



UNIVERSITAT
POLITÈCNICA
DE VALÈNCIA

MÁSTER OFICIAL EN PRODUCCIÓN
ANIMAL

“Efecto de los niveles de lisina, aminoácidos azufrados y treonina sobre la digestibilidad fecal e ileal del pienso de conejos seleccionados por velocidad de crecimiento. Revisión de sus necesidades en aminoácidos”

"Effect of lysine, sulphur amino acids and threonine levels in the diet on faecal and ileal digestibility of feed in rabbits selected by growth rate. Review of their amino acids requirements"

Trabajo Fin de Máster

Juan Carlos Arias Quispe

Directores

Pablo Jesús Marín García

Juan José Pascual Amorós

Valencia, septiembre 2018

Índice de contenidos

RESUMEN.....	1
ABSTRACT.....	2
1. INTRODUCCIÓN.....	3
1.1 Selección por velocidad de crecimiento.....	3
1.2 Necesidades nutricionales.....	3
1.3 Necesidades de proteínas y aminoácidos.....	4
1.4 Digestión de proteínas y aminoácidos.....	5
1.4.1 Digestibilidad ileal.....	6
1.4.2 Digestibilidad fecal.....	6
1.5 Trabajos previos en esta línea de investigación.....	6
2. OBJETIVOS.....	8
3. MATERIAL Y MÉTODOS.....	8
3.1 Diseño experimental.....	8
3.2 Piensos.....	9
3.3 Animales.....	10
3.4 Análisis químico.....	10
3.4.1 Cálculo digestibilidad fecal e ileal.....	11
3.5 Análisis estadístico.....	11
4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	12
5. CONCLUSIÓN.....	14
6. AGRADECIMIENTOS.....	14
7. BIBLIOGRAFÍA.....	15

Índice de figuras

Figura 1: Esquema de cruce a tres vías.....	3
Figura 2: Proteína corporal (PC) retenida en función de la ganancia de peso del cuerpo vacío (Δ PCV).....	7
Figura 3: Lisina (4a) y aminoácidos azufrados (4b) retenidos en función de la ganancia de peso del cuerpo vacío (Δ PCV).....	7

Índice de tablas

Tabla 1: Necesidades de energía, proteína y aminoácidos para la crianza intensiva de conejos de engorde.	4
Tabla 2: Parámetros productivos provisionales con piensos experimentales, difiriendo en el contenido en los tres primeros aminoácidos limitantes, obtenidos en una prueba previa (28-63 días de vida).	8
Tabla 3: Ingredientes y composición química de la mezcla basal.	9
Tabla 4: Adición de aminoácidos (g/kg MS) totales a cada una de las dietas experimentales.	10
Tabla 5: Niveles finales (g/kg de MS) totales de los tres primeros aminoácidos limitantes y proteína bruta (PB).	10
Tabla 6: Efecto de los piensos experimentales sobre los coeficientes de digestibilidad aparente a nivel fecal (d) y datos productivos durante la prueba de digestibilidad.	12
Tabla 7: Efecto de los piensos experimentales sobre los coeficientes de digestibilidad aparente a nivel ileal de la materia seca, proteína bruta y aminoácidos (%).	13
Tabla 8: Contenido en aminoácidos digestibles a nivel ileal aparente para los tres primeros aminoácidos limitantes en los piensos experimentales (g/kg MS).	13
Tabla 9: Recomendaciones nutricionales para los tres primeros aminoácidos limitantes en el conejo de engorde (g/Kg materia seca). Escalando, asumiendo que todos los aminoácidos añadido se digiere.	14

RESUMEN

Desde la irrupción de la enteropatía mucoide, las recomendaciones actuales de proteína bruta (PB) son menores para reducir la incidencia de trastornos digestivos. En este contexto, los animales seleccionados por velocidad de crecimiento (VC) pueden no estar expresando todo su potencial genético, posiblemente debido a la presencia de algún aminoácido (AA) limitante. Los tres principales AA limitantes de los conejos de engorde son la lisina (Lys), los AA azufrados (sAA) y la treonina (Thr). Fruto de trabajos previos (de esta misma línea de investigación) se proponen tres combinaciones diferentes de estos AA; el pienso MMM (formulado según las actuales recomendaciones; con unos valores de 8.1, 5.7 y 6.8 g/kg de materia seca (MS) de Lys, sAA y Thr, respectivamente); el pienso AAA (añadiendo un 15% más de cada uno de ellos; 9.4, 6.6 y 7.8 g/kg MS, respectivamente) y el pienso MAB (aquel que minimizó los valores de nitrógeno ureico plasmático y que previsiblemente mostraba un mejor aprovechamiento proteico; 8.1, 6.6 y 5.7 g/kg MS, respectivamente). El objetivo del presente trabajo fue evaluar la digestibilidad fecal e ileal de estos tres piensos para mejorar el ajuste de las necesidades del conejo. Para ello se utilizaron 85 conejos de engorde (40 y 45 animales para la digestibilidad fecal e ileal, respectivamente) procedentes de la línea R (seleccionada por VC). En cuanto a la digestibilidad fecal, el pienso AAA presentó mayor digestibilidad de la MS ($P < 0.05$) que las otras dos dietas. Sin embargo, el pienso AAA obtuvo una digestibilidad de la PB similar ($P > 0.05$) al pienso MMM, pero ambas fueron mayores a la del pienso MAB ($P < 0.05$). Estas diferencias pudieron deberse a la adición de AA sintéticos ampliamente digestibles. En cuanto a la digestibilidad ileal, el resultado fue similar, aquellos piensos que partían con más niveles de AA totales, mostraron mayores niveles de digestibilidad a nivel ileal. Este trabajo nos ha permitido determinar las recomendaciones actuales para la Lys, sAA y Thr a nivel ileal aparente (5.2, 3.6 y 4.3 g/kg MS, respectivamente) por primera vez, así como unas nuevas recomendaciones, basados en mejores rendimientos productivos, a nivel ileal aparente (5.2, 4.7 y 3.0 g/kg MS, respectivamente).

Palabras clave: conejo, lisina, aminoácidos azufrados, treonina, digestibilidad fecal e ileal.

ABSTRACT

Since the onset of mucoid enteropathy, current recommendation for crude protein (CP) has been decreased to reduce the incidence of digestive disorders. In this context, animals selected for growth rate (GR) may not be expressing their full genetic potential, possibly due to the presence of some limiting amino acid (AA). The three main limiting AAs of fattening rabbits are lysine (Lys), sulfurized AA (sAA) and threonine (Thr). In previous works (from this same line of research) three different combinations of these AA were proposed; MMM diet (formulated according to the current recommendations, with 8.1, 5.7 and 6.8 g/kg dry matter (DM) of Lys, sAA and Thr, respectively); AAA diet (adding 15% more of each of them, 9.4, 6.6 and 7.8 g/kg DM, respectively) and the MAB diet (the one that minimized plasma urea nitrogen values and predictably showed better protein utilization; 8.1, 6.6 and 5.7 g/kg MDM, respectively). The aim of the present work was to evaluate the faecal and ileal digestibility of these three feeds to improve the adjustment of the rabbit's needs. To this end, 85 fattening rabbits were used (40 and 45 animals for faecal and ileal digestibility, respectively) from line R (selected by GR). Regarding faecal digestibility, AAA diet presented greater DM digestibility ($P < 0.05$) than the other two diets. However, AAA and MM diet had similar digestibility of the CP ($P > 0.05$), but both were higher than that of the MAB diet ($P < 0.05$). These differences could be due to the different level on synthetic AAs. Regarding ileal digestibility, the results were quiet similar, those diets that started with more total AA levels showed higher levels of ileal digestibility. This work has allowed us to determine the current recommendations for Lys, sAA and Thr at apparent ileal level for the first time (5.2, 3.6 and 4.3 g/kg DM, respectively), as well as new recommendations, based on better performance traits, at apparent ileal level (5.2, 4.7 and 3.0 g/kg DM, respectively).

Key words: rabbit, lysine, sulfur amino acids, threonine, fecal and ileal digestibility.

1. INTRODUCCIÓN

Europa es la segunda región productora de carne de conejo a nivel mundial; España, Italia y Francia forman el grupo líder de países productores a nivel continental (FAOSTAT, 2016). En las últimas décadas, se ha producido importantes avances en la mejora genética, la reproducción y la alimentación que han permitido el desarrollo de una cunicultura racional en Europa. Dichos avances, nos permite disponer de animales de una elevada productividad, pero también puede haber afectado a sus necesidades nutricionales, que deben ser revisadas con frecuencia para asegurar un adecuado equilibrio entre el potencial genético y productivos y los recursos aportados para su provecho.

1.1 Selección por velocidad de crecimiento

El desarrollo de las líneas maternas y paternas es un punto crucial en los programas de mejora (Baselga, 2004). La línea R, generada en la Universitat Politècnica de València, se utiliza repetidamente como macho terminal en el cruce a tres vías (ver Figura 1). Así, esta línea ha sido seleccionada por velocidad de crecimiento (VC) entre los 28 y 63 días, con el objetivo de mejorar indirectamente el índice de conversión (IC), por estar ambos caracteres correlacionados negativamente (Baselga, 2004; Piles *et al.*, 2004).

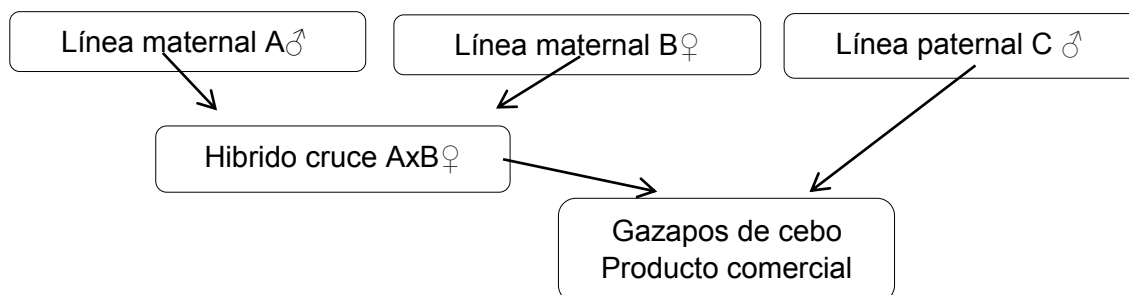


Figura 1: Esquema de cruce a tres vías (adaptación de Blasco *et al.*, 1984).

El desarrollo de la línea R ha mejorado los parámetros productivos y para poder asegurar el progreso genético, es necesario que los piensos actuales aporte suficiente cantidad y calidad proteica y aminoacídica. Existe riesgo de que los actuales piensos puedan no estar cubriendo las demandas de aminoácidos (AA) y proteínas, lo que estaría dificultando la expresión total del potencial genético.

1.2 Necesidades nutricionales

En las explotaciones cunícolas intensivas, el coste de la alimentación tiene un gran peso económico, alrededor de 62% (Cartuche *et al.*, 2014). Para reducir estos costes, entre otras acciones, se ha tratado de mejorar la VC con el objetivo de mejorar el IC (Baselga, 2004 y Mínguez, 2012).

En general, los conejos de engorde son alimentados *ad libitum* con pienso granulado. Actualmente, se recomienda utilizar tres tipos de piensos en el engorde, para los períodos de post destete, crecimiento y acabado (Xiccato y Trocino, 2008).

El aporte de proteína debe estar perfectamente ajustado a las necesidades de los animales en cada una de las fases de crecimiento, ya que, un déficit o exceso de

proteína conlleva a problemas metabólicos, y esta proteína debe cubrir las siguientes necesidades:

- Reposición de las pérdidas consecuentes del intercambio de proteína tisular.
- Elaboración de enzimas, reposición de células epiteliales del intestino y síntesis de secreciones intestinales.
- Crecimiento del tejido magro en forma de proteína retenida.

Desde el punto de vista de la salud, es fundamental mantener una adecuada salud digestiva para un adecuado desarrollo durante el engorde, y existen varios factores nutricionales que pueden contribuir. Así, el incremento de distintas fracciones fibrosas reduce los problemas gastrointestinales (Trocino *et al.*, 2013). De hecho, como consecuencia de la irrupción de la enteropatía mucoide, las recomendaciones actuales de proteína bruta (PB) han sido reducidas, ya que existe una clara correlación entre el flujo de nitrógeno ileal y la incidencia de trastornos digestivos (Carabaño *et al.*, 2009). En la Tabla 1, se muestra un resumen de las necesidades nutricionales para conejos de cebo, es importante ajustar al máximo las recomendaciones a las necesidades verdaderas de cada fase de crecimiento para evitar así el exceso de proteínas y AA en las dietas.

Tabla 1: Necesidades de energía, proteína y aminoácidos para la crianza intensiva de conejos de engorde (de Blas y González-Mateos, 2010).

Nutriente	Unidad	Conejos de engorde	Piensos mixtos
Energía digestible	MJ	10.2	10.2
Proteína cruda ¹	%	15 (14.2-16.0)	15.9 (15.4-17.0)
Proteína digestible ²	%	10.4 (10.0-11.0)	11.1 (10.8-11.3)
Lisina ³			
Total	g/kg	7.3	7.8
Digestible	g/kg	5.7	6.1
Aminoácidos azufrados ⁴			
Total	g/kg	5.2	5.9
Digestible	g/kg	4.0	4.5
Treonina			
Total	g/kg	6.2	6.5
Digestible	g/kg	4.3	4.5

¹ Valores en paréntesis indican el rango de valores mínimos y máximos recomendados.

² Digestibilidad de la proteína cruda y los aminoácidos esenciales expresados como la digestibilidad fecal aparente.

³ Requerimiento total de aminoácidos ha sido calculado para la contribución de aminoácidos sintéticos de 0,15.

⁴ Metionina debe proveer un mínimo de 35% de los requerimientos totales de aminoácidos sulfurados.

1.3 Necesidades de proteínas y aminoácidos

Las proteínas son macromoléculas formadas por AA que están unidos por enlaces peptídicos, dependiendo las propiedades de cada AA del tamaño y la carga eléctrica de su cadena. Las necesidades de proteínas y AA de los animales están en función de su crecimiento. Asimismo, es importante considerar el valor nutricional de la proteína aportada, que está determinado no solo por la composición de AA, sino además por la digestibilidad de proteínas, que es el porcentaje de proteína digerida en el intestino y absorbida como AA libres. Los principales factores que influyen en la digestibilidad de las proteínas en los conejos son sus características químicas y estructurales y el acceso a la actividad enzimática.

Existen dos tipos de AA, los no esenciales (animales que pueden producirlo a partir de otros) y los esenciales (que no pueden producirlo por sí mismo). Solo los AA esenciales son susceptibles de volverse limitantes cuando la dieta no proporciona suficiente cantidad. En el caso de los conejos en crecimiento, se dispone información de las

necesidades de los que se suponen son los tres primeros AA limitantes (de Blas y González-Mateos, 2010), son la lisina (Lys), los AA azufrados (sAA; metionina + cisteína) y la treonina (Thr); ver la Tabla 1. Estos AA pueden obtenerse a partir de algunas de fuentes vegetales del pienso (semillas y hojas), y pueden ser ajustados mediante la incorporación de AA sintéticos, disponibles a nivel comercial.

Para garantizar un suministro correcto de proteínas, se debe garantizar una relación correcta de proteína digestible y energía digestible de la dieta. En los conejos en crecimiento, la proporción debe mantenerse entre 10.5 y 11 g/MJ, para garantizar una ingesta diaria de 12-13 g de proteína digestible (Xiccato y Trocino, 2008, 2010).

La ingesta de AA en conejos se deriva del pienso y de la re-ingestión de heces blandas (cecotrofia). La cecotrofia cubre entre 10 a 29% de los requerimientos de proteína (Villamide *et al.*, 2010), que varía del tipo de dieta y el origen de PB, los piensos comerciales pueden aportar en promedio el 18%, pero los animales necesitan un suministro correcto de AA para garantizar sus funciones vitales, así como la activación de mecanismos de defensa de la barrera intestinal puede implicar necesidades específicas. La Thr es un componente importante de las proteínas de las mucinas, mientras que el ácido glutámico es el principal AA utilizado por los enterocitos como fuente de energía, jugando un papel esencial en los mecanismos de reparación del tejido de la mucosa (de Blas *et al.*, 2007).

1.4 Digestión de proteínas y aminoácidos

La digestión de proteínas consiste en su degradación, a través de un proceso de hidrólisis a péptidos, dipéptidos y tripéptidos, y finalmente a AA libres para poder ser absorbidos en el intestino delgado. A nivel de la boca, las proteínas no sufren transformación importante, es en el estómago donde comienza la digestión de las proteínas, continuando en el intestino delgado. Por medio de las enzimas proteolíticas (pepsina, tripsina, quimotripsina) que ayudan a descomponer las proteínas en sus componentes AA, esta descomposición proteica facilita al intestino delgado la absorción y asimilación de los AA libres.

Después de la absorción activa de la mucosa intestinal se revierten en la sangre y a través de la vena porta hepática llegan al hígado donde tienen lugar los procesos metabólicos y de allí al resto del organismo.

La degradación de AA puede ocurrir por tres circunstancias:

- Durante la síntesis de proteínas, si algunos AA no se utilizan debido a alguna deficiencia en AA limitantes.
- Cuando la dieta es demasiado rica en proteínas, y el exceso de AA no se puede almacenar.
- Durante el ayuno, cuando los carbohidratos y los lípidos no están disponibles.

La degradación de los AA es un proceso energético importante del metabolismo animal. El proceso lleva a la separación del grupo amino del resto del esqueleto carbonado del AA y la producción de amoníaco. Los esqueletos carbonados se transforman en intermedios metabólicos para obtener glucosa, cuerpos cetónicos o intermedios del ciclo del ácido cítrico, que son utilizados como fuentes de energía.

Así, los AA excedentes pueden sufrir en el hígado una transaminación, dando lugar a otro aminoácido, o una desaminación, que da lugar a urea, que es vertida al torrente sanguíneo aumentando el nitrógeno ureico plasmático (PUN), para ser finalmente excretada en la orina.

1.4.1 Digestibilidad ileal

El íleon es el último segmento del tracto digestivo donde los AA pueden ser absorbidos. Sin embargo, una parte no despreciable del flujo ileal de proteína y AA es de origen endógeno. Aun así, la digestibilidad ileal es considerada como la mejor herramienta para valorar, con mayor rigor, la disponibilidad de AA para la síntesis proteica en conejos (Carabaño *et al.*, 2000).

Respecto a la digestibilidad ileal se puede realizar por dos métodos. El primero de ellos es con animales canulados, y el segundo caso es mediante toma de muestras post-mortem. Esta última, no precisa medir la cantidad de pienso consumido ni la cantidad de excrementos producidos, basta con recolectar una muestra representativa. Para ello se utiliza un marcador (yterbio u óxido de cromo), cuya concentración es conocida en el alimento. Puesto que el marcador es indigerible por el tracto digestivo del animal, la cantidad de marcador ingerido será igual a la cantidad excretada.

1.4.2 Digestibilidad fecal

Los AA dietarios pueden sufrir grandes cambios al llegar al ciego por la acción de la microbiota, que degrada o sintetiza nuevos AA, o bien fermenta los AA a nitrógeno amoniacal, los cuales son eliminados en la orina como urea y altera los valores obtenidos en las heces. El grado de fermentación en el ciego no es constante para los diferentes ingredientes ni para los AA.

La digesta ileal y fecal contiene grandes cantidades de proteína de origen endógeno procedente de secreciones digestivas, células epiteliales y mucinas o microorganismos. Algunos trabajos (García *et al.*, 2004; Llorente *et al.*, 2006) dan valores de 3.7 y 2.3 g de nitrógeno endógeno por cada 100 g materia seca (MS) ingerida a nivel ileal y fecal, respectivamente. Esta proteína endógena varía del tipo de dieta y el origen de PB, y representa aproximadamente el 64% del flujo total de nitrógeno tanto a nivel ileal como fecal.

En la digestibilidad aparente no se conoce la proporción de la proteína que proviene de la dieta o de la secreción de nitrógeno endógeno o de microorganismos. Conociendo el valor del nitrógeno de origen endógeno, puede aplicarse una corrección en el dato obtenido de digestibilidad aparente, obteniendo una nueva unidad de medida del nitrógeno que recibirá el nombre de digestibilidad verdadera. La digestibilidad verdadera ofrece un valor más exacto de la digestión, este método contempla la proteína de origen endógeno en sus cálculos y no son afectados el contenido de proteína y AA de la dieta.

1.5 Trabajos previos en esta línea de investigación

En general, debería existir una relación lineal entre la retención proteica y la VC. Sin embargo, en los trabajos previos de Marín-García *et al.* (2016a y 2016b) se demostró que, los animales con altas VC (+55 g de peso vivo/día) presentaron una retención proteica y de AA en el cuerpo vacío menor de la que se esperaría en función de su crecimiento (ver Figura 2 y 3), por lo que estos conejos podrían no estar expresando todo su potencial genético. Este efecto estaría relacionado con un déficit de algún AA limitante y la calidad proteica. El uso de las recomendaciones actuales (de Blas y González-Mateos, 2010) podría no estar cubriendo las necesidades de los animales con elevadas VC.

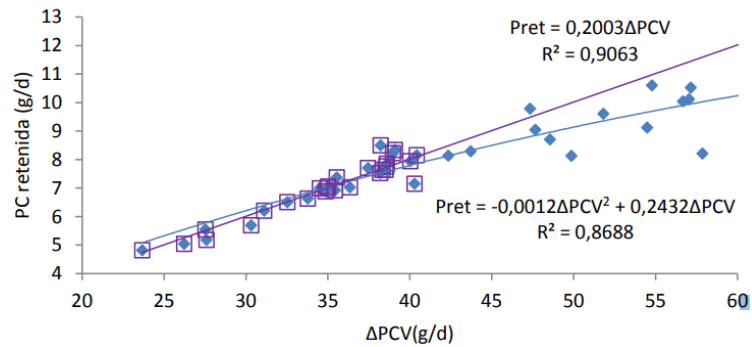


Figura 2: Proteína corporal (PC) retenida en función de la ganancia de peso del cuerpo vacío (Δ PCV) (Marín García *et al.*, 2016b).

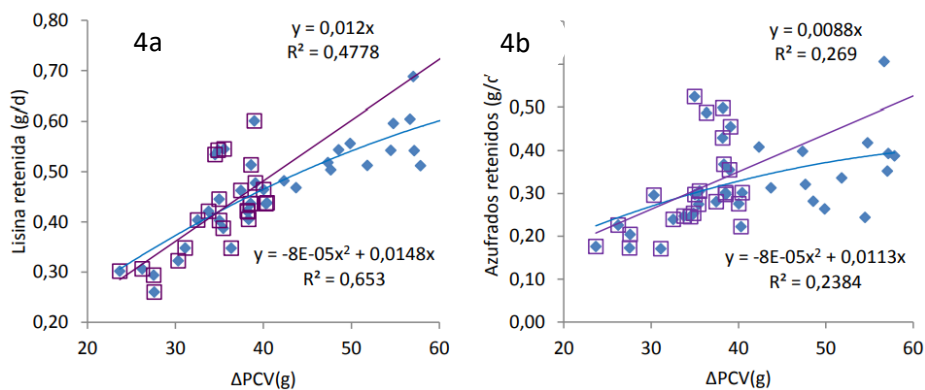


Figura 3: Lisina (4a) y aminoácidos azufrados (4b) retenidos en función de la ganancia de peso del cuerpo vacío (Δ PCV) (Marín García *et al.*, 2016b).

A partir de estas observaciones, surge la necesidad de encontrar una herramienta que permita detectar desequilibrios de AA. Por primera vez, Marín-García *et al.* (2016c) utilizaron la aplicación de la metodología del PUN como un indicador del desequilibrio de AA en los piensos de conejos. Se observó un incremento del PUN asociado al déficit de algún AA limitante, aunque también podía deberse a un exceso de proteína en la dieta. Este mismo estudio se propuso la metodología más adecuada para detectar dichas diferencias; a las 08:00 horas (h) bajo alimentación *ad libitum* o a las 21:00 h, 3h después de haber reestablecido el pienso, tras un ayuno de 10 h.

Posteriormente se realizó una matriz de 27 piensos diferentes, mediante la combinación de 3 niveles (actual y 15% más o menos del actual) de los 3 primeros AA limitantes en conejos arriba citados (Marín-García *et al.*, 2017), con el objeto de averiguar que combinación de dichos AA limitantes minimizaban el PUN en sangre. De este experimento se seleccionaron tres combinaciones para la realización de una prueba de cebo (Marín-García *et al.*, 2018a y 2018b): pienso MMM según las recomendaciones actuales (de Blas y González-Mateos, 2010); MAB el cual minimizó los niveles de PUN en el trabajo previo (8.1, 6.6 y 5.7 g/kg MS de Lys, sAA y Thr, respectivamente); y finalmente, AAA con niveles altos (+15%) de todos los AA (9.4, 6.6 y 7.8 g/kg MS de Lys, sAA y Thr, respectivamente), presuponiendo mayores necesidades en los animales

seleccionados por VC (>55 g/día). Los datos productivos con los tres piensos de dicho estudio están recogidos en la Tabla 2.

Tabla 2: Parámetros productivos provisionales con piensos experimentales, difiriendo en el contenido en los tres primeros aminoácidos limitantes, obtenidos en una prueba previa (28-63 días de vida). Comunicación personal por Marín-García et al.

	MMM	MAB	AAA	P-valor
Nº animales	49	47	46	
Ganancia media diaria (g/d)	55.56± 1.07 ^a	57.76± 0.91 ^b	54.96± 1.18 ^a	0.0245
Ingestión (g/d)	155± 3.2	155± 3.1	152± 3.5	0.8578
Índice de conversión	2.81± 0.05 ^b	2.69± 0.04 ^a	2.77± 0.05 ^{ab}	0.0245

^{a,b} ; Medias en una misma fila que no comparte superíndice difieren estadísticamente a nivel P<0.05.

MMM = 8.1; 5.7 y 6.8 g/Kg materia seca (MS) de lisina, aminoácidos azufrados y treonina, respectivamente.

MAB = 8.1; 6.6 y 5.7 g/Kg MS de lisina, aminoácidos azufrados y treonina, respectivamente

AAA = 9.4; 6.6 y 7.8 g/Kg MS de lisina, aminoácidos azufrados y treonina, respectivamente.

2. OBJETIVOS

Evaluar como los niveles de inclusión de los tres primeros aminoácidos limitantes en dietas de conejos (piensos MMM, MAB y AAA, ver arriba) afectan tanto a la digestibilidad fecal como ileal en conejos seleccionados por velocidad de crecimiento. Realizar una revisión de las necesidades de aminoácidos, que permitirán mejorar el ajuste de dichas necesidades a partir de los resultados de este estudio.

3. MATERIAL Y MÉTODOS

3.1 Diseño experimental

Los conejos utilizados en el presente estudio son de la línea R alojados en la granja de la Universitat Politècnica de València. Fueron necesarios 85 gazapos recién destetados (28 días), el mismo día de destete se realizó el primer control del peso y finalmente distribuidos en sus respectivas jaulas metabólicas, asignándose de manera aleatoria a los tres piensos experimentales (MMM, MAB y AAA).

Para la digestibilidad fecal tenemos 40 conejos (13, 15 y 12 conejos para el pienso MMM, MAB y AAA respectivamente), tras el destete hasta el día 42 de vida fueron alimentados con un pienso comercial. Tras esa semana, se instalaron bajo las jaulas los conos metálicos para recuperar las heces, se incluyó una rejilla metálica en el interior del cono, entre el conejo y cubo de recogida, para separar el residuo líquido del sólido. El día 43 se introdujeron los piensos experimentales hasta el día 53. Durante los 4 días de alimentación; se controló la ingestión del pienso y se recolectó las heces diariamente, siguiendo las recomendaciones de Pérez *et al.*, (1995) y fueron congeladas a -20°C en la propia granja.

Para la digestibilidad ileal, utilizamos 45 conejos (16, 14 y 15 conejos para los piensos MMM, MAB y AAA respectivamente) durante el periodo de cebo (28 a 63 días), que fueron alimentados *ad libitum* con piensos experimentales. El día 58 de vida se introdujo el pienso marcado con yterbio, a través de la inclusión en el pienso de alfalfa marcada con yterbio (5 %), siguiendo los procedimientos de García *et al.* (1999). El día 63 de vida, los animales fueron sacrificados y se recogió el contenido ileal distal, que se mantuvo a -20°C hasta su análisis.

Finalmente, obtenidas las muestras necesarias (pienso y heces), éstas fueron desecadas y molidas para su posterior análisis. En el caso de las heces, se les redujo la humedad en una estufa durante 24h a 100°C, una vez secas se trituraron en un molino

eléctrico y fueron almacenadas en botes de plástico correctamente identificadas. El contenido ileal, al estar adherido a la base de la placa Petri y para evitar pérdidas, fue liofilizado y molido, debido a la poca cantidad obtenida, de forma manual con una espátula metálica.

3.2 Piensos

Se formularon tres piensos experimentales a partir de una misma mezcla basal (ver Tabla 3). A partir de esta mezcla basal se añadieron los AA sintéticos necesarios (Tabla 4) hasta alcanzar los valores recogidos en la Tabla 5.

Tal y como puede observarse en la Tabla 3, se partió de una misma mezcla basal pobre en PB (157 g/Kg MS), alcanzándose valores más ricos (177 g/Kg MS de media de PB) una vez añadidos los AA sintéticos. A partir de dicha mezcla basal, se añadieron AA para obtener el pienso MMM, según las recomendaciones actuales (de Blas y González-Mateos, 2010); el pienso MAB el cual minimizó los niveles de PUN en un trabajo previo (8.1, 6.6 y 5.7 g/kg MS de Lys, sAA y Thr, respectivamente); y finalmente, el pienso AAA con niveles altos (+15%) de todos los AA (9.4, 6.6 y 7.8 g/kg MS de Lys, sAA y Thr, respectivamente). La nomenclatura de los piensos corresponde al nivel de inclusión de los 3 primeros AA, por orden Lys, sAA y Thr. El nivel "M" corresponde al nivel de las recomendaciones actuales, el nivel "B" a un 15% por debajo de dichas recomendaciones, y el nivel "A" a un 15% por encima de éstas. Se añadió tanto arginina como histidina sintética, con el fin de asegurar que estos AA, que posiblemente sean los siguientes limitantes en conejos, no estuviesen limitando el crecimiento.

Tabla 3: Ingredientes y composición química de la mezcla basal.

Ingredientes (g/kg)	Basal	Composición química (g/kg materia seca)	Basal
Salvado de trigo	300	Materia seca (g/kg)	896
Paja de cereal	175	Cenizas	73,2
Torta de girasol integral	167	Proteína bruta	157
Heno de alfalfa	148	Grasa bruta	26,7
Pulpa de remolacha	120	Fibra neutro detergente	473
Cebada	42	Fibra ácido detergente	275
Melaza de remolacha	29	Lignina ácido detergente	58,1
Aceite de palma	4,5	Composición de aminoácidos	
Sal	4,8	Aspártico	12,17
Carbonato cálcico	2,6	Serina	6,40
L-Lisina sulfato (Biolys 70)	2,4	Glucina	27,22
Fosfato monocálcico	0,2	Glicina	7,43
Corrector vitaminas-oligoelementos	5,2	Histidina	2,91
		Arginina	7,98
		Treonina	4,93
		Alanina	6,22
		Prolina	7,57
		Tirosina	2,86
		Valina	7,34
		Lisina	6,85
		Isoleucina	6,31
		Leucina	9,43
		Fenilamina	6,01
		Cisteína	2,37
		Metionina	2,6
		Azufrados	4,97

Tabla 4: Adición de aminoácidos (g/kg MS) totales a cada una de las dietas experimentales.

	Arginina	Histidina	Lisina	Azufrados (Cis+Met)	Treonina	Total
MMM	+1.94	+1.16	+1.25	+0.73 (0+0.73)	+1.87	+6.85
MAB	+1.94	+1.16	+1.25	+1.63 (0+1.63)	+0.77	+6.65
AAA	+1.94	+1.16	+2.55	+1.63 (0+1.63)	+2.87	+10.15

MS = materia seca; Cis = Cisteína; Met = Metionina..

MMM = 8.1; 5.7 y 6.8 g/Kg MS de lisina, aminoácidos azufrados y treonina, respectivamente.

MAB = 8.1; 6.6 y 5.7 g/Kg MS de lisina, aminoácidos azufrados y treonina, respectivamente

AAA = 9.4; 6.6 y 7.8 g/Kg MS de lisina, aminoácidos azufrados y reonina, respectivamente.

Tabla 5: Niveles finales (g/kg de MS) totales de los tres primeros aminoácidos limitantes y proteína bruta (PB).

Pienso	Lisina	AA azufrados (Cis+ Met)	Treonina	PB	PB (g/kg)
MMM	8.1	5.7 (2.37 + 3.33)	6.8	179	161
MAB	8.1	6.6 (2.37 + 4.23)	5.7	173	156
AAA	9.4	6.6 (2.37 + 4.23)	7.8	180	162

MS = materia seca; Cis = Cisteína; Met = Metionina.

MMM = 8.1; 5.7 y 6.8 g/Kg MS de lisina, aminoácidos azufrados y treonina, respectivamente.

MAB = 8.1; 6.6 y 5.7 g/Kg MS de lisina, aminoácidos azufrados y treonina, respectivamente

AAA = 9.4; 6.6 y 7.8 g/Kg MS de lisina, aminoácidos azufrados y treonina, respectivamente.

3.3 Animales

Se utilizaron un total de 85 conejos de la línea R seleccionada por VC entre los 28 y 63 días, pertenecientes a la Universitat Politècnica de València, 40 para digestibilidad fecal y 45 para digestibilidad ileal.

3.4 Análisis químico

El pienso y las heces se analizaron de acuerdo los procedimientos de la Association of Official Analytical Chemist (AOAC, 2000), siguiendo los métodos: 934.01 para MS y 976.06 para PB. La energía bruta se determinó mediante combustión utilizando una bomba calorimétrica adiabática.

El contenido aminoacídico fue determinado después de una hidrólisis ácida con HCL 6N a 110°C durante 23h, como describe Bosch *et al.*, 2006. Se usó un HPLC, que consiste en dos bombas, un inyector, un detector fluorescente y un módulo de control de temperatura. Tras la hidrólisis se añadió ácido aminobutírico. Los AA fueron derivatizados con AQC (6-aminoquinol-N-hidroxisuccinimidil carbamato) y separados con una columna de fase inversa C-18 Watter Tag (150 mm x 3.9 mm). La Met y la Cis fueron determinados de forma separada como metionina sulfona y ácido cisteico respectivamente, después de una oxidación con ácido per fórmico seguido de una hidrolisis ácida.

Para realizar este último análisis de digestibilidad de proteína y AA del contenido ileal fue necesario determinar la concentración de marcador, se realiza la preparación previa de las muestras, para ello se pesó 0.3 g de muestra en un matraz Erlenmeyer de 20 mL y se calcinó el contenido en una mufla durante 6 horas a 550°C. Tras enfriarse las muestras a temperatura ambiente, se les añadió 15 mL de una solución ácida (HNO3 1.5N + KCl 0.38%) a las cenizas obtenidas, se taparon los matraces con unas canicas, evitando que haya evaporación y se calentaron en una placa calefactora 15 minutos hasta alcanzar la ebullición. Una vez frías se transfirió el contenido a un matraz aforado

de 20 mL y se enrasó hasta dicho volumen, se agitó y se filtró con papel Whatman nº4 recogiendo el filtrado en unos botes de vidrio con tapón de rosca de plástico duro. Una vez obtenidas las muestras, se transportaron a la Universidad Politécnica de Madrid, donde se procedió a su análisis en un equipo de espectrofotometría de absorción atómica, según el método descrito por García *et al.*, (1999). Cada encendido de la máquina requiere un pase con un patrón formado por una recta de calibrado ajustada a las concentraciones de las muestras. Con las rectas de calibrado pueden traducirse las absorbancias dadas por el equipo a unidades de concentración de la muestra (ppm).

La ecuación utilizada para determinar la concentración:

$$\left(Y_b \left(\frac{\mu\text{g}}{\text{g}}\right) * \text{volumen aforado (g)}\right) / P_{ms} = \mu\text{g} \frac{Y_b}{\text{g}} \text{ de muestra seca}$$

3.4.1 Cálculo digestibilidad fecal e ileal

Para el cálculo del coeficiente de digestibilidad fecal e ileal se utilizaron las siguientes ecuaciones:

$$D_{\text{fecal}} (\%) = \frac{\% \text{ ingerido} - \% \text{ heces}}{\% \text{ ingerido}} \times 100$$

$$D_{\text{ileal}} = 1 - \frac{\% \text{ marcador alimento}}{\% \text{ marcador heces}} \times \frac{\% \text{ nutrientes heces}}{\% \text{ nutrientes alimento}} \times 100$$

4.5 Análisis estadístico

Se realizaron dos análisis independientes (digestibilidad fecal e ileal). Los datos se analizaron utilizando el procedimiento GLM de SAS (SAS, 2009) de acuerdo con el siguiente modelo:

Digestibilidad fecal:

$$Y_{ij} = m + \alpha * D_i + e_{ij}$$

Donde m es el promedio global, Di = efecto de dieta (3 niveles) y e_{ij} el error.

Digestibilidad ileal:

$$Y_{ijkl} = m + \alpha * D_i + \beta * B_j + \gamma * M_k + e_{ijkl}$$

Donde m es el promedio global, Di = efecto de dieta (3 niveles), Bj = efecto de lote (2 niveles), Mk = efecto de madre (14 niveles) y e_{ijkl} el error.

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Los resultados relativos a la digestibilidad aparente a nivel fecal están recogidos en la Tabla 6. En primer lugar, mencionar que los datos productivos (consumo, ganancia media diaria e IC) obtenidos durante la prueba de digestibilidad son normales para la línea R para dicha edad, y concordantes con una prueba de cebo que ha utilizado estas mismas dietas experimentales (comunicación personal Marín-García *et al.*), lo que da validez a la prueba de digestibilidad. Aunque este experimento no ha sido dimensionado para observar diferencias significativas en los parámetros productivos entre piensos, podemos observar una mayor ganancia media diaria y consumo del pienso MAB ($P > 0.05$), que podría estar relacionado con un mejor ajuste de los AA a sus necesidades. En cuanto a los coeficientes de digestibilidad aparente a nivel fecal, se observa una mayor digestibilidad tanto para la MS como para la PB con el pienso AAA ($P < 0.05$). Dichas diferencias podrían ser debidas a la mayor digestibilidad de los AA sintéticos, altamente digestibles, y que se encuentran incluidos en una mayor proporción en el pienso AAA (Ver Tabla 4). Esta mayor digestibilidad, tanto de PB como de MS tras la adición de AA sintéticos, ya ha sido observada por otros autores (Taboada *et al.*, 1994 y 1996; de Blas *et al.*, 1998).

Tabla 6: Efecto de los piensos experimentales sobre los coeficientes de digestibilidad aparente a nivel fecal (d) y datos productivos durante la prueba de digestibilidad.

	MMM	MAB	AAA	P-valor
Digestibilidad:				
Materia Seca (%)	55.80±0.60 ^{ab}	54.26±0.54 ^a	56.47±0.66 ^b	0.0289
Proteína Bruta (%)	74.23±0.74 ^b	71.77±0.66 ^a	74.65±0.80 ^b	0.0112
Energía Bruta (%)	54.38±0.70	52.72±0.63	53.96±0.76	0.1786
Parámetros productivos:				
Consumo (g/d)	141.7±7.5 ^{ab}	150.3±6.7 ^b	124.1±8.0 ^a	0.0513
Ganancia media diaria (g/d)	65.10±3.72 ^{ab}	67.58±3.35 ^b	55.45±4.00 ^a	0.0688
Índice de conversión	2.45±0.11	2.51±0.10	2.60±0.12	0.6807

^{a,b} ; Medias en una misma fila que no comparte superíndice difieren estadísticamente a nivel $P < 0.05$.

MMM = 8.1; 5.7 y 6.8 g/Kg MS de lisina, aminoácidos azufrados y treonina, respectivamente.

MAB = 8.1; 6.6 y 5.7 g/Kg MS de lisina, aminoácidos azufrados y treonina, respectivamente

AAA = 9.4; 6.6 y 7.8 g/Kg MS de lisina, aminoácidos azufrados y treonina, respectivamente.

En cuanto a los coeficientes de digestibilidad aparente a nivel ileal, y como era de esperar, solamente se observaron diferencias significativas en los coeficientes de digestibilidad aparente de los AA que fueron añadidos en diferente proporción en las dietas: Lys, sAA y Thr. La digestibilidad aparente a nivel ileal observada fue proporcional a la adición de AA sintéticos. Es decir, los AA que se encontraban en niveles altos mostraron una mayor digestibilidad aparente a nivel ileal que incluidos a valores medios y bajos (64.6 vs 80.1% para medio y alto de Lys $P < 0.05$, respectivamente; 63.0 vs 70.5% para medio y alto de sAA, $P < 0.05$, respectivamente; y 53.0 vs 63.7 vs 73.2 para bajo, medio y alto de Thr $P < 0.05$, respectivamente). Estos datos son concordantes a los obtenidos en una prueba de digestibilidad aparente a nivel ileal utilizando valores medios de todos los AA (comunicación personal, Marín-García *et al.*) donde se observaron unos coeficientes de digestibilidad muy similares a los obtenidos en el presente trabajo (36, 66, 78, 56 y 63 % para la digestibilidad aparente a nivel ileal de MS, PB, Lys, Thr, sAA, respectivamente). Además, en cuanto a las variaciones debidas a la adición de AA sintéticos, las tendencias son iguales a los ensayos de digestibilidad aparente a nivel fecal (Taboada *et al.*, 1994 y 1996; de Blas *et al.*, 1998).

Tabla 7: Efecto de los piensos experimentales sobre los coeficientes de digestibilidad aparente a nivel ileal de la materia seca, proteína bruta y aminoácidos (%).

	MMM	MAB	AAA	P-valor
Materia seca	32.8±3.8	36.8±5.0	34.8±4.0	0.8220
Proteína bruta	57.0±2.9	54.3±3.8	61.1±3.0	0.3138
Aspártico	60.9±3.6	56.3±4.9	68.7±4.1	0.1075
Serina	50.9±4.1	44.5±5.4	55.8±4.5 ^b	0.2491
Glucina	77.7±2.4	72.8±3.4	81.7±2.7	0.0988
Glicina	30.4±4.6	34.1±6.3	39.7±5.3	0.4137
Histidina	73.1±3.1	67.7±4.1	75.0±3.4	0.3629
Arginina	79.8±2.3	75.9±3.0	82.4±2.5	0.2310
Treonina	63.7±3.2 ^{ab}	53.0±4.2 ^a	73.2±3.5 ^b	0.0023
Alanina	58.4±3.6	52.1±4.9	63.3±4.2	0.2189
Prolina	66.9±2.4	66.7±3.2	69.2±2.6	0.7300
Tirosina	53.2±4.1	46.1±5.4	55.5±4.5	0.3874
Valina	61.5±3.6	55.2±4.8	66.9±4.0	0.1499
Lisina	70.1±3.8 ^{ab}	59.1±5.1 ^a	80.1±4.3 ^b	0.0085
Isoleucina	65.2±3.8	57.9±5.1	72.0±4.3	0.1099
Leucina	65.2±3.8	57.9±5.1	71.5±4.3	0.1099
Fenilamina	66.0±3.8	58.5±5.1	72.0±4.3	0.1153
Cistina	40.4±4.1 ^a	54.1±5.6 ^{ab}	60.0±4.5 ^b	0.0105
Metionina	73.9±2.7	74.1±3.7	81.6±3.0	0.1040
Azufrados	63.0±3.0 ^a	67.0±4.0 ^{ab}	74.0±3.0 ^b	0.0492

^{a,b}; Medias en una misma fila que no comparte superíndice difieren estadísticamente a nivel P<0.05.

MMM = 8.1; 5.7 y 6.8 g/Kg MS de lisina, aminoácidos azufrados y treonina, respectivamente.

MAB = 8.1; 6.6 y 5.7 g/Kg MS de lisina, aminoácidos azufrados y treonina, respectivamente

AAA = 9.4; 6.6 y 7.8 g/Kg MS de lisina, aminoácidos azufrados y treonina, respectivamente.

A partir de la inclusión total de cada AA y su coeficiente de digestibilidad, podemos determinar los niveles de AA digestibles (ver Tabla 8) para las recomendaciones actuales. Hasta el día de hoy, las recomendaciones actuales (de Blas y González Mateos, 2010) a nivel ileal aparente no se encontraban disponibles, a excepción de la Thr que fue propuesta de ser 4.1 g/kg MS (de Blas *et al.*, 1998). Estos datos son muy similares a obtenidos en el presente experimento (4.3 g/kg de MS) lo que aporta solidez a los datos obtenidos tanto para la Lys como para sAA en el presente trabajo. De manera análoga, podemos calcular las recomendaciones de AA digestibles aparentes a nivel ileal de la nueva combinación que mejoraba los datos productivos (MAB), así como del pienso con niveles altos (AAA).

Tabla 8: Contenido en aminoácidos digestibles a nivel ileal aparente para los tres primeros aminoácidos limitantes en los piensos experimentales (g/kg MS).

Pienso	Lisina	AA azufrados (cisteína + metionina)	Treonina
MMM	5.2	3.60 (0.96+2.46)	4.33
MAB	5.2	4.65 (1.35+3.29)	3.02
AAA	7.53	4.65 (1.35+3.29)	5.71

MMM = 8.1; 5.7 y 6.8 g/Kg MS de lisina, aminoácidos azufrados y treonina, respectivamente.

MAB = 8.1; 6.6 y 5.7 g/Kg MS de lisina, aminoácidos azufrados y treonina, respectivamente

AAA = 9.4; 6.6 y 7.8 g/Kg MS de lisina, aminoácidos azufrados y treonina, respectivamente.

Finalmente, la Tabla 9 recoge las recomendaciones nutricionales para los tres primeros AA limitantes en conejos de engorde a partir de los datos disponibles en la bibliografía (principalmente, de Blas y Mateos, 2010) y los derivados a partir de la presente línea de investigación (Marín-García *et al.*, 2018; y el presente estudio). En dicha tabla proponemos las recomendaciones de AA totales y digestibles aparentes (a nivel fecal e ileal), tanto para las recomendaciones disponibles actuales (de Blas y Mateos, 2010), así como para nuestra nueva propuesta de recomendaciones que maximizan el crecimiento. Estos valores pretenden servir como referencia y hacer ver como nuevas

recomendaciones, que ayudara mejorar el ajuste y precisión de la nutrición proteica de los conejos de engorde.

Tabla 9: Recomendaciones nutricionales para los tres primeros aminoácidos limitantes en el conejo de engorde (g/Kg materia seca). Escalando, asumiendo que todos los aminoácidos añadido se digiere.

	de Blas y Mateos (2010)			Nueva propuesta		
	Lys	sAA	Thr	Lys	sAA	Thr
Total	8.1 ¹	5.7 ¹	6.8 ¹	8.1 ³	6.6 ³	5.7 ³
Fecal aparente	6.3 ¹	4.4 ¹	4.8 ¹	6.3 ⁴	5.2 ⁴	3.7 ⁴
Ileal aparente	5.2 ²	3.6 ²	4.3 ²	5.2 ²	4.7 ²	3.0 ²

¹: Obtenidos a partir de de Blas y González-Mateos 2010.

²: Datos obtenidos del presente experimento.

³: Marín-García *et al.*, 2018.

⁴: Estimados a partir de la digestibilidad fecal aparente observada en otros trabajos y asumiendo que todo el aminoácidos sintético añadido se digiere.

De hecho, el presente estudio propone un nuevo nivel en las necesidades de estos AA limitantes, abordando la necesidad de determinar no solo necesidades de AA totales sino también aparentemente digestibles (a nivel ileal). Este nivel conduce a un mejor ajuste del suministro de AA, ya que considera la alta variabilidad de la digestibilidad de la proteína observada en las materias primas (Villamide *et al.*, 2013). Además, este ajuste en la dieta por AA aparentemente digestibles a nivel ileal puede ayudar a minimizar la carga de nitrógeno transmitida al ambiente, y ajustarse a las nuevas leyes ambientales de la legislación europea.

5. CONCLUSIÓN

Este trabajo aporta una valoración de los requerimientos actuales a nivel digestible ileal aparente de las actuales recomendaciones (5.2, 3.6 y 4.3 g/kg MS de Lys, sAA y Thr, respectivamente). Además, fija una nueva recomendación, basados en unos niveles de inclusión que reducen el PUN y mejoran los datos productivos, a unos valores de digestibilidad ileal aparente de 5.2, 4.7 y 3.0 g/kg MS de Lys, sAA y Thr, respectivamente.

6. AGRADECIMIENTOS

Mi agradecimiento y gratitud al Dr. Juan José Pascual Amorós y al M.Sc. Pablo Jesús Marín García, por permitirme trabajar en su equipo, por sus enseñanzas, su apoyo constante en los trabajos de laboratorio y en la redacción de este documento.

A todos los profesores de la Maestría de Producción Animal de la UPV, mis sinceros agradecimientos por sus sabias enseñanzas, sus experiencias transmitidas y la amistad brindada.

Mis agradecimientos a Luis, Javier, Eugenio y Juan Carlos, que apoyaron con interés y dedicación las labores de laboratorio y granja, cada uno desde sus responsabilidades contribuyeron en lograr objetivos del estudio.

A mis compañeros y amigos del Máster y amigos de la Comunidad Valenciana, con quienes compartí momentos inolvidables. Gracias a todos por su amistad.

A Jackelin Melissa L.A., a quien dedico este estudio por soportar con valentía mi ausencia y no estar a su lado para compartir el día a día que la vida nos depara, pronto estaremos juntos y a mis padres Rafael y María y mis hermanos.

Reconocimiento especial al Programa Nacional de Becas y Crédito Educativo (PRONABEC) del estado Peruano por la beca brindada, quienes apuestan por la investigación e innovación de los conocimientos científicos.

7. BIBLIOGRAFÍA

- A.O.A.C. (2000). Official Methods of Analysis. Association of Official Analytical Chemist. EUA.
- Baselga, M. (2004). Genetic improvement of meat rabbits. Programmes and diffusion in proceeding of 8th world Rabbit Congress. Puebla, Mexico.
- Blasco, A., Baselga, M., & Estany, J. (1984). Mejora genética del conejo. Valencia - España.
- Bosch, L., Alegría, A., Farré, R. (2006). Application of the 6-aminoquinoly-Nhydroxysuccinimidyl carbamate (AQC) reagent to the determination of amino acids in infant foods. *Journal of Chromatography B*. 831, 176-183.
- Carabaño, R., de Blas, C., García, A.I. (2000). Recent advances in nitrogen nutrition in rabbits. *World Rabbit Science*. 8, 14–28.
- Carabaño, R., Villamide, M.J., García, J., Nicodemus, N., Llorente, A., Chamorro, S., Menoyo, D., García-Rebollar, P., García-Ruiza, A.I., De Blas, J.C. (2009). New concepts and objectives for protein-amino acid nutrition in rabbits: a review. *World Rabbit Science*. 17, 1-14.
- Cartuche, L., Pascual, M., Gómez, E.A., Blasco, A. (2014). Economic weights in rabbit meat production. *World Rabbit Science*. 22, 165-177.
- De Blas, C., Astillero, R., Chamorro, S., Corujo, A., García-Alonso, J., García-Rebollar, P., García-Ruiz, I., Menoyo, D., Nicodemus, N., Romero, C., Carabaño, R. (2007). Efectos de la nutrición y el manejo sobre el desarrollo de patologías digestivas de gazapos en un entorno de enteropatía epizoótica. XXIII Curso de especialización FEDNA, Madrid.
- De Blas, J.C., Mateos, G.G. (2010). Feed formulation. In: C. De Blas, J. Wiseman (eds). *En The Nutrition of the Rabbit*. 2nd Edition. CABI Publishing. CAB International, Wallingford Oxon, UK. 222-232.
- De Blas, J.C., Taboada, E., Nicodemus, N., Campos, R., Piquer, J. y Mendez, J. (1998). Performance response of lactating and growing rabbits to dietary threonine content. *Animal Feed Science Technology*. 70, 151–160.
- FAOSTAT. (2016). Statistic data: food and agriculture organization. [FAO//http://faostat.fao.org/site/569/DesktopDefault.aspx?PageID=569#ancr](http://faostat.fao.org/site/569/DesktopDefault.aspx?PageID=569#ancr).
- García, A.I., de Blas, J.C., Carabaño, R. (2004). Effect of type of diet (casein-based or protein-free diet) and caecotrophy on ileal endogenous nitrogen and amino acid flow in rabbits. *Animal Science*. 79, 231–240.
- García, G., Carabaño, R., De Blas, J.C. (1999). Effect of fiber source on cell wall digestibility and rate of passage in rabbits. *J. Anim.*
- Llorente, A., García, A.I., Nicodemus, N., Villamide, M.J., Carabaño, R. (2006). Digestibilidad ileal aparente y verdadera de aminoácidos de harinas de girasol, productos de soja y guisante en conejos. In: *Proceedings of the XXXI Symposium de Cunicultura de ASESCU*. Lorca, Spain. 117-124.
- Marín-García P.J., Martínez-Paredes E.M., Ródenas L., López M.C., Arnau-Bonachera A., Blas E., Pascual J.J. (2017). Determinación de las necesidades de treonina en conejos de engorde a partir del nivel de nitrógeno ureico plasmático. In:

- Proceedings of the XLII Symposium de Cunicultura de ASESUCU, Mucia, España, 134-137.
- Marín-García P.J., Martínez-Paredes E.M., Ródenas L., López M.C., Blas E., Pascual J.J. (2018a). Do high-growth-rate rabbits prefer diets richer on amino acids than those recommended?. In: Proceedings of the 43 Symposium de Cunicultura de ASESUCU, Calamocha, España. 48-51.
- Marín-García P.J., Martínez-Paredes E.M., Ródenas L., López M.C., Blas E., Pascual J.J. (2018b). Efectos de los niveles de lisina, aminoácidos azufrados y treonina en piensos para conejos con altas velocidades de crecimiento. In: Proceedings of the 43 Symposium de Cunicultura de ASESUCU, Calamocha, España. 44-47.
- Marín-García, P.J., Blas, E., Cervera, C., Pascual, J.J. (2016b). A deficient protein supply could be affecting selection for growth rate in rabbits. Annual Meeting of the European Federation of Animal Science. Belfast, UK.
- Marín-García, P.J., Blas, E., Cervera, C., Pascual, J.J. (2016a). Effects of the animal breeding about growth rate on nutritional parameters in rabbits. World Rabbit Congress, Quindago.China.
- Marín-García, P.J., Blas, E., Cervera, C., Pascual, J.J. (2016c). El nitrógeno Ureico plasmático como indicador de desequilibrio en aminoácidos de conejos. : evolución diaria. 41º Symposium de cunicultura de ASESUCU, Hondarribia 2016.
- Mínguez, C. (2012). Comparación de cuatro líneas maternas de conejo en caracteres de crecimiento. Tesis doctoral, Universidad Politécnica de Valencia.
- Perez, J. M., Lebas, F., Gidenne, T. Maertens, I.; Xiccato, G. . P., R.; Dalle Zotte, A.; Cossu, M. E.; Carazzolo, A. . V., M. J.; Carabaño, R.; Rraga, M. J.; Ramos, M. A.; Cervera, C. . B., & E.; Fernandez, J.; Falcão e Cunha, I.; Bengala Freire, J. (1995). European reference method for in vivo determination of diet digestibility in rabbits. World Rabbit Science. 41-43.
- Piles, M., Gomez, E. A., Rafel, O., Ramon, J., & Blasco, A. (2004). Elliptical selection experiment for the estimation of genetic parameters of the growth rate and feed conversion ratio in rabbits. Journal of Animal Science. 82, 654-660.
- SAS, Institute. (2009). SAS/STAT® User's Guide (Release 9.2). SAS Inst. Inc., Cary NC, USA.
- Taboada, E., Mendez, J., & de Blas, J. C. (1996). The response of highly productive rabbits to dietary sulphur amino acid content for reproduction and growth. Reproduction, Nutrition, Development. 36, 191–203.
- Taboada, E., Mendez, J., Mateos, G. G., & Blas, J. C. De. (1994). Livestock production science The response of highly productive rabbits to dietary lysine content. 40, 329–337.
- Trocino, A., García, J., Carabaño, R., Xiccato, G. (2013). A meta-analysis on the role of soluble fibre in diets for growing rabbits. World Rabbit Sci. <http://dx.doi.org/10.4995/wrs.2013.1285>.
- Villamide, M. J., García, A. I., Llorente, A. Carabaño, R. (2013). Ileal vs. faecal amino acid digestibility in concentrates and fibrous sources for rabbit feed formulation. Animal Feed Science and Technology. 182(1–4), 100–110.
- Villamide, M.J., Nicodemus, N., Fraga, M.J., Carabano, R. (2010). Protein Digestion. In: C. De Blas, J. Wiseman (eds.) The Nutrition of the Rabbit. 2nd Edition. CABI Publishing. CAB Intenational, Wallingford Oxon, UK. 39-55.

- Xiccato, G., Trocino, A. (2008). Conigliicoltura, Nutrizione e alimentazione. In: I. Romboli, M. Marzoni Fecia di Cossato, A. Schiavone, L. Zaniboni, S. Cerolini (eds.). Avicoltura e Conigliicoltura. Le Point Veterinaire Italie, Milano, Italy. 481-502.
- Xiccato, G., Trocino, A. (2010). Energy and protein requirements and metabolism. In: C. De Blas, J. Wiseman (eds.). The Nutrition of the Rabbit. 2nd Edition. CABI Publishing. CAB International, Wallingford Oxon, UK. 83-118.