82,4 e 84,6% rispettivamente per Controllo e Gruppo 2). Al contrario prolificità e mortalità non sono state influenzate dal trattamento. Nei due gruppi sperimentali il picco di LH ematico (36.6 e 37.8 ng/mL) è stato raggiunto 60 minuti dopo l'IA, mentre nelle femmine del gruppo controllo tale picco (35,1 ng/mL) è stato rilevato 90 minuti dopo l'IA; dopo 150 minuti in tutti i gruppi i valori sono tornati al livello basale (da 3,4 a 4,9 ng/mL) osservato prima della somministrazione di Buserelina. Gli stessi Autori in una prova di campo, pur non avendo osservato differenze significative in termini di fertilità, hanno confermato quanto riscontrato in precedenza circa la correlazione positiva tra performance riproduttive e dose di Buserelina utilizzata. Operando in tal modo, sono riusciti a dimostrare la possibilità di un uso di GnRH analoghi per via intravaginale purché a dosaggi almeno 15 volte superiori a quelli utilizzati nei trattamenti intramuscolari.

Il dato più interessante emerso dalla sperimentazione è quello relativo al picco dell'LH che nei gruppi sperimentali è stato raggiunto più rapidamente, ad indicare una probabile maggiore velocità di assorbimento dell'ormone attraverso la via mucosale. Tale situazione potrebbe anche essere legata al fatto che gli alti livelli di estrogeni presenti durante l'estro, aumentano la vascolarizzazione del tratto genitale incrementando la permeabilità dei capillari (Hafez, 1993) e facilitando così l'assorbimento di varie sostanze attraverso le mucose. Il fatto che non sia stata riscontrata una maggiore efficacia è probabilmente da collegarsi ad una frazione dell'ormone che viene dispersa e/o non assorbita. Potrebbero aver influenzato la risposta anche altri fattori legati per esempio ad alcuni costituenti del plasma seminale, come le prostaglandine, o a particolari situazioni dell'apparato riproduttore che possono modulare l'assorbimento dell'ormone e che saranno oggetto della relazione seguente in questo Convegno. Gli stessi Autori in successive sperimentazioni (Quintela *et al.*, 2008; 2009), sia in stabulario che in campo, hanno confrontato l'efficacia di un trattamento intramuscolare con 20 µg/coniglia di gonadorelina (Inducel GnRH: 20 µg/ml) e di una somministrazione intravaginale di 25 µg di [des-Gly10, D-Ala6]-LHRH etilamide (L-4513, Sigma, St. Louis, MO, USA). Tale analogo avrebbe una potenza inferiore alla Buserelina (0,7 volte) ma sarebbe 14 volte più potente della Gonadorelina (Conn e Crowley, 1991). I risultati relativi alla fertilità hanno confermato queste asserzioni, specialmente nella prova di campo, ove il trattamento intravaginale ha permesso di ottenere livelli significativamente superiori (91,1 vs 85,6%; $P < 0,05$). Un altro aspetto interessante è il mantenimento dell'efficacia anche dopo trattamenti ripetuti. Infine, circa la tempistica di aggiunta dell'analogo alla dose inseminante, si è

osservata una stabilità di azione fino a 24 ore prima della IA; invece, aggiungendo l'ormone 32 ore prima, la fertilità si è ridotta in maniera significativa. Quindi, anche i risultati di tali studi hanno dimostrato che l'agonista GnRH [des-Gly10, D-Ala6] - LHRH etilamide, veicolato in dose seminale, può essere utilizzato con successo per indurre l'ovulazione in coniglie nullipare o pluripare in lattazione.

In un altro studio, Ondruška *et al.* (2008) hanno verificato l'efficacia di un trattamento intravaginale del superanalogo GnRH-Lecilerum (Supergestran) a diversi dosaggi: 2,5, 5, 7,5 e 15 µg/dose, confrontata con quella di un trattamento intramuscolare (2,5 µg/coniglia). Il più basso valore del tasso di fertilità (42,99%) è stato ottenuto nel gruppo S2,5 ed il più elevato in quello S7,5 (72,09%), superiore del 9,35% rispetto al controllo. Il numero medio di nati vivi e la mortalità non hanno mostrato differenze significative tra i gruppi.

Viudez-de-Castro *et al.* (2007) hanno proseguito in questa serie di studi, aggiungendo alla dose inseminante due analoghi del GnRH, la Buserelina e la Triptorelina.

In questo caso i gruppi a confronto erano:

- Controllo negativo (femmine inseminate 0.5 mL di seme diluito senza aggiunta di analoghi);
- Controllo positivo (femmine inseminate 0.5 mL di seme diluito senza aggiunta di analoghi e trattate con 1 µg di buserelina acetato (Suprefact, Hoechst Marion Roussel, S.A., Madrid, Spain) per via intramuscolare;
- Gruppo Buserelina4 (femmine inseminate 0.5 mL di seme diluito con aggiunta di 4 µg/mL di Buserelina);
- Gruppo Buserelina10 (femmine inseminate 0.5 mL di seme diluito con aggiunta di 10 µg/mL di Buserelina, Spanish patent registered number ES2190723B1).
- Gruppo Triptorelina 4 (femmine inseminate 0.5 mL di seme diluito con aggiunta di 4 µg/mL di Triptorelina, Decapeptyl, Ipsen-Pharma, Barcellona, Spagna);
- Gruppo Triptorelina 10 (femmine inseminate 0.5 mL di seme diluito con aggiunta di 10 µg/mL di Triptorelina, Decapeptyl, Ipsen-Pharma, Barcellona, Spagna).

Solo le coniglie del gruppo Buserelina 10 hanno raggiunto percentuali di ovulazione simili a quelle del Controllo positivo (88,9 vs 97,8%), mentre in tutti gli altri gruppi i livelli di questo parametro sono stati significativamente più bassi.

Per ciò che concerne la fertilità, l'aggiunta dei due analoghi ai più alti dosaggi ha permesso di eguagliare i risultati ottenuti nel gruppo Controllo (79,5 vs 79,5 e 74,4, rispettivamente per Controllo, Buserelina10 e Triptorelina10).

In un altro studio, i medesimi Autori (Vicente *et al.*, 2007), utilizzando tre diversi genotipi e diverse condizioni di allevamento, hanno riscontrato una minor efficacia del trattamento intravaginale con Buserelina (10 µg/mL dose) in termini di fertilità e di percentuali di parti (+ 7,1% e +7,4% rispettivamente nel gruppo Controllo; $P < 0,05$), anche se poi i gruppi non hanno mostrato differenze a livello di numerosità della nidiata e mortalità.

CONCLUSIONI

In sintesi, da questa ricerca bibliografica si può dedurre che l'efficacia della somministrazione di GnRH analoghi per via intravaginale può considerarsi soddisfacente solo utilizzando dosaggi molto superiori rispetto a quelli utilizzati nel trattamento intramuscolare. Ciò dipende evidentemente dalla ridotta capacità di assorbimento degli analoghi da parte della mucosa vaginale (circa il 20% del totale; Okada *et al.*, 1982).

Come verrà approfondito nella relazione successiva, è evidente che l'assorbimento del GnRH a livello vaginale è probabilmente influenzato in diversa misura dallo stato delle mucose e dalle già citate secrezioni legate alle condizioni di recettività, dalla presenza di acidi organici nel mestruo diluitore, dalla concentrazione spermatica (gli spermatozoi presentano una grande capacità di incorporare molecole estranee come frammenti di DNA), dalla presenza del plasma seminale e da eventuali stati infiammatori. In questo scenario, a fronte degli indubbi vantaggi in termini di benessere animale e di organizzazione del lavoro in allevamento, l'individuazione dell'analogo più efficace che possa essere utilizzato a dosaggi economicamente sostenibili rappresenta una delle sfide più importanti della coniglicoltura attuale.

BIBLIOGRAFIA – **Adams**, C.E., 1961. Artificial insemination in the rabbit. *J. Repr. Fert.* 2:521-528. **Battaglini**, M., Costantini, F., Baldissera, C.N., Castrovilli, C.F., 1982. Induction of ovulation and artificial insemination in the rabbit. *Riv. Coniglicoltura* 19:45-54. **Berger**, H., Heinrich, N., Albrecht, E., Kertscher, U., Oehlke, J., Bienert, M., Schafe, H., Baeger, I., Mehlis, B., 1991. Gonadotropin-releasing hormone analogs: relationship between their structure, proteolytic inactivation and pharmacokinetics in rats. *Regul. Pept.* 33:299-311. **Bassol**, S., Barraza-Vasquez, A., Nava, M.P., Recio, R., 1997. Effects of oral buserelin on urinary LH secretion in male infants. *Contraception* 55:311-314. **Bellerby**, C.W., 1933. The relation of the anterior lobe of the pituitary to ovulation in the rabbit. *Exp. Physiol.* 123-132. **Biggers**, J.D., 1991. Walter Heape, FRS: a pioneer in reproductive biology. Centenary of his embryo transfer experiments. *J. Repr. Fert.* 93:176-186. **Brüssow**, J.K., Kanitz, E., Tuchscherer, A., Tosch, P., 2007. Study of enteral versus parenteral application of the Gonadotropin Releasing Hormone agonist Gonadorelin[6-D-Phe] (D-Phe6-LHRH) on LH secretion in goettinger miniature pigs. *J. Repr. Dev.* 3:699-706. **Buttnerw**, D., Wienertk, F., 1935. Dauerbrunst und Follikelpersistenz. (Experimentelle Untersuchungen an Kaninchen.). *Arch. Gynaek.* 159:64-83. **Camier**, B., Gagneur, O., Arlot, S., Thépot, F., Vitse, M., 1989. Preliminary study of the use of intranasal Buserelin in the long-term protocol of ovarian stimulation with the view toward fertilization in vitro. *Rev. Fr. Gynecol. Obstet.* 84:659-661. **Carlyle**, A., Williams, T.D., 1961. Artificially induced ovulation in the rabbit. *J. Physiol. Lond.* 157:42-54. **Conn**, P.M., Crowley, W.F., 1991. Gonadotropin-releasing hormone and its analogues. *N. Engl. J. Med.* 324:93-103. **Chrisp**, P., Goa, K.L., 1990. Nafarelin. A review of its pharmacodynamic and pharmacokinetic properties, and clinical potential in sex hormone-related conditions. *Drugs* 39:523-551. **Dahm-Kähler**, P., Ryota Fujii, L., Axelsson, A., Janson, O., Brännström, M. 2006. An intravital microscopy method permitting continuous long-term observations of ovulation *in vivo* in the rabbit. *Hum. Repr.* 3:624-631. **Donnez**, J., Nisolle-Pochet, M., Cleckx-Braun, F., Sandow, J., Casanas-Roux, F., 1989. Administration of nasal Buserelin as compared with subcutaneous Buserelin implant for endometriosis. *Fertil. Steril.* 52:27-30. **Foote**, R.H., Hafs, H.D., Staples, R.E., Gregoire, A.T., Bratton, R.W., 1963. Ovulation rates and litter sizes in sexually receptive and nonreceptive artificially inseminated rabbits given varying dosages of luteinizing hormone. *J. Repr. Fert.* 5:59-66. **Foxcroft**, G.R., Hamilton, J.W., Nalbandov A., 1975. Ovulation and luteal function in the rabbit in response to injection or infusion of synthetic Gonadotropin-Releasing Hormone (GnRH). *Biol. Repr.* 12:284-288. **Gama**, P., Alvares, E.P., 2001. Localization of luteinizing-hormone releasing hormone binding sites in the gastric mucosa of suckling

rats. *Anat. Rec.* 264:43-50. **García-Ximénez**, F., Vicente, J.S., 1992. Effect of ovarian cystic or haemorrhagic follicles on embryo recovery and survival after transfer in hCG-ovulated rabbits. *Repr. Nutr. Dev.* 32:143-149. **Griffith**, E.C., McDermott, J.R., 1984. Biotransformation of neuropeptides. *Neuroendocrinology* 39:573-581. **Gudmundsson**, J.A., Nillius, S.J., Bergquist, C., 1984. Inhibition of ovulation by intranasal nafarelin, a new superactive agonist of GnRH. *Contraception* 30:107-114. **Guttmacher**, M.A., Guttmacher, F.A., 1921. Induction of ovulation in human ovaries perfused in vitro. *Johns Hopkins Hops. Bull.* 32:394-402. **Hafez**, E.S.E., 1993. Reproducción, hormonas y factores de crecimiento. In: E.S.E. Hafez (ed) *Reproducción e inseminación artificial en animales*, 6th edition.: Interamericana-McGraw-Hill, DF, Mexico. **Hammond**, J., Asdell, S.A., 1927. The vitality of the spermatozoa in the male and female reproductive tracts. *Brit. J. Exp. Biol.* 4:155-174. **Hammond**, J., Marshall, F.H.A., 1925. *Reproduction in the rabbit*. Oliver & Boyd, Edinburgh, UK. **Harper**, J.K., 1961. The time of ovulation in the rabbit following the injection of luteinizing hormone. *J. Endocrin.* 22:147-159. **Heape**, W., 1905. Ovulation and degeneration of ova in the rabbit. *Proc. R. Soc. Lond., Biol. Sci.* 76:260-268. **Hill**, R.T., Parkes, A.S., White, W.E., 1934. The assay of the ovulation-producing substance. *J. Physiol.* 81:335-360. **Holmes**, P.V., Sogn, J., Schillinger, E., Janson, P.O., 1985. Effects of high and low preovulatory concentrations of progesterone on ovulation from the isolated perfused rabbit ovary. *J. Repr. Fert.* 75:393-399. **Hulot**, F., Mariana, J.C., Cattiau G., 1988. HCG-induced ovulation in two rabbit breeds: Effects of dose, season and sexual behaviour. *Livest. Prod. Sci.* 20: 257-267. **Janson**, P.O., LeMaire, W.J., Källfelt, B., Holmes, P.V., Cajander, S., Bjersing, L., Wiquist, N., Ahrén, K., 1982. The study of ovulation in the isolated perfused rabbit ovary. I. Methodology and patterns of steroidogenesis. *Biol. Reprod.* 26:456-465. **Keyes**, P.L., Nalbandov, A.V., 1967. Maintenance and function of corpora lutea in rabbits depend on estrogen. *Endocrinology* 80:938-945. **Lammers**, H.J., Petersen, J. 1987. Einsatz eines luteolytischen Prostaglandins in der kaninchenfelich produktion. *Dtsch. Tierarztl. Wschr.* 94:410-412. **LeMaire**, W.J., Clark, M.E., F.M., Marsh, 1979. Biochemical mechanisms of ovulation. In: E.S.E. Hafez (ed.) *Human ovulation*. Elsevier/North Holland Biochemical Press, Amsterdam, pp. 159-175. **Lindner**, H.R., Amsterdam, A., Salomon, Y., Tsafiriri, A., Nimrod, A., Lamprecht, S.A., Zor, U., Koch, Y., 1977. Intraovarian factors in ovulation: determinants of follicular response to gonadotrophins. *J. Repr. Fert.* 51:215-235. **Mehaisen**, G.M.K., Vicente, J.S.R., Lavara, R., Viudes-de-Castro, M.P., 2005. Effect of eCG dose and ovulation induction treatments on embryo recovery and in vitro development post-vitrification in two selected lines of rabbit does. *Anim. Repr. Sci.* 90:175-184. **Molina**, I., Pla, M., Vicente, J.S., Martfn, A., Romeu, A., 1991. Induction of ovulation in rabbits with pure urinary luteinizing hormone and human chorionic gonadotrophin: comparison of oocyte and embryo quality. *Hum. Repr.* 6:1449-1452. **Ondruška**, L., Parkányi, V., Rafay, J., Chlebec, I., 2008. Effect of LHRH analogue included in seminal dose on kindling rate and prolificacy of rabbits artificially inseminated. In: *Proc. 9th World Rabbit Congress*, Verona, Italy, pp. 423-425. **Okada**, H., Yamazaki, I., Ogawa, Y., Hirai, S., Yashiki, M.T., Mima, H., 1982. Vaginal absorption of a potent luteinizing hormone releasing hormone analogue (leuprolide) in rats. I. Absorption by various routes and absorption enhancement. *J. Pharm. Sci.* 71:1367-1371. **Okada**, H., Yamazaki, I., Yashiki, T., Mima, H., 1983. Vaginal absorption of a potent luteinizing hormone releasing hormone analogue (leuprolide) in rats. II. Mechanism of absorption enhancement with organic acids. *J.*

Pharm. Sci. 72:75-78. **Isachenkov**, V.A., Bakalkin, G.I., Tsibezov, V.V., 1979. Immunoreactive luteinizing hormone in the visceral organs of rats. *Biull. Eksp. Biol. Med.* 87:475-478. **Parkes**, A.S., 1943. Induction of super-ovulation and super-fecundation in rabbits. *J. Endocr.* 3:268-279. **Pincus**, G., 1940. Superovulation in rabbits. *Anat. Rec.* 77:1-14. **Quintela**, L., Pena, A., Barrio, M., Vega, M.D., Diaz, R., Maseda, F., Garcia, P., 2001. Reproductive performance of multiparous rabbit lactating does: effect of lighting programs and PMSG use. *Repr. Nutr. Dev.* 41:247-257. **Quintela**, L.A., Pena, A.I., Vega, M.D., Gullon, J., Prieto, M.C., Barrio, M., Becerra, J.J., Maseda, F., Herradon, P.G., 2004. Ovulation induction in rabbit does submitted to artificial insemination by adding buserelin to the seminal dose. *Repr. Nutr. Dev.* 44:1-10. **Quintela**, L.A., Pena, A.I., Vega, M.D., Gullon, J., Prieto, M.C., Barrio, M., Becerra, J.J., Maseda, F., Herradon, P.G., 2008. Ovulation induction in rabbit does by intravaginal administration of [des-Gly 10, D-Ala6]-LHRH Ethylamide: field trial. In *Proc. 9th World Rabbit Congress*, Verona, Italy, pp. 427-430. **Quintela**, L.A., Pena, A.I., Vega, M.D., Gullon, J., Prieto, M.C., Barrio, M., Becerra, J.J., Maseda, F., Herradon, P.G., 2009. Reproductive performance of rabbit does artificially inseminated via intravaginal administration of [des-Gly 10, D-Ala6]-LHRH Ethylamide as ovulation inductor. *Repr. Dom. Anim.* 44: 829-833. **Rebollar**, P.G., Alvariño, J.M.R., Illera, J.C., Silván, G., 1997. Effect of gonadoreline and naloxone on induction of ovulation and plasma LH in rabbit. *J. Physiol. Biochem.* 53:205-210. **Roberts**, P.R., Burney, J.D., Black, K.W., Zaloga, G.P., 1999. Effects of chain length on adsorption of biologically active peptides from the gastrointestinal tract. *Digestion* 60:332-337. **Rodríguez**, J.M., Ubilla, E., 1988. Effect of sexual receptivity on ovulation response in rabbit does induced with GnRH. In: *Proc. 4th World Rabbit Congress*, Budapest, Hungary, 504-509. **Sawyer**, C.H., Markee, J.E. 1959. Estrogen facilitation of release of pituitary ovulating hormone in the rabbit in response to vaginal stimulation. *Endocrinology* 65:614-625. **Schochet**, P. E., 1916. A suggestion as to the process of ovulation and ovarian cyst formation. *Anat Rec.* 10:477-485. **Shibata**, S., 1931. The oestrous cycle and ovulation in the rabbit. *J. Coll. Agric. Univ. Tokyo* 11:309-320. **Stormshak**, F., Casida, L.E., 1964. Effect of gonadotropins on corpora lutea of pseudopregnant rabbits. *Endocrinology* 75:321-332. **Simmon**, J.A., Danforth D.R., Hutchinson, J.S., Hodgen, G.D., 1988. Characterization of recombinant DNA-derived human luteinizing hormone *in vitro* and *in vivo*: efficacy in ovulation induction and corpus luteum support. *J. Am. Med. Assoc.* 259:3290-3295. **Stetler-Stevenson**, M.A., Yang, D.C., Lipkowski, A., McCartney, L., Peterson, D., Flouret, G., 1981. An approach to the elucidation of metabolic breakdown products of the luteinizing hormone-releasing hormone. *J. Med. Chem.* 24:688-692. **Testart**, J., Thebault, B., Lefvre B., 1983. In-vitro ovulation of rabbit ovarian follicles isolated after the endogenous gonadotrophin surge. *J. Repr. Fert.* 68:413-418. **Theau-Clément**, M., Bolet, G., Roustan, A., Mercier, P., 1990. Comparaison de différents modes d'induction de l'ovulation chez les lapines multipares en relation avec leur stade physiologique et la réceptivité au moment de la mise à la reproduction. In: *Proc. 5^{emes} Journ. Rech. Cunic.*, Paris, France, Vol. I, Communication 6. **Thebault**, B., Lefvre B., Testart, J., 1983. Role of the extra-follicular compartment in the ovulation of isolated rabbit ovarian follicles *J. Repr. Fert.* 68:419-424. **Thielate**, A., Fee, R., Parkes, R., 1929. Studies on ovulation. III. Effect of vaginal anaesthesia on ovulation in the rabbit. *J. Physiol.* 70:612-621. **Vicente**, J.S., Lavara, R., Lavara, F., Marco-Jimenez, F., Viudes-de-Castro, M.P., 2007. Rabbit reproductive performance after insemination

with buserelin acetate extender. *Livest. Sci.* 115:153-157. **Viudes-de-Castro**, M.P.; García-Ximénez, F.; Vicente, J.S., 1995. Embryo recovery from eliminating does of three selected rabbit strains for an embryo bank. *Investigación Agraria: Prod. San. Anim.* 145-152. **Viudes-de-Castro**, M.P., Lavara, R., Marco-Jimenez, F., Cortell, C., Vicente, J.S., 2007. Ovulation induced by mucosa vaginal absorption of buserelin and triptorelin in rabbit. *Theriogenology* 68:1031-1036. **Walton**, A., Hammond, J., 1928. Observations on ovulation in the rabbit. *Br. J. Exp. Biol.* 6:190-198. **Karten**, M.J., Rivier, J.E., 1986. Gonadotropin-releasing Hormone analog design. Structure-function studies towards the development of agonists and antagonists: Rationale and perspective. *Endocrinol. Rev.* 7:44-56. **Zanagnolo**, V., Dharmarajan, A.M., Hesla, J., Wallach, E.E., 1996. Effects of a gonadotropin-releasing hormone analog on rabbit ovarian function. *Endocrinology* 137:5400-5406. **Zapletal**, D., Pavlik, A., 2008. The effect of lecorelin (GnRH) dosage on the reproductive performance of nulliparous and lactating rabbit does. *Anim. Repr. Sci.* 104: 306–315.